



**Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas
Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro**

**Análise proteômica revela que a saliva de
Dipetalogaster maxima é rica em lipocalinas
e possui apirase da família 5' nucleotidase**

Paula Beatriz Santiago

Orientador: Prof. Dr. Jaime de M. Santana

Brasília-DF

2011



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Program de Pós-graduação em Ciências Médicas
Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro

Análise proteômica revela que a saliva de *Dipetalogaster maxima* é rica em lipocalinas e possui apirase da família 5' nucleotidase

Paula Beatriz Santiago

Orientador: Prof. Dr. Jaime de M. Santana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção ao grau de Mestre em Ciências Médicas.

Brasília-DF

2011



AGRADECIMENTOS

Agradeço...

À minha família...

Ao amor da minha vida, meu marido Fernando, por estar sempre ao meu lado e a história que construímos juntos, história essa que tem como presente de Deus os dois grandes amores das nossas vidas, nossas filhas...

Às minhas lindas filhas, Maria Eduarda e Maria Fernanda, por me fazerem encontrar luz e paz todas as manhãs da minha vida, por me fazerem sorrir todos os dias, por me fazerem querer ser uma pessoa melhor, por me ensinarem o quê é o amor...

Aos meus pais, Vera e Carlos, o amor incondicional demonstrado em vários momentos de nossas vidas, a proteção, o exemplo, o incentivo, a compreensão, as alegrias...

Aos meus queridos irmãos, Patricia e Ricardo, a amizade, o companheirismo e o carinho. Aos meus queridos sobrinhos, Luanna e Rickson, o sorriso e o abraço. Ao meu padrasto, Henrique, a amizade e a disposição.

Aos amigos da Universidade...

Isabel, Raquel, Vivi, Rhana, Brina, Bruna, Clênia, Camila, Cíntia, Janaína, Thiago, Hugo, André, Felipe, Teresa, Débora, a convivência diária... cada um tem algo diferente a ensinar. Agradeço especialmente as amigas Keyla e Flávia, a amizade, a paciência e o carinho.

Ao meu orientador, Jaime Santana a oportunidade de estar aqui e o incentivo. À prof^a Carla Nunes, a atenção, a educação e delicadeza. À prof^a Izabela Bastos por ser sempre solícita.

Ao prof. Sébastien Charneau e ao amigo Rayner a oportunidade e os ensinamentos na análise proteômica.

Ao prof. Cleudson Castro pela colaboração e ao sempre simpático Sr. Chigueiro pelo cuidado com os barbeiros.



Lista de abreviaturas

1. DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
2. OMS	Organização Mundial de Saúde
3. DC	Doença de Chagas
4. ICS	Iniciativa do Cone Sul
5. OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
6. AMP	Adenosina monofosfato
7. ADP	Adenosina difosfato
8. ATP	Adenosina trifosfato
9. Pi	Fosfato inorgânico
10. TXA ₂	Tromboxano A ₂
11. ON	Oxido nítrico
12. ABP	<i>Amine binding protein</i>
13. MALDI-TOF/TOF	<i>Matrix assisted laser desorption Ionization time of flight mass spectrometry</i>
14. IEF	Focalização isoeletrica
15. SDS-PAGE	Eletoforese em gel de poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio
16. ACN	Acetonitrila
17. TFA	Ácido trifluoroacético
18. DHB	Ácido dihidroxibenzóico
19. PMF	<i>Peptide mass fingerprinting</i>
20. β-ME	β-mercaptoetanol
21. TCA	Ácido tricloroacético
22. AEBSF	(4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride)
23. TPCK	(N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone),
24. PRP	Plasma rico em plaquetas
25. PPP	Plasma pobre em plaquetas

**Sumário**

RESUMO	8
SUMMARY	9
INTRODUÇÃO.....	10
Visão Global das Doenças Tropicais.....	11
Doenças Tropicais Negligenciadas no Brasil	12
Panorama Brasileiro da Doença de Chagas	13
<i>Trypanosoma cruzi</i> e transmissão.....	14
Ciclo de Vida do <i>T. cruzi</i>	15
Aspectos Clínicos da Doença de Chagas.....	16
Dinâmica da Interação Parasito-Vetor-Hospedeiro	17
Hemostasia	18
Vasoconstrição.....	18
Agregação plaquetária	18
Coagulação sanguínea	20
Propriedades farmacológicas da saliva.....	21
Vasodilatadores	22
Inibidores de agregação plaquetária.....	22
Inibidores da cascata de coagulação sanguínea	24
<i>Dipetalogaster maxima</i> , um triatomíneo singular	25
Biblioteca de cDNA de <i>D. maxima</i>	27
Perspectivas das aplicações do sialoma.....	28
JUSTIFICATIVA.....	29
Justificativa.....	30
OBJETIVOS.....	31
Objetivos	32
MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
Criação dos triatomíneos	34
Obtenção da saliva.....	34
Eletroforese bidimensional.....	34
Identificação de proteínas por espectrometria do tipo MALDI-TOF-TOF	35
Digestão das proteínas	35
Espectrometria de massa.....	36
Identificação das proteínas.....	36
Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	36
Atividade ADPásica em SDS-PAGE	37
Caracterização da atividade enzimática.....	37



Inibição da agregação plaquetária	38
Produção de anticorpos.....	39
Imunodeteção.....	40
Análise filogenética	41
RESULTADOS	42
O gel bidimensional exibiu grande quantidade de proteínas entre 20 e 30 kDa	43
O proteoma salivar de <i>D. maxima</i> revelou 3 famílias salivares.....	43
Perfil eletroforético unidimensional da saliva de <i>D. maxima</i>	47
A atividade em gel de poliacrilamida revelou proteínas com atividade apirásica	47
A caracterização da atividade enzimática mostrou uma temperatura ótima de 37 °C e pH ótimo variável com íons	49
A saliva do triatomíneo <i>D. maxima</i> inibe a agregação plaquetária induzida por ADP.....	53
A saliva de <i>D. maxima</i> é imunogênica	54
A apirase de <i>D. maxima</i> apresenta homologia com a família 5' nucleotidase.....	56
DISCUSSÃO.....	57
O proteoma de <i>D. maxima</i>	58
Famílias	59
Lipocalinas.....	59
Antígeno-5	61
Apirases	62
SDS-PAGE e atividade em gel revelaram a presença de pontes dissulfeto em proteínas com atividade apirásica	64
A atividade ADPásica de <i>D. maxima</i> apresenta similaridades com a atividade apirásica de <i>T. infestans</i>	64
A saliva de <i>D. maxima</i> inibe agregação plaquetária.....	66
A imunodeteção revelou epítomos similares entre a apirase de <i>D. maxima</i> e <i>T. infestans</i>	66
O alinhamento da sequência apirásica de <i>D. maxima</i> confirmou homologia com a família 5' nucleotidase	67
CONCLUSÃO.....	68
Conclusões	69
Considerações finais e perspectivas	69
REFERÊNCIAS	71
ANEXO 1	77



Lista de figuras

Figura 1.	Ciclo de vida de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	16
Figura 2.	Agonistas da agregação plaquetária.	20
Figura 3.	Inibidores da agregação plaquetária.	24
Figura 4.	Perfil eletroforético bidimensional salivar de <i>D. maxima</i> , corado com nitrato de prata.	26
Figura 5.	Perfil eletroforético salivar de <i>D. maxima</i> em SDS-PAGE 8%, corado com azul de Coomassie.	48
Figura 6.	Efeito de cátions sobre a atividade ADPásica salivar de <i>D. maxima</i> .	49
Figura 7.	Efeito da temperatura sobre a atividade ADPásica salivar de <i>D. maxima</i> .	51
Figura 8.	Efeito do pH sobre a atividade ADPásica salivar de <i>D. maxima</i> .	51
Figura 9.	Efeito de inibidores de serino-proteases sobre a atividade ADPásica salivar de <i>D. maxima</i> .	52
Figura 10.	Inibição de agregação plaquetária induzida por ADP na presença de saliva de <i>D. maxima</i> .	53
Figura 11.	Imunodeteção anti-apirase em saliva de <i>D. maxima</i> .	54
Figura 12.	Imunodeteção anti-apirase em saliva de <i>T. infestans</i> .	55
Figura 13.	Alinhamento da sequência apirásica de <i>D. maxima</i> com membros da família apirásica 5'nucleotidase.	56

Lista de Tabelas

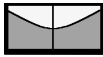
Tabela 1.	Classificação funcional dos transcritos do transcriptoma salivar de <i>Dipetalogaster maxima</i> .	27
Tabela 2.	Classificação funcional dos transcritos de natureza secretória da saliva de <i>Dipetalogaster maxima</i> .	27
Tabela 3.	Identificação das proteínas salivares de <i>D. maxima</i> por <i>peptide mass fingerprinting</i> (PMF).	45



RESUMO

A pesquisa em doença de Chagas acumula bons resultados no que se refere à transmissão do *Trypanosoma cruzi*. Contudo, fatores devem ser considerados: a ocupação humana de áreas naturalmente habitadas por esses insetos e a presença constante do *T. cruzi* em populações animais aumentam o risco de novas transmissões ao homem. Esse cenário é similar ao encontrado na região sul da Baixa Califórnia, México, onde a invasão do ambiente do triatomíneo da espécie *Dipetalogaster maxima* pelo homem mostrou a versatilidade alimentar do vetor, que além do sangue de lagartos, passou a se alimentar do sangue humano. O fluxo sanguíneo deve ser constante para o sucesso do repasto e para contrapor a hemostasia do hospedeiro os triatomíneos hematófagos apresentam uma fonte complexa de proteínas em sua saliva, como vasodilatadores, anti-agregadores plaquetários e anti-coagulantes. O trabalho aqui realizado demonstrou que a saliva do triatomíneo *D. maxima* contém proteínas anti-hemostáticas já descritas na saliva de outros triatomíneos como *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* e *Triatoma pallidipennis*. A análise proteômica revelou as três maiores famílias de proteínas salivares encontradas em outros triatomíneos: lipocalina, antígeno-5 e apirase. A atividade apirásica salivar detectada em *D. maxima* apresenta características similares às aquelas encontradas na saliva de *T. infestans*. Além disso, a análise molecular revelou que as apirases de ambos triatomíneos pertencem à família 5'nucleotidase e são enzimas oligoméricas. A pesquisa dos compostos salivares de hematófagos estimula o desenvolvimento de novos fármacos usados em desordens de origem circulatória.

Palavras-chave: Doença de Chagas; *Dipetalogaster maxima*; Saliva; Proteoma.



SUMMARY

The research on Chagas disease accumulates good results with regard to the control of *Trypanosoma cruzi* transmission. However, some factors should be considered: the human occupation of areas naturally inhabited by these insects and the constant presence of *T. cruzi* in animal population increasing the risk of new transmissions to humans. This scenario is similar to that found in southern Baja California, Mexico, where the invasion of the triatomine species *Dipetalogaster maxima* environment by man showed the versatility of the feeding vector, that besides the blood of lizards, started to feed on human blood. Blood flow must be constant for the success of the meal and to counteract host hemostasis, hematophagous triatomines employ a complex source of proteins and other molecules, present in their saliva, as vasodilators, anti-platelet aggregators and anti-coagulants. The work conducted here demonstrated that the salive of triatomine *D. maxima* comprises anti-hemostatic proteins that had been already described in the saliva of other triatomines such as *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, and *Triatoma pallidipennis*. Proteome analysis showed the three major salivary families of proteins found in other triatomines: lipocalin, antigen-5 and apyrase. The detected salivary apyrase activity of *D. maxima* displays features of that found in the saliva of *T. infestans*. Furthermore, molecular analysis revealed that apyrases of both insects belong to the 5' nucleotidase family and are oligomeric enzymes. The research on salivary compounds of hematophagous insects stimulates the development of new drugs to be used in disorders of circulatory origin.

Keywords: Chagas disease; *Dipetalogaster maxima*; Saliva; Proteome.



INTRODUÇÃO



Visão Global das Doenças Tropicais

A maioria das doenças tropicais negligenciadas (DTN) são antigas e têm atormentado a humanidade durante séculos. Dengue, leishmaniose, ascaridíase, esquistossomose, malária, hanseníase, filariose, doença de Chagas, assim como outras, estão entre as DTN. Essas doenças estão concentradas em regiões de menor progresso sócio-econômico, em áreas rurais remotas ou em favelas urbanas (WHO, 2010). Embora clinicamente diversificadas, formam um grupo porque estão fortemente associadas à áreas pobres, onde tendem a coexistir. A falta de água tratada, de saneamento básico e de acesso aos serviços de saúde, as moradias inadequadas e a desnutrição são fatores que aumentam a vulnerabilidade de uma população às infecções (Lindoso & Lindoso, 2009).

Mais de 1 bilhão de pessoas, um sexto da população mundial, sofre de uma ou mais das DTN. Essas doenças matam cerca de 534 mil pessoas no mundo a cada ano, além de enfraquecer e incapacitar outras tantas, resultando em impactos negativos na qualidade de vida e na produtividade do trabalhador, mantendo baixa a renda de países em situação de pobreza (WHO, 2009).

Essas doenças são consideradas “negligenciadas” porque em geral não possuem investimentos significativos no desenvolvimento de vacinas e novas drogas e os programas de controle são insuficientes (Lindoso & Lindoso, 2009). Por muito tempo foi assim, as DTN receberam pouca ou nenhuma atenção. Essa foi a visão até a última década, quando a Organização Mundial de Saúde (OMS) convenceu o mundo, particularmente os líderes políticos em países endêmicos e não endêmicos, a investir no combate à essas doenças como forma de impulsionar o desenvolvimento humano e econômico (WHO, 2006). Hoje, existem parcerias em programas de nutrição e educação em saúde, além de doações responsáveis por permitir às populações o acesso aos medicamentos (WHO, 2010).

O primeiro relatório da OMS sobre o assunto, “First WHO report on neglected tropical diseases” (WHO, 2010) apresenta evidências de que as atividades desenvolvidas para prevenir e controlar as DTN estão produzindo resultados. O relatório cita que cerca de 670 milhões de pessoas, em 75 países, receberam quimioterapia específica até o final de 2008 e sugere a queda da transmissão das doenças quando boa parte da população tem tratamento médico.



Certamente ainda há muito a ser feito e é necessário que a colaboração e os programas continuem. Segundo a OMS o controle dessas doenças é viável e vai quebrar o ciclo de doença e pobreza, melhorar as condições da população e contar com o aumento da produtividade do trabalhador, contribuindo assim para o crescimento sócio-econômico dos países atingidos pelas doenças.

Doenças Tropicais Negligenciadas no Brasil

O Brasil faz parte do grupo de países atingidos pelas DTN. Leishmaniose, dengue, raiva, esquistossomose, teníase e doença de Chagas (DC) estão entre as doenças conhecidas no país. Sobre a leishmaniose, o relatório de 2010 da OMS (WHO, 2010) comenta o aumento do número de casos de calazar desde 1999 com uma expansão da doença para a zona urbana, destacando os cães como reservatórios. Já em relação à dengue, menciona que o aumento de focos nos últimos anos está relacionado ao aumento da população urbana, fato que resulta em maior número de pessoas em contato com o vetor, *Aedes aegypti*, em áreas favoráveis. A OMS recomenda que devem ser mantidas as campanhas para erradicar o vetor.

No que se refere à DC, o relatório cita que o risco de transmissão se encontra reduzido devido aos programas de controle vetorial e à triagem sorológica nos bancos de sangue. O número de infectados nas Américas caiu de 20 milhões em 1981 para cerca de 10 milhões em 2009 e hoje, o número de pessoas em risco de contrair a doença chega a 25 milhões (WHO, 2010). A estimativa do Ministério da Saúde é que cerca de dois a três milhões dos infectados se encontram no Brasil (Ministério da Saúde, disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31114, acesso em 15 de jan de 2011).

Nos últimos anos, a ocorrência de DC aguda tem sido observada em especial na região da Amazônia, principalmente em decorrência da transmissão oral. Nesta forma de transmissão suspeita-se de alimentos como sucos de frutas frescas contaminados com material infectante, provavelmente advindo de triatomíneos silvestres (Dias, 2009).



Panorama Brasileiro da Doença de Chagas

Foi em 1909 que Carlos Chagas levou ao conhecimento mundial uma nova doença, seu vetor e seu agente causal, um protozoário do gênero *Trypanosoma*, denominado por ele *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz. Em 1910, a doença recebeu o nome de seu descobridor e passou a se chamar DC.

Naquele tempo, como não havia medicamentos eficazes contra a doença nem inseticidas para controle dos vetores, a base preventiva era a melhoria das habitações. Na década de 1960, programas nacionais e regionais de combate à DC tiveram início no Brasil, Argentina, Venezuela, Chile e Uruguai (Dias, 2007), contudo, espacialmente limitados, não surtiram grandes efeitos (OPAS, 2002). Já nas décadas de 1970 a 1990 foram tomadas ações de melhor cobertura, direcionadas à interrupção da transmissão vetorial pelo emprego de inseticidas (OPAS, 2002; Dias, 2007). O receio da síndrome da imunodeficiência humana adquirida e da hepatite B ajudou a controlar também a transmissão via transfusão sanguínea.

Na década de 1990 países endêmicos decidiram partilhar esforços contra a doença. A Iniciativa do Cone Sul (ICS), lançada em 1991, é um programa internacional de controle da DC e dele participam: Argentina, Peru, Chile, Uruguai, Paraguai, Bolívia e Brasil. O objetivo do programa é controlar a transmissão da doença, eliminando o principal vetor, *Triatoma infestans*, em vastas áreas do Cone Sul, além de controlar a transmissão transfusional, mediante triagem sorológica (Dias, 2007). É importante ressaltar que a ICS não foi o início de ações que culminaram com o controle da doença, mas representa a consolidação de ações regulares que o efetivaram.

Contudo, a Organização Pan Americana de Saúde (OPAS, 2002) faz menção aos limitantes epidemiológicos da doença e cita que como uma enzootia, sua completa erradicação não é possível pois sempre haverá o risco de infecção humana por transmissão silvestre, já que são vastos os reservatórios animais, inviabilizando o esgotamento das fontes de infecção.

Além disso, há preocupação com as áreas que demonstram ocorrência de triatomíneos nativos silvestres e peridomiciliares, podendo ocorrer esporádica ou progressiva invasão e colonização de moradias humanas, uma situação que exige permanente vigilância epidemiológica. Merecem atenção as espécies *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida*, entre outros



(Dias, 2007). Na região amazônica é comum observar o gênero *Rhodnius*, frequentemente encontrado em folhas de piaçava e folhas de palmeiras. Já o gênero *Triatoma* pode ser encontrado na região nordeste, assim como em Minas Gerais e Tocantins. O gênero *Panstrongylus* pode ser encontrado na região de zona da mata (Araujo, Waniek *et alli*, 2009).

Após cem anos de sua descoberta a DC segue incurável. Ainda hoje os instrumentos para o tratamento na fase crônica são limitados, não havendo um tratamento específico ideal contra a doença. Como também não existe uma vacina, o controle do vetor e a triagem sorológica ainda são as principais ações preventivas (Dias, 2009). Ações de vigilância em saúde e a sustentabilidade dos programas de controle são fundamentais para a prevenção da DC, visto que a epidemiologia da doença exige permanente atenção a fim de evitar o risco de novas explosões de casos.

***Trypanosoma cruzi* e transmissão**

O *T. cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, um eucarioto flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Essa espécie apresenta grande diversidade adaptativa, sendo encontrada em diferentes hemípteros e animais silvestres e domésticos, além do homem (Brener *et alli*, 2000).

O *T. cruzi* é transmitido ao homem através das fezes contaminadas do triatomíneo hematófago adaptado ao ambiente doméstico. O inseto defeca no hospedeiro enquanto se alimenta e as fezes contaminadas podem penetrar pela lesão ocasionada pela picada do vetor ou através de mucosas como olhos, nariz e boca (Prata, 2001). Outras vias de transmissão são a transfusional, com sangue contaminado pelo protozoário, ou a congênita, tipos de transmissão que podem ocorrer em áreas não-endêmicas. Os mecanismos de transmissão secundários incluem acidentes laboratoriais, manejo de animais infectados e alimentos contaminados, entre outros (Prata, 2001).

Na natureza existem três ciclos de transmissão vetorial: o selvagem, o peridoméstico e o doméstico. O ciclo selvagem é enzoótico e é mantido por triatomíneos e animais silvestres contaminados pelo *T. cruzi*. O peridoméstico mantém a ligação entre o ciclo silvestre e o doméstico, é originado a partir do ciclo selvagem e mantém a infecção entre os animais domésticos em áreas ao redor de habitações humanas. Já o doméstico é



mantido na natureza por triatomíneos domesticados que transmitem a infecção à animais domésticos e humanos (Coura & Dias, 2009).

Ciclo de Vida do *T. cruzi*

O protozoário flagelado apresenta 4 formas de desenvolvimento durante o seu ciclo de vida que alternam-se entre vertebrados e insetos vetores (Figura 1). A forma epimastigota proliferativa está presente no intestino médio do vetor, e a tripomastigota metacíclica, forma não proliferativa, está presente na porção final de seu intestino. No hospedeiro vertebrado, o parasito se apresenta de duas formas, tripomastigota e amastigota. A primeira é a forma infectiva presente no sangue e a segunda é intracelular proliferativa que, ao contrário das outras formas, é arredondada ou oval com um flagelo curto que não se exterioriza (de Souza, de Carvalho *et alli*, 2010).

O ciclo de vida se inicia após o repasto sanguíneo do barbeiro em um vertebrado contaminado com a forma tripomastigota. No intestino do vetor os parasitas se diferenciam em epimastigotas, se multiplicam e sofrem diferenciação para a forma infectante tripomastigota metacíclica, que é liberada pelas fezes durante as refeições subsequentes, entrando em contato com novos hospedeiros. No vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos penetram nas células do hospedeiro, transformam-se em amastigotas que após crescimento diferenciam-se em tripomastigostas. Após evasão celular, entram na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado, disseminando a infecção (de Souza, de Carvalho *et alli*, 2010) (Figura 1).

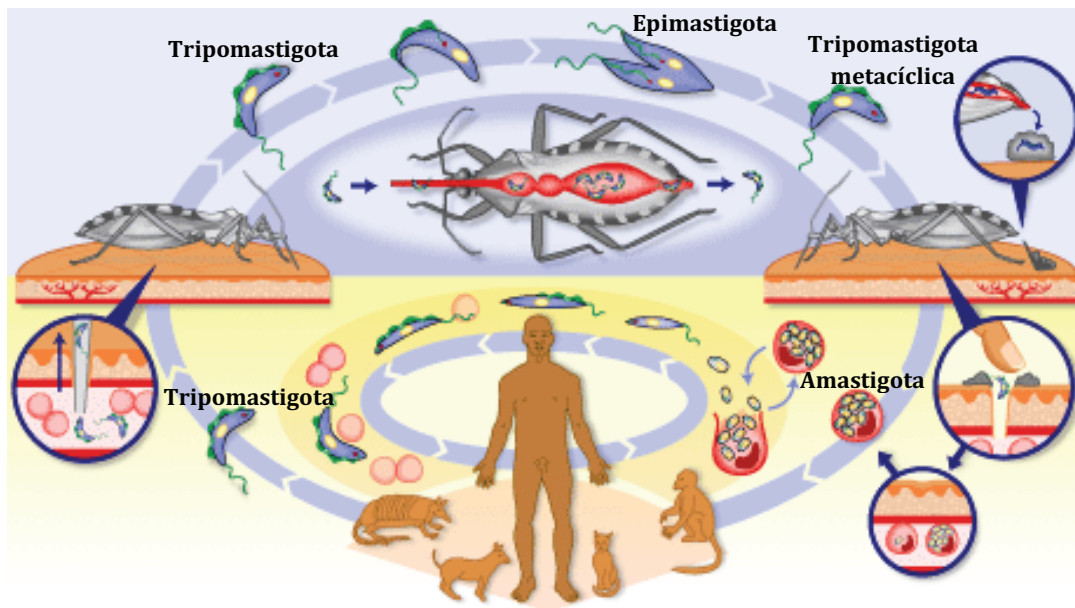
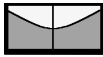


Figura 1. Ciclo de vida de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/tdrold/diseases/chagas/lifecycle.htm>> (modificado). Acesso em 08/02/2011.

Aspectos Clínicos da Doença de Chagas

A doença de Chagas apresenta uma diversidade de fases clínicas: aguda, latente ou indeterminada e crônica. A fase aguda é caracterizada pela alta parasitemia dos tecidos e do sangue sendo, na maioria das vezes, assintomática. Quando aparecem os sintomas podem incluir febre, mialgia, edema e insuficiência cardíaca (Prata, 2001). Em alguns pacientes, um inchaço pode aparecer no local do sítio de entrada do parasito, denominado chagoma. Quando o local de entrada é pela conjuntiva, pode resultar em um inchaço da pálpebra, denominado sinal de Romaña (Punukollu, Gowda *et alli*, 2007).

A fase latente pode persistir por toda a vida ou durar de 5 a 15 anos. Durante essa fase o paciente permanece assintomático com sorologia positiva, sem evidências físicas ou clínicas típicas da doença (Punukollu, Gowda *et alli*, 2007). Com o decorrer do tempo o paciente pode desenvolver a fase crônica, caracterizada por danos aos órgãos atingidos em decorrência do processo inflamatório desencadeado pelo *T. cruzi*. Os sintomas podem estar relacionados com o sistema cardiocirculatório, forma cardíaca, com o sistema digestivo, forma digestiva, menos frequente, ou com ambos, forma mista. Na forma cardíaca a



principal manifestação clínica é a insuficiência cardíaca proveniente das lesões inflamatórias ao tecido cardíaco. Já a forma digestiva apresenta alterações morfológicas que caracterizam o megaesôfago e o megacólon (Coura & Borges-Pereira, 2010).

Dinâmica da Interação Parasito-Vetor-Hospedeiro

Os insetos da subfamília Triatominae, ordem Hemiptera e família Reduviidae, são hematófagos e possíveis transmissores do *T. cruzi*. Estão distribuídos em ambiente neotropical, do sul dos Estados Unidos à Argentina. A hematofagia ocorre em ambas as formas sexuais e em todas as fases de desenvolvimento dos triatomíneos, que apresentam cinco estágios até a forma adulta. Para que os insetos mudem de um estágio para outro é necessário que ocorra pelo menos um repasto sanguíneo.

Uma vez que o vetor localiza o hospedeiro, a pele deve ser penetrada para o acesso ao sangue e para isso os triatomíneos utilizam uma probóscide longa e flexível para atingir um vaso sanguíneo. O hábito alimentar do vetor proporciona o cenário para a transmissão do *T. cruzi* ao hospedeiro. A injeção de saliva induz o recrutamento de células mononucleares fagocitárias para o sítio da picada e os tripomastigotas metacíclicos eliminados nas fezes por ocasião do repasto podem interagir com as células do sistema imune, instalando a infecção. Nesse contexto, o patógeno é favorecido pela ação da saliva, quanto mais macrófagos presentes na lesão, maiores as chances do parasito se estabelecer no hospedeiro (Mesquita, Carneiro *et alli*, 2008). Assim, a saliva do hematófago liga os três elementos da doença: parasito-vetor-hospedeiro.

A lesão vascular causada pela picada do triatomíneo desencadeia uma resposta fisiológica no hospedeiro que é determinada por três manifestações: inflamação, resposta imunológica e hemostasia. A inflamação consiste em uma resposta tripla caracterizada por dor, vermelhidão e calor. A exposição aos antígenos salivares induz o sistema imune a reagir contra essas moléculas (Morita, Isawa *et alli*, 2006). A hemostasia é a resposta fisiológica do hospedeiro contra a perda de sangue. Esse processo começa dentro de segundos após a lesão tecidual e é resultado de uma tríade formada por vasoconstrição, agregação plaquetária e coagulação sanguínea, minimizando a perda sanguínea e promovendo uma restauração da arquitetura vascular normal (Francischetti, Sa-Nunes *et alli*, 2009).



Para o sucesso do repasto é fundamental que não cesse o fluxo sanguíneo para o aparelho bucal do hematófago. Desta forma, a hemostasia do hospedeiro vertebrado é contornada pelo triatomíneo por meio de ações executadas através de uma série de componentes anti-hemostáticos presentes na saliva, por exemplo, vasodilatadores, anti-agregadores de plaqueta e anti-coagulantes (Champagne, 2005).

Hemostasia

Vasoconstrição

A vasoconstrição é a resposta contrátil da musculatura lisa de um vaso sanguíneo por ocasião de uma lesão física, resultando no estreitamento do vaso. Esse mecanismo pode fechar o lúmen de arteríolas e pequenos vasos, cessando o fluxo sanguíneo.

Agregação plaquetária

As plaquetas têm um papel central na hemostasia. A cascata hemostática é iniciada pela interação das plaquetas com a matriz extracelular que, uma vez lesionada, expõe colágeno e fibronectina. A lesão induz uma firme interação entre plaqueta e colágeno através do receptor $A2\beta1$, promovendo a liberação de adenosina difosfato (ADP) e tromboxano $A2$ (TXA₂), agonistas que causam a aderência de mais plaquetas (Varga-Szabo, Pleines *et alli*, 2008).

O ADP promove a agregação plaquetária através da ativação dos receptores plaquetários $P2Y_1$ e $P2Y_{12}$. O ADP se liga ao primeiro induzindo a mudança de forma plaquetária, e se liga ao segundo para amplificar a agregação inibindo a produção de AMP cíclico mediado por adenilato ciclase. Já TXA₂ auxilia na ativação plaquetária através do receptor TP, que também induz mudança de forma (Kahner, Shankar *et alli*, 2006).

Plaquetas ativas promovem a geração de trombina, o mais potente agonista da agregação. A trombina ativa receptores de proteases plaquetários desencadeando múltiplas vias de transdução de sinal, e assim modulam a trombose, a coagulação e a inflamação. Os



agonistas ADP e trombina também são responsáveis por ativar a integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Jennings, 2009).

Com a secreção dos grânulos plaquetários há liberação de agonistas mais fracos como serotonina e epinefrina. A serotonina estimula a mudança de forma plaquetária e intensifica a vasoconstrição e a epinefrina inibe cAMP sem alterar visivelmente a agregação. Contudo, os dois agonistas em conjunto potencializam a agregação. Adicionalmente, as plaquetas ativas também secretam moléculas pró-inflamatórias e contribuem para o processo de inflamação local (Varga-Szabo, Pleines *et alli*, 2008).

Assim, a agregação plaquetária é resultado da ação simultânea de uma série de agonistas, os quais trabalham de maneira redundante em diferentes receptores (Figura 2). A agregação continua até o bloqueio da lesão pela massa de plaquetas agregadas.

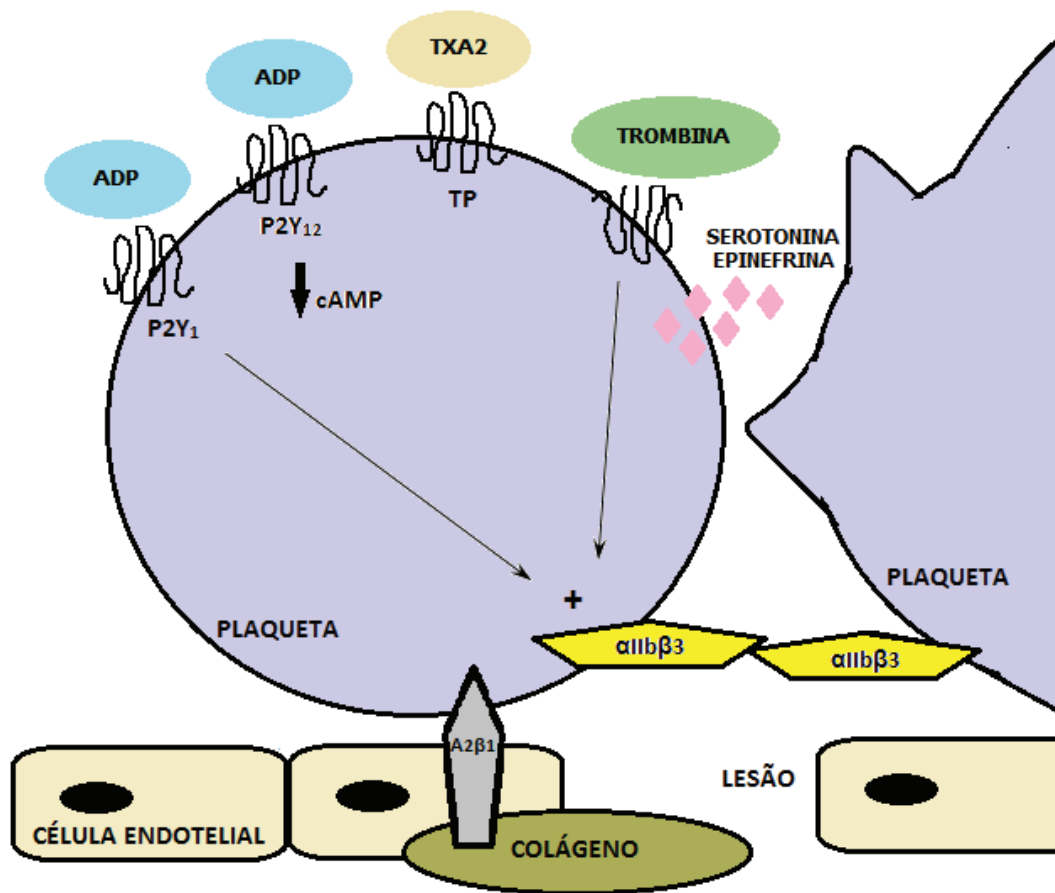


Figura 2. Agonistas da agregação plaquetária. Moléculas agonistas como ADP, colágeno, trombina e TXA2 ativam a agregação plaquetária através de receptores específicos. As plaquetas agregadas obstruem a lesão e evitam o extravasamento sanguíneo. Fonte: figura produzida por Paula Beatriz Santiago.

Coagulação sanguínea

A coagulação é um processo complexo e consiste na ativação sequencial de vários fatores presentes no sangue, envolvendo complexas interações entre serino proteases plasmáticas e seus cofatores.

O início da cascata de coagulação depende da exposição sanguínea a um componente-chave, o fator tecidual, processo que acontece em decorrência de injúrias vasculares ou estímulo por citocinas. O fator tecidual é uma glicoproteína de membrana e



funciona como receptor para o fator VII da coagulação, o qual em pequena proporção é encontrado na circulação em sua forma ativa, VIIa. A exposição do fator tecidual ao fator VIIa em decorrência de uma lesão vascular inicia a cascata de coagulação (Franco, 2001).

A etapa-chave na coagulação sanguínea é a conversão de fibrinogênio em fibrina pela trombina. O coágulo formado consiste em uma malha densa de filamentos de fibrina e engloba os elementos da coagulação no sítio da lesão endotelial, processo crítico para a manutenção da integridade vascular.

Propriedades farmacológicas da saliva

A hemostasia poderia impedir o vínculo do vetor com o hospedeiro. O sucesso alimentar dos hematófagos requer uma ação contrária a essa resposta fisiológica, a fim de manter o fluxo sanguíneo durante o repasto. Nesse contexto, os triatomíneos expressam em suas glândulas salivares moléculas anti-hemostáticas como vasodilatadores, anti-agregadores plaquetários e anti-coagulantes (Champagne, 2005), além de moléculas imuno-modulatórias e anestésicas. Essas proteínas são denominadas sialogeninas (Francischetti, 2010).

Deve-se considerar o potencial farmacológico dessas moléculas salivares no desenvolvimento de medicamentos relacionados aos distúrbios vasculares e hemostáticos. O benefício do estudo das sialogeninas pode ser comprovado com o exemplo representado pelo composto denominado bivariludina (inicialmente chamado hirulog) derivado de um anticoagulante presente nas glândulas salivares de sanguessugas, denominado hirudina. Esse fármaco já foi aprovado para uso clínico como anticoagulante em angioplastia coronariana nos Estados Unidos e Nova Zelândia (Ciprandi, Horn *et alli*, 2003).

Os medicamentos conhecidos como heparina e varfarina vêm sendo usados clinicamente como anticoagulantes por mais de 50 anos, contudo, seu uso está associado a uma grande variação de dose-resposta, sendo necessário um acompanhamento intensivo do paciente (Mousa, 2006). O ácido acetilsalicílico (aspirina) é comumente utilizado como agente antiplaquetário, agindo de forma preventiva nos eventos trombóticos cardiovasculares, mas pode gerar efeitos colaterais como sangramento gastrointestinal e episódios hemorrágicos (Castro, 2006). Desta forma, as sialogeninas isoladas de animais hematófagos ou análogos desenhados a partir delas podem ser futuramente testadas para



desenvolver medicamentos mais específicos e seguros no tratamento de processos patológicos como trombose arterial.

Vasodilatadores

Os vasodilatadores são amplamente distribuídos na saliva dos hematófagos, essas moléculas neutralizam a vasoconstrição local e aumentam o fluxo sanguíneo para o local da picada.

Dentre as estratégias que culminam com vasodilatação é possível encontrar em *Rodnius prolixus* uma proteína salivar denominada nitroforina responsável por estocar e transportar óxido nítrico (ON), que quando liberado na lesão se liga à adenilato ciclase solúvel, promovendo o relaxamento da musculatura vascular (Andersen & Montfort, 2000). Um mecanismo similar é encontrado na espécie de percevejo *Cimex lectularius* (Valenzuela, Walker *et alli*, 1995).

Outra proteína salivar vasodilatadora, denominada maxadilan, foi descrita no flebotomíneo *Lutzomia longipalpis* e é responsável pelo eritema provocado pela picada do mosquito transmissor da leishmaniose (Lerner, Ribeiro *et alli*, 1991). Já a espécie *Aedes aegypti* apresenta vasodilatadores pertencentes à família taquiquinina, os quais mimetizam uma proteína endógena estimulando a produção de ON ao se ligar a um receptor do hospedeiro (Champagne & Ribeiro, 1994).

Inibidores de agregação plaquetária

Vários mecanismos inibidores de agregação plaquetária já foram descritos. Uma importante estratégia é a hidrólise de ATP e ADP em AMP e Pi, atividade realizada por uma sialogenina denominada apirase (Ribeiro, Sarkis *et alli*, 1984; Francischetti, 2010).

Essa enzima é ubíqua entre os hematófagos e já foi descrita em mosquitos das espécies *Anopheles gambiae* (Lombardo, Di Cristina *et alli*, 2000) e *Aedes aegypti* (Champagne, Smartt *et alli*, 1995), em carrapatos dos gêneros *Ornithodoros* (Stutzer, Mans *et alli*, 2009) e *Rhipicephalus* (Liyou, Hamilton *et alli*, 1999) e em triatomíneos como *T. infestans* (Faudry, Lozzi *et alli*, 2004) e *R. prolixus* (Ribeiro, Andersen *et alli*, 2004). Além das espécies *Cimex lectularius* (Valenzuela, Charlab *et alli*, 1998), *Phlebotomus papatasi*



(Valenzuela, Belkaid *et alli*, 2001) e *Lutzomia longipalpis* (Charlab, Valenzuela *et alli*, 1999).

O triatomíneo *R. prolixus* apresenta uma proteína denominada RPAI, que age ligando-se à ADP em baixas concentrações, outra estratégia descrita para inibir agregação induzida por ADP (Francischetti, Andersen *et alli*, 2002). Nesse triatomíneo também foi possível encontrar uma sialogenina que inibe agregação através da ligação à serotonina e norepinefrina por moléculas denominadas ABP (*amine-binding protein*) (Andersen, Francischetti *et alli*, 2003).

Outro mecanismo já descrito foi a inibição da agregação induzida por colágeno, atividade encontrada na saliva de *A. aegypti* por uma sialogenina denominada aegiptina (Calvo, Tokumasu *et alli*, 2007), na saliva de *Triatoma pallidipennis* por uma proteína denominada palidipina (Noeske-Jungblut, Kratzschmar *et alli*, 1994) e na saliva de *T. infestans*, sialogenina conhecida como triplatina (Morita, Isawa *et alli*, 2006).

A moubatina é uma sialogenina recombinante da saliva do carrapato *Ornithodoros moubata* e sua ação inibe agregação plaquetária mediada por TXA2 (Mans & Ribeiro, 2008).

Enfim, as moléculas salivares descritas evitam a agregação plaquetária inibindo agonistas distintos (Figura 3). A atividade de proteínas com o mesmo objetivo é compreensível, visto que a agregação plaquetária é fator chave do processo de hemostasia. Pesquisas futuras podem descobrir outras sialogeninas inibidoras da agregação à medida que enriquece o estudo a respeito da saliva de insetos hematófagos.

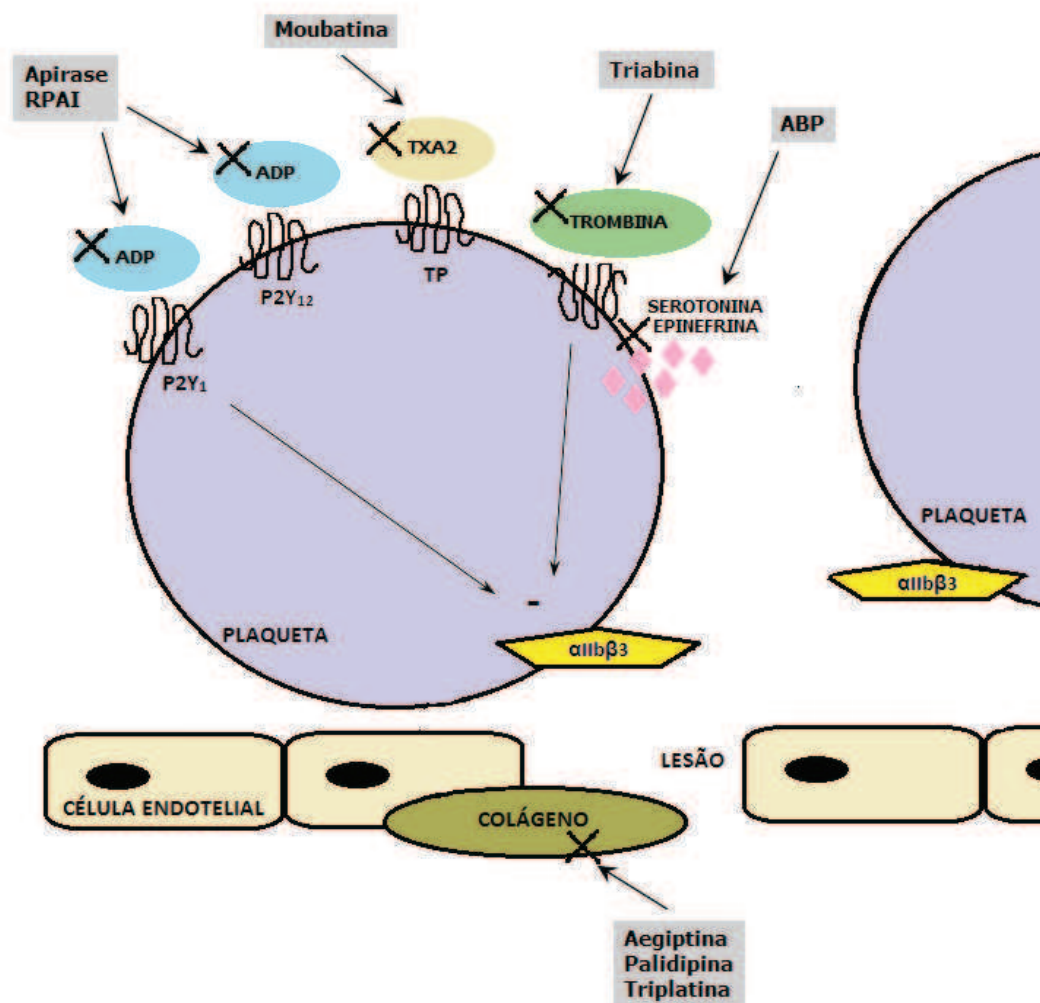


Figura 3. Inibidores da agregação plaquetária. Moléculas salivares, em cinza, evitam a agregação plaquetária inibindo agonistas distintos, o que mantém o extravasamento sanguíneo na lesão. Fonte: figura produzida por Paula Beatriz Santiago.

Inibidores da cascata de coagulação sanguínea

Outro desafio importante para o sucesso da hematofagia é o bloqueio da cascata de coagulação. A trombina, além de inibir a agregação plaquetária, é um importante agonista da coagulação. Em *T. pallidipenis* foi descrito um inibidor de trombina denominado triabina (Noeske-Jungblut, Haendler *et alli*, 1995), ação também observada pela anofelina, molécula encontrada na saliva do mosquito *Anopheles albimanus* (Valenzuela, Francischetti *et alli*, 1999).



***Dipetalogaster maxima*, um triatomíneo singular**

Dipetalogaster maxima é uma espécie de triatomíneo hematófago que vive em ambiente silvestre na região do Cabo, ao sul da península da Baixa Califórnia, no México. Habita zonas secas e é encontrado em pedreiras e rochas, associado a lacertílios como lagartixas, lagartos e camaleões (Badauy, Silva *et alli*, 2000). É o maior triatomíneo conhecido e apresenta cinco estágios de desenvolvimento (Figura 4). Alimenta-se durante o dia ou noite, é um predador agressivo e quando está com fome, deixa seu refúgio para se alimentar de qualquer vertebrado disponível, incluindo humanos (Jimenez, Llinas *et alli*, 2003). Possui um abdomen expansível que lhe permite armazenar grande quantidade de sangue e permanecer longo tempo em jejum, uma possível adaptação à sobrevivência em ambiente semi-desértico.

Esse triatomíneo não apresenta importância epidemiológica no México, contudo, é importante na manutenção do ciclo silvestre da DC. A infecção natural de *D. maxima* por *T. cruzi* foi demonstrada por Marsden (Marsden, Cuba *et alli*, 1979) e o triatomíneo tem sido utilizado em xenodiagnóstico por apresentar boa suscetibilidade a este parasito (Marsden, Barreto *et alli*, 1979).

Em seus estudos, Jimenez (Jimenez M. L. & C, 1999) revelou preocupação com o rápido crescimento da população humana que invade áreas suburbanas na região endêmica. Habitantes locais e turistas ficam expostos, ocasionando um aumento da transmissão de *T. cruzi* pelo *D. maxima*. Jimenez encontrou o triatomíneo em 90% das casas visitadas na região sul da Baixa Califórnia, indicando que o mesmo tem grande potencial para adaptação à ambiente peri e intra-domiciliar.

O potencial farmacológico de um anticoagulante estomacal de *D. maxima* já foi descrito. Em 1999 uma pesquisa isolou e caracterizou a dipetalogastina, proteína que inibe trombina bloqueando seu sítio ativo, uma atividade comparável à hirudina (Mende, Petoukhova *et alli*, 1999). Em um segundo momento, a fim de diminuir o potencial antigênico e melhorar o perfil terapêutico da dipetalogastina, a mesma teve um segmento trocado pela cauda C-terminal da hirudina, o segmento de bloqueio, e passou a ser denominada dipetarudina. O tempo de coagulação foi ligeiramente prolongado quando comparado à hirudina. Estudos futuros devem avaliar sua toxicidade, antigenicidade e outros parâmetros farmacocinéticos para uma possível aplicação *in vivo* (Lopez, Mende *et alli*, 2003).

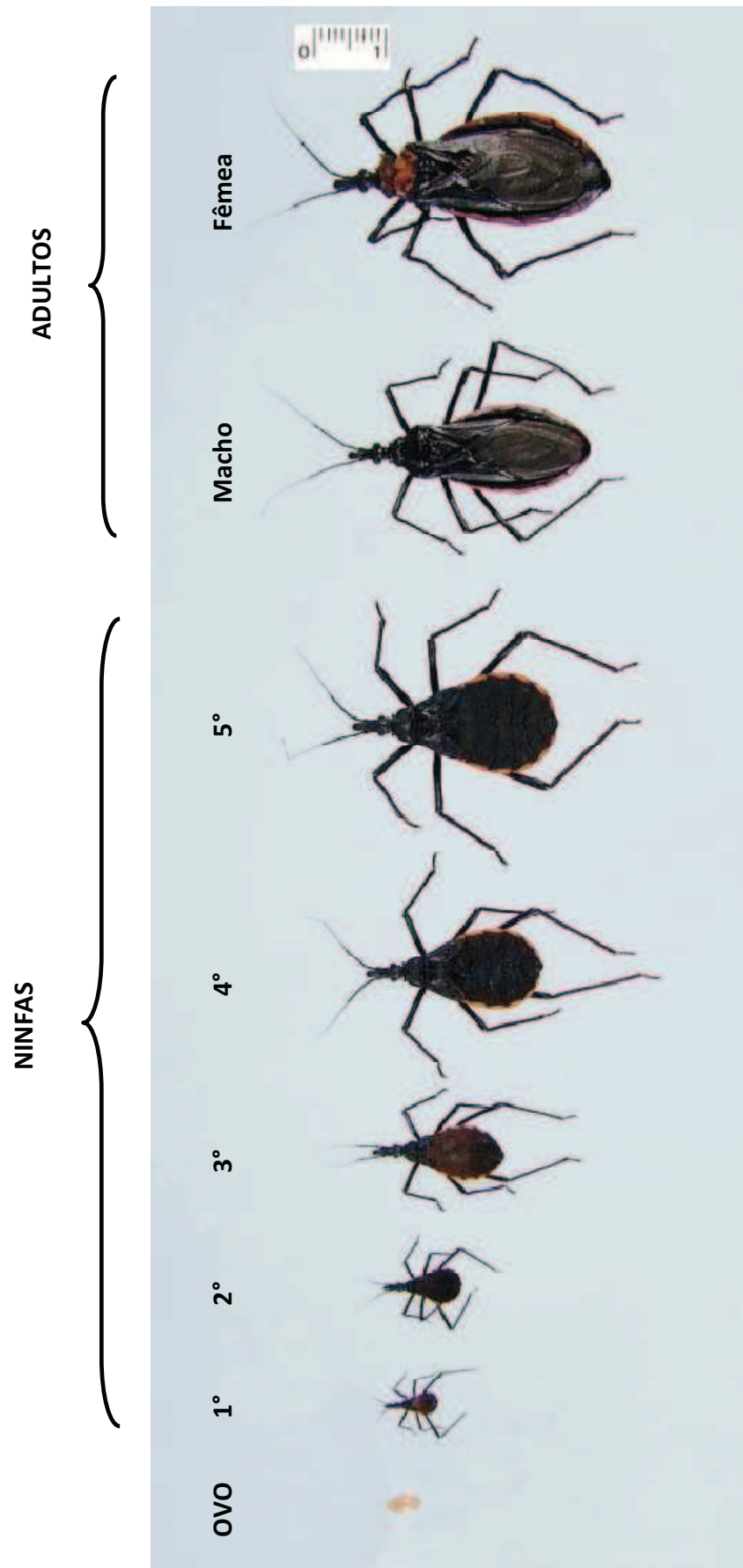


Figura 4. Estágios de desenvolvimento do triatomíneo *Dipetalogaster maxima*.

**Biblioteca de cDNA de *D. maxima***

O conjunto de mRNA das glândulas salivares de *D. maxima* foi anteriormente analisado por Assumpção e colaboradores (Assumpção *et alli*, 2011), sendo possível observar 2728 sequências, das quais 1375 codificam proteínas de natureza secretória (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação funcional dos transcritos da saliva de *Dipetalogaster maxima*.

CLASSE	NÚMERO DE CONTIGS	NÚMERO DE ESTs	ESTs/CONTIG
Secretória	161	1375	8.5
Constitutiva	107	207	1.9
Viral	1	1	1.0
Microbiana	1	1	1.0
Elementos transponíveis	20	21	1.1
Desconhecida	909	1123	1.2
Total	1199	2728	

A análise do grupo de natureza secretória classificou essas sequências em seis grupos de proteínas salivares: Lipocalinas, Antígenos-5, Apirases, Produtos relacionados à imunidade, Hemolisinas e outros polipeptídeos (Tabela 2). A maioria das proteínas salivares descritas foram identificadas como lipocalinas, correspondendo à 93% dos transcritos. Esses resultados serviram de base para a formação de um banco de dados formado pelo sialotranscriptoma salivar de *D. maxima* a fim de realizar experimentos de identificação das proteínas, sendo possível acessá-lo em servidor interno, de acesso restrito ao laboratório de realização dos trabalhos.

Tabela 2. Classificação funcional dos transcritos de natureza secretória da saliva de *Dipetalogaster maxima*.

CLASSE	NÚMERO DE ESTs
Lipocalinas	1285
Antígenos-5	67
Apirases	9
Produtos relacionados à imunidade	2
Hemolisinas	1
Outros polipeptídeos	11
Total	1375



Perspectivas das aplicações do sialoma

A descrição do conjunto de mRNAs (transcriptoma) e do conjunto das proteínas (proteoma) presentes na saliva formam o sialoma (Ribeiro, Andersen *et alli*, 2004). Os avanços recentes da biologia molecular como as bibliotecas de cDNA e a espectrometria de massa são ferramentas usuais na descoberta dos novos sialomas e possibilitam o reconhecimento da complexidade bioquímica e farmacológica dos hematófagos, auxiliando as pesquisas sobre as distintas estratégias anti-hemostáticas das sialogeninas. A descrição do proteoma de um organismo não só oferece um catálogo das proteínas codificadas pelo genoma, mas também informações sobre a expressão de proteínas em diferentes condições fisiológicas e/ou ambientais (Lopez, 2007).

A espécie *Anopheles gambiae*, mosquito transmissor da malária teve seu sialoma descrito em 2002 (Francischetti, Valenzuela *et alli*, 2002) a fim de alcançar um conhecimento mais profundo sobre suas sialogeninas. Com o mesmo objetivo, também já foram descritos os sialomas das espécies dos dípteros: *Aedes aegypti* (Valenzuela, Pham *et alli*, 2002), *Anopheles stephensi* (Valenzuela, Francischetti *et alli*, 2003), *Culex quinquefasciatus* (Ribeiro, Charlab *et alli*, 2004), *Aedes albopictus* (Arca, Lombardo *et alli*, 2007), *Anopheles funestus* (Calvo, Dao *et alli*, 2007), *Simulium vittatum* (Andersen, Pham *et alli*, 2009). Também dos carrapatos: *Ixodes scapularis* (Valenzuela, Francischetti *et alli*, 2002), *Ornithodoros parkeri* (Francischetti, Mans *et alli*, 2008) e *Ixodes ricinus* (Chmelar, Anderson *et alli*, 2008). E do percevejo *Cimex lectularius* (Francischetti, Calvo *et alli*, 2010).

Os triatomíneos *R. prolixus* (Ribeiro, Andersen *et alli*, 2004), *T. infestans* (Assumpcao, Francischetti *et alli*, 2008) e *Triatoma brasiliensis* (Santos, Ribeiro *et alli*, 2007) também já tiveram seus sialomas descritos. Nos três casos houve um destaque para as famílias das lipocalinas, característica contrastante aos dípteros, pois esses não possuem lipocalinas salivares descritas. Futuramente, outros sialomas devem ser desvendados com as novas tecnologias a fim de enriquecer o conhecimento sobre a complexidade salivar dos triatomíneos.



JUSTIFICATIVA



Justificativa

A diversidade de reservatórios animais e de triatomíneos capazes de transmitir o *T. cruzi* ao homem mantém a doença de Chagas como problema epidemiológico na América Latina. A saliva dos vetores é fonte de moléculas complexas e possibilita o sucesso do repasto, processo central na transmissão do patógeno. Assim, a pesquisa das proteínas salivares enriquece o estudo da dinâmica parasito-vetor-hospedeiro.

Outro ponto importante sobre conhecimento salivar tem sido demonstrado através dos novos sialomas ao revelar as diversas fontes de proteínas com propriedades farmacológicas presentes na saliva de hematófagos. E também através dos estudos dos mecanismos de ação das sialogeninas, pesquisa promissora na busca de fármacos para o tratamento de distúrbios circulatórios. Um excelente alvo de investigação terapêutica é a inibição de agregação plaquetária induzida por ADP e a apirase é a enzima-chave desse processo.

Justifica-se assim o trabalho aqui apresentado. Além de todo o exposto acima, a curiosidade a respeito da diversidade molecular das sialogeninas de *D. maxima* estimulou as atividades realizadas neste estudo. Foi desenvolvido o proteoma salivar da espécie, além de caracterizações iniciais das propriedades cinéticas das proteínas com atividade apirásica presentes em sua saliva. O reconhecimento da complexidade salivar de *D. maxima* pode auxiliar estudos posteriores sobre a evolução dos triatomíneos hematófagos e estimular a busca de aplicações terapêuticas. É certo que a evolução trabalhou de forma extraordinária nesse triatomíneo já que a habilidade de se alimentar em animais de sangue frio e de sangue quente não é comum na natureza.



OBJETIVOS



Objetivos

Esta dissertação encontra-se inserida em uma linha de pesquisa que visa conhecer a diversidade molecular e funcional de substâncias farmacologicamente ativas presentes na saliva de triatomíneos relacionados com a DC, enriquecendo o conhecimento acerca da interação parasito-vetor-hospedeiro.

O presente trabalho investe na pesquisa das proteínas salivares da espécie *Dipetalogaster maxima* e tem como principais objetivos:

- Descrever o proteoma de *D. maxima*
- Identificar e caracterizar parcialmente a apirase salivar de *D. máxima*

Objetivos específicos

Para atingir os objetivos citados acima, as seguintes atividades são propostas:

- Separar as proteínas salivares de *D. maxima* por eletroforese bidimensional e identificar as proteínas separadas mediante espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF;
- Investigar atividade ADPásica em gel de poliacrilamida;
- Analisar as propriedades bioquímicas e biofísicas da apirase salivar;
- Investigar o papel da saliva na inibição da agregação plaquetária;
- Estudar a imunogenicidade e antigenicidade da apirase salivar;
- Analisar antigenicidade e homologia de sequência entre as apirases salivares de *D. maxima* e *T. infestans*.



MATERIAIS E MÉTODOS



Criação dos triatomíneos

Os triatomíneos da espécie *D. maxima* utilizados neste estudo são provenientes da colônia mantida no departamento de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, onde são conservados a 28 ± 2 °C, com umidade relativa de 70 ± 5 % e fotoperíodo de 12 h. Os insetos foram utilizados aos 45 ± 5 dias após o repasto em galinha, *Gallus gallus domesticus*.

Obtenção da saliva

Para obtenção do conteúdo das glândulas salivares, cada triatomíneo foi imobilizado por resfriamento, a -20 °C, por 5 min e posicionado ventralmente em uma lâmina de vidro. Com auxílio de uma lupa a cabeça foi deslocada com pinça cirúrgica a fim de expor o par de glândulas salivares. Uma seringa de calibre 0,3 mm foi utilizada para recolhimento e perfuração cuidadosa e imediata das glândulas em microtubo, mantido em gelo. Após centrifugação a 1000 xg por 1 min, o sobrenadante foi recolhido e utilizado prontamente ou estocado a -80 °C para posterior utilização. Foi possível coletar aproximadamente 1 µL de saliva por glândula.

Eletroforese bidimensional

O conteúdo salivar de *D. maxima* foi submetido à eletroforese bidimensional para completa separação das proteínas. Uma amostra de aproximadamente 80 µg do conteúdo luminal das glândulas salivares foi ressuspendida em 350 µL de tampão de amostra (uréia 7 M; tiouréia 2 M; DTT 85 mM; isopropanol 10%; *pharmalyte* 3-10 0,5 % (v/v); Triton X-100 2,5% (v/v)), durante 1h sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 5 min a 14 000 x g e o sobrenadante foi aplicado em uma fita de gel de poliacrilamida com gradiente imobilizado de pH 3 a 10 (*IPGstrip* 3-10) de 18 cm (GE Healthcare), e submetido à primeira dimensão denominada focalização isoeétrica (IEF) no sistema Ettan IPGphor3 (GE-Healthcare). A IEF ocorreu com uma corrente máxima permitida de 50 mA e foi iniciado sem corrente por 6 h, seguido por 30 V por 6 h, 500 V por 1 h, 1000 V por 1 h e 8000 V por 4 h.



Posteriormente o *IPGstrip* foi submetido à redução em tampão de equilíbrio (Tris 50 mM, pH 8.8; uréia 6 M; glicerol 30%; SDS 4%) com adição de DTT 125 mM por 40 min à temperatura ambiente e em seguida em tampão de equilíbrio com adição de acrilamida 300 mM por um período de mais 20 min. Posteriormente, as proteínas foram separadas em SDS-PAGE 12% no sistema Protean II (BioRad). O gel bidimensional foi corado com nitrato de prata, adaptado de (Blum, Beier *et alli*, 1987).

Após lavagem em H₂O o gel foi escaneado e armazenado em ácido acético 1%. A imagem digitalizada foi analisada com o programa Image Master 2D Platinum 5.0 para contagem do número de pontos protéicos.

Identificação de proteínas por espectrometria do tipo MALDI-TOF-TOF

Digestão das proteínas

Cada ponto corado no gel 2D foi excisado, incubado em solução descorante (tiosulfato de sódio 50 mM; ferrocianato de potássio 15 mM) por 10 min e submetido a 3 ciclos de lavagem com água Milli-Q e acetonitrila (ACN) 50%, alternadamente. Em seguida foram feitos mais dois ciclos de lavagem com bicarbonato de amônio (50 mM) e ACN 100%, por 5 min cada. Durante a última lavagem com ACN 100%, os pedaços de acrilamida foram imediatamente macerados e secos a vácuo em centrífuga *SpeedVac* por aproximadamente 20 min. Após reidratação com tampão de digestão (5 a 10 µL de NH₄HCO₃ 25 mM, CaCl₂ 2,5 mM; tripsina 12,5 ng/µL, Promega), foram incubados no gelo por 45 min. Após esse período o excesso de tampão foi retirado para adicionar novo tampão de digestão, desta vez na ausência de tripsina, e as amostras foram incubadas a 37 °C por toda a noite.

Na manhã seguinte foi adicionado 1 µL de ácido trifluoroacético 1% ao produto da digestão e 1 µL desta amostra acidificada foi aplicado na placa AnchorChipTM *target* (Bruker Daltonics, Alemanha). Ao secar, foram aplicados 0,5 µL de matriz (ácido 2,5 dihidroxibenzoico, DHB, 5 mg/ml em solução aquosa de 30% ACN e 0,1% TFA) sobre a mesma. Esse procedimento foi realizado de acordo com Charneau *et alli*, 2007.



Espectrometria de massa

Os peptídeos trípticos obtidos foram analisados por PMF (*peptide mass fingerprinting*) mediante espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF (*Matrix assisted laser desorption Ionization time of flight mass spectrometry*) no equipamento Autoflex II (Bruker Daltonics) operado com o programa Flex Control versão 2.2 (Bruker Daltonics), conforme instrução do fabricante.

Identificação das proteínas

Cada espectro de massa obtido foi processado com o programa Flex Analysis versão 3.0 e Biotoools versão 2.2 (Bruker Daltonics) para a geração da listas dos picos de massa. Usando o programa MASCOT (www.matrixscience.com), as massas experimentais dos peptídeos trípticos foram comparadas às massas teóricas obtidas por digestão *in silico* das sequências protéicas previstas da biblioteca de cDNA de *D. maxima*, armazenada no servidor interno do laboratório onde foram realizados os experimentos.

Para a busca no banco de dados foram obedecidos os seguintes parâmetros: acurácia de 100 ppm de massa monoisotópica de íons monocarregados positivamente para os espectros calibrados internamente e de 200-250 ppm para os não calibrados, presença de até um sítio de clivagem tríptica perdido, propionamidação das cisteínas como modificação fixa e oxidação de metionina e N-acetilação da proteína como modificações variáveis.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A fim de analisar o perfil eletroforético unidimensional da saliva de *D. maxima*, o extrato salivar foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). A amostra foi diluída em tampão (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8; glicerol 10%; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1%; β -ME 15 mM) com ou sem β -ME. A eletroforese foi realizada a uma voltagem constante (90 V, na passagem pelo concentrador e 120 V, durante a passagem pelo separador) com tampão de corrida tris-glicina (Tris HCl 25 mM, pH 8.8; glicina 250 mM e



SDS 0,1%), em sistema de eletroforese vertical *MiniProtean 3* (Bio-Rad). Como padrão de massa molecular foi utilizado marcador *Bench Mark* (Sigma).

Para observação do perfil protéico o gel foi corado com azul de Coomassie. Após a corrida eletroforética, o gel foi submerso em solução corante (metanol 45%; ácido acético 10%; *Coomassie Brilliant Blue R-250*) e incubado sob agitação lenta por 2 h, a temperatura ambiente. Posteriormente o gel foi transferido à solução descorante (ácido acético 10%; metanol 10%) sob agitação lenta à temperatura ambiente até que as bandas protéicas fossem visualizados. O gel foi lavado e escaneado.

Atividade ADPásica em SDS-PAGE

A atividade ADPásica da saliva foi investigada mediante atividade hidrolítica em gel SDS-PAGE, determinada pela precipitação de fosfato de cálcio. A determinação da atividade hidrolítica é fundamentada pela associação do fosfato, liberado do nucleotídeo, com cálcio, formando um precipitado de fosfato de cálcio, insolúvel, de cor branca e visível em gel.

O conteúdo salivar de *D. maxima* foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida conforme descrito anteriormente, contudo à temperatura de 4 °C. Logo após a corrida, o gel foi lavado 2x por 20 min em Triton X-100 2,5% e 2x por 20 min em água Milli-Q, alternadamente, sob agitação lenta à temperatura ambiente. A seguir, o gel foi incubado em solução de atividade (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; NaCl 100 mM; CaCl₂ 20 mM; ADP 5 mM) por 30 min ou até a visualização das bandas de atividade. A reação foi parada com a mesma solução citada acima na ausência do nucleotídeo (Faudry, Lozzi *et alli*, 2004).

Caracterização da atividade enzimática

O ensaio de atividade ADPásica foi baseado em método colorimétrico que mede a liberação de fosfato inorgânico (Pi), a partir do substrato, ADP (Fiske & Subbarow, 1925). Utilizando microplaca de 96 poços a reação foi iniciada incubando-se a saliva, na diluição de 1/8 de glândula, com o tampão de atividade (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; NaCl 150 mM; CaCl₂ ou MgCl₂ 5 mM; 0,1 mM EDTA) e ADP 2 mM, por 20 min a 37 °C. A reação



enzimática foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (TCA) 75%, a uma concentração de 5% do volume final. Para a coloração da amostra foi adicionado 30 μL de molibdato de amônio 2,5% (m/v) diluído em HCl 2N e 12 μL de ácido aminonaftolsulfônico (Fiske e Subbarow, Sigma), para um volume final de 200 μL . Após 10 min de incubação a absorbância a 630 nm foi medida no leitor de microplaca Tp reader (Thermoplate) O controle foi obtido ao encubar o tampão de atividade e o ADP na ausência de saliva. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

A reação pode ser descrita da seguinte forma:



A atividade enzimática foi determinada a 25, 30, 37, 42, 56 e 65 °C por 20 min, como descrito acima. A influência iônica na atividade foi determinada pela substituição do CaCl_2 ou do MgCl_2 presente no tampão de atividade por MnCl_2 , CoSO_4 , CuCl_2 e ZnCl_2 , a uma concentração final de 5 mM.

Também foi testado o efeito do pH na atividade enzimática, e neste caso, o tampão de atividade não continha Tris-HCl e foi diluído em AMT (ácido acético 50 mM; Mes 50 mM; Tris-HCl 100 mM, pH 6 –10) nos pHs 6-10. Já no ensaio de inibição, a saliva foi pré-incubada com os inibidores, AEBSF (4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride) na concentração final 0,5 μM e TPCK (N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone), antipaína, quimostatina e leupeptina na concentração final 50 μM , por 10 min a 37 °C.

Inibição da agregação plaquetária

O ensaio de inibição da agregação plaquetária aconteceu mediante coleta de sangue de doador humano sadio, em jejum de pelo menos 6 h e não exposto a fármacos que pudessem interferir na agregação plaquetária por, pelo menos, 10 dias. Aproximadamente 5



mL de sangue foram coletados em 3,8% de citrato de sódio. As amostras foram utilizadas em, no máximo, 4 h.

O método é baseado na formação de agregados plaquetários após a exposição a um agente agregante. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação lenta, 100 xg por 10 min, realizada logo após a coleta e com o tubo vedado. Após a retirada do PRP, o plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido pela centrifugação do mesmo tubo da coleta a 1.500 xg por 10 min. O PRP foi deixado em repouso de 30 a 60 min a temperatura ambiente antes do início dos testes.

O volume de 400 µL de PRP foi incubado por 10 min, sob agitação a 37 °C. Em cada teste de inibição foram adicionadas diferentes diluições de saliva por 4 min, para posteriormente, adicionar o ADP a 5 µM e registrar a curva de agregação por 5 min, sob agitação e a 37 °C. O controle foi obtido ao encubar o PRP com ADP na ausência de saliva. Para quantificar a formação dos agregados plaquetários *in vitro*, foi utilizado o agregômetro Agreg Pic (Qualitem), seguindo as instruções do fabricante.

Produção de anticorpos

Anticorpos contra bandas protéicas do extrato de glândulas salivares de *D. maxima* que apresentaram atividade ADPásica (bandas de 220 e 160 kDa, resultados discutidos na página 48) foram produzidos por imunização de camundongos Balb/c. Foram selecionados 4 animais machos, com 7 semanas de idade, 2 foram imunizados com a banda de 220 kDa e 2 com a de 160 kDa. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. Antes da primeira imunização, realizou-se a coleta de sangue de cada animal para obtenção do soro negativo.

Para as imunizações, a saliva diluída em tampão de amostra contendo β-ME foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida e as bandas protéicas foram coradas com azul de Coomassie, como descrito anteriormente. Aproximadamente 5 µg de cada proteína foram macerados em 50 µL de PBS (NaCl 137 mM; KH₂PO₄ 6 mM; Na₂HPO₄ 5,4 mM; KCl 2,68 mM, pH 7,2) e homogeneizados em 50 µL de adjuvante completo de Freund na primeira dose, ou em igual volume de adjuvante incompleto de Freund na segunda dose, ou ainda na ausência de adjuvante na terceira dose. Cada animal foi imunizado por via intraperitoneal, em um intervalo de 14 dias entre as doses. Após uma semana da última dose



foi colhido sangue por punção cardíaca e o soro diluído em glicerol 30 % foi estocado a -20 °C até utilização.

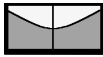
Imunodeteção

Para averiguar a reação com o anticorpo produzido, o conteúdo das glândulas salivares de *D. maxima* foi separado em gel de poliacrilamida como descrito anteriormente. As bandas protéicas presentes no gel foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose em um sistema de transferência horizontal (*MultiphorII*). A transferência ocorreu a uma corrente constante de 0,8 mA e 90 V, por 90 min em tampão de transferência (Tris-HCl 48 mM, pH 9,2; glicina 39 mM; metanol 20%; SDS 0,037%). As bandas transferidas à membrana foram visualizadas após coloração com solução Ponceau (Ponceau S 0,2% p/v; ácido acético 1%).

Para evitar que o anticorpo sintetizado se ligasse inespecificamente à superfície da membrana, a mesma foi incubada em solução PBS-leite 5% por toda a noite, a 4 °C. Após o bloqueio a membrana foi submetida a três ciclos de lavagem em PBS, sob agitação constante, por 5 min.

A seguir, a membrana foi incubada com o soro contendo os anticorpos primários, na diluição 1/500 em PBS-leite 1%, por 2 h sob agitação constante. A membrana sofreu novo ciclo de lavagem e foi incubada com o segundo anticorpo, anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Invitrogen) diluído 1/2000. Finalmente, a membrana foi novamente lavada, incubada por 10 min em tampão de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM) e revelada com substrato NBT/BCIP (Sigma) diluído no mesmo tampão. A reação foi interrompida com sucessivas lavagens em água Milli-Q.

A saliva do triatomíneo *T. infestans*, anteriormente estocada no Laboratório de Interação parasito-hospedeiro, também foi submetida à imunodeteção com os anticorpos contra as bandas protéicas de 160 kDa e 220 kDa da saliva de *D. maxima* conforme descrito acima.



Análise filogenética

A sequência parcial (truncada na região 5') da apirase salivar de *D. maxima* obtida em sua identificação, referente ao contig Dm-68 do banco de cDNA, foi submetida à análise comparativa a outras sequências protéicas não redundantes (NR) depositadas no banco de dados do *National Center of Biological Information* (NCBI) utilizando o programa BLAST (disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências de maior *score* foram utilizadas para realizar alinhamento utilizando o programa ClustaW (disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), dentre as quais encontram-se a apirase salivar de 79 kDa de *T. infestans* (número de acesso no banco de dados: CAE46445.1), também as apirases de *Glossina morsitans* (nº de acesso: ADD18818.1), *Nasonia vitripennis* (nº de acesso: XP 001600210.1), *Drosophila melanogaster* (nº de acesso: NP 611218.1), *Ixodes scapularis* (nº de acesso: XP 002403568.1), *Anopheles gambiae* (nº de acesso: XP 001688439.1), *Aedes aegypti* (nº de acesso: XP 001661272.1) e *Culex quinquefasciatus* (nº de acesso: XP 001866034.1), todas membros da família 5' nucleotidase.



RESULTADOS



Para atingir os objetivos deste trabalho o conteúdo salivar do triatomíneo *D. maxima* foi analisado. O conjunto dos resultados a serem expostos em seguida, obtidos através de espectrometria do tipo MALDI-TOF/TOF, revelou que as proteínas expressas pelas glândulas salivares de *D. maxima* correspondem àquelas observadas em seu transcriptoma e foi possível observar lipocalinas, antígenos-5 e apirases. Em um segundo momento, a atividade ADPásica da saliva foi investigada, sendo visualizada por atividade em gel e analisada sob a influência de íons, temperatura, pH e inibidores. Além disso, a saliva do triatomíneo inibiu a agregação plaquetária induzida por ADP e revelou ser imunogênica ao induzir a produção de anticorpos em camundongos. O alinhamento da sequência parcial da apirase de *D. maxima* indicou que a proteína apresenta homologia com sequências pertencentes à família 5' nucleotidase.

O gel bidimensional exibiu grande quantidade de proteínas entre 20 e 30 kDa

Foi realizada eletroforese bidimensional para completa separação das proteínas mais abundantemente expressas pelas glândulas salivares de *D. maxima*. A focalização isoeétrica foi realizada na faixa ampla de pH 3-10, seguida por SDS-PAGE 12%, protocolo otimizado na análise do proteoma salivar de *T. infestans* por Charneau e colaboradores, 2007. Na análise do gel bidimensional foi possível observar aproximadamente 150 pontos protéicos com maior abundância entre 20 e 30 kDa (Figura 4).

O proteoma salivar de *D. maxima* revelou 3 famílias salivares

Com o objetivo de identificar as proteínas salivares de *D. maxima*, todos os 150 pontos protéicos separados pelo gel 2D foram submetidos à digestão trípica e os peptídeos resultantes foram analisados por PMF. A identificação das proteínas foi possível mediante busca feita diretamente na biblioteca de cDNA salivar de *D. maxima* presente no servidor interno.

Dos 150 pontos protéicos, a análise proteômica permitiu identificar somente 47 proteínas, incluindo isoformas (Tabela 3). Também indicou regiões correspondentes a 3 famílias descritas na biblioteca: lipocalinas e palidipinas, antígenos-5 e apirases (Figura 4).

O grupo das lipocalinas foi o mais abundante, 37 proteínas das 47 identificadas. Essa família foi localizada majoritariamente entre 20 e 30 kDa, em diferentes pIs, na região mais básica do gel. Essa abundância é consistente com o resultado achado por Assumpção e colaboradores, 2011, que determinou que 93% do transcriptoma de *D. maxima* codifica lipocalinas.

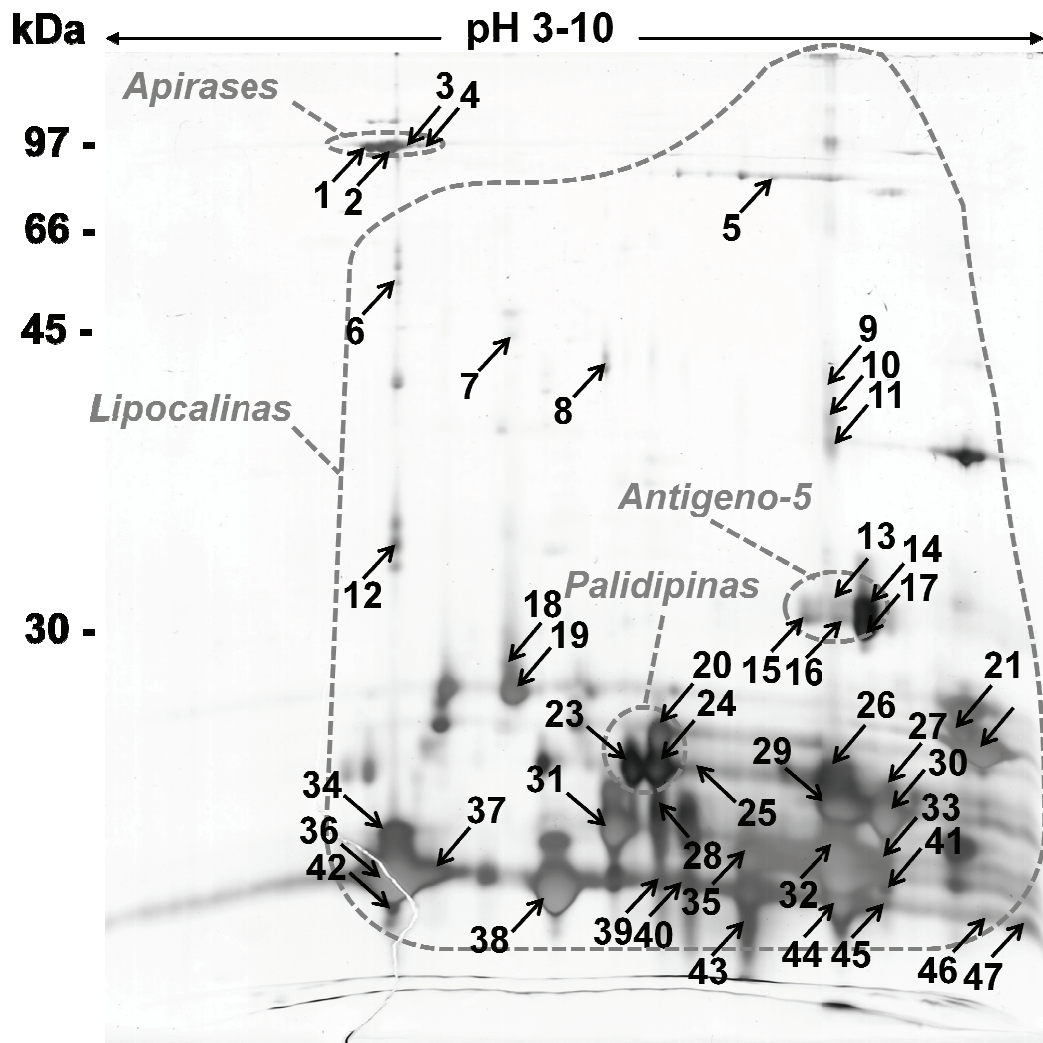


Figura 4. Perfil eletroforético bidimensional salivar de *D. maxima*, corado com nitrato de prata. A focalização isoelétrica foi realizada com aproximadamente 80 µg de saliva sob condições desnaturantes em gradiente de pH linear 3-10, seguida por eletroforese em SDS-PAGE 12%. As regiões delimitadas indicam o local onde as famílias de proteínas foram encontradas. A numeração indica proteínas identificadas por digestão triptica e espectrometria de massa.



O segundo grupo de proteínas foi identificado em cinco pontos protéicos, sendo correspondente aos antígenos-5. As manchas 13, 14, 15 e 16, representam a isoforma da sequência denominada Dm-124 e a mancha 17, corresponde a sequência Dm-79. Com aproximadamente 30 kDa, localizam-se na faixa de *pI* que vai de 8,2 a 8,6.

Também foi possível observar uma pequena região de proteínas identificadas como apirases, correspondente à sequência Dm 68. As manchas 1, 2, 3 e 4 estão presentes na faixa de massa entre 94 e 95 kDa e na faixa de pH ácido, aproximadamente 5,0.

Tabela 3. Identificação das proteínas salivares de *D.maxima* por *peptide mass fingerprinting* (PMF).

Mancha ^a	Identidade ^b	Número de acesso (biblioteca) ^c	Score ^d	Cobertura (%) ^e	Massa exp. e teor. (kDa) ^f	<i>pI</i> exp. e teor. ^g		
1	Apirase	Dm-68	74 >48	31%	94.4	25.0	4.8	4.8
2	Apirase	Dm-68	53 >48	17%	94.0	25.0	5.0	4.8
3	Apirase	Dm-68	70 >48	26%	95.7	25.0	5.1	4.8
4	Apirase	Dm-68	49 >48	16%	95.0	25.0	5.2	4.8
5	Lipocalina	Dm-96	68 >48	28%	83.1	17.7	7.6	5.2
6	Lipocalina	Dm-96	51 >48	25%	53.5	17.7	5.0	5.2
7	Lipocalina	Dm-105	84 >48	42%	44.6	16.0	5.9	5.4
8	Lipocalina	Dm-45	60 >48	24%	43.3	19.8	6.6	6.9
9	Lipocalina	Dm-272	95 >48	46%	42.5	17.6	8.4	7.7
10	Lipocalina	Dm-270	77 >48	29%	40.0	17.3	8.4	7.7
11	Lipocalina	Dm-270	129 >48	50%	38.5	17.3	8.4	7.7
12	Lipocalina	Dm-96	61 >48	31%	33.6	17.7	5.0	5.2
13	Antígeno-5	Dm-124	53 >48	18%	31.1	28.3	8.4	8.6
14	Antígeno-5	Dm-124	88 >48	38%	31.4	28.3	8.6	8.7
15	Antígeno-5	Dm-124	136 >48	38%	30.4	28.3	8.2	8.6
16	Antígeno-5	Dm-124	58 >48	14%	30.4	28.3	8.4	8.6
17	Antígeno-5	Dm-79	80 >48	46%	30.0	21.2	8.6	8.5
18	Lipocalina	Dm-105	60 >48	28%	28.7	16.0	5.9	5.4
19	Lipocalina	Dm-75	58 >48	34%	27.3	14.9	5.9	5.2
20	Lipocalina	Dm-78	90 >48	31%	25.7	18.1	7.0	6.6
21	Lipocalina	Dm-99	97 >48	48%	25.7	14.3	9.4	8.9
22	Lipocalina	Dm-1189	196 >48	77%	25.0	11.4	9.5	9.6
Mistura		Dm-288		36%	25.0	21.4		7.5
23	Palidipina	Dm-1049	72 >48	40%	24.6	20.3	6.8	6.5
24	Palidipina	Dm-1049	66 >48	33%	24.1	20.3	7.0	6.5
25	Palidipina	Dm-1049	85 >48	32%	24.3	20.3	7.2	6.5
26	Desconhecido	<u>M ASB-722 FR2</u>	52 >48	13%	24.2	31.8	8.4	10.4
27	Lipocalina	Dm-346	118 >48	47%	23.8	20.2	8.8	8.7
28	Palidipina	<u>M ASB-1047 FR1</u>	116 >48	18%	23.0	39.4	7.0	9.9
Mistura		Dm-78		26%	23.0	18.1		6.6
29	Lipocalina	Dm-49	261 >48	68%	23.0	20.2	8.4	8.1



30	Lipocalina	Dm-346	70>48	35%	22.5	20.2	8.8	8.7
31	Lipocalina	Dm-240	65>48	28%	22.0	17.9	6.7	7.0
32	Lipocalina	Dm-270	175>48	43%	21.5	17.3	8.5	7.7
33	Lipocalina	Dm-270	95>48	26%	21.5	17.3	8.8	7.7
34	Lipocalina	Dm-96	70>48	35%	22.1	17.7	5.0	5.2
35	Lipocalina	Dm-270	122>48	43%	21.2	17.3	7.7	7.7
36	Lipocalina	Dm-96	64>48	40%	20.6	17.7	5.0	5.2
37	Lipocalina	Dm-96	89>48	40%	20.7	17.7	5.3	5.2
38	Lipocalina	Dm-171	68>48	36%	20.3	8.2	6.2	8.6
39	Lipocalina	Dm-278		28%		16.3		5.6
Mistura		Dm-78	102>48	26%	20.4	18.0	7.0	6.6
40	Lipocalina	Dm-237		42%		15.2		6.1
Mistura		Dm-278	158>48	37%	20.0	16.3	7.7	5.6
41	Lipocalina	Dm-270		45%		17.3		7.7
Mistura		Dm-346	131>48	40%	20.3	20.1	8.8	8.7
42	Lipocalina	Dm-96	69>48	33%	19.7	17.7	5.0	5.2
43	Lipocalina	Dm-270	124>48	49%	18.8	17.3	7.7	7.7
44	Lipocalina	Dm-272	139>48	46%	19.4	17.6	8.4	7.7
45	Lipocalina	Dm-278		32%		16.3		5.6
Mistura		Dm-258	123>48	27%	19.8	17.7	8.8	7.7
46	Lipocalina	Dm-270	93>48	26%	19.5	17.3	9.5	7.7
47	Lipocalina	Dm-278	94>48	36%	19.1	16.4	9.8	5.6

^a Número das manchas indicados na figura 01;

^b Resultados obtidos pelo *software* MASCOT contra a biblioteca de cDNA de Dm;

^c Número de acesso das proteínas na biblioteca de cDNA de *D. maxima*;

^d Probabilidade obtida no *software* MASCOT. O número após o símbolo “>” representa o *score* mínimo estatisticamente significativo calculado pelo programa;

^e Percentual de sequências protéicas cobertas por peptídeos combinados via MASCOT;

^f Massa molecular experimental e teórica das proteínas visualizadas no gel

^g Ponto isoelétrico experimental e teórico das proteínas visualizadas no gel



Perfil eletroforético unidimensional da saliva de *D. maxima*

O extrato salivar foi submetido à eletroforese unidimensional na ausência ou na presença de β -ME. O perfil eletroforético indicou a presença de bandas protéicas acima de 220 kDa (Figura 5, B) que possivelmente têm suas subunidades separadas na presença do agente redutor, passando a apresentar somente três bandas bem definidas, uma com massa acima de 220 kDa, uma de 220 e outra de 160 kDa (Figura 5, C). Esse dado sugere a formação de oligômeros de tamanhos progressivamente maiores entre as proteínas presentes nessa faixa de massa, observação que é compreensível, pois a oligomerização de uma enzima a torna mais estável.

A atividade em gel de poliacrilamida revelou proteínas com atividade apirásica

A ação hidrolítica da saliva sobre o ADP foi constatada pela observação de precipitado de fosfato de cálcio no gel de poliacrilamida. O perfil eletroforético da amostra na ausência de β -ME mostrou forte atividade em bandas acima de 220 kDa (Figura 5, D). Sob ação redutora, as múltiplas bandas observadas deram lugar à apenas duas bandas, uma de 220 kDa e outra de 160 kDa (Figura 5, E). Esses resultados revelaram o mesmo padrão observado em SDS-PAGE, permitindo estimar a massa molecular das proteínas com atividade apirásica.

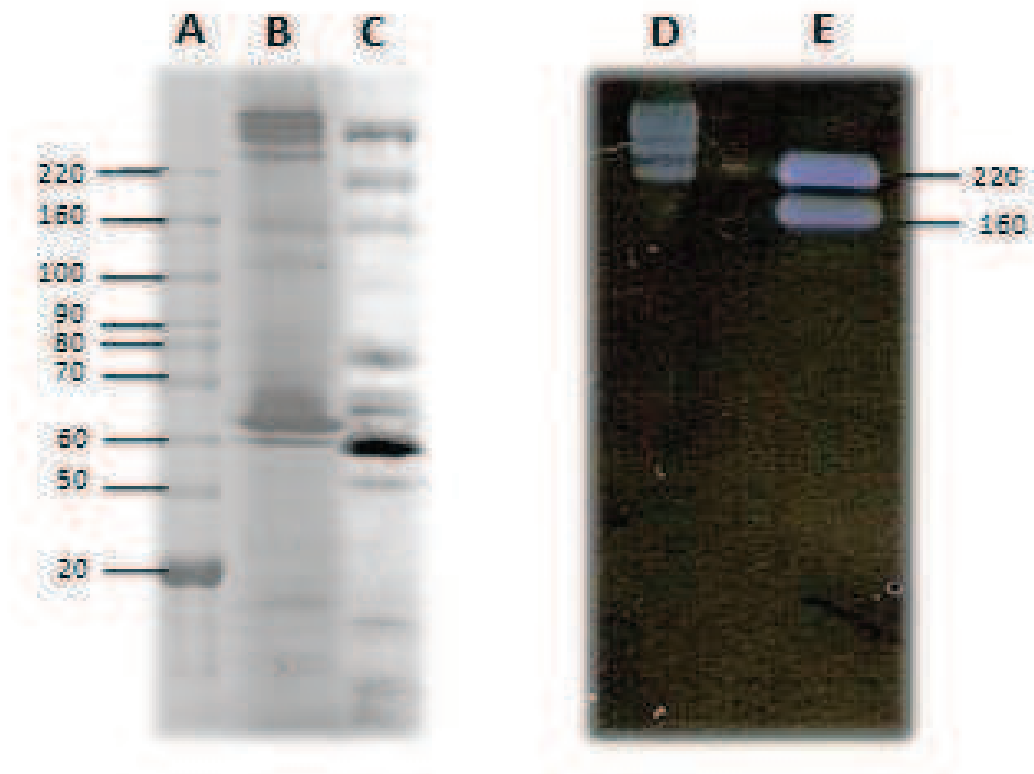
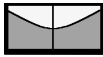


Figura 5. Perfil eletroforético salivar de *D. maxima* em SDS-PAGE 8%, corado com azul de Coomassie: A, B e C. (A): marcador Bench Mark, em kDa. (B): Extrato salivar total (1 par de glândulas). (C): extrato salivar reduzido com β -ME (1 par de glândulas). As amostras foram submetidas a eletroforese sem prévia fervura. **Atividade ADPásica da saliva de *D. maxima* em gel: D e E.** (D) extrato salivar total (1 par de glândulas). (E): extrato salivar reduzido com β -ME (1 par de glândulas). O extrato salivar (D) e o extrato salivar reduzido com β -ME (E) foram submetidos à SDS-PAGE 8% a 4 °C e posteriormente incubados em tampão de atividade e ADP 5 mM. A atividade hidrolítica em SDS-PAGE foi constatada pela associação do fosfato, liberado do ADP, com cálcio, formando um precipitado de fosfato de cálcio, de cor branca e visível em gel.



A caracterização da atividade enzimática mostrou uma temperatura ótima de 37 °C e pH ótimo variável com íons

A caracterização enzimática foi empregada na investigação das propriedades bioquímicas e biofísicas da atividade ADPásica presente na saliva de *D. maxima*. Uma análise da influência dos cátions divalentes revelou um aumento significativo da atividade na presença de Mg^{2+} , Co^{2+} e Mn^{2+} , sendo que a máxima foi observada quando a reação ocorreu na presença de Mg^{2+} . Entretanto, a presença dos cátions Zn^{2+} e Cu^{2+} afetaram a atividade de forma negativa. Já o íon Ca^{2+} não alterou de forma significativa a atividade apirásica da saliva determinada na ausência de íons (Figura 6).

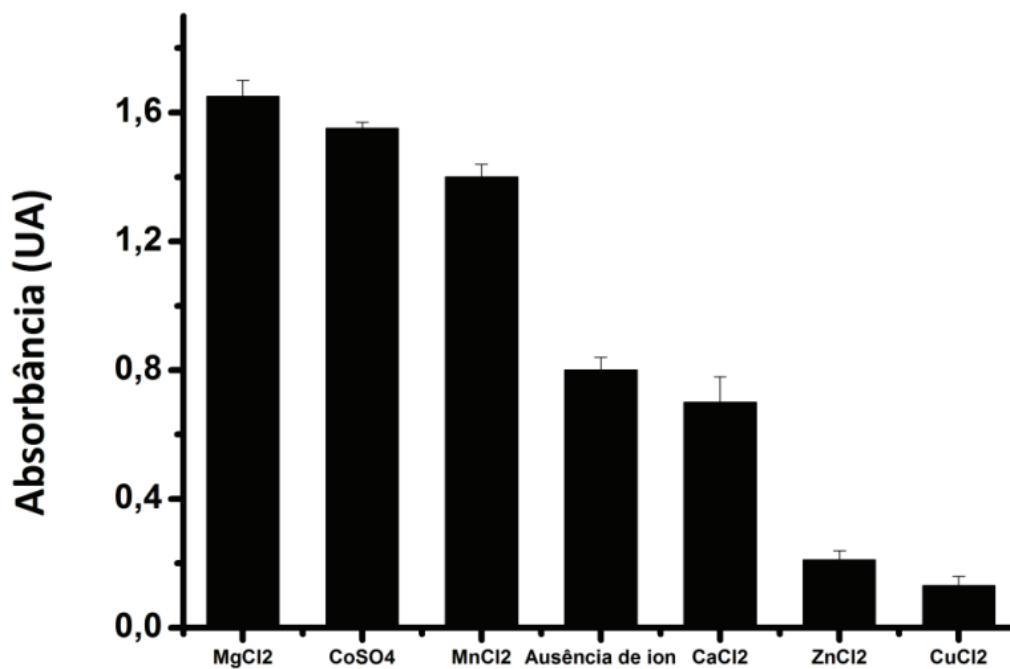


Figura 6. Efeito de cátions sobre a atividade ADPásica salivar de *D. maxima*. Utilizando microplaca de 96 poços, a reação foi iniciada incubando-se a saliva, na diluição de 1/8 de glândula, em tampão de atividade e ADP 2 mM, por 20 min a 37 °C na presença de diferentes íons, em uma concentração final de 5 mM. Posteriormente a amostra foi incubada com reagentes que conferem a cor azulada ao fosfato liberado e a absorbância foi medida a 630 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.



Os valores ótimos de temperatura e pH, na presença de solução de atividade contendo Ca^{2+} , foram 37 °C e 8,0, respectivamente (Figuras 7 e Figura 8). Nas condições aqui empregadas, os inibidores de serino proteases utilizados alteraram o padrão de atividade com o íon Ca^{2+} , sendo TPCK, o inibidor mais significativo (Figura 9). Como uma maior atividade ADPásica foi observada na presença de Mg^{2+} , a influência da temperatura, do pH e de inibidores também foi analisada substituindo-se o CaCl_2 do tampão de atividade por MgCl_2 e os testes de atividade foram repetidos. Nesses ensaios, a temperatura ótima manteve-se 37 °C (Figura 7). Em relação ao pH, a atividade manteve-se constante nos pHs 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0 (Figura 8) e os inibidores tiveram menor influência sobre a atividade ADPásica quando comparados ao ensaio na presença de Ca^{2+} (Figura 9).

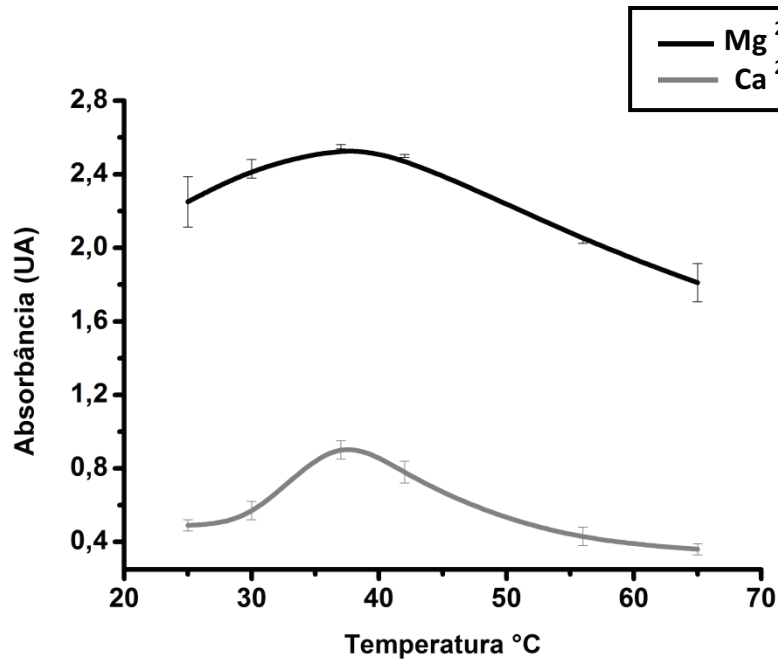


Figura 7. Efeito da temperatura sobre a atividade ADPásica salivar de *D. maxima*. Utilizando microplaca de 96 poços, a reação foi iniciada incubando-se a saliva, na diluição de 1/8 de glândula, com tampão de atividade contendo Ca²⁺ ou Mg²⁺ e ADP 2 mM, por 20 min a 37 °C em diferentes temperaturas. Posteriormente a amostra foi incubada com reagentes que conferem a cor azulada ao fosfato liberado e a absorbância foi medida a 630 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

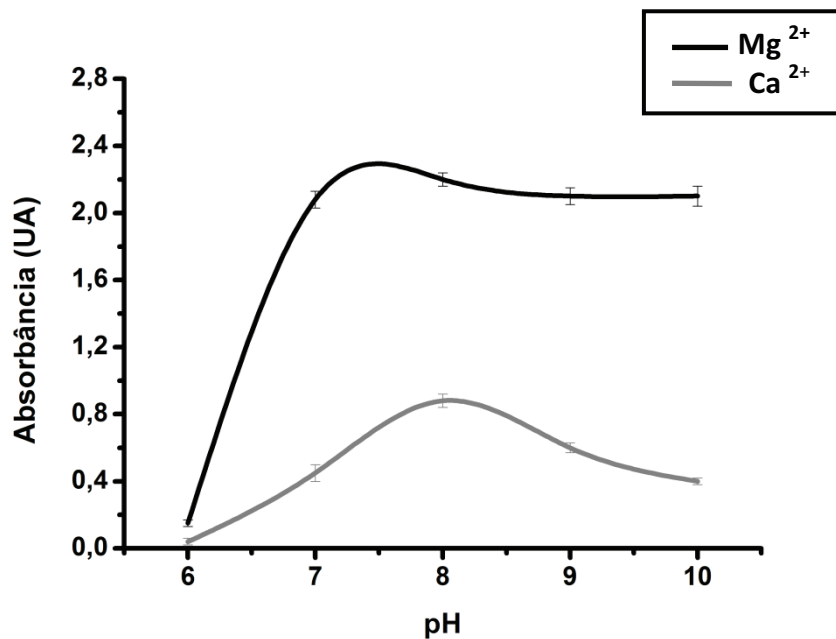


Figura 8. Efeito do pH sobre a atividade ADPásica salivar de *D. maxima*. Utilizando microplaca de 96 poços, a reação foi iniciada incubando-se a saliva, na diluição de 1/8 de glândula, com tampão de atividade contendo Ca²⁺ ou Mg²⁺ e ADP 2 mM, por 20 min a 37 °C em diferentes pHs. Posteriormente a amostra foi incubada com reagentes que conferem a cor azulada ao fosfato liberado e a absorbância foi medida a 630 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

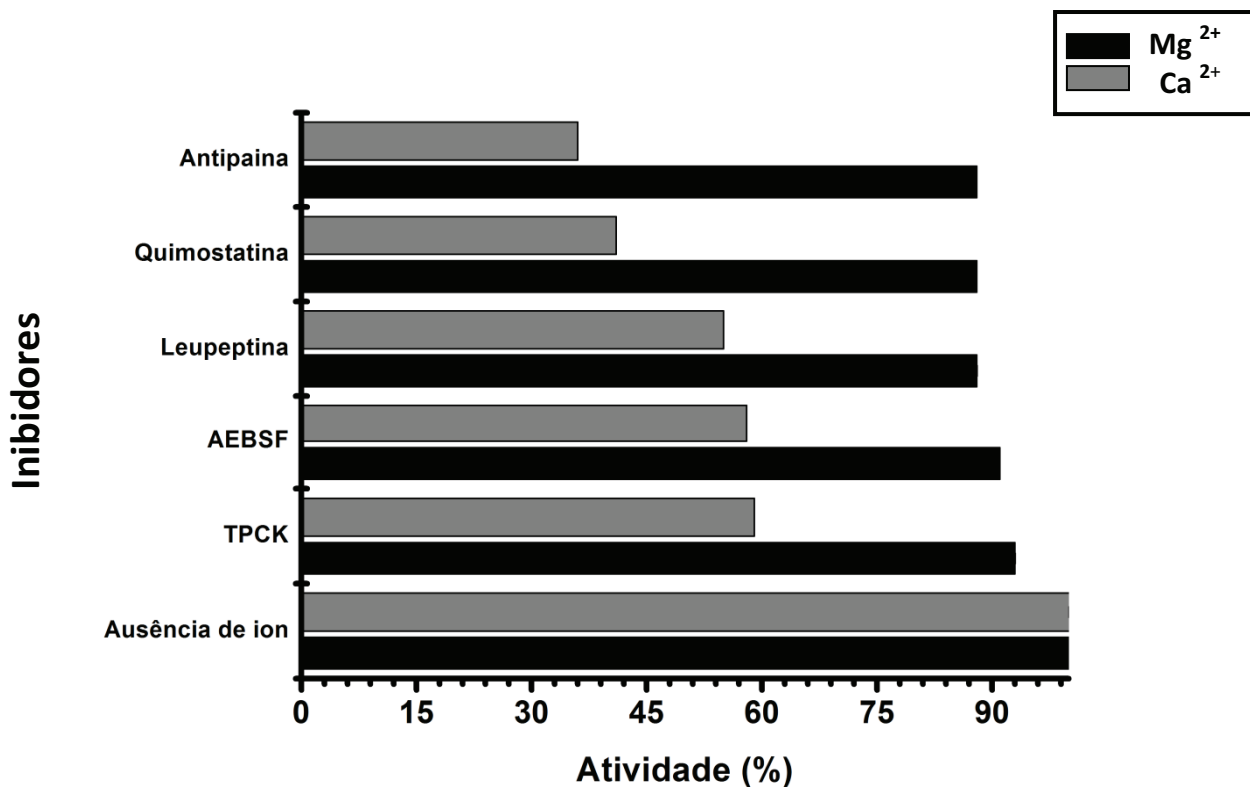


Figura 9. Efeito de inibidores de serino-proteases sobre a atividade ADPásica salivar de *D. maxima*. A saliva foi pré-incubada com diferentes inibidores de serino proteases por 10 min a 37 °C. Utilizando microplaca de 96 poços, a reação foi iniciada incubando-se a saliva, na diluição de 1/8 de glândula, com o tampão de atividade contendo Ca²⁺ ou Mg²⁺ e ADP 2 mM, por 20 min a 37 °C. Posteriormente a amostra foi incubada com reagentes que conferem a cor azulada ao fosfato e a absorbância foi medida a 630 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.



A saliva do triatomíneo *D. maxima* inibe a agregação plaquetária induzida por ADP

Com o objetivo de investigar a inibição da agregação plaquetária induzida pelo ADP, PRP humano foi incubado com diferentes diluições de saliva de *D. maxima*. A agregação plaquetária induzida por 5 μ M ADP em 400 μ L de PRP foi completamente inibida na presença de 1/4 do extrato de uma glândula salivar. O ensaio com 1/8 do extrato de glândula perde bastante eficiência, havendo aproximadamente 60% de agregação. O controle foi feito na ausência de saliva e atingiu aproximadamente 90% de agregação (Figura 10).

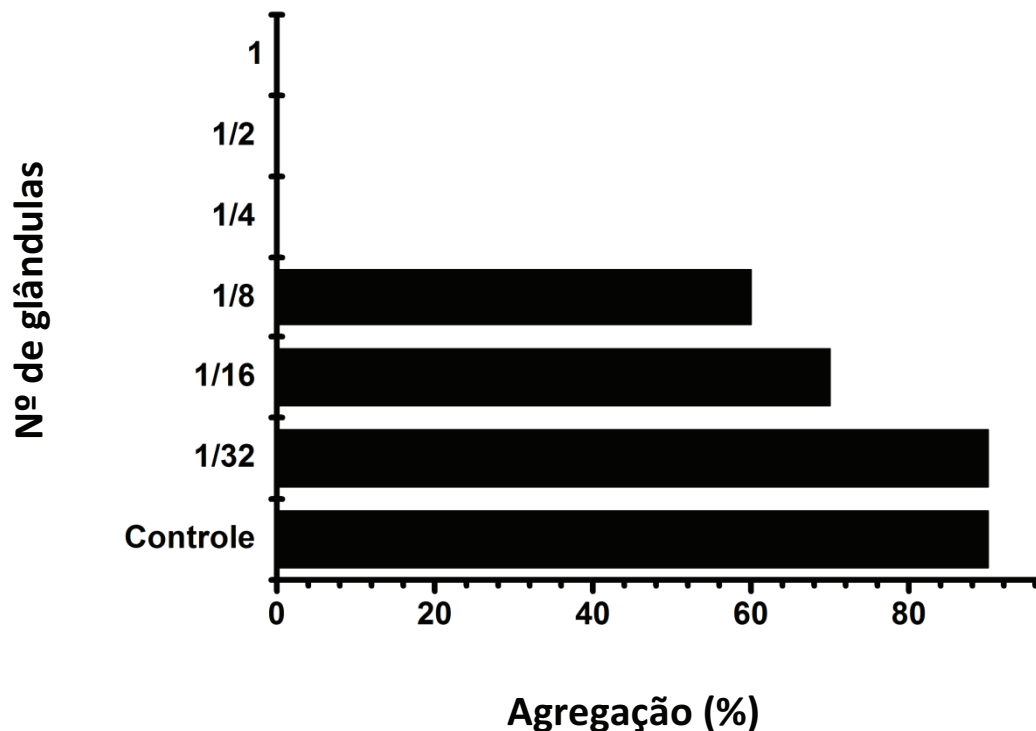


Figura 10. Inibição de agregação plaquetária induzida por ADP na presença de saliva de *D. maxima*. A inibição completa da agregação plaquetária foi obtida com 1/4 de extrato total de glândula salivar. Experimento realizado em triplicata. 400 μ L de PRP foram incubados sob agitação a 37 °C na presença de diferentes diluições de saliva por 4 min. Em seguida foi adicionado ADP 5 μ M (final) e a agregação plaquetária foi medida em agregômetro.

A saliva de *D. maxima* é imunogênica

As duas bandas visualizadas no gel de atividade ADPásica realizado com amostra reduzida sob ação do β -ME foram utilizadas para a produção de anticorpos.

As imunizações em camundongos com as bandas protéicas que apresentaram atividade apirásica foram suficientemente antigênica para a produção de soro (anti-apirase de 160 kDa, Figura 11, A e B; soro anti-apirase de 220 kDa, Figura 11, C). Os soros produzidos contra cada uma das bandas reconheceram epítomos de ambas. Também apresentaram reação positiva com bandas de proteínas que não apresentaram atividade no zimograma, sugerindo uma separação dos oligômeros em subunidades sem atividade menores que 160 kDa, sob as condições realizadas. Soros pré-ímenes não produziram sinais positivos (dados não mostrados).

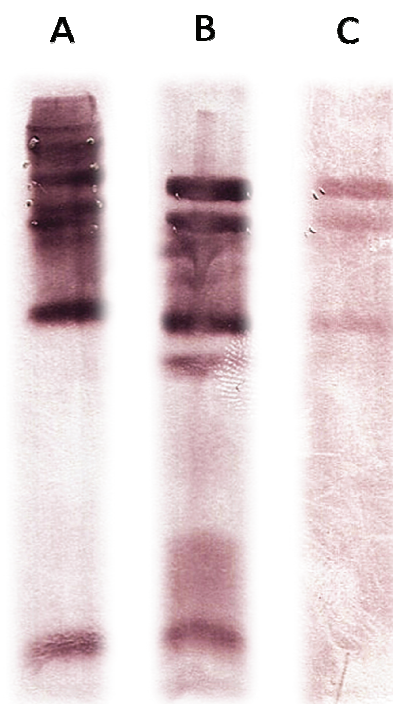


Figura 11. Imunodeteção anti-apirase em saliva de *D. maxima*. As membranas contendo extrato salivar total não reduzido (A) e extrato salivar total reduzido com β -ME (B) foram incubadas com o soro de camundongo anti-apirase de 160 kDa. O extrato salivar total reduzido com β -ME foi incubado com o soro anti-apirase de 220 kDa (C). Cada soro reconheceu tanto a apirase de 160 kDa quanto a de 220 kDa, além de proteínas que não apresentaram atividade no zimograma.

Ainda, o soro anti-apirase de 160 kDa de *D. maxima*, que mostrou uma marcação mais forte, foi capaz de reconhecer as apirases de 88 kDa e, mais sutilmente, a de 79 kDa da saliva do triatomíneo *T. infestans* (Figura 12), sugerindo a existência de epítomos similares entre as apirases dos triatomíneos em questão.

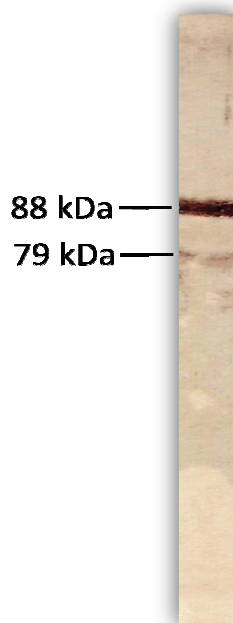


Figura 12. Imunodeteção anti-apirase em saliva de *T. infestans*. A membrana contendo extrato salivar total de *T. infestans* foi incubada com o soro de camundongo anti-apirase de 160 kDa. O soro reconheceu as apirases de 79 e 88 kDa da saliva de *T. infestans*.



A apirase de *D. maxima* apresenta homologia com a família 5'nucleotidase

Apesar da sequência apirásica obtida na biblioteca de cDNA na identificação por PMF ser truncada na região 5'a análise comparativa da sequência protéica de *D. maxima* pelo programa BLAST mostrou que a mesma apresenta domínio conservado relacionado à família apirásica 5'nucleotidase, denominado pfam02872, indicando que a apirase salivar do triatomíneo pertence a essa família. Além disso, o alinhamento da sequência parcial de *D. maxima* com as sequências protéicas de maior *score* na análise por BLAST revelou resíduos conservados e similares (Figura 13), e uma identidade de 52% e similaridade de 68% com a sequência de maior *score*, referente à apirase de 79 kDa de *T. infestans*, resultados indicativos de homologia.

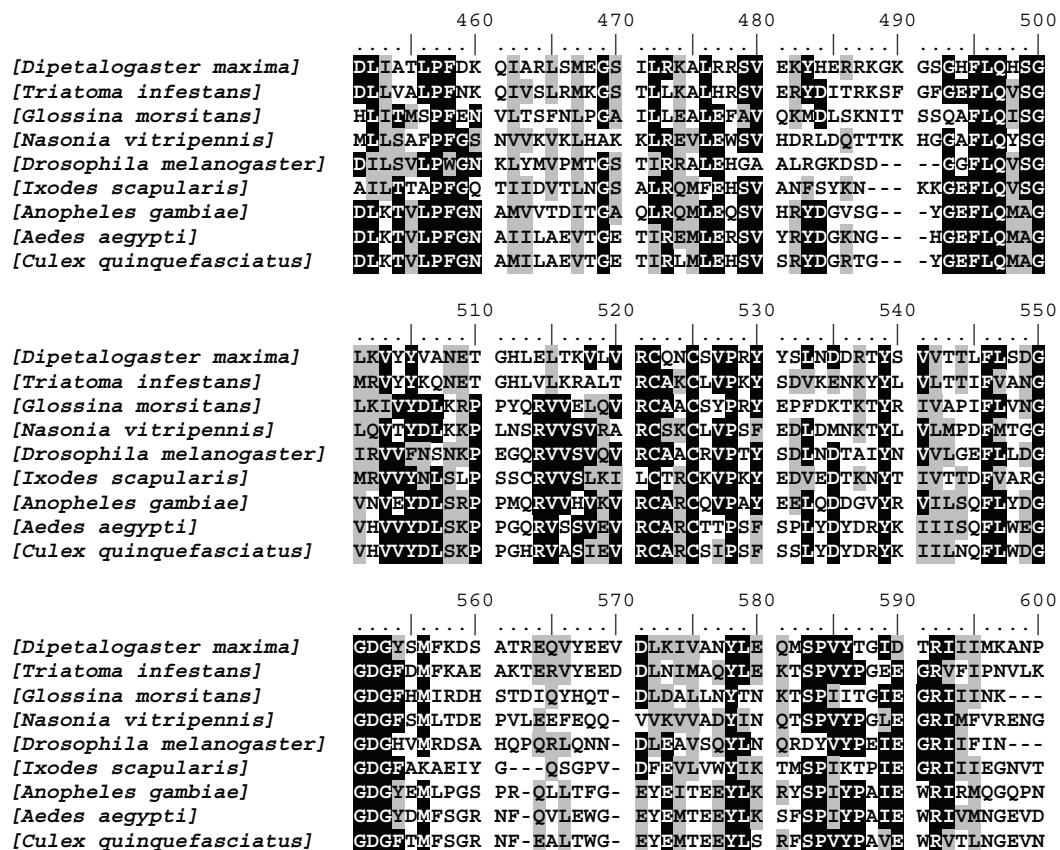


Figura 13. Alinhamento da sequência apirásica de *D. maxima* com membros da família apirásica 5'nucleotidase. A marcação em preto indica resíduos conservados e em cinza, resíduos similares.



DISCUSSÃO



O proteoma de *D. maxima*

A eletroforese bidimensional salivar de *D. maxima* revelou aproximadamente 150 proteínas com maior abundância entre 20 e 30 kDa. Sob as mesmas condições, a análise bidimensional de *T. infestans* revelou um número maior, 200 proteínas (Charneau, Junqueira *et alli*, 2007). Usando o programa MASCOT, a busca convencional no banco de dados do NCBI não obteve sucesso, resultado explicado pela ausência de sequências protéicas salivares de *D. maxima* no mesmo. Entretanto, o sucesso na identificação de suas proteínas salivares foi possível mediante busca feita diretamente na biblioteca de cDNA de *D. maxima*, construída por Assumpção e colaboradores (Assumpcao, Charneau *et alli*, 2011), presente no servidor interno, acesso restrito ao laboratório em que os trabalhos foram realizados. Essa biblioteca revelou 5 famílias putativas de proteínas secretadas pelas glândulas salivares de *D. maxima*: lipocalinas, antígenos-5, apirases, produtos relacionados à imunidade e hemolisinas.

Já a análise proteômica realizada neste trabalho indicou regiões correspondentes somente a 3 das 5 famílias descritas na biblioteca de cDNA: lipocalinas, antígenos-5 e apirases, componentes já observados na saliva de outros hematófagos. É possível que as demais famílias não tenham sido observadas porque não estão presentes no gel devido a baixa massa molecular, porque estão presentes em quantidades não detectáveis no gel 2D ou porque algumas proteínas apresentam as mesmas propriedades, em particular, mesmo *pI* e massa, assim o resultado observado não exclui a possibilidade da existência de outras famílias salivares em *D. maxima*.

Os resultados apresentaram proteínas com massas moleculares e pontos isoelétricos experimentais e teóricos distintos. É possível haver influência de modificações pós-traducionais como glicosilação, resultando em aumento das massas moleculares de algumas proteínas ou como fosforilação, no ponto isoelétrico.



Famílias

Lipocalinas

O proteoma de *D. maxima* realizado neste trabalho indicou uma grande região de lipocalinas, representando 37 manchas das 47 identificadas. Entretanto, foi identificada somente uma lipocalina específica, referente à sequência protéica Dm-1049, putativa à palidipina. Pode ser observada nas manchas 23, 24 e 25 identificadas no gel bidimensional. No proteoma de *T. infestans*, Charneau e colaboradores (2007) encontraram uma maior diversidade nesse grupo, observando lipocalinas putativas à infestilina, triplatina e palidipina. Apesar dessa discrepância, não é possível sugerir uma menor diversidade salivar em *D. maxima*, visto que o alinhamento das sequências das lipocalinas obtidas na biblioteca de cDNA por Assunção e colaboradores (2011) indicou sequências próximas aos grupos representados por: procalina, triplatina e triafestina.

As lipocalinas formam uma família de proteínas amplamente distribuída, exibindo grande diversidade sequencial e funcional dentro e entre espécies. Já foram demonstradas funções como: transporte, síntese enzimática, imunomodulação, olfação, sinalização por ferormônio, regulação do ciclo celular e coloração em invertebrados (Flower, 1996).

Geralmente as lipocalinas agem ligando-se a pequenas moléculas hidrofóbicas, mas também podem interagir com receptores de superfície celular ou macromoléculas solúveis. Apresentam sequências peptídicas pouco similares em contraste com uma estrutura tridimensional conservada: um barril com 8 fitas-beta antiparalelas formando uma cavidade central hidrofóbica de interação com o ligante (Flower, 1996). Os loops que conectam as folhas- β são flexíveis e toleram substituições na cadeia de aminoácidos sem alterar o dobramento da proteína (Andersen, Gudderra *et alli*, 2005). É exatamente a flexibilidade na composição desses loops que permite os diferentes modos de interação das lipocalinas, capazes de acomodar ligantes de tamanhos, formas e características químicas distintas (Flower, North *et alli*, 2000).

Na saliva de hematófagos como carrapatos e triatomíneos, as lipocalinas salivares são abundantemente expressas, mas não em dípteros ou pulgas. Nos carrapatos, tem funções associadas com ligação à histamina e serotonina, às imunoglobulinas, além de atividade anti-complemento e propriedades tóxicas (Francischetti, Sa-Nunes *et alli*, 2009).



Dentre os triatomíneos, o hematófago melhor caracterizado é o *Rhodnius prolixus*. Nessa espécie foi descrito um grupo de proteínas heme de aproximadamente 20 kDa, denominadas nitroforinas. Essas lipocalinas podem sequestrar histamina liberada pelos mastócitos do hospedeiro, reduzindo a inflamação e a resposta imune. Ou, podem ainda, estocar e liberar óxido nítrico (ON), culminando com vasodilatação (Walker, 2005).

As nitroforinas se ligam ao gás instável ON por longos períodos através de um grupamento heme, o qual estabiliza o gás nas glândulas salivares do inseto para liberá-lo após diluição e aumento de pH quando a saliva é injetada no hospedeiro (Noeske-Jungblut, Haendler *et alli*, 1995). A histamina do hospedeiro se liga ao mesmo grupo heme que o ON, tornando a liberação do gás irreversível (Walker, 2005). A terceira função conhecida para as nitroforinas de *R. prolixus* é responsável por inibir a coagulação sanguínea do hospedeiro, evitando a transformação do fator X em Xa. O mecanismo exato não é conhecido, mas não requer o grupamento heme (Montfort, Weichsel *et alli*, 2000).

O segundo grupo de lipocalinas encontrado na saliva de *R. prolixus* é denominado RPAI e inibe a agregação plaquetária induzida por pequenas doses de ADP (Francischetti, Andersen *et alli*, 2002). Ainda nesse triatomíneo foi descrita por Andersen (Andersen, Francischetti *et alli*, 2003) uma lipocalina denominada ABP (*amine-binding protein*), a qual se liga às aminas biogênicas: serotonina, epinefrina e norepinefrina. Fisiologicamente age como inibidor da vasoconstrição estimulada por norepinefrina. Também age como inibidor de agregação plaquetária, se ligando à serotonina e à epinefrina liberadas pelos grânulos densos de plaquetas ativadas (Andersen, Francischetti *et alli*, 2003).

Componentes salivares da espécie *Triatoma pallidipennis* também já foram estudados, sendo possível conhecer o anticoagulante denominado triabina, o qual inibe trombina na cascata de coagulação formando um complexo não-covalente (Noeske-Jungblut, Haendler *et alli*, 1995). A segunda sialogenina descrita é um anti-hemostático de 19 kDa denominado palidipina. Essa molécula também foi encontrada no proteoma de *D. maxima* e é responsável por bloquear a agregação plaquetária mediada por colágeno, não sendo influenciada por agonistas como ADP e trombina (Noeske-Jungblut, Kratzschmar *et alli*, 1994).

Já na espécie *Triatoma protracta* foi descrita uma lipocalina de 19 kDa com atividade alérgica denominada procalina (Paddock, McKerrow *et alli*, 2001). E em *T. infestans* a triplatina foi caracterizada por inibir agregação plaquetária induzida por colágeno



(Morita, Isawa *et alli*, 2006) e a triafestina por ação anti-coagulante e anti-inflamatória (Isawa, Orito *et alli*, 2007). As três moléculas foram encontradas no transcriptoma de *D. maxima*.

Somente uma lipocalina salivar de *D. maxima* foi caracterizada funcionalmente e foi denominada como dipetalodipina. Com 18 kDa, tem similaridade de sequência com a palidipina, proteína que inibe agregação mediada por colágeno. Assumpção e colaboradores (Assumpcao, Alvarenga *et alli*, 2010) sugerem que a lipocalina de *D. maxima* tem propriedade anti-hemostática multifuncional, atenuando a agregação plaquetária e a vasoconstrição, e bloqueando a angiogênese mediante sua ligação à distintos eicosanóides envolvidos na hemostasia.

Os dados obtidos no proteoma de *D. maxima* sugerem similaridades entre *D. maxima* e outros triatomíneos do gênero *Triatoma*. Além disso, corroboram a importância das lipocalinas, as quais representam 78% das proteínas identificadas, abundância também encontrada no sialoma de *T. brasiliensis* 93% (Santos, Ribeiro *et alli*, 2007), além de se destacarem na saliva de *T. infestans* (Charneau, Junqueira *et alli*, 2007) e *R. prolixus* (Ribeiro, Andersen *et alli*, 2004). A redundante presença das lipocalinas é certamente relevante, pois apresentam mecanismos de ação e funções distintas, agindo como vasodilatadores, redutores de inflamação, anticoagulantes ou anti-agregadores plaquetários. Permanece o desafio de realizar estudos significativos sobre as lipocalinas, pois muito da riqueza funcional dessas proteínas ou até mesmo uma proteína exclusiva em *D. maxima* ainda pode ser descoberta a fim de explicar o sucesso adaptativo do repasto.

Antígeno-5

Cinco manchas no gel foram identificadas como proteínas putativas aos antígenos-5, de 13 a 17, próximos a 30 kDa. Esse grupo de proteínas pertence à família CAP, a qual inclui proteínas secretórias ricas em cisteína, encontradas em mamíferos e sintetizadas por neutrófilos e macrófagos em resposta à infecção. Também foram relacionadas à patogênese em plantas, sendo sintetizadas em resposta à estresse ambiental, inclusive infecções (Nobile, Noceti *et alli*, 1996; Megraw, Kaufman *et alli*, 1998). Além disso, pode atuar no relaxamento muscular quando presente em veneno de cobra (Yamazaki,



Koike *et alli*, 2002) ou pode atuar como neurotoxina quando presente no veneno de lagartos (Nobile, Noceti *et alli*, 1996).

O grupo de proteínas dos antígenos-5 também faz parte da composição do veneno de vespas e formigas junto à hialuronidase e fosfolipase A1, todas essas moléculas são ativas como alérgenos em mamíferos (Fang, Vitale *et alli*, 1988; Hoffman, 1993). O veneno pode ser usado tanto para defesa contra predadores ou na captura de presas (Megraw, Kaufman *et alli*, 1998).

Apesar dos antígeno-5 já terem sido encontrados em hematófagos dos gêneros *Aedes* (Valenzuela, Pham *et alli*, 2002; Ribeiro, Arca *et alli*, 2007) e *Anopheles* (Arca, Lombardo *et alli*, 2005), a maioria dessas proteínas ainda não possui uma função salivar bem estabelecida. Podem agir como moduladores da resposta imune do hospedeiro, como o exemplificado no díptero *Stomoxys calcitrans*, ligando-se às imunoglobulinas do hospedeiro (Ameri, Wang *et alli*, 2008). Ou podem se destacar por suas propriedades alérgicas, como foi demonstrado na saliva da mosca tse-tse, a qual induziu reação de hipersensibilidade em ratos (Caljon, Broos *et alli*, 2009).

Estudos futuros podem mostrar uma associação entre a família dos antígenos-5 da saliva dos triatomíneos e a indução de reações de hipersensibilidade no hospedeiro vertebrado, como por exemplo, o chagoma de inoculação e o sinal de Romaña, assim como na resposta imune do inseto em proteção a patógenos presentes nos seus hospedeiros.

Apirases

Uma pequena região, em padrão horizontal, de isoformas de apirase correspondente à sequência protéica Dm 68, pontos 1, 2, 3 e 4, pode ser observada. A apirase é uma enzima ubíqua, com ocorrência em diversos hematófagos como carrapatos, mosquitos, triatomíneos, pulgas e flebotomíneos, o que evidencia sua importância. A saliva desses artrópodes contém forte atividade apirásica e inibem a agregação plaquetária por meio da hidrólise de ATP e ADP em AMP e Pi (Ribeiro, Sarkis *et alli*, 1984; Ribeiro & Francischetti, 2003; Champagne, 2005).

Existem duas famílias de apirase descritas. Inicialmente uma proteína salivar com atividade apirásica foi isolada de *Aedes aegypti* por Champagne e colaboradores, 1995.



Esse trabalho demonstrou homologia com a família 5'nucleotidase previamente descrita em vertebrados (Champagne, Smartt *et alli*, 1995; Champagne, 2005). Posteriormente membros dessa mesma família foram descritos na saliva nas espécies *Anopheles gambiae* (Arca, Lombardo *et alli*, 2005) e *T. infestans* (Faudry, Lozzi *et alli*, 2004).

A segunda família apirásica foi primeiramente identificada no percevejo *Cimex lectularius* (Valenzuela, Charlab *et alli*, 1998), sendo denominada como família Cimex. Posteriormente foi descrita em *Lutzomyia longipalpis* (Charlab, Valenzuela *et alli*, 1999) e *Phlebotomus papatasi* (Valenzuela, Belkaid *et alli*, 2001).

As duas famílias diferem em suas propriedades farmacológicas. A família 5'nucleotidase apresenta atividade com os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} e tem pH ótimo próximo à 9,0, apesar de manter atividade forte em pH fisiológico. Já a família Cimex tem atividade somente na presença de Ca^{2+} e apresenta pH ótimo mais neutro (Champagne, 2005).

A região apirásica de *D. maxima* está presente na faixa de massa entre 94 e 95 kDa, na faixa de *pI* ácido, aproximadamente 5,0. Além disso, mostra o mesmo padrão horizontal de isoformas visualizado na análise da eletroforese 2D de *T. infestans*, distinguindo-se aparentemente o número de isoformas, cinco no segundo caso e ainda a determinar no primeiro, que poderia apresentar apenas uma. As isoformas de *T. infestans* variam em massa, de 88 a 67 kDa, e em *pI*, de 6,6 a 8,9 (Charneau, Junqueira *et alli*, 2007). O resultado sugere que a saliva de *T. infestans* contém uma maior diversidade de apirases quando comparado com a saliva do triatomíneo *D. maxima*.

Foi possível notar uma grande discrepância entre a massa apirásica teórica, kDa, e experimental, kDa (Tabela 3), fato que pode ser explicado diante da observação de que a sequência apirásica presente no banco de cDNA, portanto a sequência obtida na identificação por PMF, é truncada na região 5' e por isso não está completa. Além disso, modificação pós-traducional como glicosilação também pode aumentar a massa experimental da proteína.

A presença de apirase na saliva de *D. maxima* reforça sua ubiquidade. Não foi surpresa notar a presença de proteínas com a mesma função, apirases e palidipinas, corroborando que os componentes salivares podem ser funcionalmente redundantes. Várias proteínas podem ter um único alvo, visto que a inibição da agregação plaquetária é um mecanismo fundamental para o sucesso do repasto.



SDS-PAGE e atividade em gel revelaram a presença de pontes dissulfeto em proteínas com atividade apirásica

O perfil eletroforético da amostra salivar de *D. maxima* na presença do agente redutor β -ME revelou proteínas com pontes dissulfeto na faixa de massa acima de 220 kDa, já que as múltiplas bandas observadas dão lugar à apenas três bandas, uma acima de 220, uma de 220 e outra de 160 kDa, quando a amostra é reduzida.

As múltiplas bandas na amostra não-reduzida sugerem a presença de heterogeneidade das pontes dissulfeto de cada banda protéica, condição que pode ser representada por um número variável de subunidades seguradas pelas pontes ou pela presença/ausência de pontes dissulfeto intra-cadeia (Faudry, Santana *et alli*, 2006). Além disso, a massa molecular estimada por SDS-PAGE deve ser considerada com restrição, já que pontes dissulfeto intra-cadeia são conhecidas por tornar a proteína mais compacta, fazendo com que a migração protéica fique mais rápida.

A saliva de *D. maxima* também foi utilizada na investigação da atividade ADPásica em gel e o mesmo padrão foi observado, mostrando que apesar do agente redutor alterar a estrutura dessas proteínas, as mesmas se mantêm ativas. Embora os monômeros apresentem atividade é possível que os mesmos sofram oligomerização a fim de conferir uma maior estabilidade à proteína, o que seria um ganho biológico na atividade enzimática. Outros estudos, como por exemplo purificação enzimática e ultracentrifugação analítica, são necessários para conhecer como a(s) apirase(s) de *D. maxima* são molecularmente organizada(s).

A atividade ADPásica de *D. maxima* apresenta similaridades com a atividade apirásica de *T. infestans*

Durante a investigação das propriedades bioquímicas da atividade apirásica da saliva foi possível observar uma maior atividade na presença dos íons Mg^{2+} , Co^{2+} e Mn^{2+} , enquanto o Ca^{2+} não influenciou a atividade da enzima, resultados similares aos encontrados por Faudry e colaboradores (2004) após estudos sobre as propriedades da apirase salivar purificada de *T. Infestans*. Já a presença dos íons Zn^{2+} e Cu^{2+} influenciaram negativamente a atividade, sugerindo que esses íons são possivelmente tóxicos para a enzima.



As análises da influência da temperatura e do pH na atividade apirásica na presença de Ca^{2+} revelaram uma temperatura ótima de 37 °C e um pH ótimo de 8,0 e novamente Faudry e colaboradores (2004), encontraram resultados similares com a apirase de *T. infestans* em ensaios na presença de Mg^{2+} . Os ensaios na presença dos inibidores indicaram perda significativa de atividade, destacando-se o TPCK. Esses resultados poderiam significar inibição direta da enzima pela alteração do domínio de ligação da enzima ao substrato, ou indireta, como por exemplo, o impedimento de algum processamento por serino proteases presentes na saliva em uma cascata que culminaria com a hidrólise de ADP. Futuros ensaios de purificação da apirase de *D. maxima* poderão resolver essa questão.

É importante ressaltar que os testes de atividade com tampão contendo Mg^{2+} foram distintos daqueles observados com Ca^{2+} , revelando que a atividade da enzima continua a ser ótima em 37 °C, mas que a influência da temperatura na atividade é menos marcante na presença do íon Mg^{2+} , sugerindo uma estabilização da proteína na presença desse íon. A análise da influência do pH revelou atividade alta por toda a faixa de pH que vai de 7 a 10, resultado novamente indicativo da estabilização da enzima na presença de Mg^{2+} . Além disso, a presença dos inibidores de serino proteases pouco influenciou a atividade ADPásica na presença de Mg^{2+} , mais uma vez indicando maior estabilização. Esses ensaios foram realizados com o extrato salivar total. A riqueza das proteínas salivares impede uma interpretação precisa dos resultados, mais testes com a apirase purificada são necessários para a elucidação dos resultados citados acima.

As análises da influência de íons, temperatura, pH e inibidores na atividade ADPásica de *D. maxima* sugerem características similares à atividade apirásica de *T. infestans*, como por exemplo, maior atividade na presença de Mg^{2+} , Co^{2+} e Mn^{2+} , temperatura ótima de 37 °C e pH ótimo próximo à 8,0. Achados que também sugerem que as proteínas com atividade ADPásica, atividade atribuída à apirase, presentes na saliva de *D. maxima* pertencem à família 5' nucleotidase, da qual também faz parte a apirase de *T. infestans*, já que funcionam não só na presença do íon Ca^{2+} , mas também na presença de Mg^{2+} .

Os resultados também revelaram a destreza das proteínas aqui observadas na presença do íon Mg^{2+} , as quais são pouco influenciadas por mudanças de temperatura e pH, mantendo boa atividade em diversas condições. O triatomíneo *D. maxima* é capaz de se alimentar em vertebrados diversos, por exemplo, lagartos e humanos, onde as condições



fisiológicas são significativamente distintas. Apresentar enzimas que mantêm sua atividade enzimática em diferentes condições é um ganho na adaptação do animal às diversas condições de sobrevivência. É possível que essas proteínas sejam fundamentais para o sucesso durante o repasto e provavelmente a evolução contribuiu para que essas proteínas exerçam atividade não só em animais de sangue quente, mas também em animais de sangue frio, mais fáceis de serem encontrados no ambiente natural de *D. maxima*.

A saliva de *D. maxima* inibe agregação plaquetária

O ensaio de inibição da agregação plaquetária revelou a complexidade molecular da saliva de *D. maxima* indicando que esses triatomíneos são biologicamente bem adaptados para a interação com o hospedeiro. É possível afirmar o triatomíneo em questão expressa em sua saliva uma quantidade de proteínas inibidoras de agregação plaquetária induzida por ADP suficiente para evitar agregação em plasma humano nas condições experimentais utilizadas. Para conhecer o papel fundamental das apirases nessa inibição é necessário purificar a enzima e a realizar novos testes, já que outras moléculas também poderiam participar do processo, por exemplo, algumas seqüestradoras de ADP.

A imunodeteccção revelou epítomos similares entre a apirase de *D. maxima* e *T. infestans*

Durante a análise da saliva de *D. maxima* com os anticorpos anti-apirase foi possível notar imunodeteccção cruzada entre as apirase de 220 e 160 kDa, revelando que as bandas apirásicas observadas em eletroforese unidimensional expressam epítomos similares. Essa observação pode ser confirmada pelo proteoma, no qual foi possível observar somente uma isoforma apirásica na saliva. A análise com os anticorpos também revelou a marcação de uma subunidade apirásica próxima à massa de 100 kDa, sugerindo que esse seja o monômero observado em 97 kDa no gel bidimensional. Com as informações obtidas até o momento não é possível sugerir se as diferentes bandas protéicas são oriundas de genes distintos ou mesmo se são transcritos diferentes de um mesmo gene, enfim, não é possível supor quantos são os genes para apirase em *D. maxima*.



O anticorpo anti-apirase de 160 kDa de *D. maxima* também reagiu com as bandas protéicas de 88 e 79 kDa da saliva de *T. infestans*, as bandas imunodetectadas correspondem àquelas encontradas por Faudry e colaboradores (2004). A imunodeteção cruzada observada nesse trabalho indica a existência de epítomos similares entre as apirases dos hematófagos em questão, sugerindo similaridade de sequência protéica.

O alinhamento da sequência apirásica de *D. maxima* confirmou homologia com a família 5'nucleotidase

A análise comparativa da sequência protéica de *D. maxima* pelo programa BLAST mostrou que a mesma apresenta domínios conservados relacionados à família apirásica 5'nucleotidase.

Apesar da sequência apirásica obtida na biblioteca de cDNA na identificação por PMF ser truncada na região 5', o alinhamento da mesma com a sequência apirásica de 79 kDa de *T. infestans* revelou uma identidade de 52% e similaridade de 68%, resultado representativo de homologia, corroborando os resultados obtidos na imunodeteção, os quais mostraram que as enzimas possuem epítomos similares.

O alinhamento com apirases membros da família 5'nucleotidase revelou resíduos conservados e similares, resultado novamente indicativo de homologia entre as sequências e reforçando que a apirase de *D. maxima* pertence a família 5'nucleotidase, resultado anteriormente sugerido na análise da atividade ADPásica da saliva, a qual demonstrou características similares à esse grupo de proteínas quando se mostrou ativa na presença tanto na presença do íon divalente Ca^{2+} , quanto na presença de Mg^{2+} .



CONCLUSÃO



Conclusões

O conjunto dos resultados observados no trabalho aqui apresentado, referente à saliva do triatomíneo hematófago *Dipetalogaster maxima*, permite concluir que:

1. A saliva apresenta uma composição protéica similar a outras já descritas em hematófagos e contém proteínas pertencentes às famílias: lipocalina, antígeno-5 e apirase;
 - 1.1 As lipocalinas formam o grupo mais abundante;
2. As proteínas com atividade apirásica apresentam pontes dissulfeto;
3. As proteínas com atividade apirásica exibem atividade similar à apirase de *T. infestans* e mantêm atividade em diferentes condições na presença de Mg^{2+} ;
4. A saliva inibe agregação plaquetária, *in vitro*, induzida por ADP;
5. Existe similaridade de sequência entre as apirases de *D. maxima* e de *T. infestans*;
6. A apirase de *D. maxima* pertence à família 5' nucleotidase;

Considerações finais e perspectivas

A análise proteômica realizada neste trabalho proporcionou uma colaboração com o grupo coordenado pelo Prof. José M. Ribeiro, NIH, trabalho disponível no anexo 1. Os resultados revelaram que o triatomíneo *Dipetalogaster maxima* apresenta uma composição salivar similar ao encontrado em outros triatomíneos, abundante em lipocalinas e com a presença de proteínas apirásicas. Posteriormente as proteínas encontradas podem ser isoladas e estudadas a fim de se conhecer seus mecanismos de ação.

Os ensaios de investigação das propriedades apirásicas da saliva indicaram uma boa atividade em diversas condições. Contudo, ensaios com a enzima purificada podem trazer resultados mais apurados. A purificação também pode ser útil para o conhecimento do papel essencial da apirase na inibição da agregação plaquetária *in vitro* e para experimentos de ultracentrifugação analítica a fim de investigar a organização molecular da proteína.

A análise proteômica salivar ajuda a compor o sialoma, o qual constitui um ponto de partida na pesquisa das sialogeninas e seus mecanismos de ação, contribuindo para uma



compreensão da saliva não só no contexto da biologia do animal e a da hematofagia, mas também na dinâmica estabelecida entre vetor-parasito-hospedeiro. Além disso, descrever as propriedades farmacológicas dessas proteínas e seus mecanismos de ação abre caminhos para a pesquisa de novas moléculas terapêuticas úteis em distúrbios de origem vascular.

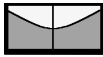


REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

- Ameri, M., X. Wang, et al. (2008). "An immunoglobulin binding protein (antigen 5) of the stable fly (Diptera: Muscidae) salivary gland stimulates bovine immune responses." J Med Entomol **45**(1): 94-101.
- Andersen, J. F., I. M. Francischetti, et al. (2003). "Inhibition of hemostasis by a high affinity biogenic amine-binding protein from the saliva of a blood-feeding insect." J Biol Chem **278**(7): 4611-7.
- Andersen, J. F., N. P. Gudderra, et al. (2005). "The role of salivary lipocalins in blood feeding by *Rhodnius prolixus*." Arch Insect Biochem Physiol **58**(2): 97-105.
- Andersen, J. F. and W. R. Montfort (2000). "The crystal structure of nitrophorin 2. A trifunctional antihemostatic protein from the saliva of *Rhodnius prolixus*." J Biol Chem **275**(39): 30496-503.
- Andersen, J. F., V. M. Pham, et al. (2009). "Insight into the sialome of the Black Fly, *Simulium vittatum*." J Proteome Res **8**(3): 1474-88.
- Araujo, C. A., P. J. Waniek, et al. (2009). "An overview of Chagas disease and the role of triatomines on its distribution in Brazil." Vector Borne Zoonotic Dis **9**(3): 227-34.
- Arca, B., F. Lombardo, et al. (2007). "An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*." Insect Biochem Mol Biol **37**(2): 107-27.
- Arca, B., F. Lombardo, et al. (2005). "An updated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Anopheles gambiae*." J Exp Biol **208**(Pt 20): 3971-86.
- Assumpcao, T. C., P. H. Alvarenga, et al. (2010). "Dipetalodipin, a novel multifunctional salivary lipocalin that inhibits platelet aggregation, vasoconstriction, and angiogenesis through unique binding specificity for TXA₂, PGF₂alpha, and 15(S)-HETE." J Biol Chem **285**(50): 39001-12.
- Assumpcao, T. C., S. Charneau, et al. (2011). "Insight into the Salivary Transcriptome and Proteome of *Dipetalogaster maxima*." J Proteome Res.
- Assumpcao, T. C., I. M. Francischetti, et al. (2008). "An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease." Insect Biochem Mol Biol **38**(2): 213-32.
- Badauy R., Silva I. , et al. (2000). "Ecologia, comportamento e e bionomia. Relação Interespecífica entre *Dipetalogaster maximus* Uhler (Hemiptera: Reduviidae) e a Cepa y do *Trypanosoma cruzi* Chagas (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)." An. Soc. Entomol. Brasil **29**(4): 659-666.
- Blum, H., H. Beier, et al. (1987). "Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels." Electrophoresis **8**(2): 93-99.
- Brener, Z., Andrade, Z.A. and Barral-Neto, M (2000). Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara.
- Caljon, G., K. Broos, et al. (2009). "Identification of a functional Antigen5-related allergen in the saliva of a blood feeding insect, the tsetse fly." Insect Biochem Mol Biol **39**(5-6): 332-41.
- Calvo, E., A. Dao, et al. (2007). "An insight into the sialome of *Anopheles funestus* reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families." Insect Biochem Mol Biol **37**(2): 164-75.
- Calvo, E., F. Tokumasu, et al. (2007). "Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, integrin alpha2beta1, and von Willebrand factor." J Biol Chem **282**(37): 26928-38.
- Castro, H. C. F., Bruno Leal Alves; Nagashima, Tammy; Schueler, Ana; Rueff, Carlos; Camisasca, Danielle; Moreira, Gisele; Scovino, Gloria; Borges, Luciana; Leal, Maria; Filgueira, Marilene; Paschoal, Patricia; Bernardo, Vagner; Bourguinhon, Saulo; Rodrigues, Carlos Rangel; Santos, Dilvani Oliveira. (2006). "Plaquetas: ainda um alvo terapeutico " J. bras. patol. med. lab **42**(5): 321-332.
- Champagne, D. E. (2005). "Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods." Pathophysiol Haemost Thromb **34**(4-5): 221-7.



- Champagne, D. E. and J. M. Ribeiro (1994). "Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(1): 138-42.
- Champagne, D. E., C. T. Smartt, et al. (1995). "The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(3): 694-8.
- Charlab, R., J. G. Valenzuela, et al. (1999). "Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 15155-60.
- Charneau, S., M. Junqueira, et al. (2007). "The saliva proteome of the blood-feeding insect *Triatoma infestans* is rich in platelet-aggregation inhibitors." Int. J. Mass Spectrom. **268**(1): 265-276.
- Chmelar, J., J. M. Anderson, et al. (2008). "Insight into the sialome of the castor bean tick, *Ixodes ricinus*." BMC Genomics **9**: 233.
- Ciprandi, A., F. Horn, et al. (2003). "Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes." Rev. bras. hematol. hemoter. **25**(4): 250-262.
- Coura, J. R. and J. Borges-Pereira (2010). "Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review." Acta Trop **115**(1-2): 5-13.
- Coura, J. R. and J. C. Dias (2009). "Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery." Mem Inst Oswaldo Cruz **104 Suppl 1**: 31-40.
- de Souza, W., T. M. de Carvalho, et al. (2010). "Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction." Int J Cell Biol **2010**.
- Dias, J. C. (2007). "Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives." Mem Inst Oswaldo Cruz **102 Suppl 1**: 11-8.
- Dias, J. C. (2009). "Elimination of Chagas disease transmission: perspectives." Mem Inst Oswaldo Cruz **104 Suppl 1**: 41-5.
- Fang, K. S., M. Vitale, et al. (1988). "cDNA cloning and primary structure of a white-face hornet venom allergen, antigen 5." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(3): 895-9.
- Faudry, E., S. P. Lozzi, et al. (2004). "*Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family." J Biol Chem **279**(19): 19607-13.
- Faudry, E., J. M. Santana, et al. (2006). "Salivary apyrases of *Triatoma infestans* are assembled into homo-oligomers." Biochem J **396**(3): 509-15.
- Fiske and Subbarow (1925). "The colorimetric determination of phosphorus." JBC **66**: 375-400.
- Flower, D. R. (1996). "The lipocalin protein family: structure and function." Biochem J **318 (Pt 1)**: 1-14.
- Flower, D. R., A. C. North, et al. (2000). "The lipocalin protein family: structural and sequence overview." Biochim Biophys Acta **1482**(1-2): 9-24.
- Francischetti, I. M. (2010). "Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals." Toxicon **56**(7): 1130-44.
- Francischetti, I. M., J. F. Andersen, et al. (2002). "Biochemical and functional characterization of recombinant *Rhodnius prolixus* platelet aggregation inhibitor 1 as a novel lipocalin with high affinity for adenosine diphosphate and other adenine nucleotides." Biochemistry **41**(11): 3810-8.
- Francischetti, I. M., E. Calvo, et al. (2010). "Insight into the Sialome of the Bed Bug, *Cimex lectularius*." J Proteome Res **9**(8): 3820-31.
- Francischetti, I. M., B. J. Mans, et al. (2008). "An insight into the sialome of the soft tick, *Ornithodoros parkeri*." Insect Biochem Mol Biol **38**(1): 1-21.
- Francischetti, I. M., A. Sa-Nunes, et al. (2009). "The role of saliva in tick feeding." Front Biosci **14**: 2051-88.
- Francischetti, I. M., J. G. Valenzuela, et al. (2002). "Toward a catalog for the transcripts and proteins (sialome) from the salivary gland of the malaria vector *Anopheles gambiae*." J Exp Biol **205**(Pt 16): 2429-51.
- Franco, R. (2001). "Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise." Simpósio: HEMOSTASIA E TROMBOSE. Medicina, Ribeirão Preto **34**: 229-237.



- Hoffman, D. R. (1993). "Allergens in Hymenoptera venom. XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity." J Allergy Clin Immunol **92**(5): 707-16.
- Isawa, H., Y. Orito, et al. (2007). "Identification and characterization of plasma kallikrein-kinin system inhibitors from salivary glands of the blood-sucking insect *Triatoma infestans*." FEBS J **274**(16): 4271-86.
- Jennings, L. K. (2009). "Role of platelets in atherothrombosis." Am J Cardiol **103**(3 Suppl): 4A-10A.
- Jimenez M. L. and P. C. (1999). "Incidencia de la chinche piedrera (*Dipetalogaster maximus*) (Hemiptera:Heteroptera:Reduviidae) vector de *Trypanosoma cruzi* en zonas urbanas de La Paz, Baja California Sur, Mexico." Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología **70**(2): 215-221.
- Jimenez, M. L., J. Llinas, et al. (2003). "Infection rates in *Dipetalogaster maximus* (Reduviidae: Triatominae) by *Trypanosoma cruzi* in the Cape Region, Baja California Sur, Mexico." J Med Entomol **40**(1): 18-21.
- Kahner, B. N., H. Shankar, et al. (2006). "Nucleotide receptor signaling in platelets." J Thromb Haemost **4**(11): 2317-26.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lerner, E. A., J. M. Ribeiro, et al. (1991). "Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*." J Biol Chem **266**(17): 11234-6.
- Lindoso, J. A. and A. A. Lindoso (2009). "Neglected tropical diseases in Brazil." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **51**(5): 247-53.
- Liyou, N., S. Hamilton, et al. (1999). "Cloning and expression of ecto 5-nucleotidase from the cattle tick *Boophilus microplus*." Insect Mol Biol **8**(2): 257-66.
- Lombardo, F., M. Di Cristina, et al. (2000). "Promoter sequences of the putative *Anopheles gambiae* apyrase confer salivary gland expression in *Drosophila melanogaster*." J Biol Chem **275**(31): 23861-8.
- Lopez, J. L. (2007). "Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **849**(1-2): 190-202.
- Lopez, M., K. Mende, et al. (2003). "Cloning, purification and biochemical characterization of dipetarudin, a new chimeric thrombin inhibitor." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **786**(1-2): 73-80.
- Mans, B. J. and J. M. Ribeiro (2008). "Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins." Insect Biochem Mol Biol **38**(9): 841-52.
- Marsden, P. D., A. C. Barreto, et al. (1979). "Improvements in routine xenodiagnosis with first instar *Dipetalogaster maximus* (Uhler 1894) (Triatominae)." Am J Trop Med Hyg **28**(4): 649-52.
- Marsden, P. D., C. C. Cuba, et al. (1979). "Report on a field collection of *Dipetalogaster maximus* (Hemiptera Triatominae) (Uhler, 1894)." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **21**(4): 202-6.
- Megraw, T., T. C. Kaufman, et al. (1998). "Sequence and expression of *Drosophila* Antigen 5-related 2, a new member of the CAP gene family." Gene **222**(2): 297-304.
- Mende, K., O. Petoukhova, et al. (1999). "Dipetalogastin, a potent thrombin inhibitor from the blood-sucking insect. *Dipetalogaster maximus* cDNA cloning, expression and characterization." Eur J Biochem **266**(2): 583-90.
- Mesquita, R. D., A. B. Carneiro, et al. (2008). "Trypanosoma cruzi infection is enhanced by vector saliva through immunosuppressant mechanisms mediated by lysophosphatidylcholine." Infect Immun **76**(12): 5543-52.
- Montfort, W. R., A. Weichsel, et al. (2000). "Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods." Biochim Biophys Acta **1482**(1-2): 110-8.
- Morita, A., H. Isawa, et al. (2006). "Identification and characterization of a collagen-induced platelet aggregation inhibitor, triplatin, from salivary glands of the assassin bug, *Triatoma infestans*." FEBS J **273**(13): 2955-62.
- Mousa, S. A. (2006). "Role of current and emerging antithrombotics in thrombosis and cancer." Drugs Today (Barc) **42**(5): 331-50.



- Nobile, M., F. Noceti, et al. (1996). "Helothermine, a lizard venom toxin, inhibits calcium current in cerebellar granules." Exp Brain Res **110**(1): 15-20.
- Noeske-Jungblut, C., B. Haendler, et al. (1995). "Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin." J Biol Chem **270**(48): 28629-34.
- Noeske-Jungblut, C., J. Kratzschmar, et al. (1994). "An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*." J Biol Chem **269**(7): 5050-3.
- OPAS (2002). O controle da doença de Chagas nos países do Cone Sul da América, Organização Pan Americana de Saúde.
- Paddock, C. D., J. H. McKerrow, et al. (2001). "Identification, cloning, and recombinant expression of procalin, a major triatomine allergen." J Immunol **167**(5): 2694-9.
- Prata, A. (2001). "Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease." Lancet Infect Dis **1**(2): 92-100.
- Punukollu, G., R. M. Gowda, et al. (2007). "Clinical aspects of the Chagas' heart disease." Int J Cardiol **115**(3): 279-83.
- Ribeiro, J. M., J. Andersen, et al. (2004). "Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*." Insect Biochem Mol Biol **34**(1): 61-79.
- Ribeiro, J. M., B. Arca, et al. (2007). "An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*." BMC Genomics **8**: 6.
- Ribeiro, J. M., R. Charlab, et al. (2004). "An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*." Insect Biochem Mol Biol **34**(6): 543-63.
- Ribeiro, J. M. and I. M. Francischetti (2003). "Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives." Annu Rev Entomol **48**: 73-88.
- Ribeiro, J. M., J. J. Sarkis, et al. (1984). "Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate." Comp Biochem Physiol B **79**(1): 81-6.
- Santos, A., J. M. Ribeiro, et al. (2007). "The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae)." Insect Biochem Mol Biol **37**(7): 702-12.
- Stutzer, C., B. J. Mans, et al. (2009). "Ornithodoros savignyi: soft tick apyrase belongs to the 5'-nucleotidase family." Exp Parasitol **122**(4): 318-27.
- Valenzuela, J. G., Y. Belkaid, et al. (2001). "The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel *Cimex* family of apyrases." J Exp Biol **204**(Pt 2): 229-37.
- Valenzuela, J. G., R. Charlab, et al. (1998). "Purification, cloning, and expression of an apyrase from the bed bug *Cimex lectularius*. A new type of nucleotide-binding enzyme." J Biol Chem **273**(46): 30583-90.
- Valenzuela, J. G., I. M. Francischetti, et al. (2002). "Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*." J Exp Biol **205**(Pt 18): 2843-64.
- Valenzuela, J. G., I. M. Francischetti, et al. (2003). "Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito." Insect Biochem Mol Biol **33**(7): 717-32.
- Valenzuela, J. G., I. M. Francischetti, et al. (1999). "Purification, cloning, and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*." Biochemistry **38**(34): 11209-15.
- Valenzuela, J. G., V. M. Pham, et al. (2002). "Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*." Insect Biochem Mol Biol **32**(9): 1101-22.
- Valenzuela, J. G., F. A. Walker, et al. (1995). "A salivary nitrophorin (nitric-oxide-carrying hemoprotein) in the bedbug *Cimex lectularius*." J Exp Biol **198**(Pt 7): 1519-26.
- Varga-Szabo, D., I. Pleines, et al. (2008). "Cell adhesion mechanisms in platelets." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(3): 403-12.
- Walker, F. A. (2005). "Nitric oxide interaction with insect nitrophorins and thoughts on the electron configuration of the {FeNO}6 complex." J Inorg Biochem **99**(1): 216-36.
- WHO (2006). Neglected tropical diseases, hidden successes, emerging opportunities, World Health Organization.
- WHO (2010). First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva, Switzerland, World Health Organization.



Yamazaki, Y., H. Koike, et al. (2002). "Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction." Eur J Biochem **269**(11): 2708-15.



ANEXO 1

Insight into the Salivary Transcriptome and Proteome of *Dipetalogaster maxima*

Teresa C. F. Assumpção,[†] Sébastien Charneau,[‡] Paula B. M. Santiago,[‡] Ivo M. B. Francischetti,[†]
 Zhaojing Meng,[§] Carla N. Araújo,[‡] Van M. Pham,[†] Rayner M. L. Queiroz,[‡]
 Cleudson Nery de Castro,[‡] Carlos André Ricart,[‡] Jaime M. Santana,^{*‡} and José M. C. Ribeiro^{*†}

Vector Biology Section, Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, 12735 Twinbrook Parkway, Rockville, Maryland 20852, United States, Laboratory of Proteomics and Analytical Technologies, SAIC Frederick, Inc., National Cancer Institute at Frederick, National Institutes of Health, Frederick, Maryland, United States, and Department of Cell Biology, Department of Tropical, Medicine, and Faculty of Ceilândia, The University of Brasília, Brasília, Brazil

Received August 24, 2010

Dipetalogaster maxima is a blood-sucking Hemiptera that inhabits sylvatic areas in Mexico. It usually takes its blood meal from lizards, but following human population growth, it invaded suburban areas, feeding also on humans and domestic animals. Hematophagous insect salivary glands produce potent pharmacologic compounds that counteract host hemostasis, including anticlotting, antiplatelet, and vasodilatory molecules. To obtain further insight into the salivary biochemical and pharmacologic complexity of this insect, a cDNA library from its salivary glands was randomly sequenced. Salivary proteins were also submitted to one- and two-dimensional gel electrophoresis (1DE and 2DE) followed by mass spectrometry analysis. We present the analysis of a set of 2728 cDNA sequences, 1375 of which coded for proteins of a putative secretory nature. The saliva 2DE proteome displayed approximately 150 spots. The mass spectrometry analysis revealed mainly lipocalins, pallidipins, antigen 5-like proteins, and apyrases. The redundancy of sequence identification of saliva-secreted proteins suggests that proteins are present in multiple isoforms or derive from gene duplications.

Keywords: saliva • hematophagy • transcriptome • proteome • triatomine • *D. maxima*

Introduction

Dipetalogaster maxima (Hemiptera: Reduviidae), the largest triatomine known, lives in the southern area of Baja California Sur, Mexico. Although more closely related to the genus *Triatoma*, the gross anatomy and physiology of *D. maxima* (Dm) is practically identical to the phylogenetically more distant, but well studied bug *Rhodnius prolixus*, except for its size, which can reach 5 cm long as adults; each instar can be about six times larger than the corresponding one in *Rhodnius*.^{1,2} It resides in dry rocky areas, and its large size allows it to store a greater amount of blood and to survive fasting in semidesert weather.³ It is an aggressive biter, attacking avidly when hungry, day or night, feeding on any available vertebrate—including humans—within the environment.^{4,5} Although Dm is typically from sylvatic environments where it feeds on lizards, its adaptation to humans has been documented in La Paz, the capital city of Baja California Sur.⁶ Many populations of this blood-sucking bug are naturally infected with the protozoan

parasite *Trypanosoma cruzi* (American trypanosomiasis), the etiologic agent of Chagas' disease, but its role in transmission of *T. cruzi* to the human host is unknown.^{3,7}

Blood-feeding arthropods show a variety of antihemostatic compounds in their salivary glands (SGs) that help them obtain the blood meal.^{8,9} Hematophagous insects are able to counteract host hemostatic responses triggered to prevent blood loss following tissue injury, such as vasoconstriction, blood coagulation, and platelet aggregation.¹⁰ The sialome (set of RNA message + set of proteins found in SGs) of blood-sucking arthropods previously described^{11–13} has revealed a more complex composition than expected and the presence of many proteins to which we cannot yet ascribe a function. There has been no detailed report of Dm saliva and SG content, even though it, like other triatomines,¹⁴ is able to avoid host hemostasis.

In this work, we present the analysis of a set of 2728 SG cDNA sequences, 1375 of which code for proteins of a putative secretory nature. Most salivary proteins were described as lipocalins, corresponding to 93% of the transcripts coding for putative secretory proteins. Lipocalins are a large and heterogeneous group of proteins that play various roles, mainly as carriers of small ligands in vertebrates and invertebrates.¹⁵ A great array of SG proteins belonging to the lipocalin family has generated a large number of different molecules having anti-

* To whom correspondence should be addressed. J.M.C.R. Phone: 301.496.9389. Fax: 301 480.2571. E-mail: jrbeiro@niaid.nih.gov. J.M.S. Phone: 61 31073055. Fax: 61 31072904. E-mail: jsantana@unb.br.

[†] National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health.

[§] National Cancer Institute at Frederick, National Institutes of Health.

[‡] The University of Brasília.

hemostatic functions while maintaining the fundamental structure of the protein fold.¹⁶ Lipocalins were found in the saliva of other blood-sucking triatomine bugs such as *Rhodnius prolixus*,¹⁷ *Triatoma brasiliensis*,¹⁸ *Triatoma infestans* (Ti),^{19,20} and also in tick saliva.²¹

We expect this work will contribute with new salivary transcripts that could help us understand the role of salivary molecules in host/vector interactions and the evolutionary mechanisms leading to insect adaptation to this feeding habit.

Materials and Methods

Dm and SG cDNA Library Construction. Dm were reared in an insectary room in the Tropical Medicine Department, University of Brasilia. They were kept at 27 °C ± 1.0 °C with a relative humidity of 70–75% and a 16 h/8 h light/dark photoperiod. SGs were dissected from Vth instar nymphs and adults 7 days after a blood meal and transferred to RNA-Later (Ambion, Austin, TX) solution in 1.5-ml polypropylene vials. SGs were kept at –20 °C for isolating polyA+ RNA.

Dm SG mRNA was isolated from 15 SG pairs from Vth instar nymphs and adults using the Micro-FastTrack mRNA isolation kit (Invitrogen, San Diego, CA). The PCR-based cDNA library was made following the instructions for the SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) cDNA library construction kit (Clontech, Palo Alto, CA). This kit provides a method for producing high-quality, full-length cDNA libraries from nanogram quantities of polyA+ or total RNA. It utilizes a specially designed oligonucleotide named SMART IV in the first-strand synthesis to generate high yields of full-length, double-stranded cDNA. Dm SG polyA+ RNA was used for reverse transcription to cDNA using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Clontech), SMART IV oligonucleotide, and CDS III/3' primer (Clontech). Trehalose was added to the reaction that was carried out at 60 °C for 1 h, then at 42 °C for 40 min. Second-strand synthesis was performed according to a long-distance PCR-based protocol using the 5' PCR primer and CDS III/3' primer as sense and antisense primers, respectively. These two primers also create *Sfi*I and *B* restriction enzyme sites at the end of the cDNA. Advantage Taq polymerase mix (Clontech) was used to carry out long-distance PCR reaction on a GeneAmp PCR system 9700 (Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA). The PCR conditions were: 95 °C for 1 min; 14 cycles of 95 °C for 10 s, 68 °C for 6 min. An aliquot of the cDNA was analyzed on a 1.1% agarose/EtBr (0.1 µg/mL) gel to check for the quality and range of the synthesized cDNA. Double-stranded cDNA was immediately treated with proteinase K (0.8 µg/mL) at 45 °C for 20 min and washed three times with water using Amicon filters with a 100-kDa cutoff (Millipore, Bedford, MA). The clean double-stranded cDNA was then digested with *Sfi*I restriction enzyme at 50 °C for 2 h followed by size fractionation on a ChromaSpin-400 drip column (Clontech). The profiles of the fractions were checked on a 1.1% agarose/EtBr (0.1 µg/mL), and fractions containing cDNA were pooled in three different groups according to size: large, medium, or small sequences. Each group was concentrated and washed three times with water using an Amicon filter with a 100-kDa cutoff. Concentrated cDNA was then ligated into a λ TriplEx2 vector (Clontech), and the resulting ligation mixture was packaged using GigaPack Gold III Plus packaging extract (Stratagene, La Jolla, CA) according to the manufacturer's instructions. The packaged library was plated by infecting log-phase XL1-Blue *Escherichia coli* cells (Clontech). The percent-

age of recombinant clones was determined by blue-white selection screening on LB/MgSO₄ plates containing X-gal/IPTG.

Sequencing of the Dm cDNA Library. The Dm SG cDNA library was plated on LB/MgSO₄ plates containing X-gal/IPTG to an average of 250 plaques per 150-mm Petri plate. Recombinant (white) plaques were randomly picked up and transferred to 96-well MicroTest U-bottom plates (BD BioScience, San Jose, CA) containing 75 µL of H₂O per well. The phage suspension was either immediately used for PCR or stored at 4 °C until use.

To amplify the cDNA using a PCR reaction, 4 µL of the phage sample were used as a template. The primers were sequences from the λ TriplEx2 vector and named PT2F1 (5'-AAG TACTCTAG-CAATTGTGAGC-3') and PT2R1 (5'-CTCTTCGCTATTACGC-CAGCTG-3'), positioned at the 5' and 3' end of the cDNA insert, respectively. The reaction was carried out in MicroAmp 96-well PCR plates (Applied Biosystems, Inc., Fullerton, CA) using FastStart PCR Master (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) on a GeneAmp PCR system 9700 (Perkin-Elmer Corp.). The PCR conditions were: 1 hold of 75 °C for 3 min, 1 hold of 94 °C for 4 min, 33 cycles of 94 °C for 1 min, 49 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min 20 s. The amplified products were analyzed on a 1.2% agarose/EtBr gel. cDNA library clones (2880 clones) were PCR amplified, and those showing a single band were selected for sequencing. The PCR products were used as a template for a cycle-sequencing reaction using a DTCS labeling kit (Beckman Coulter, Fullerton, CA). The primer used for sequencing (PT2F3) is upstream of the inserted cDNA and downstream of the PT2F1 primer. The sequencing reaction was performed on a Perkin-Elmer 9700 thermocycler. Conditions were 1 hold of 75 °C for 2 min, 1 hold of 94 °C for 4 min, and 30 cycles of 96 °C for 20 s, 50 °C for 20 s, and 60 °C for 4 min. After cycle-sequencing the samples, a cleaning step was performed using the multiscreen 96-well plate cleaning system (Millipore). The 96-well multiscreening plate was prepared by adding a fixed amount (manufacturer's specification) of Sephadex-50 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) and 300 µL of deionized water. After partially drying the Sephadex in the multiscreen plate, the entire cycle-sequencing reaction was added to the center of each well, centrifuged at 2,500 rpm for 5 min, and the clean sample was collected on a sequencing microtiter plate (Beckman Coulter). The plate was then dried on a Speed-Vac SC110 model with a microtiter plate holder (Savant Instruments Inc., Holbrook, NY). Dried samples were immediately resuspended with 25 µL of formamide, and one drop of mineral oil was added to the top of each sample. Samples were either sequenced immediately on a CEQ 2000 DNA sequencing instrument (Beckman Coulter) or stored at –30 °C. A total of 2728 cDNA library clones was sequenced. The EST sequences were deposited into the NCBI DBEST database under accessions HS099662-HS102332. The coding sequences were deposited into GenBank under accessions HP639789-HP639855.

Proteomic Characterization Using One-Dimension Gel Electrophoresis (1DE) and Tandem Mass Spectrometry (MS). Both the soluble and insoluble (pellet following centrifugation at 16 000× g) protein fractions from SG homogenates from Dm corresponding to three pairs of SGs (approximately 500 µg of protein per gland) were brought up in reducing Laemmli gel-loading buffer. The samples were boiled for 10 min, and approximately 100 µg of protein were resolved on a NuPAGE 4–12% Bis-Tris precast gel. Separated proteins were visualized by staining with SimplyBlue (Invitrogen). Gels were

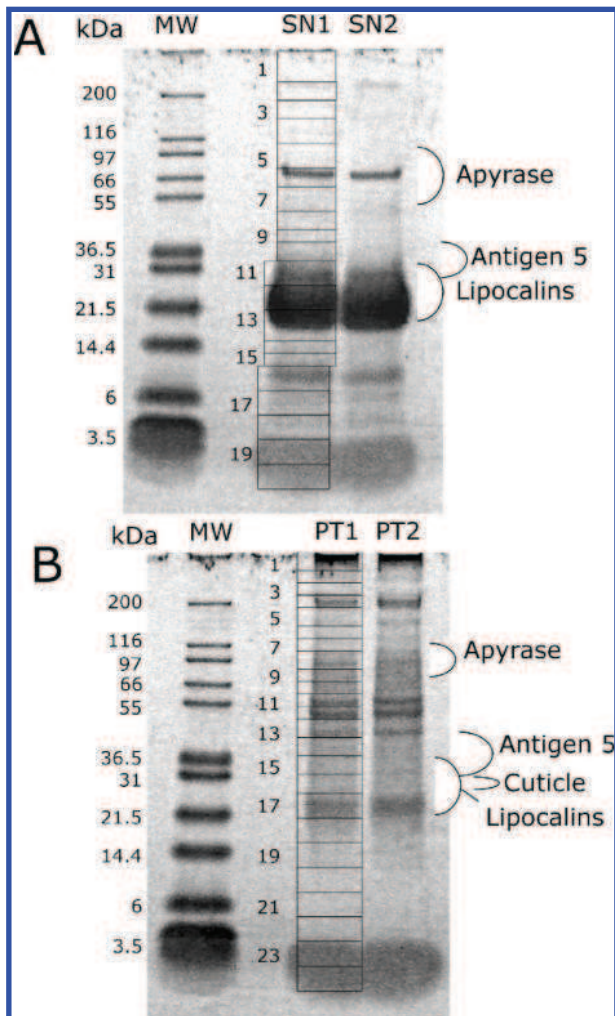


Figure 1. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis separation of the (A) soluble and (B) insoluble fractions of *Dipetalogaster maxima* salivary proteins. The grids indicate how the duplicated gel bands containing the salivary proteins (SN1, SN2, PT1, and PT2) were cut for tryptic digestion and mass spectrometric detection of peptides following nano reversed-phase high-performance liquid chromatography. The left of the figures indicate the molecular weight of the markers (kDa) indicated in the MW lane. For more information, see text.

sliced into 20 (soluble) or 24 (pellet) individual sections (Figure 1) that were destained and digested overnight with trypsin at 37 °C. Peptides were extracted and desalted using ZipTips (Millipore) and resuspended in 0.1% TFA prior to MS analysis.

Nanoflow reverse-phase liquid chromatography tandem MS was performed using an Agilent 1100 nanoflow LC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) coupled online with a linear ion-trap (LIT) mass spectrometer (LTQ, ThermoElectron, San José, CA, USA). NanoRPLC columns were slurry packed in-house with 5 μm , 300-Å pore size C-18 phase (Jupiter, Phenomenex, CA) in a 75- μm i.d. \times 10-cm fused silica capillary (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) with a flame-pulled tip. After sample injection, the column was washed for 30 min with 98% mobile phase A (0.1% formic acid in water) at 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$, and peptides were eluted using a linear gradient of 2% mobile phase B (0.1% formic acid in acetonitrile [ACN]) to 42% mobile phase B in 40 min at 0.25 $\mu\text{L}/\text{min}$, then to 98% B for an additional 10 min. The LIT-MS was operated in a data-dependent MS/MS mode in which each full MS scan was

followed by seven MS/MS scans where the seven most abundant molecular ions were dynamically selected for collision-induced dissociation (CID) using a normalized collision energy of 35%. Dynamic exclusion was applied to minimize repeated selection of peptides previously selected for CID.

Tandem mass spectra were searched using SEQUEST on a 20-node Beowulf cluster against a *Dm* proteome database with methionine oxidation included as dynamic modification. Only tryptic peptides with up to two missed cleavage sites meeting a specific SEQUEST scoring criteria [$\Delta C_n \geq 0.08$ and charge state-dependent cross correlation ($X_{\text{corr}} \geq 1.9$ for $[M + H]^+$, ≥ 2.2 for $[M + 2H]^{2+}$ and ≥ 3.5 for $[M + 3H]^{3+}$] were considered as legitimate identifications. The peptides identified by MS were converted to Prosite block format²² by a program written in Visual Basic. This database was used to search matches in the Fasta-formatted database of salivary proteins, using the Seedtop program, which is part of the BLAST package. The result of the Seedtop search was piped into the hyperlinked spreadsheet to produce a hyperlinked text file with details of the match. Note that the ID lines indicate, for example, sDGM12_80, which means that one match was found for fragment number 80 from gel band 12. Because the same tryptic fragment can be found in many gel bands, another program was written to count the number of fragments for each gel band, displaying a summarized result in an Excel table, for example on cell AX4 of Supplemental Table S2 (Supporting Information). The summary in the form of sDGM12 \rightarrow 5lsDGM13 \rightarrow 4 indicates that five fragments were found in band 12, while four peptides were found in band 13. Furthermore, this summary included a protein identification only when two or more peptide matches to the protein were obtained from the same gel slice. The summary program also produces additional spreadsheet cells with the larger number of peptides found in a single gel band and the percent amino acid (aa) sequence coverage of the sum of the peptide matches, thus facilitating data analysis.

Proteomic Characterization Using Two-Dimensional Gel Electrophoresis (2DE) and Peptide Mass Fingerprinting (PMF). SGs obtained from several bug adults dissected at 7–9 days following the blood meal were punctured, and intralymphal fluids were harvested by centrifugation (2000 \times g, 5 min, 5 °C). Salivary proteins were quantified using the Plus One 2D Quant Kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions. Saliva proteins (80 μg) resuspended in 350 μL of 2DE sample buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2.5% v/v Triton X-100, 85 mM DTT, 0.5% v/v Pharmalyte 3–10, 10% isopropanol) were applied to 18 cm pH 3–10 IPG gel strips, and submitted to isoelectrofocusing using an Ettan IPGphor3 Unit (GE-Healthcare, Piscataway, NJ), no current for 6 h and 30 V for 6 h, followed by 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, as optimized.¹⁹ Before SDS-PAGE, IPG strips were subjected to reduction in equilibrium buffer (50 mM Tris, pH 8.8, 6 M urea, glycerol 30%, 4% SDS), adding with 125 mM DTT for 40 min at room temperature and alkylation in equilibrium buffer, and with 300 mM acrylamide for an extended 20-min period. Subsequently, the proteins were separated by 12% SDS-PAGE on a Protean II system (BioRad, Richmond, CA), and silver-stained as adapted from Blum et al.²³ After washing with ultrapure H₂O, the gels were scanned with the Image Scanner (PowerLook 1120; Amersham Biosciences) at 300-dpi resolution and stored in 1% acetic acid. Digitized images were analyzed

with Image Master 2D Platinum 5.0 software (GE Healthcare) to count protein spots.

Protein identification was achieved by tryptic peptide fingerprinting using matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-time-of-flight (TOF)/TOF MS. Protein spots were cut from 2DE gels and processed as adapted from Garaguso and Borlak.²⁴ Briefly, spots were destained for 10 min in a fresh solution of 15 mM potassium ferrocyanide and 50 mM sodium thiosulphate. After destaining, gel pieces were washed with three cycles of 200 μ L ultrapure H₂O followed by 50% ACN, then another two cycles in 50 mM NH₄HCO₃ for 5 min followed by washing in ACN for 5 min. During the final washing with ACN, gel fragments were pistil macerated and vacuum-dried in a Speed Vacuum for 20 min. Dried gels were rehydrated with 5–10 μ L of 25 mM NH₄HCO₃, 2.5 mM CaCl₂, 12.5 ng/ μ L trypsin (Promega, Madison, WI) and incubated in ice for 45 min. Immediately after incubation, the remaining solution was removed; to it was added, depending on the size of the gel piece, 5–10 μ L of the same digestion buffer without enzyme, and it was incubated overnight at 37 °C. The following day, 1 μ L of 1% TFA was added to solution covering the gel pieces which contains the digestion product, and 1 μ L of this acidified sample was loaded onto a 600-nm AnchorChip target plate (Bruker Daltonics, Karlsruhe, Germany) and allowed to dry completely. Afterward, 0.5 μ L of 5- μ g/ μ L DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) matrix in 30% ACN and 0.1% TFA was applied, allowed to dry completely, and subjected to PMF analysis. PMF analysis was performed using a MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Autoflex II; Bruker Daltonics). Mass spectra were processed using Flex Analysis 2.2 and Biotools 2.2 software (Bruker Daltonics).

Protein identification was performed using MASCOT software against the database of proteins predicted from the Dm cDNA library in our server. Spectra containing autodigested trypsin peptides were internally calibrated. The following parameters were used for database searches: monoisotopic mass accuracy up to 100 ppm for internally calibrated spectra and up to 200 ppm for uncalibrated spectra; up to one missed cleavage site; propionamide of cysteine as fixed modification; and oxidation of methionine and protein N-acetylation as variable modifications.

Bioinformatic Tools and Procedures. Expressed sequence tags (ESTs) were trimmed of primer and vector sequences, clustered, and compared with other databases as previously described.²⁵ The BLAST tool,²⁶ CAP3 assembler,²⁷ ClustalW,²⁸ and TreeView software²⁹ were used to compare, assemble, and align sequences and to visualize alignments. For functional annotation of the transcripts, we used blastx³⁰ to compare the nucleotide sequences with the nonredundant (NR) protein database of the National Center of Biological Information (NCBI) and to the Gene Ontology (GO) database.³¹ Rpsblast³² was used to search for conserved protein domains in the Pfam,³³ Smart,³⁴ Kog,³⁵ and conserved domains (CDD) databases.³⁶ We also compared the transcripts with other subsets of mitochondrial and rRNA nucleotide sequences. Segments of the three-frame translations of the EST (because the libraries were unidirectional, we did not use six-frame translations) starting with a methionine in the first 100 predicted aa—or the predicted protein translation, in the case of complete coding sequences—were submitted to the SignalP server³⁷ to help identify translation products that could be secreted. O-glycosylation sites on the proteins were predicted with the program NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>).³⁸ Func-

Table 1. Functional Classification of Transcripts Originating from the Salivary Gland Transcriptome of *Dipetalogaster maxima*

class	number of contigs	number of ESTs	ESTs/contig
Secreted	161	1375	8.5
Housekeeping	107	207	1.9
Viral	1	1	1.0
Microbial	1	1	1.0
Transposable element	20	21	1.1
Unknown	909	1123	1.2
Total	1199	2728	

tional annotation of the transcripts was based on all the comparisons above. Following inspection of all results, transcripts were classified as either secretory (S), housekeeping (H), or of unknown (U) function, with further subdivisions based on function and/or protein families. Sequence alignments were done with the ClustalX software package.³⁹ Phylogenetic analysis and statistical neighbor-joining bootstrap tests (10 000 iterations) of the phylogenies were performed with the Mega package.⁴⁰ Hyperlinked Excel spreadsheets of the assembled ESTs and of the salivary protein database are supplied as Supplemental Spreadsheets S1 and S2 (Supporting Information).

Results

Description of Clusterized Data Set/cDNA Library

Characteristics. A total of 2728 sequences were used to assemble a clusterized database, yielding 1199 clusters of related sequences, 1014 of which contained only one EST. The consensus sequence of each cluster is named either a contig (deriving from two or more sequences) or a singleton (deriving from a single sequence). In this paper, we use the denomination contig to address sequences deriving from both consensus sequences and from singletons. The 1199 contigs were compared by the program blastx, blastn, or rpsblast³⁰ to the NR protein database of the NCBI, to the gene ontology database,³¹ to the conserved domains database of the NCBI,³⁶ and to a custom-prepared subset of the NCBI nucleotide database containing either mitochondrial or rRNA sequences. Because the libraries are unidirectional, the three-frame translations of the data set were also derived, and open reading frames starting with methionine and longer than 40-aa residues were submitted to SignalP server³⁷ to help identify putative secreted proteins. The EST assembly, BLAST, and signal peptide results were transferred into an Excel spreadsheet for manual annotation.

Six categories of expressed genes derived from the manual annotation of the contigs (Table 1). The S category contained 13.4% of the clusters and 50.4% of the sequences, with an average number of 8.5 sequences per cluster. The H category had 8.9% and 7.6% of the clusters and sequences, respectively, and an average of 1.9 sequences per cluster. Forty-one percent of the sequences, corresponding to 75.8% of all contigs, were classified as U, because no assignment for their function could be made; most of those consisted of singletons. Possible transposable elements originated 20 clusters, mostly singletons, including both class I and class II elements, including a mariner transposase. We have also identified a microbial and a viral transcript in our data set. These data can be downloaded as Supplemental Table S1 (Supporting Information) for the EST data.

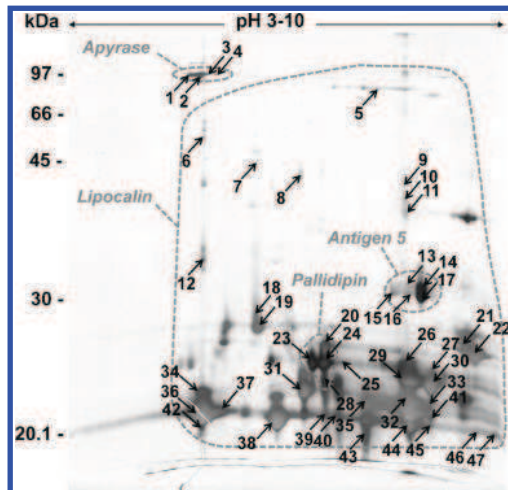


Figure 2. Two-dimensional gel electrophoresis map of *Dipetalogaster maxima* secreted salivary proteins. IEF was performed from approximately 80 μ g of saliva protein under denaturing conditions using a 3–10 linear IPG strip and following by 12% SDS-PAGE in a second dimension. The gel was silver stained. The dashed circles correspond to localizations of the different families of *D. maxima* identified proteins by MALDI-MS against the transcriptomic data. The spot numbers correspond to the identified proteins shown in Supplemental Table 1 (Supporting Information).

Proteomic Assays. To attempt identification of the proteins expressed in the SGs of Dm, we separated the proteins by 1DE (Figure 1) and 2DE (Figure 2) followed by mass spectrometry identification, as indicated in Methods. The transcriptome and extracted coding sequences (CDS) provided for the database needed for assigning peptide hits. These hits are indicated in Figures 1 and 2 as well as in the Supplemental Spreadsheets S1 and S2 (Supporting Information).

2DE analysis of Dm saliva was performed using isoelectrofocusing within a wide pH range (3–10) followed by 12% SDS-PAGE as optimized for the 2DE-based Ti proteomic analysis.¹⁹ The average number of silver-stained spots detected from the Dm 2DE profile was approximately 150 (Figure 2) versus about 200 from Ti saliva¹⁹ under the same experimental conditions. The majority of Dm saliva secreted proteins were visualized between 20 and 30 kDa on both 1DE and 2DE gels. Despite the absence of Dm-secreted saliva protein sequences available in the NCBI NR database, conventional database searching based on protein identification by peptide mass fingerprinting and peptide fragmentation fingerprinting was attempted without success. The identification was, however, successfully performed directly from the extensive Dm cDNA library reported here, although several predicted protein sequences are partial and consequently experimental and theoretical molecular masses and isoelectric points for several identified spots were very different (Supplemental Table 1, Supporting Information).

The following sections will describe the protein families observed in the transcriptome analysis in context with the proteome assays reported in Figures 1 and 2. It was interesting to note that both 1DE- and 2DE-based-proteome analyses allowed assignment of regions of gels corresponding to the identified secreted protein families (Figures 1 and 2).

Transcripts Coding for Putative Secreted Proteins in Dm SGs. The S group of ESTs was further classified into six groups (Table 2) including lipocalins, antigen 5, apyrase, immunity-

Table 2. Functional Classification of Transcripts Attributed to Secreted Products from the Sialotranscriptome of *Dipetalogaster maxima*

class	number of ESTs
Lipocalins	1285
Antigen 5 family	67
Apyrase/5' nucleotidase family	9
Immunity-related products	2
Hemolysin family	1
Other putative secreted polypeptides	11
Total	1375

related products, hemolysins, and other putative secreted polypeptides, as described in more detail below.

Lipocalins. The most abundant group of putative secreted proteins in Dm SGs is the lipocalins, corresponding to 93% of the transcripts in the S class. Similarly, the sialotranscriptome of *T. brasiliensis* revealed a high content of lipocalins in its SGs, with 93.8% of the transcripts coding for putative secreted proteins.¹⁸ Lipocalins are widely distributed and heterogeneous proteins occurring in animals, plants, and bacteria. An interesting feature of the lipocalins is their well conserved three-dimensional structure, contrasting with their primary sequence that shows a low percentage of similarity when comparing randomly selected members of this family.⁴¹ They are typically small extracellular proteins sharing several common molecular recognition properties: the binding of small, principally hydrophobic molecules, and binding to specific cell-surface receptors, forming covalent and noncovalent complexes with other soluble macromolecules. Although they have been classified mainly as transport proteins, it is now clear that members of the lipocalin family fulfill a wide variety of functions.¹⁵ Efforts to discover the role of salivary lipocalins in blood-sucking insects through functional genomics and proteomic studies have identified anticoagulants, antiplatelets, anticomplement, and vasodilatory molecules.⁴²

We found lipocalins similar to salivary proteins of other species of *Triatoma* such as pallidipin, an inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from *Triatoma pallidipennis*,⁴³ and procalin, a salivary allergen from *Triatoma protracta*.⁴⁴ The South American insect Ti was also shown to contain salivary cDNA sequences similar to these previously described lipocalins.²⁰ Lipocalins have also been found in tick saliva and in *Rhodnius* performing similar functions, such as histamine and serotonin binding.^{17,21,45}

Supplemental Spreadsheet S2 (Supporting Information) presents the coding sequences for 68 lipocalins. Several of these are possible alleles of the same gene, because they are >90% identical at the aa level. If we exclude those within this group, 45 sequences are still obtained, indicating a vast expansion of this protein family.

Lipocalin sequences from Dm were aligned with sequences from other *Triatominae*, and a neighbor-joining phylogenetic tree was constructed (Figure 3). The diverse nature of lipocalins has been noted before, and the phylogenetic tree shows divergent groups of proteins, suggesting that these sequences have evolved beyond recognition of a common ancestor; however, three groups of *Dipetalogaster* proteins with more than 2 sequences each are clearly discerned in the phylogenetic tree. Group I (Figure 3) appears to be a large *Dipetalogaster* gene expansion that might have occurred by multiple gene duplication events. This group contains the Procalin antigen

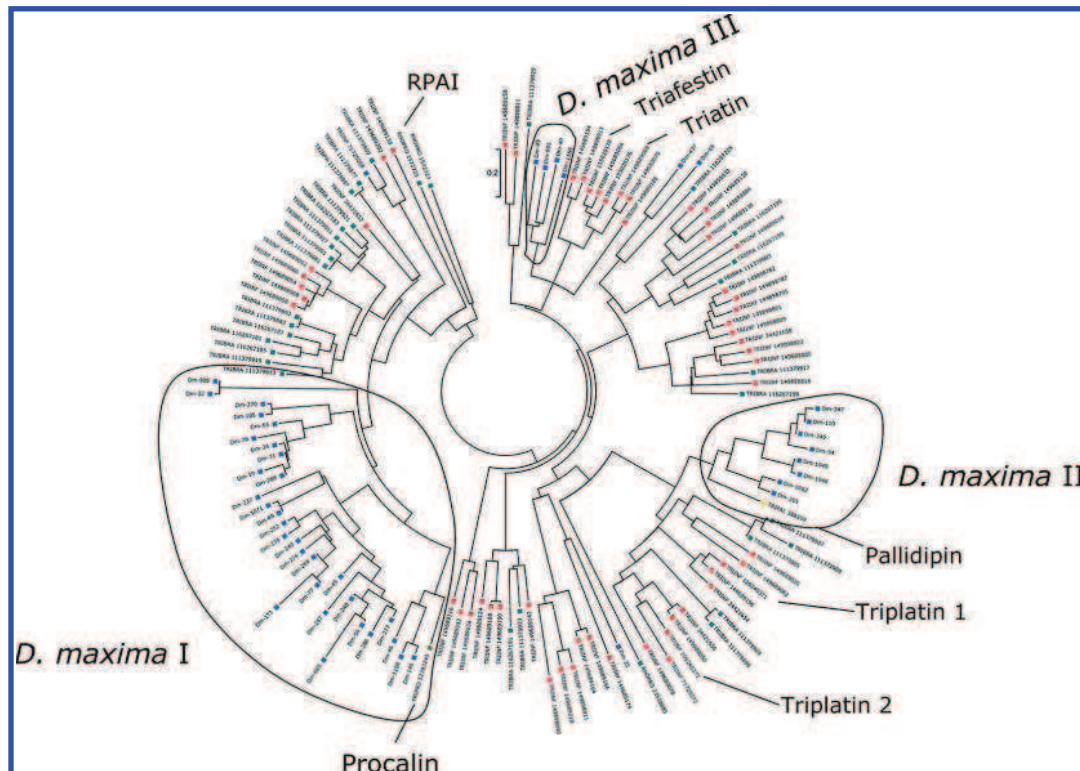


Figure 3. Dendrogram of the *Dipetalogaster maxima* salivary lipocalins with other insect salivary lipocalins. The sequences derived from the nonredundant protein database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) are represented by six letters followed by the NCBI gi| accession number. The six letters derive from the first three letters of the genus and the first three letters of the species name. The protein sequences were aligned by the Clustal program,³⁹ and the dendrogram was made with the Mega package⁴⁰ after 10 000 bootstraps with the neighbor-joining algorithm. The bar at the top represents 20% amino acid substitution. The colorful squares indicate each insect species whose sequences were used.

precursor of *T. protracta*. Group II also represents a gene expansion and is related to the Pallidipin family of platelet aggregation inhibitors, and, more distantly to the triplatin, also platelet inhibitors from *T. infestans*. Group III is more closely related to the Triafestin family which are inhibitors of the plasma kallikrein-kinin system, and also to Triatin, a thrombin inhibitor.

Proteomic experiments revealed the expression of most lipocalins, as indicated in Supplemental Spreadsheet S2 (Supporting Information). These lipocalins were identified in gel fractions 11, 12, and 13 (Figure 1A), and fractions 15, 16, and 17 (Figure 1B) at regions corresponding to MW markers ranging from 21 to 30 kDa and coincident with the strongest gel band comigrating with the 21.5 kDa marker, in agreement with the estimated mature molecular mass of these proteins. The 2DE gels presented the same lipocalins spread over different *pI*s, mostly to the basic side of the gel, providing good resolution of the various polypeptides that appear as a single blob in Figure 1. Of note is the set of spots that migrated in the bottom of the gel (around 20 kDa) that revealed many lipocalins. The lipocalins annotated as Dm-96 and Dm-58 are the most abundantly transcribed and have been assembled from 138 and 122 ESTs, respectively. Dm-96 is identified with neighboring spots 36 and 37 in the 2D gel, whereas six fragment ions were obtained in each of the spots, while Dm-58 was identified in several spots, including the strong spots 32 (10 fragment ions), 43 (12 ions) and 11 (10 ions), this last spot near the 40-kDa marker, and same *pI* as spot 32, indicating a possible dimer or posttranslational modifications. These abundant lipocalins are candidates for antagonizing histamine or serotonin, where

micromolar amounts of these 20-kDa proteins are needed to bind and neutralize the near micromolar amounts of the biogenic amines that accumulate in inflamed tissues. Less abundant lipocalins may act by binding to agonists of inflammation that occur at lower concentrations, such as thromboxane A₂ and leukotrienes, which are the targets of several tick lipocalins.^{46,47} The intense spots numbered 23, 20, 24, and 25 or gel regions consistent with a molecular mass of 25 kDa produce ion matches to members of the Pallidipin clade. Spots 22 and 21, on the extreme basic side of the gel, provide matches to Dm-1189 and Dm-99, respectively.

Apyrase/5' Nucleotidase Family. Apyrases are ATP-diphosphohydrolases that catalyze hydrolysis of both ATP and ADP to AMP, facilitating blood feeding by degradation of ADP, a mediator of platelet aggregation and inflammation,⁸ and ATP, a mediator of neutrophil activation.^{48,49} Apyrases are very commonly found in the SGs of blood-feeding insects⁹ and ticks,⁵⁰ the activity being higher in mammal feeders and lower in bird or lizard feeders.^{51–53} The salivary apyrase of *Ti* was cloned and shown to be a member of the 5' nucleotidase family.^{54,55} Partial coding sequences (truncated in the 5' region) for members of the 5' nucleotidase family were found in the sialotranscriptome of *Dm* (Supplemental Spreadsheets S1 and S2, Supporting Information).

5'-Nucleotidases are typically membrane bound and extracellular enzymes. A glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor in the carboxyterminal domain is associated with binding to the membrane and is indicated by the box in the alignment in Figure 4; indeed, 5' nucleotidases from bovine liver,⁵⁶ electric ray,⁵⁷ human,⁵⁸ and rat liver⁵⁹ have GPI anchor motifs, ac-

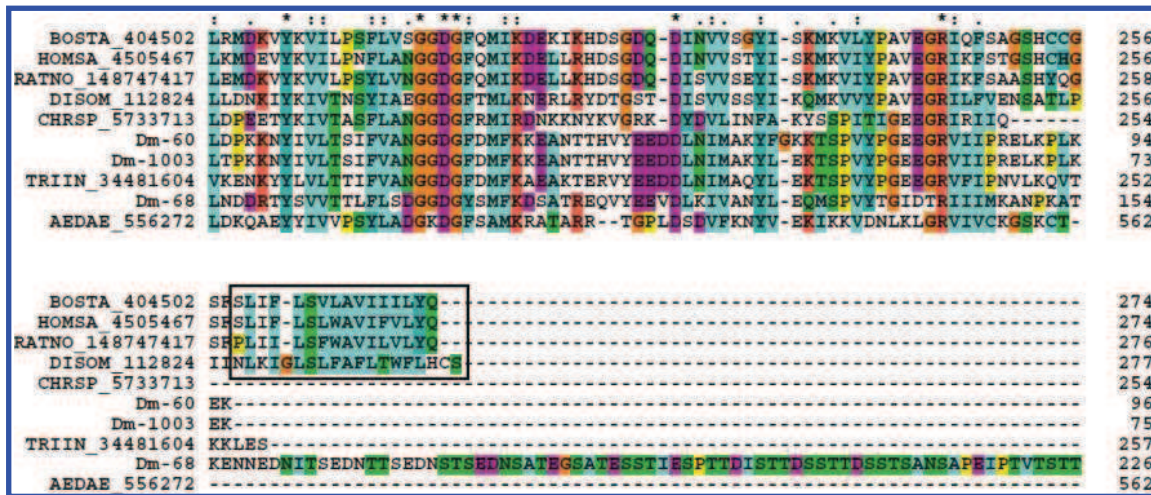


Figure 4. Clustal alignment of members of the apyrase/5' nucleotidase family deriving from salivary glands of *D. maxima* and from other organisms. The *D. maxima* proteins are Dm-60, Dm-68, and Dm-1003. The remaining sequences are named with the first three letters from the genus name followed by two letters from the species name and by their NCBI protein accession number. The box shows the membrane anchor region present in the salivary 5' nucleotidases. The symbols above the alignment indicate: (*) identical sites; (:) conserved sites; (.) less conserved sites. For more details, see text.

according to the PredGPI prediction server.⁶⁰ Apyrases of the 5'-nucleotidase family lacking the aa sequence required for a GPI anchor are secreted,⁶¹ which suggests that apyrases from Dm are probably secreted, although the amino-terminally truncated sequences does not permit verification of a signal peptide for secretion. The contig Dm-68 has an extension characteristic of mucins, rich in serine and threonine, when compared with other apyrases/5'-nucleotidases (Figure 4), suggesting that this protein can be highly glycosylated. In both cases of Dm, no GPI anchor region was found, indicating that the proteins are secreted.

The 1DE proteomic experiment (Figure 1) identifies apyrase fragments on fractions 6 (where a strong gel band exists, just above the 66-kDa marker) and fraction 7 of the soluble protein gel (Figure 1A), and in fractions 8 and 9 of the insoluble protein gel (Figure 1B). The 2DE experiment (Figure 2) identifies apyrase isoforms from the unique contig Dm-68 in the vicinal spots 1, 2, 3, and 4, each having between three and five ion matches. These bands are located under the 97-kDa marker, in a slightly acidic *pI*, in a region of the gel consistent with the 79-kDa molecular mass of *Triatoma* apyrases.⁵⁴ Furthermore, Ti saliva would have a multigene apyrase family with at least three to five forms and *N*-glycosylation.⁶² In 2DE-based-proteomic analysis, five Ti apyrase forms displayed a typical pattern of isoforms for each form.¹⁹ The same 2DE pattern was observed in the case of the Dm identified apyrases, suggesting that posttranslational modifications might also be a source of apyrase heterogeneity in this saliva.

Antigen 5 Family. This is a family of secreted proteins that belong to the CAP family (cysteine-rich secretory proteins; antigen 5 proteins of insects; pathogenesis-related protein 1 of plants).⁶³ The CAP family is related to venom allergens in social wasps and ants.^{64,65} Antigen 5 is the most studied member of a conserved family of proteins, and together with hyaluronidase and phospholipase A₁ is one of the three major venom proteins acting as allergens in vespids.^{66,67} Members of this protein family are found in the SGs of most blood-sucking insects.^{11,13,20,68–70} However, the function of most antigen 5 proteins in the saliva of blood-sucking arthropod is still unknown. Exceptionally, a tabanid protein of this family incorporated a disintegrin domain and acquired a platelet

aggregation inhibitory function,⁷¹ and another family member expressed in the SGs of the stable fly binds immunoglobulins and could serve as inhibitor of the classical pathway of complement activation.⁷²

We here report five salivary members of the antigen 5 family found in Dm SGs (Supplemental Spreadsheet S2, Supporting Information), two of which are probable alleles (Dm-124 and Dm-127). Alignment and phylogenetic analysis of insect members of this family indicate that Dm salivary antigen 5 protein clusters with other reported antigen 5 proteins from *R. prolixus*, *Ti*, and vespids (Figure 5). The hymenoptera protein, from vespids, has an additional domain after the signal peptide, indicating that its evolution probably diverged at some point. Like *Rhodnius* and *Triatoma* proteins, antigen 5 contigs from Dm have a poly-Lys-rich basic tail, which may direct these proteins to negatively charged membranes such as activated platelet surfaces. This binding/interaction on the platelet surface could interfere or block platelets' physiologic function, disrupting, then, the host hemostasis process.

The 1DE experiment (Figure 1) shows most of the ions hitting antigen 5 proteins located in band 11 of the soluble protein gel and an equivalent location in the insoluble protein gel (Figure 1A). The 2DE experiment indicates that the strongly stained spot 14—as well as the vicinal spots 13, 15, 16, and 17—produce hits to the antigen 5 family. In all cases, the gel location is consistent with the MW of this protein family, between 25 and 30 kDa.

Hemolysin Family. Hemolysins are secreted, water-soluble proteins that form transmembrane polymeric channels. They are capable of permeating target cells, forming pores in cytoplasmic membranes of erythrocytes, leukocytes, and other cells, causing modification of cellular functions and/or lysis of host cells. This family of proteins is more often described in microorganisms such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus*,^{73–75} being considered a virulence factor. Collectively, they are members of the RTX (repeats in toxin) protein family.⁷⁶ The presence of amphipathic and hydrophilic domains confers to the protein an overall amphiphilic character, which would explain its ability to be secreted and to interact with membranes.^{77–79}

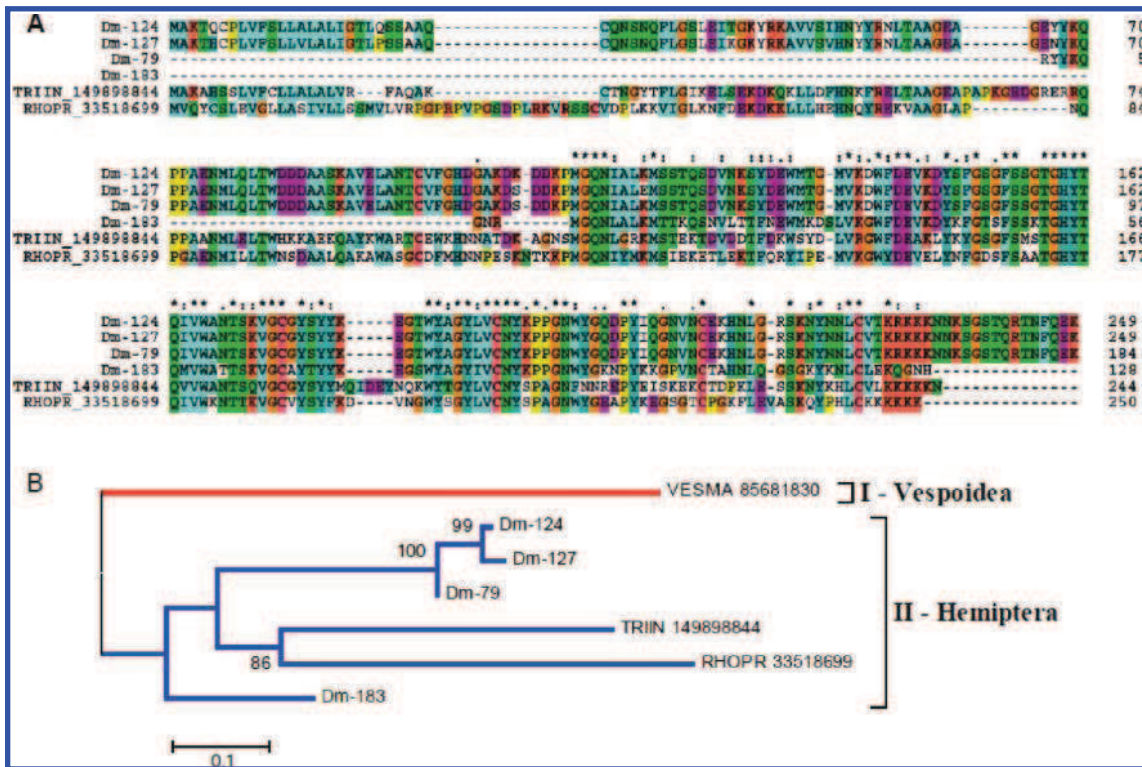


Figure 5. (A) Clustal alignment of *D. maxima* salivary Antigen-5 proteins with members of the same family from other Triatominae. (B) Phylogenetic tree of selected members of the antigen-5 family of proteins from Hemiptera and Vespoidea, obtained by the NJ method after 10 000 bootstraps. The numbers in the phylogram nodes indicates percent bootstrap support for the phylogeny. The bar at the bottom indicates 10% amino acid divergence in sequences.

We found one contig with similarity to salivary-secreted hemolysin-like proteins (Supplemental Figure 1, Supporting Information), previously described in the sialotranscriptome of *Ti*. These proteins could act as cytolytic proteins, causing erythrocyte lysis in their saliva and helping the early steps of the digestion process, or having antimicrobial activity. A single ion with sequence A-T-S-Y-[IL]-G-N-[KQ]-V-[IL]-D-[KQ] was found matching Dm-594 in gel band 17 of the insoluble protein experiment (Figure 1B). This is not a promiscuous match, having been found solely to this protein.

Immunity-Related Products. One contig from the Dm cDNA library showed similarity to a portion of the carboxyterminal region of hemolectin (Supplemental Figure 2, Supporting Information), a multidomain protein described in *Drosophila*. Hemolectin is the most abundant insect clot protein, and it shares conserved domains with von Willebrand factor and coagulation and complement factors.⁸⁰ Clotting of hemolymph in arthropods is important to promote wound healing and limit loss of hemolymph. It also plays a role in immune defense, forming a secondary barrier to infection.⁸¹ Also, loss of hemolectin in *Drosophila* was associated with more susceptibility to infection by *E. coli*, suggesting it could be part of an integrated defense mechanism to prevent bacterial contamination⁸² or, alternatively, being exapted for an antihemostatic function. A single ion corresponding to the sequence [KQ]-E-S-V-[KQ]-T-C-[KQ]-[KQ]-T-C-[KQ] and found in band 9 of the insoluble protein gel matches *Dipetalogaster* hemolectin, in a region of the gel consistent with proteins in the range of 70–80 kDa. Hemolectins are large proteins with over 3000 aa, suggesting the match may be spurious or related to a protein fragment.

Proteins containing Gly-Tyr repeats have been commonly found in sialotranscriptomes of blood-sucking arthropods.

These proteins resemble nematode peptides identified as having an immune function⁸³ but are also similar to cuticular proteins. No matches to this predicted protein were found in the proteomic experiments.

Other Putative Secreted Polypeptides. Histidine-Rich Peptide Precursor. This EST sequence found in Dm shows similarity to secreted histidine-rich peptide precursors (Supplemental Figure 3, Supporting Information). Polypeptides rich in histidine are described as both small and large molecules. Histatins, a family of small histidine-rich basic salivary proteins, exhibit antimicrobial activity against bacteria and fungi (perhaps by their Cu or Ni or Zn ion chelating properties), similar to many other small basic polypeptides, being considered a component in the host defense system.⁸⁴ Histidine-rich glycoprotein is a plasma glycoprotein that has a multidomain structure and interacts with many ligands including Zn²⁺, tropomyosin, heparin, plasminogen, plasmin, fibrinogen, thrombospondin, IgG and complement. This protein could act as an extracellular adaptor, bringing together different ligands on cell surfaces.⁸⁵ The histidine-rich region in these proteins is highly responsible to Zn²⁺ and low pH, conditions associated with sites of tissue injury.⁸⁶ Metal binding by histidine-rich proteins could have important physiologic functions related to microbial growth.⁸⁴ For the triatomine Dm, the ability to interact with molecules related to coagulation and immune response through a histidine-rich protein could be an advantage, helping the acquisition of the blood meal and avoiding the host response. Also, they could play a role in the innate defense system. No matches to this protein were found in the proteomic experiments.

Larval Cuticle Protein. This cDNA library also revealed a contig with similarity to larval cuticle protein, and the alignment shows the presence of a chitin-binding domain (Supplemental Figure 4, Supporting Information). Arthropod cuticles

Table 3. Functional Classification of Transcripts Attributed to the Housekeeping Class Originating from the Sialotranscriptome of *Dipetalogaster maxima*

class	number of contigs	number of ESTs	ESTs/contig
Protein synthesis machinery	33	102	3.1
Metabolism, energy	20	43	2.2
Unknown, conserved	10	10	1.0
Transcription machinery	7	7	1.0
Signal transduction	7	10	1.4
Protein export machinery	6	6	1.0
Protein modification machinery	5	9	1.8
Transporters/storage	4	4	1.0
Cytoskeletal	4	4	1.0
Transcription factor	2	2	1.0
Proteasome machinery	2	2	1.0
Oxidant metabolism/detoxification	2	2	1.0
Metabolism, carbohydrate	2	2	1.0
Nuclear regulation	1	2	2.0
Metabolism, intermediate	1	1	1.0
Extracellular matrix/cell adhesion	1	1	1.0
Total	107	207	

are composed of fiber of chitin, a biopolymer that contributes strength and rigidity when in fibrillar form. One of the common functions for chitin is its structural role, serving as mechanical support and protective barriers in the exoskeleton of arthropods.^{87,88} This protein may be related to the structure of the salivary duct or tracheoli. The 1D proteomic experiment with the insoluble protein fraction revealed six ions matching Dm-850 in band 16, located between the 21.5- and 31-kDa markers (Figure 1B).

Housekeeping (H) Genes. The 107 gene contigs (comprising 207 ESTs) attributed to H genes expressed in the SGs of Dm were further characterized into 16 groups consistent to their possible function (Table 3). According to an organ specialized in secreting polypeptides and as observed in previous sialotranscriptomes,^{11,17,70,89} the two larger sets were associated with protein synthesis machinery (102 ESTs in 33 contigs) and with energy metabolism (20 contigs containing 43 ESTs). We have also included in this category a group of 10 ESTs that grouped into 10 contigs and represent conserved proteins of unknown function presumably associated with cellular metabolism. Other sequences with homology to housekeeping proteins include those coding for ribosomal proteins, cytochrome, and NADH-dehydrogenase, among other molecules (Table 3 and Supplemental Spreadsheet S1, Supporting Information). Several of these housekeeping gene products were identified by the proteomic experiments. They can be verified in Supplemental Spreadsheets S1 and S2 (Supporting Information), and are not marked in Figures 1 and 2.

Conclusions

In an attempt to improve our understanding of the variety of proteins and transcripts expressed in Dm SGs, we have made a cDNA library and both 1D and 2D-gel electrophoreses using mRNA and proteins from this same tissue. We described the set of cDNA present in the SGs of Dm. Comparison of this set with other triatomine sialomes indicates that *Dipetalogaster* has a less complex sialome when compared to *Triatoma*. In addition, the 2DE map of the Dm saliva presented a protein number considerably inferior to that of Ti saliva, 150 versus 200, respectively, under the same experimental conditions. The lesser salivary proteome complexity of the Dm in comparison with Ti could be correlated with the quantity of SG pairs, one

versus three, respectively. For example, the following protein families are missing when compared with the Ti sialome:^{19,20} trypsin, chitinase, kazal, pheromone-binding, inositol phosphatase, and serine protease. Perhaps these extra protein families in *Triatoma* reflect its adaptation to feed on mammals, while *Dipetalogaster* mainly feeds on lizards; however, we cannot exclude the possible that more intense sequencing of the *Dipetalogaster* sialotranscriptome may reveal transcription of these families, although these *Triatoma*-secreted proteins were not identified by proteomic studies. On the other hand, *Dipetalogaster* homologues were found for previously orphan protein families from Ti, such as the hemolysins family, indicating the ancient status of this family within Triatomines before the *Dipetalogaster/Triatoma* branch. Most of these proteins have unknown function. Expression and bioassay of the novel proteins will ultimately characterize the salivary pharmacologic complexity from Dm evolution to blood feeding.

This cDNA library will facilitate our continuing efforts to understand the evolution of blood sucking in vector arthropods and the discovery of novel pharmacologically active compounds.

Abbreviations: 2D, two-dimensional; aa, amino acid; ACN, acetonitrile; Dm, *Dipetalogaster maxima*; EST, expressed sequence tags; H, putative housekeeping transcripts; MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization; MS, mass spectrometry; NCBI, National Center of Biological Information; NR, nonredundant; PMF, peptide mass fingerprinting; S, putative secreted transcripts; SG, salivary glands; Ti, *Triatoma infestans*; TOF, time-of-flight; U, unknown function transcripts.

Acknowledgment. This work was supported by the Intramural Research Program of the Division of Intramural Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health. The content of this publication does not necessarily reflect the views or policies of the Department of Health and Human Services, nor does mention of trade names, commercial products, or organization imply endorsement by the government of the United States of America. This work was supported by Brazilian Grants from CNPq, FINEP, FAP-DF, CAPES, and PRONEX.

Supporting Information Available: Supplemental figures and tables. Supplemental Spreadsheet S1: Excel spreadsheet of assembled ESTs. Supplemental Spreadsheet S2: Excel spreadsheet of the salivary protein database. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>. Supplemental files can be downloaded from http://exon.niaid.nih.gov/transcriptome/D_maxima/Dm-S1-web.xls and http://exon.niaid.nih.gov/transcriptome/D_maxima/Dm-S2-web.xls.

References

- Salazar Schettino, P. M.; de Haro Arteaga, I.; Uribarren Berrueta, T. Chagas disease in Mexico. *Parasitol. Today* **1988**, *4* (12), 348–352.
- Nijhout, H. F. Abdominal stretch reception in *Dipetalogaster maximus* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Insect Physiol.* **1984**, *30* (8), 629–633.
- Guzmán-Bracho, C. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends Parasitol.* **2001**, *17* (8), 372–376.
- Zeledón, R.; Rabinovich, J. E. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu. Rev. Entomol.* **1981**, *26*, 101–133.
- Zárate, L. G. Comportamiento de los triatomíneos en relación a su potencial transmisor de la enfermedad de Chagas (Hemiptera: Reduviidae). *Fol. Entomol. Mex.* **1984**, *61*, 257–271.

- (6) Jiménez, M. L.; Palacios, C. Incidencia de la chinche piedrera (*Dipetalogaster maximus*) (Hemiptera:Heteroptera:Reduviidae) vector de *Trypanosoma cruzi* en zonas urbanas de La Paz, Baja California Sur, Mexico. *Ann. dlnst. Biol. UNAM, Ser. Zoologia* **1999**, *70* (2), 215–221.
- (7) Jiménez, M. L.; Llinas, J.; Palacios, C. Infection rates in *Dipetalogaster maximus* (Reduviidae: Triatominae) by *Trypanosoma cruzi* in the Cape Region, Baja California Sur, Mexico. *J. Med. Entomol.* **2003**, *40* (1), 18–21.
- (8) Ribeiro, J. M.; Francischetti, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu. Rev. Entomol.* **2003**, *48*, 73–88.
- (9) Ribeiro, J. M. C.; Arca, B. From sialomes to the sialoverse: an insight into the salivary potion of blood feeding insects. *Adv. Insect Physiol.* **2009**, *37*, 59–118.
- (10) Ribeiro, J. M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists. *Infect. Agents Dis.* **1995**, *4* (3), 143–152.
- (11) Francischetti, I. M.; Valenzuela, J. G.; Pham, V. M.; Garfield, M. K.; Ribeiro, J. M. Toward a catalog for the transcripts and proteins (sialome) from the salivary gland of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *J. Exp. Biol.* **2002**, *205* (Pt 16), 2429–2451.
- (12) 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.* **2002**, *205* (Pt 18), 2843–2864.
- (13) Valenzuela, J. G.; Pham, V. M.; Garfield, M. K.; Francischetti, I. M.; Ribeiro, J. M. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *32* (9), 1101–1122.
- (14) Ribeiro, J. M.; Schneider, M.; Isaias, T.; Jurberg, J.; Galvao, C.; Guimaraes, J. A. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). *J. Med. Entomol.* **1998**, *35* (4), 599–610.
- (15) Flower, D. R.; North, A. C.; Sansom, C. E. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1482* (1–2), 9–24.
- (16) Montfort, W. R.; Weichsel, A.; Andersen, J. F. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1482* (1–2), 110–118.
- (17) Ribeiro, J. M.; Andersen, J.; Silva-Neto, M. A.; Pham, V. M.; Garfield, M. K.; Valenzuela, J. G. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *34* (1), 61–79.
- (18) Santos, A.; Ribeiro, J. M.; Lehane, M. J.; Gontijo, N. F.; Veloso, A. B.; Sant' Anna, M. R.; Nascimento Araujo, R.; Grisard, E. C.; Pereira, M. H. The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *37* (7), 702–712.
- (19) 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. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *268* (2–3), 265–276.
- (20) Assumpção, T. C.; Francischetti, I. M.; Andersen, J. F.; Schwarz, A.; Santana, J. M.; Ribeiro, J. M. An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *38* (2), 213–232.
- (21) Paesen, G. C.; Adams, P. L.; Nuttall, P. A.; Stuart, D. L. Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1482* (1–2), 92–101.
- (22) Hulo, N.; Bairoch, A.; Bulliard, V.; Cerutti, L.; De Castro, E.; Langendijk-Genevaux, P. S.; Pagni, M.; Sigrist, C. J. The PROSITE database. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (Database issue), D227–230.
- (23) Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **1987**, *8* (2), 93–99.
- (24) Garaguso, I.; Borlak, J. Matrix layer sample preparation: an improved MALDI-MS peptide analysis method for proteomic studies. *Proteomics* **2008**, *8* (13), 2583–2595.
- (25) Valenzuela, J. G.; Francischetti, I. M.; Pham, V. M.; Garfield, M. K.; Ribeiro, J. M. Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *33* (7), 717–732.
- (26) Altschul, S. F.; Gish, W. Local alignment statistics. *Methods Enzymol.* **1996**, *266*, 460–480.
- (27) Huang, X.; Madan, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* **1999**, *9* (9), 868–877.
- (28) Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22* (22), 4673–4680.
- (29) Page, R. D. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **1996**, *12* (4), 357–358.
- (30) Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25* (17), 3389–3402.
- (31) Ashburner, M.; Ball, C. A.; Blake, J. A.; Botstein, D.; Butler, H.; Cherry, J. M.; Davis, A. P.; Dolinski, K.; Dwight, S. S.; Eppig, J. T.; Harris, M. A.; Hill, D. P.; Issel-Tarver, L.; Kasarskis, A.; Lewis, S.; Matese, J. C.; Richardson, J. E.; Ringwald, M.; Rubin, G. M.; Sherlock, G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* **2000**, *25* (1), 25–29.
- (32) Schaffer, A. A.; Aravind, L.; Madden, T. L.; Shavirin, S.; Spouge, J. L.; Wolf, Y. I.; Koonin, E. V.; Altschul, S. F. Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29* (14), 2994–3005.
- (33) Bateman, A.; Birney, E.; Durbin, R.; Eddy, S. R.; Howe, K. L.; Sonnhammer, E. L. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28* (1), 263–266.
- (34) Letunic, I.; Goodstadt, L.; Dickens, N. J.; Doerks, T.; Schultz, J.; Mott, R.; Ciccarelli, F.; Copley, R. R.; Ponting, C. P.; Bork, P. Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (1), 242–244.
- (35) Tatusov, R. L.; Fedorova, N. D.; Jackson, J. D.; Jacobs, A. R.; Kiryutin, B.; Koonin, E. V.; Krylov, D. M.; Mazumder, R.; Mekhedov, S. L.; Nikolskaya, A. N.; Rao, B. S.; Smirnov, S.; Sverdlov, A. V.; Vasudevan, S.; Wolf, Y. I.; Yin, J. J.; Natale, D. A. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinform.* **2003**, *4*, 41.
- (36) Marchler-Bauer, A.; Panchenko, A. R.; Shoemaker, B. A.; Thiessen, P. A.; Geer, L. Y.; Bryant, S. H. CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (1), 281–283.
- (37) Nielsen, H.; Engelbrecht, J.; Brunak, S.; von Heijne, G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **1997**, *10* (1), 1–6.
- (38) Hansen, J. E.; Lund, O.; Tolstrup, N.; Gooley, A. A.; Williams, K. L.; Brunak, S. NetOglyc: prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility. *Glycoconj. J.* **1998**, *15* (2), 115–130.
- (39) Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25* (24), 4876–4882.
- (40) Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* **2004**, *5* (2), 150–163.
- (41) Flower, D. R. Multiple molecular recognition properties of the lipocalin protein family. *J. Mol. Recognit.* **1995**, *8* (3), 185–195.
- (42) Andersen, J. F.; Gudderra, N. P.; Francischetti, I. M.; Ribeiro, J. M. The role of salivary lipocalins in blood feeding by *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2005**, *58* (2), 97–105.
- (43) Noeske-Jungblut, C.; Kratzschmar, J.; Haendler, B.; Alagon, A.; Possani, L.; Verhallen, P.; Donner, P.; Schleuning, W. D. An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (7), 5050–5053.
- (44) Paddock, C. D.; McKerrow, J. H.; Hansell, E.; Foreman, K. W.; Hsieh, I.; Marshall, N. Identification, cloning, and recombinant expression of procalin, a major triatomine allergen. *J. Immunol.* **2001**, *167* (5), 2694–2699.
- (45) Sangamnatdej, S.; Paesen, G. C.; Slovak, M.; Nuttall, P. A. A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva. *Insect Mol. Biol.* **2002**, *11* (1), 79–86.
- (46) Mans, B. J.; Ribeiro, J. M. Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *38* (9), 841–852.
- (47) Mans, B. J.; Ribeiro, J. M. A novel clade of cysteinyl leukotriene scavengers in soft ticks. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *38* (9), 862–870.
- (48) Kuroki, M.; Minakami, S. Extracellular ATP triggers superoxide production in human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *162*, 377–380.
- (49) O'Flaherty, J.; Cordes, J. F. Human neutrophil degranulation responses to nucleotides. *Lab. Invest.* **1994**, *70*, 816–821.
- (50) Francischetti, I. M. B.; Sá-Nunes, A.; Mans, B. J.; Santos, I. M.; Ribeiro, J. M. C. The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci.* **2009**, *14*, 2051–2088.
- (51) Ribeiro, J. M. C.; Modi, G. B.; Resh, R. B. Salivary apyrase activity of some Old World phlebotomine sand flies. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1989**, *19*, 409–412.

- (52) Ribeiro, J. M. Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). *Med. Vet. Entomol.* **2000**, *14* (2), 142–148.
- (53) Calvo, E.; Sanchez-Vargas, I.; Favreau, A. J.; Barbian, K. D.; Pham, V. M.; Olson, K. E.; Ribeiro, J. M. An insight into the sialotranscriptome of the West Nile mosquito vector *Culex tarsalis*. *BMC Genomics* **2010**, *11* (1), 51.
- (54) Faudry, E.; Lozzi, S. P.; Santana, J. M.; D'Souza-Ault, M.; Kieffer, S.; Felix, C. R.; Ricart, C. A.; Sousa, M. V.; Vernet, T.; Teixeira, A. R. *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (19), 19607–19613.
- (55) Faudry, E.; Santana, J. M.; Ebel, C.; Vernet, T.; Teixeira, A. R. Salivary apyrases of *Triatoma infestans* are assembled into homooligomers. *Biochem. J.* **2006**, *396* (3), 509–515.
- (56) Suzuki, K.; Furukawa, Y.; Tamura, H.; Ejiri, N.; Suematsu, H.; Taguchi, R.; Nakamura, S.; Suzuki, Y.; Ikezawa, H. Purification and cDNA cloning of bovine liver 5'-nucleotidase, a GPI-anchored protein, and its expression in COS cells. *J. Biochem.* **1993**, *113* (5), 607–613.
- (57) Volkandt, W.; Vogel, M.; Pevsner, J.; Misumi, Y.; Ikehara, Y.; Zimmermann, H. 5'-nucleotidase from the electric ray electric lobe. Primary structure and relation to mammalian and prokaryotic enzymes. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *202* (3), 855–861.
- (58) Misumi, Y.; Ogata, S.; Ohkubo, K.; Hirose, S.; Ikehara, Y. Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *191* (3), 563–569.
- (59) Misumi, Y.; Ogata, S.; Hirose, S.; Ikehara, Y. Primary structure of rat liver 5'-nucleotidase deduced from the cDNA. Presence of the COOH-terminal hydrophobic domain for possible post-translational modification by glycosylphospholipid. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (4), 2178–2183.
- (60) Pierleoni, A.; Martelli, P. L.; Casadio, R. PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinform.* **2008**, *9*, 392.
- (61) Champagne, D. E.; Smartt, C. T.; Ribeiro, J. M.; James, A. A. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92* (3), 694–698.
- (62) Faudry, E.; Rocha, P. S.; Vernet, T.; Lozzi, S. P.; Teixeira, A. R. Kinetics of expression of the salivary apyrases in *Triatoma infestans*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *34* (10), 1051–1058.
- (63) Megraw, T.; Kaufman, T. C.; Kovalick, G. E. Sequence and expression of *Drosophila* Antigen 5-related 2, a new member of the CAP gene family. *Gene* **1998**, *222* (2), 297–304.
- (64) Hoffman, D. R. Allergens in Hymenoptera venom. XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1993**, *92* (5), 707–716.
- (65) King, T. P.; Spangfort, M. D. Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2000**, *123* (2), 99–106.
- (66) Hoffman, D. R. Hymenoptera venom allergens. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2006**, *30* (2), 109–128.
- (67) Fang, K. S.; Vitale, M.; Fehlner, P.; King, T. P. cDNA cloning and primary structure of a white-face hornet venom allergen, antigen 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85* (3), 895–899.
- (68) Li, S.; Kwon, J.; Aksoy, S. Characterization of genes expressed in the salivary glands of the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Mol. Biol.* **2001**, *10* (1), 69–76.
- (69) Arcà, B.; Lombardo, F.; Valenzuela, J. G.; Francischetti, I. M.; Marinotti, O.; Coluzzi, M.; Ribeiro, J. M. An updated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito *Anopheles gambiae*. *J. Exp. Biol.* **2005**, *208* (Pt 20), 3971–3986.
- (70) Calvo, E.; Dao, A.; Pham, V. M.; Ribeiro, J. M. An insight into the sialome of *Anopheles funestus* reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *37* (2), 164–175.
- (71) Xu, X.; Yang, H.; Ma, D.; Wu, J.; Wang, Y.; Song, Y.; Wang, X.; Lu, Y.; Yang, J.; Lai, R. Toward an understanding of the molecular mechanism for successful blood feeding by coupling proteomics analysis with pharmacological testing of horsefly salivary glands. *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7* (3), 582–590.
- (72) Wang, X.; Ribeiro, J. M.; Broce, A. B.; Wilkerson, M. J.; Kanost, M. R. An insight into the transcriptome and proteome of the salivary gland of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *39* (9), 607–614.
- (73) Bhakdi, S.; Mackman, N.; Nicaud, J. M.; Holland, I. B. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect. Immun.* **1986**, *52* (1), 63–69.
- (74) Gouaux, E. alpha-Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an archetype of beta-barrel, channel-forming toxins. *J. Struct. Biol.* **1998**, *121* (2), 110–122.
- (75) Andreeva, Z. I.; Nesterenko, V. F.; Yurkov, I. S.; Budarina, Z. I.; Sineva, E. V.; Solonin, A. S. Purification and cytotoxic properties of *Bacillus cereus* hemolysin II. *Protein Expr. Purif.* **2006**, *47* (1), 186–193.
- (76) Welch, R. A. RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2001**, *257*, 85–111.
- (77) Soloaga, A.; Veiga, M. P.; Garcia-Segura, L. M.; Ostolaza, H.; Brasseur, R.; Goni, F. M. Insertion of *Escherichia coli* alpha-hemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol. Microbiol.* **1999**, *31* (4), 1013–1024.
- (78) Schindel, C.; Zitzer, A.; Schulte, B.; Gerhards, A.; Stanley, P.; Hughes, C.; Koronakis, V.; Bhakdi, S.; Palmer, M. Interaction of *Escherichia coli* hemolysin with biological membranes. A study using cysteine scanning mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268* (3), 800–808.
- (79) Hyland, C.; Vuillard, L.; Hughes, C.; Koronakis, V. Membrane interaction of *Escherichia coli* hemolysin: flotation and insertion-dependent labeling by phospholipid vesicles. *J. Bacteriol.* **2001**, *183* (18), 5364–5370.
- (80) Goto, A.; Kumagai, T.; Kumagai, C.; Hirose, J.; Narita, H.; Mori, H.; Kadowaki, T.; Beck, K.; Kitagawa, Y. A *Drosophila* haemocyte-specific protein, hemolectin, similar to human von Willebrand factor. *Biochem. J.* **2001**, *359* (Pt 1), 99–108.
- (81) Scherfer, C.; Karlsson, C.; Loseva, O.; Bidla, G.; Goto, A.; Havemann, J.; Dushay, M. S.; Theopold, U. Isolation and characterization of hemolymph clotting factors in *Drosophila melanogaster* by a pullout method. *Curr. Biol.* **2004**, *14* (7), 625–629.
- (82) Lesch, C.; Goto, A.; Lindgren, M.; Bidla, G.; Dushay, M. S.; Theopold, U. A role for hemolectin in coagulation and immunity in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Comp. Immunol.* **2007**, *31* (12), 1255–1263.
- (83) Couillault, C.; Pujol, N.; Reboul, J.; Sabatier, L.; Guichou, J. F.; Kohara, Y.; Ewbank, J. J. TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat. Immunol.* **2004**, *5* (5), 488–494.
- (84) Gusman, H.; Lendenmann, U.; Grogan, J.; Troxler, R. F.; Oppenheim, F. G. Is salivary histatin 5 a metallopeptide. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1545* (1–2), 86–95.
- (85) Blank, M.; Shoenfeld, Y. Histidine-rich glycoprotein modulation of immune/autoimmune, vascular, and coagulation systems. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2008**, *34* (3), 307–312.
- (86) Jones, A. L.; Hulett, M. D.; Parish, C. R. Histidine-rich glycoprotein: a novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems. *Immunol. Cell Biol.* **2005**, *83* (2), 106–118.
- (87) Cohen, E. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Manag. Sci.* **2001**, *57* (10), 946–950.
- (88) Rebers, J. E.; Willis, J. H. A conserved domain in arthropod cuticular proteins binds chitin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2001**, *31* (11), 1083–1093.
- (89) Ribeiro, J. M.; Charlab, R.; Pham, V. M.; Garfield, M.; Valenzuela, J. G. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *34* (6), 543–563.

PR100866H