



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia



**Identificação de antígenos salivares imunogênicos de
triatomíneos e avaliação de sua eficiência como marcadores de
contato para *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859) (Hemiptera:
Reduviidae): o papel da apirase salivar**

Luciana Ramos Dias

Belo Horizonte
Março 2012

Luciana Ramos Dias

Identificação de antígenos salivares imunogênicos de triatomíneos e avaliação de sua eficiência como marcadores de contato para *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859) (Hemiptera: Reduviidae): o papel da apirase salivar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientador: Ricardo Nascimento Araujo

Co-orientador: Nelder de Figueiredo Gontijo

Belo Horizonte

Março 2012

Dias, Luciana Ramos.

Identificação de antígenos salivares imunogênicos de triatomíneos e avaliação de sua eficiência como marcadores de contato para *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859) (Hemiptera: Reduviidae): o papel da apirase salivar. [manuscrito] / Luciana Ramos Dias. – 2012.
66 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Ricardo Nascimento Araujo. Co-orientador: Nelder de Figueiredo Gontijo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. *Rhodnius prolixus* – Teses. 2. Saliva – Teses. 3. Antígenos - Teses. 4. Anticorpos - Teses. 5. Entomologia - Teses. 6. Parasitologia – Teses. 7. Apirase. I. Araujo, Ricardo Nascimento. II. Gontijo, Nelder de Figueiredo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 595.7:61

À minha mãe e minha irmã:
Lucilene de Brito Ramos Dias e
Daniele Ramos Dias.

Ao meu pai, com eterna saudade:
Domingos Costa Dias.

Ao meu orientador:
Ricardo Nascimento Araujo, com todo
merecimento e por toda dedicação.

Agradecimentos

Ao Senhor Jesus Cristo, que é a minha rocha, a minha fortaleza e que me ajuda a permanecer de pé em todos os dias da minha vida. A Ele que me guia em todos os meus caminhos, e por seu amor, tem colocado pessoas abençoadas em minha vida. Obrigada, Senhor!

À minha família, minha mãe Lucilene que com todo amor e compreensão tem me apoiado e incentivado em todo o tempo da minha vida, minha querida irmã Daniele, com todo seu carinho e cumplicidade tem me dado forças para continuar e ao meu amado pai Domingos Costa Dias, que mesmo não estando mais presente foi o iniciador de toda minha vontade em querer mais da vida, sempre me aconselhando e ensinado a viver com toda dedicação e amor.

À valiosa orientação do professor Ricardo Nascimento Araújo, que com toda dedicação e paciência tem sido presente desde o início até a conclusão deste trabalho, ao apoio, confiança, e principalmente pelo aprendizado e conhecimento imprescindíveis.

Ao meu co-orientador, professor Nelder de Figueiredo Gontijo, por ser uma pessoa amável e admirável em orientação e até em alguns conselhos, pela sua participação real no trabalho. Seu Nelder, muitíssimo obrigada!

Ao professor Marcos Horácio Pereira, pela atenção, pelo apoio, acompanhamento e interesse nas atividades.

Ao César Nonato, técnico do LFIH, pela amizade, respeito e por sua valiosa ajuda no desenvolver do trabalho.

À Dra. Vânia Cristina (Vaninha), que tem sido praticamente um anjo na minha vivência longe de casa. Obrigada pela amizade, apoio, pelo carinho e por tudo que você tem feito para tornar agradável a vida longe da família.

Ao Vladimir Fazito, pela amizade, por toda ajuda e pela excelente convivência.

À Ceres Luciana, também pela amizade, dedicação e disponibilidade em ajudar.

À Adriana Soares, pela amizade e disponibilidade em tudo que precisei.

À Fernanda Rocha, por sua presença agradável, amizade, apoio e ouvidoria.

À Rafinha Paim, por ter se mostrado uma grande amiga e por ser essa pessoa admirável.

Aos amigos do LFIH e "conterrâneos", Alexandre, Kleber, Kel, Naylene, Antonio, pela amizade e por tornar BH um pouco mais parecida com nossa a casa.

Aos amigos: Daniele, Lívia, Dimitri, Raffaello, Paula, Gabriel, Cássio, Kolyvan e Natália. O LFIH, não seria tão bom sem a amizade e alegria de vocês.

Aos amigos, ex-integrantes do Departamento: Karla e Andrey Andrade, pelos momentos de descontração nas conversas, pelo carinho e amizade.

Aos Professores e amigos do Departamento de Parasitologia que fazem da "Parasito" um lugar agradável e produtivo.

Aos professores Valter Santos, Alan Lane, José Ramiro e Pedro Linardi, pelo carinho e atenção.

Ao professor Reginaldo Roris Cavalcante, por todo apoio e carinho;

Aos amigos da turma: Ruthinha, Tiago, Greg, Daniel, Michelle, Flaviane, Cyntia e Antonio.

Aos amigos da Igreja (do Evangelho Quadrangular- Jaraguá) pelo apoio, carinho, e toda força nos momentos difíceis.

A todos os outros amigos que de alguma maneira têm contribuído durante esta caminhada.

Aos meus familiares, pelo carinho e incentivo.

Ao meu tio Itamar de Brito Ramos, pelo amor, carinho e apoio incondicional;

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG e aos seus funcionários, principalmente, a Sumara e Sibebe pelas orientações e auxílio;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Tudo que se descobre através da ciência é apenas uma aproximação da verdade, porque a verdade está com Deus.

Nelder Gontijo

E sabemos que todas as coisas contribuem juntamente, para o bem daqueles que amam a Deus.

Rm. 8:28

Lista de figuras

Figura 1	Fases evolutivas do ciclo de <i>Rhodnius prolixus</i>	01
Figura 2.	Esquema das sucessivas fases durante o processo alimentar de <i>Rhodnius prolixus</i> na pele de um roedor.....	07
Figura 3.	Corte do tórax de um espécime de <i>Rhodnius prolixus</i> mostrando em detalhe a glândula salivar de coloração vermelho cereja.....	10
Figura 4.	Reconhecimento de antígenos salivares de <i>Rhodnius prolixus</i> por anticorpos IgG presentes em diferentes diluições de “pools” de soros de camundongos Swiss expostos à alta e baixa infestação por <i>R. prolixus</i> , <i>Triatoma infestans</i> e <i>Triatoma brasiliensis</i>	25
Figura 5.	Reconhecimento de antígenos salivares de <i>Triatoma infestans</i> por anticorpos IgG presentes em diferentes titulações de “pools” de soros de camundongos Swiss expostos à alta e baixa infestação por <i>Rhodnius prolixus</i> e <i>T. infestans</i>	26
Figura 6.	Reconhecimento de antígenos salivares de <i>Rhodnius prolixus</i> por anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos swiss expostos à alta e baixa infestação por <i>R. prolixus</i> , <i>Triatoma infestans</i> e <i>Triatoma brasiliensis</i>	27
Figura 7.	Perfil eletroforético do extrato de glândula salivar de <i>Rhodnius prolixus</i> e reconhecimento de antígenos salivares por anticorpos IgG presentes no soro de camundongos Swiss previamente submetidos a alta infestação por <i>R. prolixus</i>	28
Figura 8.	Fracionamento do extrato de glândula salivar de <i>Rhodnius prolixus</i> , identificação das frações com atividade apirásica e visualização das moléculas ativas.....	29
Figura 9.	Cromatografia das frações ativas recuperadas do fracionamento da saliva de <i>Rhodnius prolixus</i> em coluna de exclusão molecular; identificação das frações com atividade apirásica e visualização das moléculas presentes nas frações ativas.....	30

Figura.10.	Terceiro fracionamento das frações ativas obtidas, identificação das frações com atividade apirásica e visualização das possíveis proteínas ativas.....	32
Figura 11.	Purificação da apirase salivar de <i>Rhodnius prolixus</i> em coluna de blue sepharose.....	33
Figura 12.	Perfil eletroforético de diferentes quantidades de glândulas salivares e da apirase salivar de <i>Rhodnius prolixus</i> purificada por eletroeluição.....	34
Figura 13.	Reconhecimento da apirase salivar de <i>Rhodnius prolixus</i> por anticorpos IgG presentes no soro de camundongos Swiss diluídos a 1:40 usados como fonte alimentar por triatomíneos (média ± DP).....	35
Figura 14.	Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da apirase 1 encontrada no genoma de <i>Rhodnius prolixus</i> que possui homologia com a apirase de <i>Aedes aegypti</i> (EAT41732).....	37
Figura 15.	Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da apirase 2 encontrada no genoma de <i>Rhodnius prolixus</i> que possui homologia com a apirase de <i>Cimex lectularius</i> (AAD09177).....	38
Figura 16.	Alinhamento das sequências da apirase 1 (apirase endossomal) de <i>Rhodnius prolixus</i> com a apirase de <i>Aedes aegypti</i> (EAT41732).....	39
Figura 17.	Alinhamento das sequências da apirase 2 (apirase salivar) de <i>Rhodnius prolixus</i> com a apirase de <i>Cimex lectularius</i> (AAD09177).....	39
Figura 18.	Resultados da avaliação da presença de peptídeo sinal nas apirases de <i>Rhodnius prolixus</i> pela ferramenta SignalP.....	40
Figura 19.	Expressão da apirase na glândula salivar e intestino médio anterior de ninfas de 3º estágio de triatomíneos.....	42

Lista de tabelas

Tabela 1.	Grupos de camundongos e espécies de triatomíneos utilizados nas imunizações.....	19
Tabela 2.	Espécie e número de acesso das apirases salivares de insetos hematófagos recuperadas do banco de dados de proteínas do NCBI.....	36
Tabela 3.	Sequência de iniciadores usados nas PCRs.....	42

Lista de abreviaturas e siglas

Abs – absorvância

Apy - apirase

ADP - difosfato de adenosina

AMP – monofosfato de adenosina

ATP – trifosfato de adenosina

BSA - soro albumina bovina

cDNA - DNA complementar

dNTP - desoxirribonucleotideo trifosfato

SD – desvio padrão

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético (inibidor de metalo-proteases)

EGS – extrato de glândula salivar

ELISA – Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (teste imunoenzimático)

EST - *Expressed Sequence Tags* (etiquetas de sequências expressas)

E-64 – trans-Epoxysuccinyl-L-leucilamido (4-guanidino) butane, L-trans-3-Carboxyoxiran-2-carbonyl-L-leucylagmatine, N-(trans-Epoxysucniyl)-L-Leucine-4- guanidinobutylamide (inibidor de cisteino–protease).

g - aceleração da gravidade

HEPES - (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)

HPLC – high-performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)

Ig E – imunoglobulina E

Ig G – imunoglobulina G

Ig M – imunoglobulina M

kDa - quilodaltons

min - minutos

mM - milimolar

mRNA - RNA mensageiro

NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica

NPs - nitroforinas

n.s - não significativo

nm – nanômetros

OPD - O-Phenylene-Diamine (orto-fenilenodiamino)

pb - pares de base

PBS – solução salina fosfatada

PBS -T – solução salina fosfatada/tween

Pepstatina A – inibidor de aspartil-protease

PCDCh – Programa Nacional de Controle de Doença de Chagas

PCR - *Polymerase Chain Reation* (reação em cadeia da polimerase)

pH - potencial hidrogeniônico

RNA - ácido ribonucleico

s – segundos

SDS – PAGE – gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

Tris base – tris (hidroximetil) amino metano

V – volts

3,4 – DCI – Dicloroiso-cumarina (inibidor de serino-protease)

Abstract

Triatomines bugs are important haematophagous insects and vectors of *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease in America. Identification of triatomine infestations and control are the main procedures recommended by the Chagas disease Control Program (PCChD). The current methodology used for entomological inquiries is considered expensive and demands well trained workers. Thus, it is important to develop alternative tools to investigate triatomine infestations. Due to the direct contact between the saliva and the host immune system, the monitoring of the level of antibodies anti-saliva in persons from endemic areas would be a good alternative for entomological inquiries. Therefore, the present work aimed at the identification of immunogenic salivary antigens to evaluate their use as contact markers for triatomines. For such, we exposed groups of mice to low and high infestations of different triatomine species. After that, the most immunogenic antigens in mice's sera were identified by immunoenzymatic assays (ELISA) and Western Blot. The most immunogenic antigens were purified and evaluated for cross reaction among the species of triatomines by using ELISA. The results showed that the mice exposed to low and high infestations by *R. prolixus* and *Triatoma infestans* developed an anti-saliva specie-specific response. Responses to low and high infestations were not different in the serum of mice exposed to *R. prolixus* saliva. The western blot results showed that a protein with 48.4 kDa and another with 18.2 kDa were the most immunogenic molecules in *R. prolixus* saliva. The 48.5 kDa protein was purified and identified as a salivary apyrase. ELISA showed that the apyrase from *R. prolixus* can be recognized by antibodies produced in mice exposed to *R. prolixus* infestations, but it cannot be recognized by serum of mice exposed to *T. infestans* or *Triatoma brasiliensis* infestations. By searching the NCBI databases, we identified two types of apyrase expressed in *R. prolixus* salivary glands: one intracellular and another secreted (probably the antigen with 48.5 kDa founded in the Western blot). Our results indicate the salivary apyrase from *R. prolixus* as a promising contact marker for the triatomine infestations. Nevertheless, other experiments must be

carried out to encounter other salivary antigens adequate to avoid cross reactions with salivary proteins from triatomine and other arthropods.

Key words: *Rhodnius prolixus*, saliva, apyrase, antigens, antibodies

Resumo

Os triatomíneos são insetos hematófagos e importantes vetores do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas nas Américas. Um dos principais procedimentos preconizados pelo Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh) consiste na identificação de residências infestadas e eliminação dos triatomíneos vetores. Os métodos atuais utilizados nos inquéritos entomológicos são considerados caros, precisam de mão de obra treinada e são sujeitos a erros. Sendo assim, é interessante desenvolver novos métodos que auxiliem ou substituam os atuais. Como a saliva dos triatomíneos entra em contato direto com o sistema imune do hospedeiro, uma alternativa atraente é o monitoramento do nível de anticorpos anti-saliva presentes no soro de indivíduos de regiões endêmicas. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram identificar antígenos salivares imunogênicos de triatomíneos e avaliar sua utilização como marcador de contato por *Rhodnius prolixus*. Para isto, grupos de camundongos foram expostos a altas e baixas infestações por diferentes espécies de triatomíneos e seu soro foi utilizado em ensaios imunoenzimáticos e western-blot para identificação dos antígenos salivares mais imunogênicos. Os antígenos identificados foram purificados e avaliados por ELISA quanto ao reconhecimento cruzado entre as espécies e espécie específico. Os ensaios imunoenzimáticos mostraram que camundongos expostos a altos e baixos níveis de infestação pelo *R. prolixus* e *Triatoma infestans* desenvolvem uma resposta espécie específica anti-saliva mediada por IgG. Não foi observada diferença significativa no soro de camundongos expostos a altos e baixos níveis de infestação pelo *R. prolixus*. O western-blot mostrou que os antígenos mais imunogênicos da saliva de *R. prolixus* são duas proteínas de 48,5 e 18,2 kDa. A proteína de 48,5 kDa foi purificada e identificada como a apirase salivar do *R. prolixus*. Resultados do ELISA mostraram que a apirase salivar é reconhecida por anticorpos IgG presentes no soro de camundongos expostos a infestação por *R. prolixus*, mas não é reconhecida por anticorpos IgG presentes no soro de camundongos expostos a infestação por *T. infestans* e *Triatoma brasiliensis*. Buscas realizadas nos bancos de dados (NCBI) identificaram duas apirases expressas na glândula salivar do *R. prolixus*, sendo uma endógena e uma secretada

(provavelmente o antígeno de 48,5 kDa). De forma geral, os resultados indicam que apirase salivar possui potencial para ser utilizada como marcador de contato para *R. prolixus*, mas novos ensaios devem ser realizados para avaliar a reação cruzada com outras espécies de triatomíneos e com outros artrópodes.

Palavras-chave: *Rhodnius prolixus*, saliva, apirase, antígenos, anticorpos

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Biologia e importância dos triatomíneos.....	1
1.2. Inquéritos entomológicos e epidemiologia dos triatomíneos.....	4
1.3. Processo alimentar e interação com o hospedeiro.....	6
1.4. Composição da saliva dos triatomíneos.....	9
1.5. Marcadores de contato vetor-hospedeiro.....	11
1.6. Apirase salivar do <i>Rhodnius prolixus</i>	13
2. Justificativa.....	15
3. Objetivos.....	16
3.1. Objetivo geral.....	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
4. Metodologia.....	17
4.1. Aspectos éticos.....	17
4.2. Obtenção dos triatomíneos	17
4.3. Obtenção de extratos de glândula salivar dos triatomíneos.....	17
4.4. Quantificação de proteínas.....	18
4.5. Imunização de camundongos Swiss contra saliva de triatomíneos....	18
4.6. Obtenção do soro dos camundongos imunizados.....	19
4.7. Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	19
4.8. SDS-PAGE e Western Blot.....	20
4.9. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	21
4.10. Fracionamento através da coluna de exclusão molecular.....	21
4.11. Fracionamento através da coluna de Troca aniônica.....	21
4.12. Fracionamento através da coluna de Blue Sepharose	21
4.13. Purificação da apirase por eletroeluição.....	22
4.14. Ensaio de atividade da apirase.....	22
4.15. Identificação da sequência da apirase salivar.....	23
4.16. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR.....	23
4.17. Cálculos estatísticos dos grupos experimentais.....	24
5. Resultados.....	25

5.1. Reconhecimento de antígenos salivares de <i>Rhodnius prolixus</i> por anticorpos IgG presentes no soro de camundongos.....	25
5.2. Identificação das moléculas imunogênicas presentes na saliva do <i>Rhodnius prolixus</i>	28
5.3. Avaliação da apirase salivar como marcador de contato de camundongos com <i>Rhodnius prolixus</i>	34
5.4. Identificação da sequência de nucleotídeos e aminoácidos da apirase salivar do <i>Rhodnius prolixus</i>	36
6. Discussão.....	43
6.1. Reconhecimento de antígenos salivares de <i>Rhodnius prolixus</i> por anticorpos IgG presentes no soro de camundongos.....	45
6.2. Identificação das moléculas imunogênicas presentes na saliva do <i>Rhodnius prolixus</i>	47
6.3. Avaliação da apirase salivar como marcador de contato de camundongos com <i>Rhodnius prolixus</i>	48
6.4. Identificação da sequência de nucleotídeos e aminoácidos da apirase salivar do <i>Rhodnius prolixus</i>	50
7. Conclusões.....	52
8. Referências bibliográficas.....	53
9. Anexos.....	66

1. Introdução

1.1. Biologia e importância dos triatomíneos

Os Triatomíneos são uma subfamília de insetos pertencentes à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera e família Reduviidae, sendo reconhecidas até o momento 142 espécies agrupadas em 18 gêneros (Gurgel-Gonçalves et al. 2012). Definidos por seu hábito alimentar e adaptações morfológicas associadas com sua alimentação e seu hospedeiro, estes insetos são paurometábulos tendo seu ciclo de desenvolvimento biológico passando pelas fases de ovo, ninfa (cinco estádios ninfais) e adulto desenvolvido em macho e fêmea (Fig. 1) (Lent & Wygodzinsky 1979). Tanto as formas imaturas quanto os adultos, se alimentam exclusivamente de sangue, atuando como ectoparasitos temporários de hospedeiros vertebrados (Lavoipierre et al. 1959).



Figura 1 - Fases evolutivas do ciclo de *Rhodnius prolixus*. Os insetos adultos medem aproximadamente 2 cm. fonte: (Rocha 2010).

Além da espoliação sanguínea, os triatomíneos apresentam importância médica e epidemiológica por serem os insetos transmissores do protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico da doença de Chagas (Azambuja et al. 1999; Garcia et al. 1999). Estima-se que existam aproximadamente 10 milhões de pessoas infectadas no mundo com o *T. cruzi* e outras 40 milhões vivendo em áreas de risco de transmissão (Schofield et al. 2006). Os países mais afetados localizam-se na região neotropical entre as latitudes 42° norte e 46° sul. No Brasil, a doença acomete cerca de 1,9 milhões de pessoas (Rassi et al. 2010).

Dentre as várias espécies importantes para a transmissão do *T. cruzi* para humanos destacam-se o *Rhodnius prolixus* Stal 1859, o *Triatoma infestans* Klug, 1834 e o *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911.

Nos países do Cone Sul, o *T. infestans* é a espécie mais importante na transmissão da doença. Este triatomíneo possui seu centro de dispersão na região da Bolívia e foi introduzido no Brasil provavelmente através de migrações humanas (Schofield & Dias 1999). Além do Brasil, também está presente na Argentina, Chile, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Peru (Schofield 1994). Esta espécie é altamente adaptada ao intradomicílio, sendo encontrada principalmente em habitações em estado precário de conservação e no peridomicílio. Devido a sua importância, diversos programas de controle foram implementados nos países do cone sul. Estima-se que estas intervenções reduziram a distribuição do *T. infestans* para uma área equivalente a 14,6% da área endêmica original e que a incidência da doença de Chagas tenha sido reduzida em 60% no Paraguai e 99% no Uruguai e no Chile (<http://www.who.int/ctd/chagas/epidemiology.htm>) (Schofield et al. 2006). No Brasil, após eficaz atuação do “Programa de Controle da Doença de Chagas”, o país foi certificado pela Organização Pan-Americana de Saúde como livre de transmissão pelo *T. infestans* em 2006 (Schofield et al. 2006). Embora a Iniciativa do Cone Sul tenha reduzido com sucesso a população de *T. infestans*, alguns obstáculos vêm sendo enfrentados principalmente devido ao desenvolvimento de resistência contra os principais inseticidas utilizados no controle e das dificuldades para controlar as populações peridomésticas, que podem recolonizar os domicílios após a eliminação dos espécimes domiciliados com inseticidas (Cecere et al. 2002; Schofield 1994). Desta forma, o *T. infestans* ainda continua sendo um vetor potencialmente importante para a doença de chagas (Cecere et al. 2002).

O *T. brasiliensis* é a principal espécie vetora no nordeste do Brasil (Dias 2007). Esta espécie predomina nas zonas secas, sendo encontrada atualmente nos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e Tocantins (Costa et al. 2003). *T. brasiliensis* é encontrado associado com ninhos de roedores, gambás e pássaros, assim como abrigos de várias espécies de morcegos. Ele transmite o *T. cruzi* entre roedores e gambás e também é capaz de colonizar

tanto o peridomicílio quanto o domicílio, espoliando sangue dos humanos e dos animais domésticos (Alencar 1987). Isso aumenta a importância do *T. brasiliensis* como vetor, uma vez que espécimes silvestres podem recolonizar as habitações humanas onde tenha havido, anteriormente, um controle destes insetos pela aspersão de inseticidas (Diotaiuti et al. 2000).

A espécie *R. prolixus* é a principal vetora da doença de Chagas em algumas áreas da América Central e Norte da América do Sul (Dias et al. 2002a; Ponce 2007). A espécie pode ser encontrada em algumas regiões da Amazônia (Abad-Franch & Monteiro 2007). As espécies do gênero *Rhodnius* tem preferência por áreas úmidas. Em países como Venezuela e Colômbia, *R. prolixus* apresenta caráter silvestre, habitando principalmente as copas de palmeiras porém, em algumas áreas, já pode ser encontrado bem estabelecido no intradomicílio (Schofield 1994). Em algumas partes da América Central, como Guatemala, Honduras e El Salvador, apresenta hábitos quase que exclusivamente domésticos, o que aumenta sua importância como vetor (Schofield 1994).

Além das três principais espécies descritas acima, outras espécies merecem destaque no Brasil, dentre elas:

- *Panstrongylus megistus* (Burmeister 1835): uma das espécies mais importantes do sudeste, responsável pela transmissão do *T. cruzi* em amplas áreas do estado de Minas Gerais (Dias 1982; Santos Junior et al. 2011) e ainda prevalente em unidades domiciliares do centro-oeste do estado (Villela et al. 2005).

- *Triatoma pseudomaculata* (Corrêa & Espinóla 1964) e *Triatoma sordida* (Stal 1859): colonizam frequentemente o peridomicílio, onde ocorre reinvasão proveniente de ecótopos naturais e possuem importância secundária na transmissão do *T. cruzi* (Assis et al. 2007; Carcavallo 1999; Dias et al. 2002a).

Os triatomíneos do gênero *Rhodnius* também transmitem o protozoário *Trypanosoma rangeli*, porém este é considerado não patogênico para humanos e animais, mas podem causar danos fisiológicos ao inseto vetor (Garcia et al. 1994; Hecker et al. 1990). Diferentemente do *T. cruzi*, que é capaz de se desenvolver em diferentes gêneros de triatomíneos, o desenvolvimento

completo do *T. rangeli* ocorre somente em triatomíneos do gênero *Rhodnius* (Hecker et al. 1990).

1.2. Inquéritos entomológicos e epidemiologia dos triatomíneos

Apesar dos reduviídeos estarem distribuídos em todos os continentes, os triatomíneos são encontrados principalmente nas Américas de 46° N a 46°S. Uma espécie, *Triatoma rubrofasciata* (De Geer 1773), foi descrito em regiões portuárias dos trópicos e subtropicais e um pequeno grupo de sete espécies do gênero *Triatoma* foram encontrados no leste da Ásia (da China ao norte da Austrália). Além destes, seis espécies do gênero *Linshcosteus* foram descritos na Índia (Schofield & Galvao 2009).

A distribuição dos triatomíneos pelas Américas é influenciada por diversos fatores ambientais e características de cada espécie. A maior parte das espécies é encontrada no ambiente silvestre, normalmente associadas a animais como aves, roedores e marsupiais (Noireau et al. 2005). As habitações humanas também podem servir como ambiente de colonização e triatomíneos podem ser encontrados na região peridomiciliar e intradomiciliar alimentando-se de animais domésticos como galinhas, cães, gatos, cobaias e humanos (Noireau et al. 2005). Do ponto de vista epidemiológico, as espécies mais importantes são aquelas com capacidade para colonizar as habitações humanas (Dias & Diotaiuti 1998).

O controle dos níveis populacionais de triatomíneos ainda é uma das principais medidas preconizadas pelo Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh) (Ministério da Saúde 1980). Até a descentralização a descentralização operativa das ações de controle, a avaliação das populações de triatomíneos foi baseada nos resultados de inquéritos entomológicos que eram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Programa de Controle da doença de Chagas (PCDCh) (Ministério da Saúde 1980). Os agentes de saúde faziam uma busca ativa por triatomíneos no intra e peridomicílio das unidades domiciliares que dura de 30 a 50 minutos. Os espécimes encontrados eram coletados com auxílio de pinças e lanternas, acondicionados em potes apropriados, identificados quanto ao local de coleta e enviados para os locais licenciados para identificação e avaliação da possível infecção pelo *T. cruzi*. Este procedimento, apesar de trabalhoso e sujeito a

erros, permite conhecer os locais onde existe maior chance de haver transmissão da doença de Chagas. I

Atualmente a vigilância entomológica é realizada pelos próprios moradores que, quando identificam um triatomíneo, notificam os órgãos de saúde, que determina a realização de uma investigação mais minuciosa por agentes de saúde treinados (CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS 2005).

Inquéritos entomológicos realizados nos últimos anos têm seu foco em países da América Central e América do Sul, que são os mais acometidos pela doença de Chagas, e mostraram uma situação em que várias áreas ainda apresentam grande risco de transmissão do *T. cruzi*.

Recentemente em uma região da Colômbia, um trabalho de pesquisa entomológica detectou presença de quatro espécies de triatomíneos, *Triatoma maculata* (Erichson, 1848), *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) e *R. prolixus*. Esta última espécie apresentou índices de densidade predominante, 54,7% num total de 1.431 casas inspecionadas. O diagnóstico parasitológico ainda revelou um alto índice de triatomíneos infectados por *T. cruzi* (média de 9,4%), especialmente *R. prolixus* e *T. maculata* (Montilla et al. 2011).

Feliciangeli et al. (2007) estudaram os fatores de risco de infecção por *T. cruzi* na Venezuela e identificaram uma situação epidemiológica em que o risco de infecção foi resultado da presença de populações silvestres de *R. prolixus* e a presença de colônias domésticas residuais.

No Brasil, estudos envolvendo uma área de 16 municípios no Triângulo Mineiro e Alto Parnaíba, MG, no período de 2002 a 2004, revelaram que 50% dos triatomíneos capturados, apresentaram positividade para *T. cruzi*, num total de 771 espécimes examinados. Ao todo foram identificadas cinco espécies, sendo *T. sórdida* (75,5%), *Panstrongylus diasi* (0,8%), *P. megistus* (18%), *P. geniculatus* e *Rhodnius neglectus* (9,3%) (Paula et al. 2010).

Inquéritos epidemiológicos e entomológicos chamam atenção para o aumento do número de triatomíneos infectados infestando casas na região Nordeste, segunda região mais infestada por triatomíneos no Brasil. Dados revelam em Salvador-BA, uma considerável distribuição de triatomíneos sendo 43,3% coletados fora das residências, 39,9% em áreas do peridomicílio e

16.8% dentro das residências. Os triatomíneos mais encontrados foram principalmente dos gêneros *Triatoma tibiamaculata* e *Panstrongylus geniculatus* que apresentaram presença de infecção com *T. cruzi* em mais de 20% dos espécimes (Santana Kde et al. 2011). No Ceará, *T. brasiliensis* é a espécie de maior prevalência no intradomicílio (Gonçalves et al. 2009). Nas investigações entomológicas em municípios do Maranhão onde havia casos notificados da doença de Chagas, foram encontrados exemplares de *R. robustus* positivos para formas tripomastigotas do *T. cruzi* (Cutrim et al. 2010).

Em geral, as espécies do complexo *Rhodnius prolixus* têm apresentado facilidade em colonizar ambientes artificiais. As populações naturais ocupam ecótopos arbóreos (preferencialmente palmeiras) em aproximadamente 28 regiões biogeográficas da América Central ao sul do Brasil (Abad-Franch & Monteiro 2007). Mas algumas populações se adaptaram ao ambiente artificial em diferentes regiões, como é o caso do *R. prolixus* que é um dos mais importantes vetores domésticos da doença de Chagas na América Central e alguns países da América do Sul (Dias 2007). Há vários registros desta espécie em localidades da Amazônia (Brasil, Guiana e Colômbia). A capacidade dos Rhodiniini em se adaptar à copa de árvores, com ampla distribuição em toda Amazônia, é bem documentada e pode sinalizar uma potencial dispersão para o sul (Abad-Franch & Monteiro 2007). Marcilli et al. (2009) caracterizaram 43 isolados de *T. cruzi* a partir de isolados de seres humanos, primatas silvestres e triatomíneos do gênero *Rhodnius*.

Atualmente, o Brasil é considerado oficialmente livre de transmissão da doença de Chagas pelo *T. infestans*, no entanto, ciclos enzoóticos e ocupação de nichos por outras espécies de triatomíneos (como *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida*), anteriormente ocupados por *T. infestans* mostram necessidade de manter as atividades epidemiológicas permanentes para evitar um ressurgimento da doença (Costa & Peterson 2012; Dias 2007).

1.3. Processo alimentar e interação com o hospedeiro

O ciclo de vida e a dinâmica populacional dos triatomíneos estão diretamente relacionados à interação com seus hospedeiros vertebrados. O contato dos insetos com seus hospedeiros ocorre apenas durante o repasto

sanguíneo que geralmente dura de 20 a 50 minutos. Durante este tempo, dependendo da espécie, um triatomíneo adulto pode ingerir até 1 ml de sangue (Schofield 1994).

Os triatomíneos são ectoparasitos solenofágicos, isto é, que obtêm o sangue diretamente dos vasos sanguíneos (vênulas ou arteríolas) da pele dos hospedeiros vertebrados (Fig. 2). Suas peças bucais contêm mandíbulas serrilhadas que perfuram e ancoram o aparato bucal na região superficial da pele, enquanto as maxilas penetram até a derme. Imediatamente após a introdução do fascículo (um par de mandíbulas e um par de maxilas) na pele do hospedeiro, inicia-se a fase de sondagem, em que as maxilas realizam movimentos oscilatórios, como um chicote, até identificarem e penetrarem em um vaso sanguíneo, passando, então, à fase de ingurgitamento (Lavoipierre et al. 1959).

A fase de ingurgitamento é, normalmente, a mais demorada e é caracterizada pelo bombeamento, pela bomba cibarial localizada na cabeça do inseto, do sangue diretamente do vaso sanguíneo para o local de armazenamento da dieta dos triatomíneos, o intestino médio anterior (Lavoipierre et al. 1959).

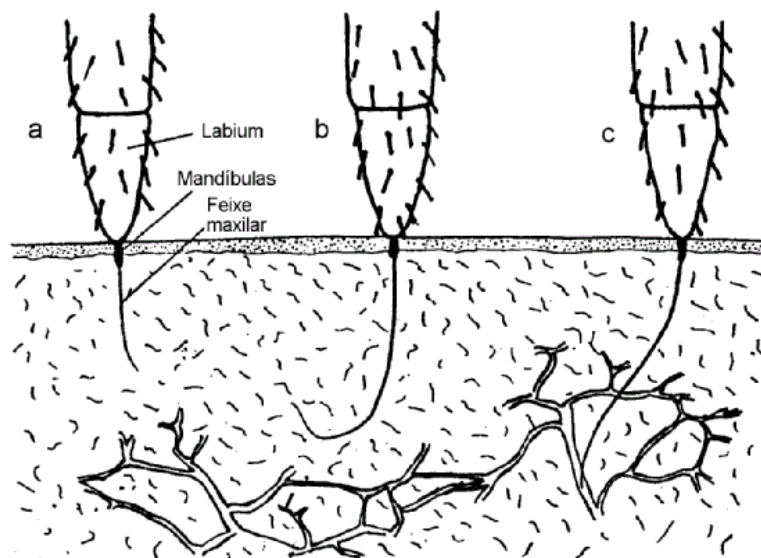


Figura 2 - Esquema das sucessivas fases durante o processo alimentar de *R. prolixus* na pele de um roedor. a: o feixe maxilar penetrando nos tecidos; b: início da fase de sondagem; c: introdução da extremidade do feixe maxilar no vaso sanguíneo (modificado de Lavoipierre et al. 1959).

Em ambas as fases da alimentação, as peças bucais do inseto entram em íntimo contato com os tecidos e o sangue do hospedeiro, fazendo com que as reações reparatórias e imunes sejam ativadas a fim de combater a perda de sangue e expulsar o agente agressor (Ribeiro & Francischetti 2003). Para conseguir neutralizar as reações do hospedeiro, os triatomíneos liberam grande quantidade de saliva em todas as fases de seu processo alimentar. Essa saliva é liberada tanto na derme durante a fase de sondagem quanto no sangue durante a fase de ingurgitamento (Soares et al. 2006).

Apesar do contato do inseto com o hospedeiro envolver as peças bucais e a saliva, as reações imunes do hospedeiro são desencadeadas principalmente pela saliva (Fox & Bayona 1968; Jones 1996). Estes achados foram relatados em experimentos anteriores realizados por Hudson et al. (1970) em que as glândulas salivares de mosquitos foram cirurgicamente removidas e os insetos foram incapazes de causar reação ao hospedeiro posteriormente à alimentação, diferentemente do grupo controle (insetos com glândulas salivares).

A exposição de antígenos estranhos ao vertebrado, como as moléculas salivares dos insetos, leva o sistema imunológico deste a reconhecer esses antígenos e reagir contra eles. Foi observado que humanos sem contato prévio com mosquitos não apresentam reação imunológica à picada. Entretanto, em um segundo contato observa-se uma hipersensibilidade tardia que, em caso de permanência do estímulo (picada/saliva) passa a hipersensibilidade imediata (Mellanby 1946).

Trabalhos realizados anteriormente, demonstram que os hospedeiros dos triatomíneos desenvolvem uma resposta imune anti-saliva com a produção de anticorpos capazes de reconhecer as moléculas salivares das espécies hematófagas. Fox & Bayona (1968) mostraram pela primeira vez o desenvolvimento de resposta imune contra a saliva de triatomíneos. Neste trabalho, três bandas foram observadas em ensaios de precipitina feitos com extratos da glândula salivar do *R. prolixus* e soro de coelhos expostos a picadas desta mesma espécie (Fox & Bayona 1968).

Volf et al. (1993) mostraram que a resposta de anticorpos anti-saliva aumentava gradativamente após uma, duas ou três exposições à picadas de *T. infestans*. Os autores descreveram que apenas três proteínas salivares de alto

peso moléculas (100, 120 e 80 kDa) foram imunogênicas e o soro dos animais não reconheceu nenhum antígeno na faixa de 18 a 35 kDa, que é onde se encontra a maior parte das proteínas salivares do *T. infestans*.

Barbosa et al. (2004) demonstraram que coelhos expostos a picadas de adultos de *P. megistus* desenvolveram baixa resposta de anticorpos contra antígenos salivares. Entretanto, apesar do baixo nível de anticorpos, o soro foi capaz de diferenciar populações de *P. megistus* pelas diferenças apresentadas nos pesos moleculares dos antígenos reconhecidos. Proteínas de baixo peso molecular foram reconhecidas pelo soro, porém os antígenos salivares mais imunogênicos foram aqueles entre 68 e 97,4 kDa. Estes resultados se assemelham aos encontrados por Volf et al. (1993) nos trabalhos com *T. infestans*.

1.4. Composição da saliva dos triatomíneos

Os vertebrados desenvolveram sofisticados sistemas hemostáticos, visando minimizar a perda de sangue. Por outro lado, os artrópodes hematófagos apresentam um amplo e redundante repertório de proteínas capazes de facilitar a ingestão do sangue do hospedeiro vertebrado (Ribeiro & Francischetti 2003; Ribeiro et al. 1998). Este repertório de proteínas tem como objetivo inibir os três principais mecanismos de reparação do hospedeiro, sendo eles: a hemostasia, a inflamação e a resposta imune.

Atualmente, são conhecidas várias atividades farmacológicas presentes na saliva dos triatomíneos com capacidade de interferirem na hemostasia, tais como, anticoagulantes (Hellmann & Hawkins 1964, 1965; Pereira et al. 1996; Ribeiro et al. 1995), vasodilatadores (Ribeiro et al. 1993; Ribeiro et al. 1990; Ribeiro & Nussenzveig 1993) e inibidores de agregação plaquetária induzida por colágeno (Noeske-Jungblut et al. 1994), por ADP (Ribeiro & Garcia 1981; Sarkis et al. 1986), por ácido aracdônico (Ribeiro & Sarkis 1982) e por trombina (Francischetti et al. 2000; Noeske-Jungblut et al. 1995).

Além dos anti-hemostáticos, foram descritas outras atividades como anti-histamínica (Ribeiro & Walker 1994; Ribeiro & Sarkis 1982), bloqueadora de canal de sódio (Dan et al. 1999) com atividade imunossupressora (Kalvachova et al. 1999), sialidásica (Amino et al. 2001) e atividade anticomplemento (Barros et al. 2009; Cavalcante et al. 2003).

Apesar deste grande número de atividades descritas, poucas moléculas salivares dos triatomíneos são conhecidas. De forma geral são conhecidas poucas moléculas distribuídas em diferentes gêneros e espécies.

Para o *R. prolixus*, as moléculas mais conhecidas são as nitroforinas (NPs), uma proteína inibidora da agregação plaquetária (RPAI-1) e um grupo de proteínas ligadoras de aminas biogênicas. As NPs são hemoproteínas multifuncionais que constituem cerca de 50% das proteínas salivares e contribuem para cor vermelho cereja em sua glândula salivar (Fig. 3) (Champagne et al. 1995a). Atualmente sete NPs são reconhecidas, porém somente as NP1 a 4 e a NP7 possuem sua sequência descrita (Champagne et al. 1995a; Knipp et al. 2007a; Moreira et al. 2003). As NP1 a 4 possuem peso molecular de 20,4, 19,6, 19,7 e 20,9, respectivamente (Champagne et al. 1995a). A NP7, última NP a ser descrita, possui peso molecular de 22,9 kDa (Knipp et al. 2007b). Curiosamente, a forma nativa da NP7 nunca foi isolada da saliva do *R. prolixus*, todos os estudos moleculares e funcionais foram realizados a partir da proteína recombinante cuja sequência foi identificada no sialoma do *R. prolixus* (Ribeiro et al. 2004).



Figura 3 - Corte do tórax de um espécime de *Rhodnius prolixus* mostrando em detalhe a glândula salivar de coloração vermelho cereja.

Além das NPs, dentre as moléculas salivares de *R. prolixus*, estudos foram realizados com a RPAI-1, um inibidor de agregação plaquetária de 19 kDa (Francischetti et al. 2002; Francischetti et al. 2000) e as proteínas ligadoras de aminas biogênicas com peso molecular aproximado de 24 kDa (Andersen et al. 2003).

Outras moléculas são conhecidas na saliva de Triatomíneos de outros gêneros como a trialisina (Amino et al. 2002), a triapsina (Amino et al. 2001) e as apirases do *T. infestans* (Faudry et al. 2004); a triabina (Noeske-Jungblut et al. 1995), a triplatina (Morita et al. 2006) e a palidipina (Haendler et al. 1995) do *Triatoma pallidipenis* (Stål 1872); e a dipetalodipina (Assumpcao et al. 2010) do *Dipetalogaster maxima*, dentre outras.

Devido à quantidade e complexidade de moléculas encontradas na saliva dos triatomíneos, trabalhos recentes focaram em estudos em larga escala, sendo a maioria na descrição do sialoma (transcriptoma + proteoma da glândula salivar) dos triatomíneos. Atualmente, existem disponíveis informações do sialoma de *R. prolixus* (Ribeiro et al. 2004), *T. infestans* (Assumpcao et al. 2008), *T. brasiliensis* (Santos et al. 2007), *T. dimidiata* (Kato et al. 2010) e *D. maxima* (Assumpcao et al. 2011).

1.5. Marcadores de contato vetor-hospedeiro

Os insetos hematofagos desenvolveram uma série de moléculas em sua saliva que são injetadas no hospedeiro durante a alimentação. Essas moléculas salivares estimulam o desenvolvimento de uma resposta imune humoral em seus hospedeiros (Jones 1996). A detecção de anticorpos contra antígenos salivares foi usada anteriormente como ferramenta epidemiológica e marcador biológico de exposição a vetores de doenças como mosquitos, carrapatos, flebotomíneos e glossina (Barral et al. 2000; Cornelie et al. 2007; Poinsignon et al. 2007; Sanders et al. 1998; Schwartz et al. 1993).

Em mosquitos, a resposta imune contra as picadas foi associada à hipersensibilidade imediata mediada por IgE (Reunala et al. 1994). Entretanto, IgG4 e IgE foram detectadas em crianças com reações alérgicas ao *Aedes aegypti* e *Aedes communis* (Palosuo et al. 1997). Além disso, os níveis séricos de IgG4 foram associados como um indicador de intensidade de exposição às picadas de mosquitos (Reunala et al. 1994).

Nascimento et al. (2001) observaram que pessoas que viviam em áreas expostas ao *T. infestans*, apresentavam altos títulos de IgG anti-saliva em comparação com indivíduos controles provenientes de áreas sem o triatomíneo. Além disso, foi observado que a subclasse predominante em

indivíduos chagásicos era a IgG4 enquanto IgG1 era a principal subclasse em indivíduos não chagásicos moradores de área endêmica para o *T. infestans*.

Em um trabalho onde galinhas e cobaios foram expostos experimentalmente a picadas de *T. infestans*, respostas de anticorpos foram detectadas dois dias após as primeiras picadas (Schwarz et al. 2009b). O soro extraído das galinhas foi capaz de reconhecer majoritariamente dois antígenos salivares de 14 e 21 kDa, enquanto o soro dos cobaios reconheceu uma proteína de 79 kDa. O soro de animais expostos naturalmente a triatomíneos na Bolívia também reconheceram estas proteínas.

Em estudos subsequentes, as proteínas salivares do *T. infestans* foram separadas por eletroforese 2D e testadas quanto à imunogenicidade utilizando Wester-blot e soro de galinhas e cobaios experimentalmente expostos ao *T. infestans* (Schwarz et al. 2009a). Cinco antígenos foram identificados como mais imunogênicos e foram identificados por espectrometria de massa. Dos cinco antígenos, uma proteína de 14,6 kDa foi a que apresentou maior especificidade, uma vez que foi reconhecida por soro de galinhas e cobaios expostas a picadas de cinco espécies de triatomíneos (*T. infestans*, *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *R. prolixus* e *P. megistus*) e de galinhas de áreas endêmicas da Bolívia e não foi reconhecida por soro de animais imunizados com saliva de mosquitos e flebotomíneos. Além disso, esta proteína foi capaz de diferenciar domicílios com altas e baixas infestações de *T. infestans* pela análise do soro de galinhas mantidas no peridomicílio. Anticorpos IgG foram detectados no soro das galinhas até 5 meses após as exposições ao *T. infestans*, limitando sua utilização para detecção e monitoramento de re-infestações em curtos períodos após as medidas de controle.

Frente às limitações da utilização dos níveis de IgG que reconhecem a proteína salivar de 14,6 kDa de *T. infestans*, Schwarz et al. (2010) descreveram o reconhecimento da proteína por anticorpos da subclasse IgM presentes nos soros utilizados anteriormente (Schwarz et al. 2009a; Schwarz et al. 2009b). Foi observado que o reconhecimento da saliva bruta e do antígeno de 14,6 kDa por IgM reduziu rapidamente e foram detectados por apenas 18 dias após a exposição de galinhas às picadas de *T. infestans*. Galinhas expostas a altas e baixas infestações por *T. infestans* não apresentaram diferença significativa nos títulos de IgM anti-saliva e anti-14,6 kDa. Nas análises de reação cruzada,

foi observado que o antígeno de 14,6 kDa é reconhecido por IgM do soro de galinhas picadas por 4 outras espécies de triatomíneos (*T. brasiliensis*, *T. sordida*, *R. prolixus* e *P. megistus*), porém, não foi detectada resposta de IgM no soro de galinhas picadas por mosquitos (*Anopheles freeborni*, *Ae aegypti* e *Culex quinquefasciatus*) e flebotomíneos (*Lu. longipalpis*).

1.6. Apirase salivar do *Rhodnius prolixus*

As apirases (ATP-diphosphohidrolase EC 3.6.1.5) (Meyerhof 1945) são enzimas encontradas em grande quantidade na saliva de diferentes artrópodes hematófagos como mosquitos, flebotomíneos, carrapatos, pulgas e triatomíneos (Champagne 2005; Ribeiro & Francischetti 2003) (Fig. 4) Elas atuam hidrolisando adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato (ADP) em adenosina monofosfato (AMP) e fosfato inorgânico (Pi) (Sarkis et al. 1995). As apirases são ubíquas na saliva dos artrópodes hematófagos provavelmente porque ADP é um potente indutor da agregação plaquetária, liberado por células danificadas no local da lesão e por plaquetas já ativadas (Law et al. 1992; Watson et al. 2005). As glândulas salivares de várias espécies de artrópodes hematófagos apresentam atividade apirásica, onde um papel antihemostático lhe tem sido atribuído (Ribeiro et al. 1987).

As apirases de artrópodes hematófagos caracterizadas em nível molecular foram classificadas em três grupos. A primeira são as apirases pertencentes à família 5' nucleotidase que são moléculas que possuem sete regiões conservadas em sua sequência (Champagne et al. 1995b). Membros deste grupo em insetos hematófagos foram isolados inicialmente da saliva do *Aedes aegypti* (Champagne et al. 1995b), apresentando alto nível de atividade e especificidade, com peso molecular de 68 kDa e dependência dos íons cálcio (Ca^{2+}) ou magnésio (Mg^{2+}). Posteriormente foram encontradas apirases homólogas na saliva de *Anopheles gambiae* (Lombardo et al. 2000), *Ornithodoros savignyi* (Stutzer et al. 2009), *Chrysops* sp (Reddy et al. 2000), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Liyou et al. 1999).

Outro grupo de apirases foi inicialmente identificada em *Cimex lectularius* e confirmada ser enzimaticamente ativa, exclusivamente dependente do íon Ca^{2+} , com pH ótimo a 8,5. A análise da sequência indicou uma região apresentando peptídeo sinal e massa molecular de 37,5 kDa

(Valenzuela et al. 1998). Membros deste grupo foram mais tarde descobertos nas salivas de *Phlebotomus papatasi* (Valenzuela et al. 2001) e *Lutzomyia longipalpis* (Charlab et al. 1999).

Do último grupo fazem parte as apirases que possuem sequência similar aos membros da família CD39. Este tipo de apirase foi descrito apenas na saliva de *Xenopsylla cheopis* como uma proteína de peso molecular 46,9 kDa e dependente de Ca^{2+} (Andersen et al. 2007). Essa proteína apresentou claramente peptídeo sinal indicativo de secreção.

Chamando atenção aos triatomíneos, é interessante a apirase de *T. infestans*, a qual, na saliva observa-se cinco isoformas (de 88, 82, 79, 68 e 67 kDa) associadas a atividade apirásica, sendo que as moléculas de 88 e 82 kDa não estavam presentes em todos os indivíduos da espécie. A sequência do gene que codifica a apirase de 70 kDa, exibiu semelhanças com a família das 5' nucleotidases. Uma mistura dessas apirases purificadas se mostrou um potente inibidor de agregação plaquetária humana, atuado em pH ótimo 8,0, com atividade de hidrólise máxima de ATP e ADP na presença dos cátions Mg^{2+} , Co^{2+} ou Mn^{2+} (Faudry et al. 2004).

Em *R. prolixus*, a presença de uma proteína inibidora de agregação de plaquetas foi relatada por Ribeiro e Garcia (1980). Mais tarde, Sarkis et al. (1986) investigaram se esta proteína se tratava de uma apirase e a atividade foi cineticamente caracterizada, demonstrando seu papel na atividade anti-hemostática. A enzima purificada, a partir de exclusão molecular produziu um pico de atividade coincidente de atividade de hidrólise de ATP e ADP, mas apesar do seu alto nível de atividade no início da purificação, a enzima se mostrou instável com rápida perda de atividade. Os resultados desse trabalho levaram à predição de uma enzima com alta atividade capaz de hidrolisar tanto ATP quanto ADP, sendo assim uma enzima não específica.

2. Justificativa

Inquéritos entomológicos que avaliam o número e intensidade de espécies de triatomíneos presentes no intra e peridomicílio de regiões endêmicas para a doença de Chagas são informações consideradas extremamente importantes dentro do PCDCh para estimar o risco de transmissão do *T. cruzi* e da necessidade de intervenção em determinada área.

Os métodos até então utilizados para avaliar a prevalência e intensidade das infestações por triatomíneos no domicílio e peridomicílio, pelo programa de controle de doença de Chagas, apesar de apresentarem resultados satisfatórios e contribuírem para o controle dos vetores, são sujeitos a erros, principalmente em casas com baixa densidade populacional de triatomíneos como normalmente acontece em residências que foram incluídas nos programas de controle e foram borrifadas recentemente com inseticidas. No intuito de reduzir os custos e viabilizar um monitoramento a longo prazo de regiões endêmicas para a doença de Chagas, novos métodos alternativos são desejáveis para se estimar populações residuais ou re-emergentes de triatomíneos.

A identificação de um antígeno que permita, por imunoenaios, estimar infestações por triatomíneos de forma precisa, a partir do soro de moradores de áreas endêmicas, poderia reduzir consideravelmente os custos e a necessidade de mão de obra nos inquéritos epidemiológicos viabilizando a continuidade de uma vigilância epidemiológica eficiente para a doença de Chagas.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Identificar antígenos salivares imunogênicos de triatomíneos e avaliar sua utilização como marcador de contato por *R. prolixus*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o reconhecimento de antígenos salivares de *R. prolixus* pelo soro de camundongos usados como fonte alimentar por triatomíneos.
- Avaliar o reconhecimento de antígenos salivares de *T. infestans* pelo soro de camundongos usados como fonte alimentar por triatomíneos.
- Identificar quais os antígenos mais imunogênicos da saliva do *R. prolixus*.
- Purificar os antígenos imunogênicos identificados.
- Avaliar a eficiência dos antígenos imunogênicos purificados na avaliação de contato de camundongos com o *R. prolixus*.
- Identificar a sequência de aminoácidos dos antígenos imunogênicos identificados.

4. Metodologia

4.1. Aspectos éticos

Todos os procedimentos envolvendo animais do presente trabalho estão de acordo com as normas para utilização de animais em pesquisa e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA-UFMG) sob o número 115/2011 (Anexo I).

4.2. Obtenção dos triatomíneos

Foram utilizadas ninfas de 3^o, 4^o e 5^o estádios e adultos de *R. prolixus*, *T. infestans*, mantidos em colônias no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH) do Departamento de Parasitologia, ICB / UFMG e *T. brasiliensis* (cedidos pelo Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia de Doença de Chagas do CPqRR- FIOCRUZ-MG). Os triatomíneos foram criados em insetário climatizado, sob condições semicontroladas de temperatura ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($65 \pm 5\%$) e fotoperíodo (12 horas claro/escuro). Os espécimes eram mantidos em recipientes cilíndricos de acrílico, forrados com papel filtro e contendo uma tira de cartolina, dobrada em sanfona, para o aumento da superfície interna. Os potes eram tampados com tecido fino de algodão para permitir o repasto sanguíneo dos insetos que era realizado, semanalmente, em ratos ou galinhas.

4.3. Obtenção de extratos de glândula salivar dos triatomíneos

Os glóbulos salivares foram dissecados em solução salina (NaCl 0,9%), com o auxílio de pinças entomológicas, sob um microscópio estereoscópico. Após a dissecação, os glóbulos salivares foram lavados cuidadosamente com NaCl 0,9% para não serem rompidos, a fim de retirar possíveis contaminações com moléculas da hemolinfa ou tecidos do inseto. Posteriormente, foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL contendo solução de HEPES 20 mM/NaCl 100 mM, pH 7,4 e inibidores de proteases (Pepstatina A 1 mM; E-64 1 μM ; EDTA, 5 mM; 3,4-DCI 10 μM). Em seguida, as glândulas foram sonicadas por 1 minuto em um sonicador de banho (Branson® 1510) e centrifugadas a 12.000 g por 3 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos de 1,5 mL e armazenado a -20°C até ser usado nos ensaios.

4.4. Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas dos extratos de glândula salivar (EGS) obtidos foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando 20 µL de EGS diluídos a 1:100 e soro albumina bovina (BSA) como padrão. A concentração de proteínas das amostras purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência, também foi estimada nas mesmas condições do EGS.

4.5. Imunização de camundongos Swiss contra saliva de triatomíneos

As imunizações foram feitas em sete grupos de camundongos conforme a tabela 1. Cada grupo foi composto por 6 camundongos da linhagem Swiss, com seis semanas de idade. Seis grupos foram utilizados para imunização contra saliva de *R. prolixus*, *T. infestans* e *T. brasiliensis* sendo três deles submetidos a altas taxas de infestação e três grupos a baixas taxas de infestação. Nestes grupos, os camundongos foram anestesiados via intraperitoneal com uma mistura de Ketamina 150 mg/kg (Cristália) e Xilazina 10 mg/kg (Bayer) e disponibilizados como fonte alimentar para os triatomíneos durante 60 minutos. Nos grupos submetidos a baixas taxas de infestação, os camundongos foram colocados em contato com três adultos de triatomíneos enquanto os submetidos a altas taxas de infestação foram colocados em contato com três adultos, duas ninfas de 5^o estágio e duas ninfas de 4^o estágio. Durante as imunizações, foi observado se os triatomíneos estavam realmente se alimentando nos camundongos. Caso um espécime de triatomíneo não estivesse se alimentando, este era trocado. As alimentações foram realizadas por quatro vezes em cada camundongo em intervalos de 7 dias. O sétimo grupo foi utilizado como controle (animais não expostos a picadas de triatomíneos) nos experimentos.

Tabela 1 – Grupos de camundongos e espécies de triatomíneos utilizados nas imunizações.

Grupos	Número de camundongos	Nível de Imunização	Espécie de triatomíneo utilizada nas imunizações
Rp A	6	Alta infestação	<i>R. prolixus</i>
Ti A	6	Alta infestação	<i>T. infestans</i>
Tb A	6	Alta infestação	<i>T. brasiliensis</i>
Rp B	6	Baixa infestação	<i>R. prolixus</i>
Ti B	6	Baixa infestação	<i>T. infestans</i>
Tb B	6	Baixa infestação	<i>T. brasiliensis</i>
Ctrl	6	Controle	Não imunizado

4.6. Obtenção do soro dos camundongos imunizados

Uma semana após a quarta imunização, o sangue de cada camundongo dos sete grupos foi obtido através da decapitação seguida de coleta do sangue em um tubo de 1,5 mL, após anestesia via intraperitoneal com uma mistura de Ketamina 150 mg/kg (Cristália) e Xilazina 10 mg/kg (Bayer), e mantido à temperatura ambiente por uma hora. Após centrifugação a 5.000 g por 30 minutos, o soro foi transferido com o auxílio de uma micropipeta para um microtubo de 1,5 ml e armazenado a -20°C até o uso.

4.7. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

A técnica de ELISA realizada foi adaptada de Rohousova et al. (2005). Uma microplaca de ELISA Maxisorp (Nunc®) foi sensibilizada durante 12 horas, à temperatura de 4°C, dentro de uma câmara úmida com 0,5 µg de extrato de glândula salivar ou 0,5 µg de apirase purificada diluído em tampão carbonato (NaHCO₃ 35 mM; Na₂CO₃, 15 mM; pH 9.6). Os poços sensibilizados foram bloqueados com 200 µl de solução bloqueadora (NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na₂HPO₄ 1,44; KH₂PO₄ 0,24 g; q.s.p. H₂O 1000 mL + 0,05% Tween-20 + 5% de leite em pó desnatado) durante 2 horas a 37°C. Após o bloqueio, cada poço foi lavado três vezes utilizando-se PBS-T (NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na₂HPO₄ 1,44 g; KH₂PO₄ 0,24 g q.s.p. H₂O 1000 mL + 0,05% Tween-20). Foram adicionados 50 µL de soro dos camundongos, diluídos previamente em solução diluente de anticorpo (PBS-T + 0,1% BSA) em diluições de 1:40; 1:80; 1:160; 1:320; 1:640; 1:1280 e

incubados a 37°C por uma hora sob agitação de 160 rpm. O controle foi preparado da mesma forma com soro dos camundongos não imunizados. Cada um dos tratamentos foi realizado em triplicata.

A detecção dos anticorpos anti-saliva de triatomíneos foi realizada com adição de anticorpo anti-mouse IgG conjugado com peroxidase produzido em cabra (Sigma-Aldrich). Foram transferidos para cada poço, 50 µL do anticorpo anti-mouse IgG peroxidase diluído a 1:50.000 em PBS-T + 0,1% BSA e incubados por uma hora a 37°C. Os anticorpos não aderidos foram lavados como descrito acima. Após nova lavagem, os poços foram rapidamente preenchidos com 100 µL de substrato OPD-H₂O₂ (1 mg/mL de O-Phenylene-Diamine [Sigma: P-9029]) dissolvido em tampão citrato de sódio (ácido cítrico 50 mM; Na₂HPO₄ 50 mM; pH 5,0) e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente no escuro. A reação foi parada com adição de 100 µL de ácido sulfúrico 1 M por poço. As leituras foram executadas a 450 nm em leitor de microplacas (Versa Max, Molecular Devices[®]) e os dados gerados foram utilizados para os cálculos estatísticos.

4.8. SDS-PAGE e Western Blot

As eletroforeses em géis de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram realizadas de acordo com a metodologia de Laemmli (1970). Para a realização do western blot, foi realizado um SDS-PAGE a 12,5% onde foram aplicados 3 glândulas salivares de ninfas de 5^o estágio de *R. prolixus*. Após a corrida, as moléculas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (HybondTMP, Amersham Biosciences) durante duas horas a 90 V (~200 mA) em banho de gelo. Os sítios de ligação livres da nitrocelulose foram bloqueados com PBS-T contendo 10% de leite em pó desnatado por 2 horas sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes, durante 10 minutos com PBS-T, sob agitação. A membrana foi incubada por 1 hora com os soros dos camundongos diluídos em PBS-T na concentração de 1:100, à temperatura ambiente, sob agitação. Após 3 lavagens de 7 minutos com PBS-T, sob agitação, foi feita a incubação da membrana por 1 hora com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído em PBS (pH 7,4) na concentração de 1:1000. Após esse período, a membrana foi novamente lavada, 2 vezes, por 7 minutos, com PBS-T e 1 vez com PBS e,

então, revelada com os reagentes do kit DAB Substrate Kit for Peroxidase (Vector Laboratories Inc.).

4.9. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para o fracionamento por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com as amostras de saliva de *R. prolixus*, foram utilizadas colunas de exclusão molecular e troca aniônica (Amino et al. 2002; Campos et al. 2002).

4.10. Fracionamento através da coluna de exclusão molecular

Cinquenta microlitros de extrato de glândula salivar (100 glândulas) de *R. prolixus* foram aplicados em uma coluna de exclusão molecular (30 cm x 4,6 mm, *range*: 0,5 a 150 kDa, Discovery[®]BIO GFC 150 Sigma-Aldrich) no aparelho HPLC Shimadzu Prominence (Shimadzu). A coluna foi previamente equilibrada em solução HN pH 7,4 (HEPES 20 mM / NaCl 100 mM) com o fluxo de 0,250 mL/min. A cromatografia foi monitorada no comprimento de onda de 280 nm e as frações, coletadas a cada minuto, foram utilizadas nos ensaios de atividade da apirase.

4.11. Fracionamento através da coluna de troca aniônica

As frações com atividade apirásica, obtidas na filtração molecular, foram re-cromatografadas em coluna de troca aniônica (Discovery[®]BIO PolyMA-WAX, Supelco). A coluna foi previamente equilibrada em tampão HEPES 20 mM pH 8,5. A eluição da amostra foi realizada utilizando como fase móvel concentrações crescentes do mesmo tampão contendo NaCl 2 M pH 8,5. A taxa de fluxo utilizada foi de 0,25 mL/minuto e a cromatografia foi monitorada no comprimento de onda de 280 nm. As frações coletadas, a cada minuto, foram utilizadas nos ensaios de atividade da apirase.

4.12. Fracionamento através da coluna de Blue Sepharose

Para esta etapa, foi utilizada uma coluna de Blue Sepharose (Blue Sepharose[®] 6 Fast Flow, Amersham). Foi aplicado na coluna 1 mL de extrato de glândula salivar de ninfas de 5^o estágio de *R. prolixus* proveniente de 100 glândulas. A coluna foi equilibrada com 5 mL de tampão HNC pH 7,5 (HEPES 20 mM; NaCl 100 mM; CaCl₂ 5 mM) e a amostra foi eluída em tampão HN pH

7,5 (HEPES 20 mM; NaCl 1 M). As frações foram coletadas a cada 500 µL em microtubos de 1,5 mL, monitoradas a 280 nm e utilizadas em ensaio de atividades da apirase.

4.13. Purificação da apirase por eletroeluição

A proteína foi obtida a partir da eletroforese de 36 géis de poliacrilamida a 7,5%, de canaleta única, onde foram aplicados em cada gel 180 µL da amostra (150 µL de extrato de glândula salivar de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* + 30 µL de tampão da amostra com 5% de β-mercaptoetanol), fervida por cinco minutos. Após a eletroforese a 120 V, um gel foi corado durante 15 minutos com solução de azul de comassie (1,25 g de azul de comassie, 35 mL de ácido acético, 25 mL de metanol, água destilada qsp 500 mL) para visualização da banda de peso molecular de interesse. Em cada gel, foram aplicados 6 µL de marcador de peso molecular Prestained Protein MW Marker (Fermentas). As bandas de interesse foram retiradas com auxílio de um estilete e transferidas a uma membrana de diálise com ponto de exclusão de 12 kDa. Em seguida, as membranas foram colocadas horizontalmente em uma cuba de eletroforese preenchida com tampão glicina (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0,1% SDS). A proteína foi eletroeluída a 35 mA durante duas horas. A fase líquida foi transferida a uma nova membrana e submetida a uma diálise em dois litros de PBS pH 7,4 (NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na₂HPO₄ 1,44 g; KH₂PO₄ 2,24 g; H₂O qsp 1000 ml) a 4°C por 24 horas. A presença da proteína eluída foi confirmada por eletroforese em SDS-PAGE 10%.

4.14. Ensaio de atividade da apirase

Das frações obtidas nas cromatografias, 2 µL de cada foram transferidos a tubos de 1,5 mL e tiveram seus volumes completados para 20 µL com tampão HN 7,4 (HEPES 20 mM / NaCl 100 mM). A esta alíquota adicionou-se 80 µL de tampão HN pH 7,4 contendo ATP 2 mM e CaCl₂ 5 mM seguida incubação a 37°C por 15 minutos. Um tubo contendo apenas 20 µL do tampão HN pH 7,4 foi utilizado como branco. Após a incubação, a liberação de fosfato inorgânico foi mensurada utilizando o kit para dosagem de Fósforo (Labtest Diagnostica).

4.15. Identificação da sequência da apirase salivar

Foi realizada uma busca nos bancos de dados do NCBI, por sequências de apirases de insetos hematófagos onde foram encontradas 10 sequências gênicas de apirases (Tabela 2). Estas sequências foram utilizadas como modelo na ferramenta BLAST para identificar sequências homólogas presentes nos banco de dados não redundantes de nucleotídeos e proteínas bem como nos bando de dados de ESTs e sequências genômicas (Whole-Genome Shotgun sequences) de *R. prolixus*. As sequências encontradas foram submetidas a análise para identificação da região codificadora e os peptídeos resultantes identificados pelo programa Translate (Expasy Bioinformatics Resource Portal; <http://web.expasy.org/translate/>). As características dos peptídeos foram identificadas com o programas ProtParam (Expasy Bioinformatics Resource Portal; <http://web.expasy.org/protparam/>) e SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Estas sequências foram utilizadas para desenhar os iniciadores específicos direto e reverso para os ensaios de avaliação de expressão em tecidos utilizando a RT-PCR.

4.16. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR

A extração de RNA de glândula foi realizada a partir de um extrato de glândula salivar com 10 glóbulos ou 3 intestinos médios anterior dissecados de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* utilizando o Kit RNeasy Micro (Quiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Ao final da extração, o RNA foi eluído em 12 µL de água Mili-Q e quantificado em espectrofotômetro a 260 nm. Para essa quantificação, foram utilizados 4 µL do RNA total eluído, diluídos 1:25 em um volume final de 100 µl de água Mili-Q . A concentração de RNA nas amostras foi avaliada considerando que cada unidade de absorbância a 260 nm equivale a concentração de 40 µg/µL de RNA. Após a quantificação, 1 µg do RNA foi utilizado para síntese de cDNA, utilizando 0,5 µg de hexâmeros randômicos (Promega) e o sistema da transcriptase reversa M-MLV (Promega) e um volume final de 12,5 µL. A reação foi realizada em um termociclador (TC-312, Techne), a 25°C por 10 minutos, 37°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos e armazenada a -20°C.

O cDNA sintetizado foi utilizado para as reações de PCR da apirase que foram realizadas em 35 ciclos (94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e

72°C por 45 segundos) com 2 µL do cDNA, 200 nM de cada iniciador, 200 µM de dNTP e 1 U de taq polimerase (Phoneutria) em volume final de 20 µL. Os produtos da PCR foram confirmados em géis de agarose a 2% corados com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL e visualizados sob luz ultravioleta. Para cada par de iniciadores utilizados, foi feito um controle negativo (branco), onde o cDNA foi substituído por água Mili-Q, a fim de descartar a presença de contaminação por DNA nas reações.

4.17. Cálculos estatísticos dos grupos experimentais

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 5.0 for Windows. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para identificar diferenças entre os grupos. $P < 0.05$ foi considerado como significativo.

Para os ensaios imunoenzimáticos, o ponto de corte foi definido como a média da densidade óptica dos controles negativos + 3 desvio padrão (DP). A sensibilidade (s) foi calculada através da fórmula $s = \frac{a}{a + b}$ onde: a = número de camundongos expostos ao *R. prolixus* que apresentaram resultado positivo no ELISA; e b = número de camundongos não expostos ao *R. prolixus* que apresentaram resultado positivo no ELISA.

A especificidade (e) foi calculada através da fórmula $e = \frac{d}{c + d}$ onde: d = número de camundongos não expostos ao *R. prolixus* que apresentaram resultado negativo no ELISA; c = número de camundongos expostos ao *R. prolixus* que apresentaram resultado negativo no ELISA.

5. Resultados

5.1. Reconhecimento de antígenos salivares de *Rhodnius prolixus* por anticorpos IgG presentes no soro de camundongos

Os anticorpos IgG presentes no “pool” de soros de camundongos Swiss, expostos previamente à alta e baixa infestação por *R. prolixus*, reconheceu os antígenos salivares do *R. prolixus*. O nível de reconhecimento foi inversamente proporcional à diluição usada, porém houve reconhecimento mesmo nas diluições mais altas, isto é, até 1: 1280 (Fig. 4). Por outro lado, os anticorpos IgG presentes nos “pools” de soros de camundongos Swiss, expostos à alta e baixa infestação por *T. infestans* e *T. brasiliensis*, não foram capazes de reconhecer, em nenhum dos títulos testados, os antígenos salivares de *R. prolixus*.

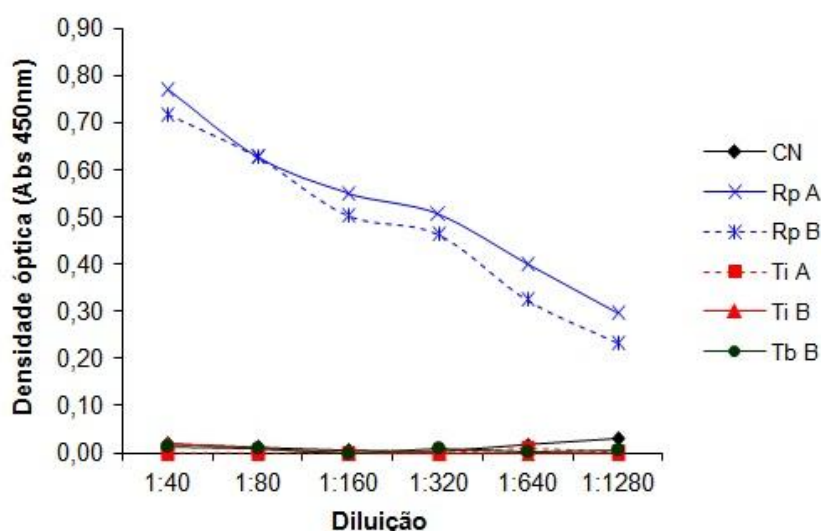


Figura 4 - Reconhecimento de antígenos salivares de *R. prolixus* por anticorpos IgG presentes em diferentes diluições de “pools” de soros de camundongos Swiss expostos à alta e baixa infestação por *R. prolixus*, *Triatoma infestans* e *Triatoma brasiliensis*.

Diferentemente do que ocorreu com antígenos salivares de *R. prolixus*, antígenos salivares de *T. infestans* foram reconhecidos tanto por anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos Swiss expostos à alta e baixa infestação por *T. infestans* quanto por soros de camundongos Swiss expostos à alta e baixa infestação por *R. prolixus* (Fig. 5). Entretanto, os maiores níveis

de reconhecimento foram obtidos com soros de camundongos picados por *T. infestans*.

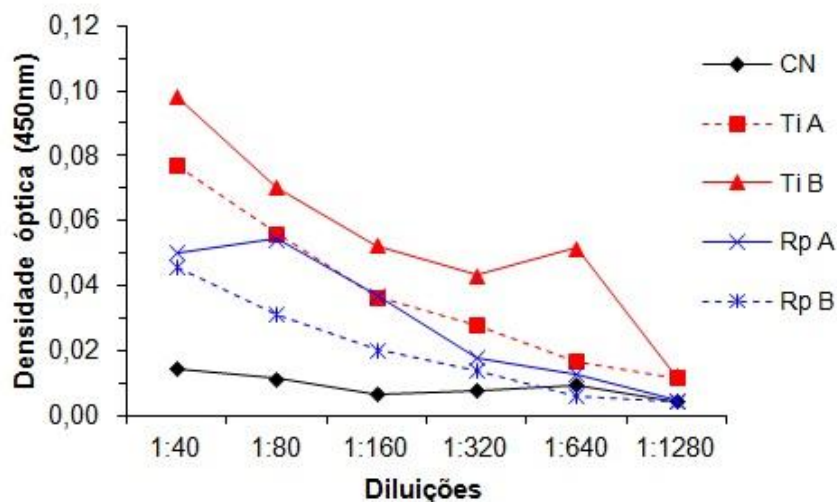


Figura 5 - Reconhecimento de antígenos salivares de *T. infestans* por anticorpos IgG presentes em diferentes titulações de “pools” de soros de camundongos Swiss expostos à alta e baixa infestação por *R. prolixus* e *T. infestans*.

Ao avaliar o reconhecimento de antígenos salivares de *R. prolixus* por anticorpos IgG presentes nos soros dos camundongos individualmente, confirmamos que apenas aqueles expostos ao *R. prolixus* são capazes de reconhecer os antígenos salivares, sendo que a média de absorbância no ELISA não foi estatisticamente maior para os camundongos submetidos a altas infestações ($0,466 \pm 0,126$) do que os submetidos à baixas infestações ($0,371 \pm 0,083$) (Tukey, n.s.) (Fig. 6). Entretanto, houve diferença estatística significativa em relação aos imunizados com *R. prolixus* comparando aos controles e àqueles imunizados com *T. infestans* e *T. brasiliensis* (Tukey, $P < 0,05$), onde a absorbância média não ultrapassou 0,100 OD.

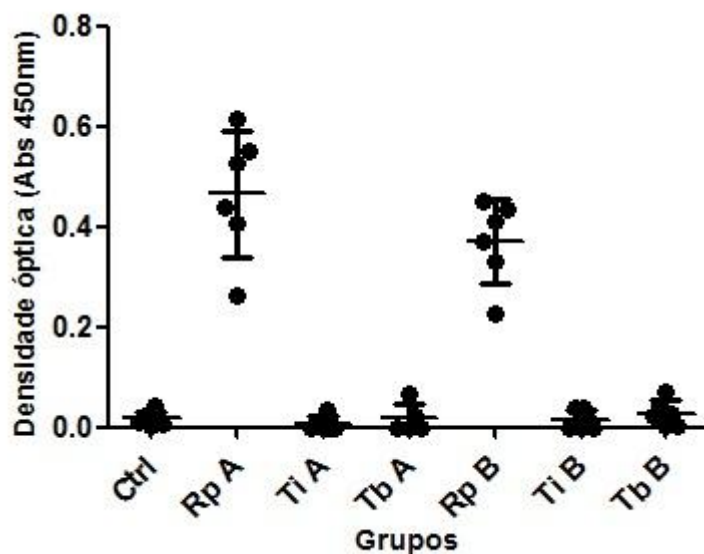


Figura 6 - Reconhecimento de antígenos salivares de *R. prolixus* por anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos swiss expostos à alta e baixa infestação por *R. prolixus*, *T. infestans* e *T. brasiliensis*. Os soros foram testados nas diluições e 1: 160. As linhas entre os valores individuais de densidade óptica representam a média \pm DP. Os grupos testados foram: controle negativo, camundongos não expostos a picadas (Ctrl); Camundongos expostos a altas taxas de infestação por *R. prolixus* (Rp A), *T. infestans* (Ti A) e *T. brasiliensis* (Tb A) e expostos a baixas taxas de infestação por *R. prolixus* (Rp B), *T. infestans* (Ti B) e *T. brasiliensis* (Tb B).

Na tentativa de identificar quais eram os antígenos salivares mais imunogênicos, o extrato de glândula salivar do *R. prolixus* foi submetido a SDS-PAGE e western-blot. O perfil eletroforético mostrou que existe uma grande quantidade de moléculas com peso molecular inferior a 30 kDa e que, acima deste valor, existem duas bandas majoritárias (isto é, de maior intensidade), com peso molecular aproximado de 83 kDa e 48,5 kDa, e outras bandas de menor intensidade cujos pesos variam de aproximadamente 36 a 120 kDa (Fig. 7A). Ao avaliar os resultados dos ensaios de western-blot conteúdo extrato de glândula salivar de *R. prolixus* como antígenos e anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos expostos à alta infestação por *R. prolixus* como ligantes, observamos que foram reconhecidos apenas dois antígenos salivares com pesos moleculares de 48,5 e 18,2 kDa (Fig. 7B).

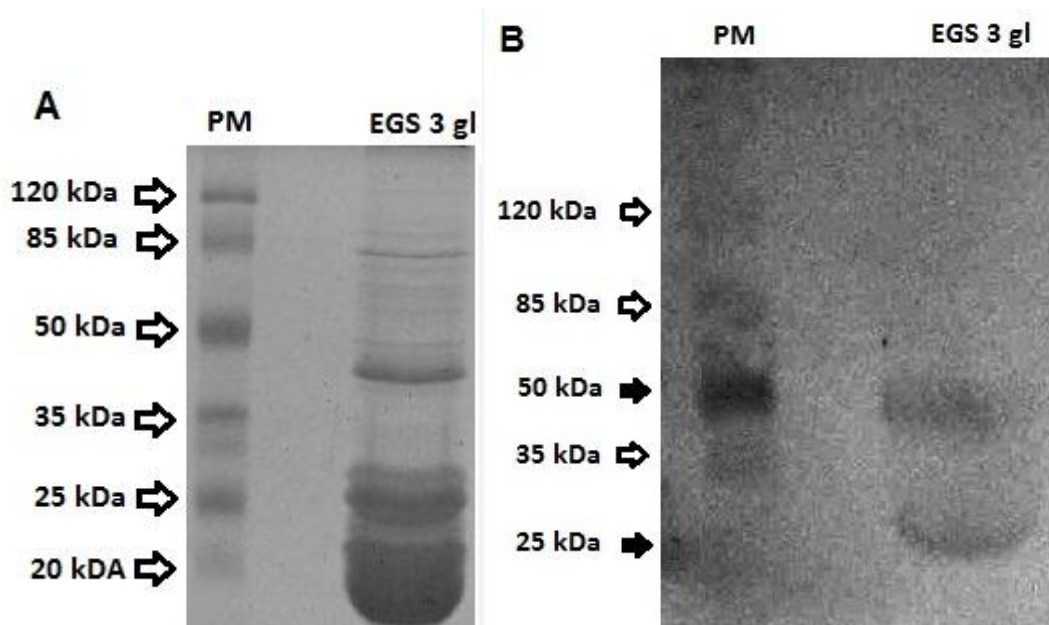


Figura 7 – Perfil eletroforético do extrato de glândula salivar de *R. prolixus* e reconhecimento de antígenos salivares por anticorpos IgG presentes no soro de camundongos Swiss previamente submetidos a alta infestação por *R. prolixus*. (A) SDS-PAGE a 12,5%; (B) Western-blot. EGS 3 gl: Extrato de glândula salivar de três ácidos.

5.2. Identificação das moléculas imunogênicas presentes na saliva do *R. prolixus*

O antígeno mais imunogênico presente na saliva do *R. prolixus* foi a molécula de 48,5 kDa. Para confirmar sua identidade, a molécula foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em diferentes colunas e as frações contendo a molécula foram submetidas a ensaios biológicos de atividade *in vitro*.

O fracionamento de um extrato de glândula salivar contendo 50 glândulas de ninfas de 5^o estágio de *R. prolixus* em coluna de exclusão molecular mostrou que o eluato (coletado a cada minuto), monitorado na absorbância de 280 nm, apresentou maior quantidade de proteínas nos tempos 14 a 21 minutos. As frações obtidas foram submetidas ao ensaio biológico para atividade apirásica e frações ativas foram observadas nos eluatos extraídos nos tempos 11 a 16 minutos, sendo os mais ativos aqueles coletados de 1 a 14 minutos (Fig. 8A). O perfil eletroforético em SDS-PAGE das frações ativas

mostrou a presença de duas moléculas majoritárias de aproximadamente 83 e 48,5 kDa e que estas moléculas seriam as responsáveis pela atividade apirásica presente na saliva do *R. prolixus* (Fig. 8B).

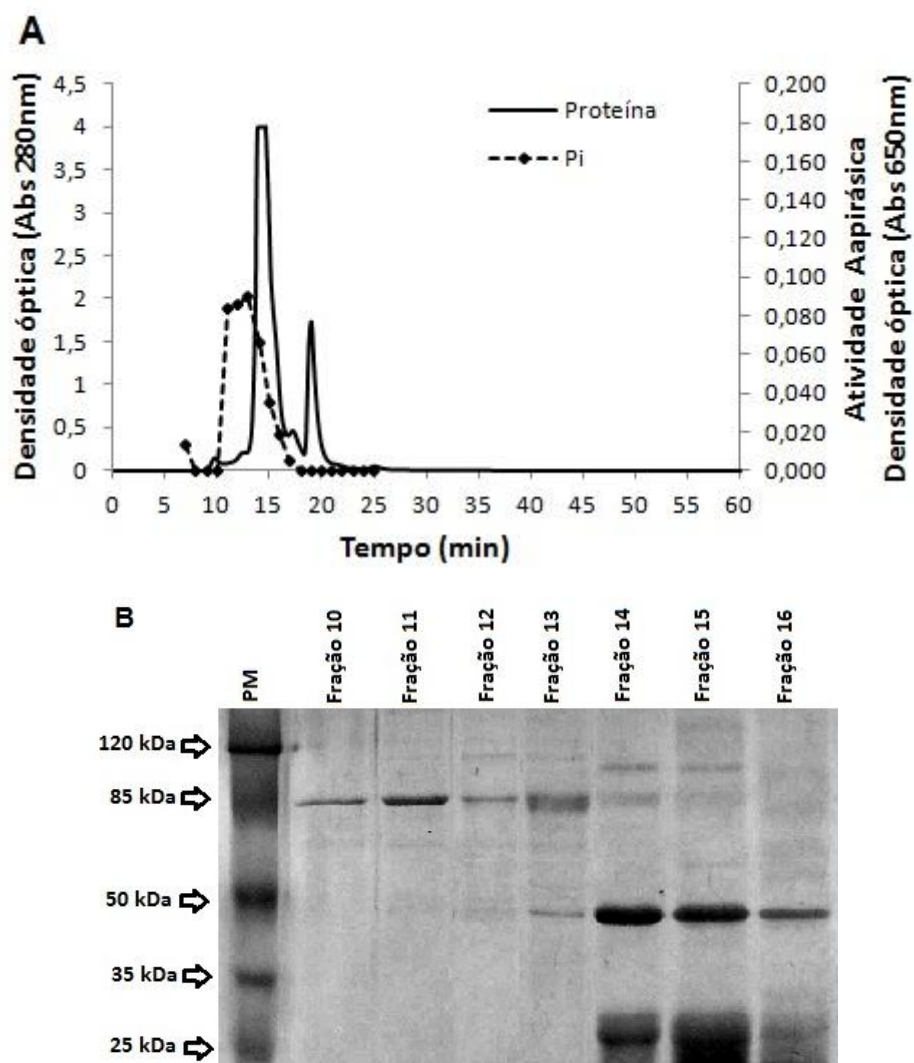


Figura 8 – Fracionamento do extrato de glândula salivar de *R. prolixus*, identificação das frações com atividade apirásica e visualização das moléculas ativas. (A) HPLC em coluna de exclusão molecular e atividade apirásica das frações obtidas; (B) SDS-PAGE a 10% das frações ativas. PM: Peso molecular.

Como as frações ainda continham moléculas de diferentes pesos moleculares, as frações ativas foram tratadas com inibidores de proteases e submetidas a um segundo fracionamento em coluna de troca aniônica com o eluato monitorado a 280nm para tentar purificar a proteína de 48,5 kDa. As frações ativas foram aquelas eluídas nos tempo 29 e 30 minutos (Fig. 9A) e a

análise por eletroforese em SDS-PAGE identificou novamente a presença das moléculas de 83 e 48,5 kDa além serem evidenciadas outras proteínas de menor peso molecular (Fig. 9B).

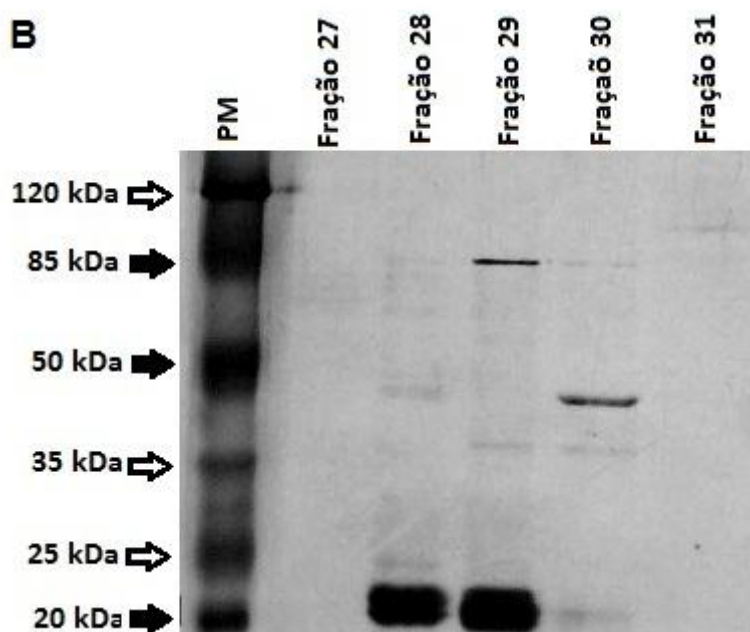
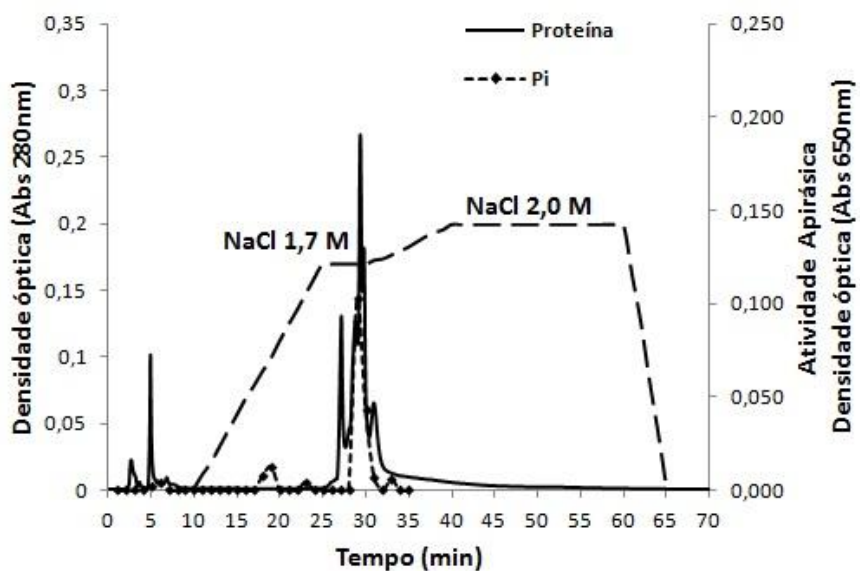


Figura 9 – Cromatografia das frações ativas recuperadas do fracionamento da saliva de *R. prolixus* em coluna de exclusão molecular; identificação das frações com atividade apirásica e visualização das moléculas presentes nas frações ativas. (A) HPLC em coluna de troca aniônica e atividade apirásica das frações obtidas; (B) SDS-PAGE 10% das frações ativas. PM: Peso molecular.

A presença de moléculas com peso molecular inferior a 48,5 kDa indicam que as amostras ainda não estão puras. Desta forma, foi realizado um terceiro passo de cromatografia com as frações ativas. Como o peso molecular das moléculas resultantes foi consideravelmente diferente, foi utilizada novamente uma coluna de exclusão molecular. As frações ativas obtidas na coluna de troca aniônica (28, 29 e 30) foram misturadas e submetidas à nova cromatografia. O ensaio de atividade apirásica identificou como ativas, as frações recuperadas nos tempos 12 e 13 (Fig. 10A). A figura 10B mostra o perfil eletroforético destas amostras em SDS-PAGE, novamente com a presença de uma proteína com peso molecular de 83 kDa na fração 12 e da proteína de 48,5 kDa juntamente com outras moléculas de pesos moleculares inferiores na fração 13.

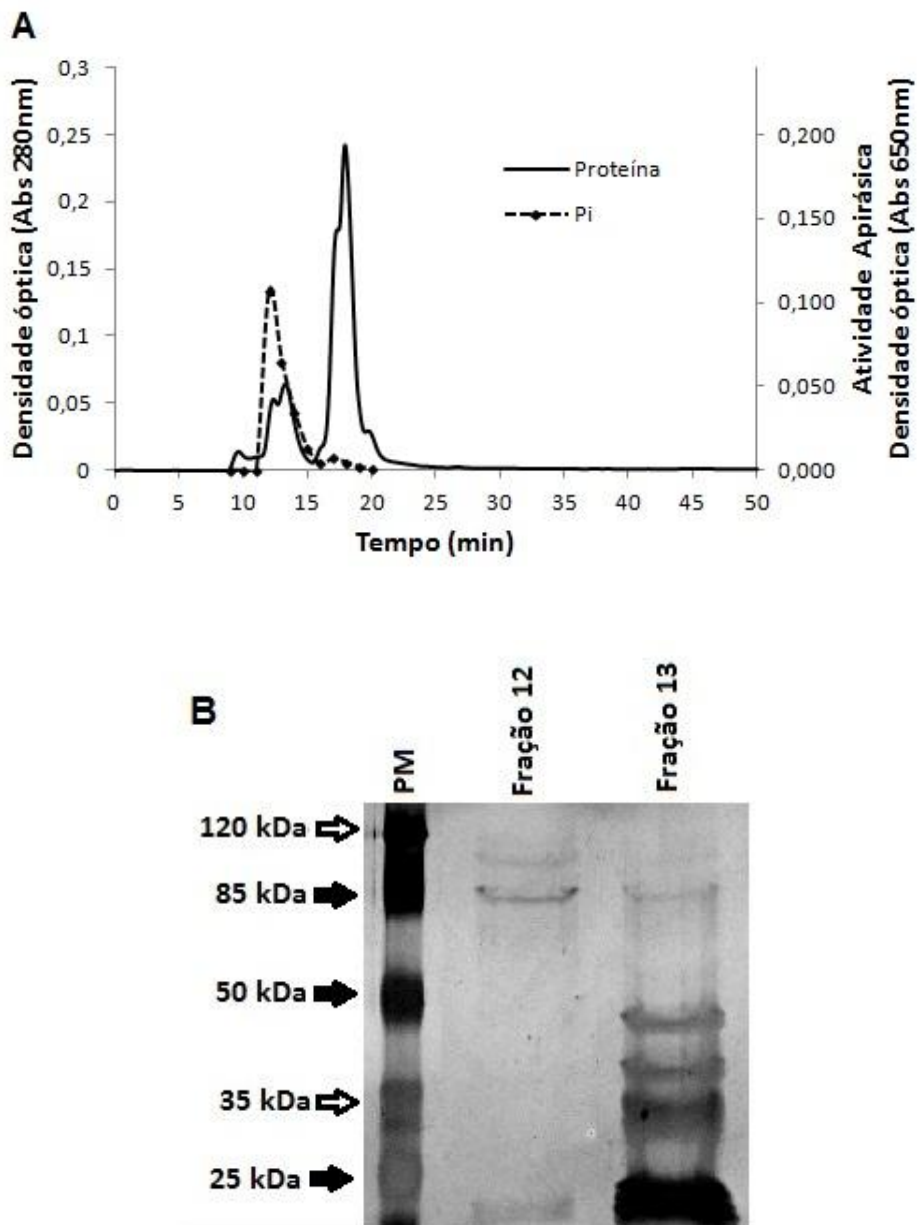


Figura 10 – Terceiro fracionamento, utilizando as frações ativas obtidas na cromatografia em troca iônica, identificação das frações com atividade apirásica e visualização das possíveis proteínas ativas. (A) HLPC em coluna de exclusão molecular; (B) Atividade apirásica das frações obtidas na HPLC; (C) SDS-PAGE das frações ativas. PM: Peso molecular.

Os resultados da cromatografia nos indicaram que a atividade apirásica salivar de *R. prolixus* é desempenhada por duas proteínas de peso molecular de 83 e 48,5 kDa. A presença de outras bandas menores na SDS-PAGE das frações ativas sugerem a necessidade de um método de purificação mais

eficaz. Sendo assim, para uma purificação mais eficiente, o extrato de 100 glândulas salivares de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* tratado com inibidores de proteases foi aplicado em uma coluna de Blue Sepharose. O eluato foi monitorado a 280 nm e coletado a cada minuto. A atividade apirásica foi observada nas frações coletadas nos tempos 27 a 38 minutos, sendo maior nos tempos 30 a 33 minutos (Fig. 11A). O perfil das frações com atividade foi analisado por eletroforese em SDS-PAGE e mostrou a presença nítida de uma proteína com peso molecular de 48,5 kDa, porém novamente com a presença de moléculas de peso molecular inferior a 48,5 kDa (Fig. 11B). Estes resultados confirmam que a apirase salivar é uma proteína de aproximadamente 48,5 kDa.

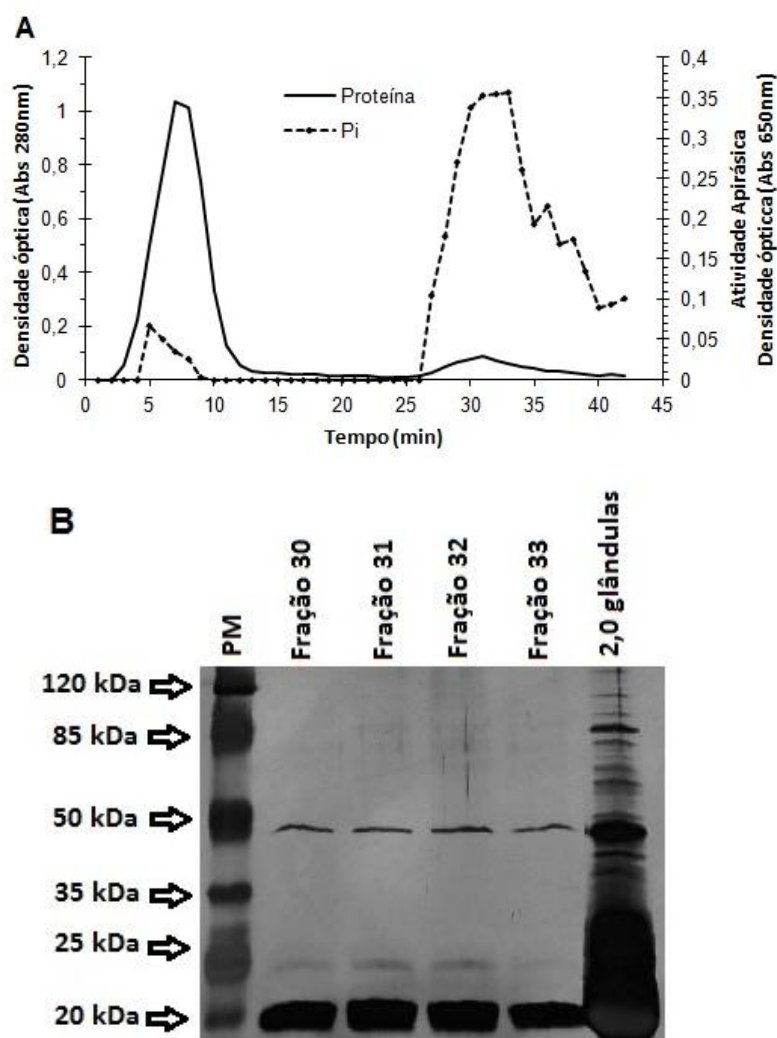


Figura 11 – Purificação da apirase salivar de *Rhodnius prolixus* em coluna de blue sepharose. (A) Cromatograma e atividade apirásica do eluato; (B) SDS-PAGE das frações ativas. PM: Peso molecular.

Uma vez confirmada que a apirase salivar era uma proteína de 48,5 kDa, foi realizada uma terceira tentativa de purificação, desta vez utilizando uma metodologia baseada na remoção manual da região que compreende a banda de 48,5 kDa do SDS-PAGE seguida da eletroeluição da proteína do gel. Esta metodologia apresentou resultados mais satisfatórios, uma vez que o perfil em SDS-PAGE mostrou apenas uma banda de 48,5 kDa, referente à apirase, com outras bandas em intensidades muito fracas e quase imperceptíveis (Fig. 12). A partir da eletroeluição da proteína de 48,5 kDa de 36 SDS-PAGES foram obtidos 945 µg da proteína que foram usados nos ensaios de ELISA. Nos 36 SDS-PAGES foram aplicados extratos de 810 glândulas de ninfas de quinto estágio de *R. prolixus*, perfazendo um total de 24,6 mg de proteínas (cada extrato de glândula salivar de ninfa de quinto estágio de *R. prolixus* possui 30,45 µg; Araujo et al., 2009). Estes dados mostram que a apirase salivar corresponde a 3,83% da quantidade total de proteínas da glândula salivar do *R. prolixus*.

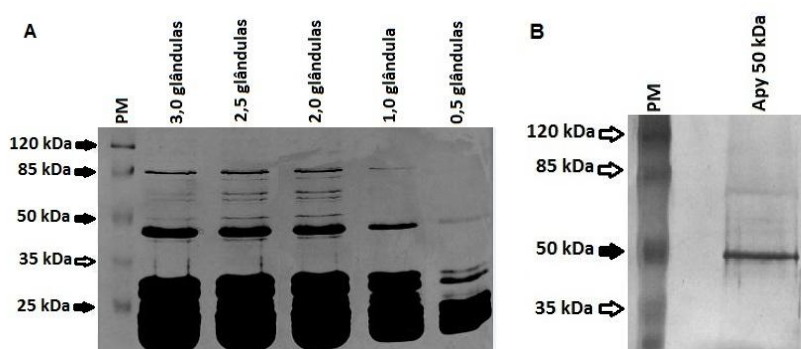


Figura 12 – Perfil eletroforético de diferentes quantidades de glândulas salivares e da apirase salivar de *Rhodnius prolixus* purificada por eletroeluição. (A) SDS-PAGE a 12,5% com extrato de glândula salivar; (B) SDS-PAGE a 10% da proteína de 48,5 kDa (Apy 50 kDa) após a eletroeluição. PM: Peso molecular.

5.3. Avaliação da apirase salivar como marcador de contato de camundongos com *Rhodnius prolixus*

Os “pools” de soro de camundongos imunizados contra saliva de *R. prolixus*, *T. infestans* e *T. brasiliensis* foram usados no título de 1:40 em ensaios imunoenzimáticos utilizando a proteína de 48,5 kDa como antígeno. A

apirase salivar de 48,5 kDa foi reconhecida apenas pelos anticorpos IgG presentes no soro dos camundongos imunizados com picadas de *R. prolixus* em altas e baixas infestações, sendo que os valores de absorbância foram $0,2862 \pm 0,1262$ e $0,3117 \pm 0,1054$, respectivamente (Fig. 13). O ELISA com a apirase de 48,5 kDa apresentou 100% de especificidade e sensibilidade para identificar camundongos picados por *R. prolixus* em relação aos picados por *T. infestans* e *T. brasiliensis*.

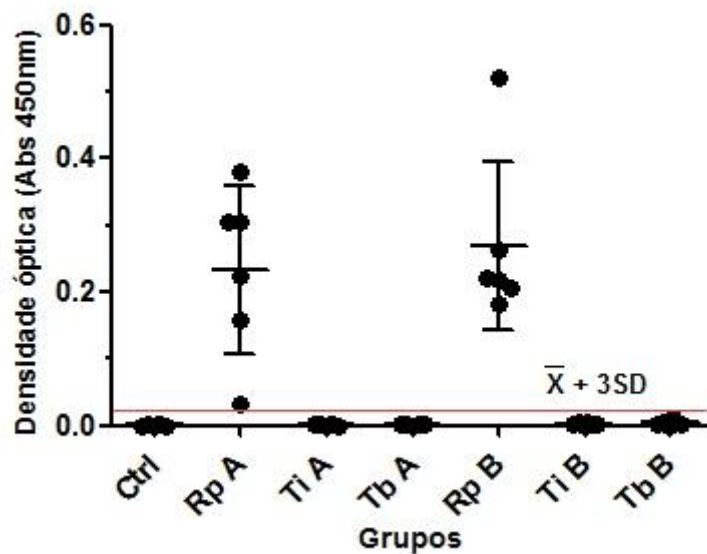


Figura 13 - Reconhecimento da apirase salivar de *R. prolixus* por anticorpos IgG presentes no soro de camundongos Swiss diluídos a 1:40 usados como fonte alimentar por triatomíneos (média \pm DP). Os soros foram testados nas diluições de 1:40. As linhas entre os valores individuais de densidade óptica representam a média \pm DP. A linha vermelha representa o ponto de corte entre positivos e negativos. Os grupos testados foram: controle negativo, camundongos não expostos a picadas (Ctrl); Camundongos expostos a altas taxas de infestação por *R. prolixus* (Rp A), *T. infestans* (Ti A) e *T. brasiliensis* (Tb A) e expostos a baixas taxas de infestação por *R. prolixus* (Rp B), *T. infestans* (Ti B) e *T. brasiliensis* (Tb B).

5.4. Identificação da sequência de nucleotídeos e aminoácidos da apirase salivar do *R. prolixus*

A partir dos resultados promissores da utilização da apirase como marcador de contato, foi realizada uma busca nos bancos de dados a fim identificar a sequência de nucleotídeos e aminoácidos da molécula para que esta possa ser produzida *in vitro* em maior escala e utilizada em novos ensaios. Inicialmente, uma busca nos bancos de dados do NCBI utilizando “apyrase + insect” como palavras chave recuperou 10 sequências de apirases de insetos hematófagos (Tab. 2).

Tabela 2 - Espécie e número de acesso das apirases salivares de insetos hematófagos recuperadas do banco de dados de proteínas do NCBI.

Espécie	Nº de acesso	Tamanho
<i>Aedes aegypti</i>	EAT41732	429 aa
<i>Cimex lectularius</i>	AAD09177	364 aa
<i>Phlebotomus arabicus</i>	ACS93497.1	333 aa
<i>Phlebotomus papatasi</i>	AAG17637	364 aa
<i>Phlebotomus duboscqi</i>	ABI20151	336 aa
<i>Culex quinquefasciatus</i>	XP_001849098	423 aa
<i>Anopheles gambiae</i>	CAB40345	557 aa
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	AAD33513	325 aa
<i>Triatoma infestans</i>	CAE46445	557 aa
<i>Xenopsylla cheopis</i>	ABM55468.1	437 aa

Estas sequências foram utilizadas como molde na ferramenta BLAST para identificar sequências homólogas presentes nos banco de dados do NCBI de nucleotídeos não redundante, EST, proteínas não redundantes e sequências genômicas (Whole-genome Shotgun Contigs) de *R. prolixus*. Foram identificados apenas dois “supercontigs” (ACPB02007196.1 e ACPB02007194.1) disponíveis nos bancos de dados de sequências genômicas de *R. prolixus* que apresentaram identidade máxima de 50 e 61% e valor esperado de 4e-43 e 2e-38 com as sequências de *Ae. aegypti* e *C. lectularius*, respectivamente. Estes “supercontigs” foram analisados, com o auxílio do Dr.

Jose M. Ribeiro (Medical Entomology Section, National Institutes of Health) a fim de identificar as sequências codificadoras e foram obtidos duas proteínas de 346 e 366 aminoácidos com peso molecular de 39,9 e 42,8 kDa chamadas inicialmente de apirase 1 e 2 (Fig. 14 e 15).

```

atgtacagtaacattgaagagggagaaatgtttatggctctaaaggactggaggaagcc
M Y S N I E E G E M F M A L K D W R K A
ataaggacaccaccttcgtacagagttgcaaaaagaacgttaaaaatacaaacccagtg
I R T P P S Y R V A K R T L K I Q T Q C
ttaacagtagtagcaattattagtgcgctgtttttgttgactacattccgatctagtgac
L T V V A I I S A L F L L T T F R S S D
agtagtaattttaacgaaattttctgaaaatgataaacttacctctgatttagtcaatagc
S S N F N E I S E N D K L T S D L V N S
gattatctaattccagtgaaagcaatacgcctataatacaacttatcctgtaaccaag
D Y L I P V K A I R P Y N T T Y P V T K
ccagtggaaccgggtgatgaaactatctcaaaaataggggtcataagtgatggatcat
P V A T G D E T I F K I G V I S D M D H
tcgtcgtgagcaaacacgagtgcaaacatgaggaagtcgggtataagaaaggaacctta
S S L S K H E S N T W R S R Y K K G T L
acatggaacagtaagtcacaaacgggttagtgtaagtgaggatgaagctgaacctaaaatg
T W N S K S Q T V S V K W D E A E P K M
ttaaatactaagtatagttactctggaagagggcatggagctttctgagttagttacattc
L K S K Y S Y S G R G M E L S E L V T F
gatggtaaatctttctgctgatgatcgtactggaataatcttatgtaattgaaaatgaa
D G K L L S A D D R T G I I Y V I E N E
aatgtgtatccttgggtggtactgttggacggacctggaaaaatcggcaaaaatttttaa
N V Y P W V V L L D G P G K I G K I F K
ggtttcaagtcagaatgggctacagtaaaagatgaacatctgttcggttggagtggtgga
G F K S E W A T V K D E H L F V G S V G
aaggaatggactacaccacaaggagaatttgtgaataacaatccgatgtgggtaaaaaaa
K E W T T P Q G E F V N N N P M W V K K
attagcagatttggcgaagtgaccgatataccgtggagaaataattatatagctttaaga
I S R F G E V T D I P W R N N Y I A L R
aagccatttggaaatcactttcccaggatataatgtggcatgaggctggagtttggagtgac
K P F G I T F P G Y M W H E A G V W S D
atcacaaaaagtggtttttcctgccaagacgaatgtcttcttatatttataatgaaaag
I H K K W F F L P R R M S S Y I Y N E K
acagatgaagaaatgggaacaaataaacttttgattgcaagtgaaaacttttaatatatc
T D E E M G T N K L L I A S E N F K Y I
aaggtattaaatataaag
K V L N I K

```

Figura 14– Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da apirase 1 encontrada no genoma de *R. prolixus* que possui homologia com a apirase de *Ae. aegypti* (EAT41732).


```

aaaacggttaaaaatgcaaaccttggtacttatcagctataactattactgctttgtttctg
K T L K M Q T W Y L S A I T I T A L F L
tggacaacatttcgatttgggtgaaaggccttttaagataactctggaaatacactactt
W T T F R F V E R A F K D N S G N T L L
gaatctgaagttgggtgataacagtttggaaaaaacatcagttttacaattcaacttatecc
E S E V G D N S L E K T S V Y N S T Y P
ataactaaatctgaagccgacggtgacaaaaattgttttcaaaatagcaattatctgat
I T K S E A D G D K I V F K I A I I S D
atggataaattgagtgctactgtatctaacacatggcggagtctgtataagaaggcacc
M D K L S A T V S N T W R S L Y K K G T
ttaacttgggataagacatcagaaaaagggttgatggtgtctgggatgaagaagatagagac
L T W D K T S E K V D V V W D E E D R D
ttaaactctaaatatagttactctggaagaggtatggagctttctgaattggttactttc
L K S K Y S Y S G R G M E L S E L V T F
aatggaaaattatcttctcccgatgatcgaacaggaatagtttatttaattgagaatggc
N G K L F S P D D R T G I V Y L I E N G
aatttctatccatgggtgatgctgttggatggccccgggaatatcaataaaggattcaaaa
N F Y P W V M L L D G P G N I N K G F K
tcagaatgggctaccgtgaaagatgaacatctttatggttggtagttcaggaatggagtg
S E W A T V K D E H L Y V G S S G M E W
gtaacaaatgggactattgacaattacaatgctatgtgggtgaaaagagttaacagatac
V T N G T I D N Y N A M W V K R V N R Y
ggaaataaaaacaaatataaaactggcaaaaataattatgaagccttaagaaagaaactaaaa
G N K T N I N W Q N N Y E A L R K K L K
gttacttaccaggatacatgtggcatgaggcagtagtttggagtgatattcataaaaaa
V T Y P G Y M W H E A V V W S D I H K K
tggtttttctgccaagaaaaatgtctcgaaaaagcttacgattccaaaaaagatgaaaaa
W F F L P R K M S R K A Y D S K K D E K
aagggaaccaataaaacttttgatcacaagtgacttttaagatataaagggtattaataata
K G T N K L L I T S D F K D I K V L I I
cactatattatcgtcggagagaagaacccagaacatggtttttagcagtttcaagtttata
H Y I I V G E K N P E H G F S S F K F I
ccaaacaccgaggataaaagttatagtagcattaaaaatcagttgaaagttggaaaacttagct
P N T E D K V I V A L K S V E V G N L A
gaaacttacatactcgcatattacaatcgatggcaaaaacattattagatgaaatgaaagtt
E T Y I L A F T I D G K T L L D E M K V
ggagacataaaaatgatgaaggtattgaatttatataa
G D I K Y E G I E F I -

```

Figura 15 – Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da apirase 2 encontrada no genoma de *R. prolixus* que possui homologia com a apirase de *C. lectularius* (AAD09177).

As proteínas codificadas apresentaram 49% e 53% de identidade com as apirases de *Ae. aegypti* e *C. lectularius*, respectivamente (Figs 16 e 17).

```

>rp_endosomal_apyrase

gi|108877507|gb|EAT41732.1| apyrase [Aedes aegypti]          330  2e-094
gi|91089647|ref|XP_973892.1| PREDICTED: similar to AGAP001217-PA... 308  8e-088
gi|156547919|ref|XP_001604339.1| PREDICTED: similar to apyrase [... 301  5e-086
gi|4185746|gb|AAD09177.1| apyrase [Cimex lectularius]      289  3e-082

==> gi|108877507|gb|EAT41732.1| apyrase [Aedes aegypti]
      Length = 429

Score = 330 bits (845), Expect = 2e-094
Identities = 168/340 (49%), Positives = 225/340 (66%), Gaps = 20/340 (5%)

Query: 9  EMFMALKDWRKAIRTPPSYRVAKRTLKIQTQCLTVVAIISAL--FLLTFRSSDSSNFNE 66
          E M L+DWR+A+RTPPSYR+ RT+++Q + +A++ AL FLL SS ++
Sbjct: 40  ETGMYLDRDWRQALRTPPSYRIGNRTIRLQVHVIVPLAVLGALLLFLLYIIGSSTMQSGSS 99

Query: 67  ISENDKLTSDLVNSDYLPVKAIRPYNTTYPVTKPVATGDETFKIGVISDMDHSSLSKH 126
          I D+ ++ YN+TYP+T+P+ + F+IGVI+D+D+S
Sbjct: 100  IGNLDR-----NSVIFYNSTYPLTEPIVSNGMYTFRIGVIADLDTNS-RVG 144

Query: 127  ESNTWRSRYKKGTLTWNKSQTVSVKWDEAEPKMLKSKYSYSGRMELSELVTFDGKLLS 186
          ++W S + KG L++ TV+V WDE PK +KS +S GRMELSELV F+GKLL+
Sbjct: 145  SKDSWNSYFMKGYLSYIPAKGTVTVSWDETGPKEKMSFSLKGRMELSELVVFNGKLLT 204

Query: 187  ADDRGTGIYVIENENVYPVWVLLDGPVKIGKIFKGFKSEWATVKDEHLFVSGVKGWTTTP 246
          DDRTG++YVIE +NVYPW++L+DG GK K GFKSEWATVKD+ L+VGS+GKEWTT
Sbjct: 205  FDDRTGLVYVIEKDNVYPWLLMDGDGKASK---GFKSEWATVKDQVLYVGS+GKEWTTA 261

Query: 247  QGEFVNNNPMWVKKISRFGEVTDIPWRNNYIALRKPFGITFPGYMWHEAGVWSDIHKWF 306
          G+F NNNPM+VK I+ GE+ + W NN+ ALR GI +PGYM HE+GVWS KKW+
Sbjct: 262  GGFENNNPMYVKAITVHGEIYHLNWNANFKALRSSIGIEWPGYMIHESGVWSSEAKKWY 321

Query: 307  FLPRRMSSYIYNEKTDEEMGTNKLIIASENFKYIKVLNIK 346
          FLPRR S YNE DE MG N L+ A E+F IK + +K
Sbjct: 322  FLPRRCSKDRYNETRDEHMGCNYLITADESFHSIKPIELK 361

```

Figura 16 – Alinhamento das sequências da apirase 1 (apirase endosomal) de *R. prolixus* com a apirase de *Ae. aegypti* (EAT41732).

```

>rp_salivary_apyrase

gi|4185746|gb|AAD09177.1| apyrase [Cimex lectularius]      358  e-103
gi|108877507|gb|EAT41732.1| apyrase [Aedes aegypti]      305  4e-087
gi|91089647|ref|XP_973892.1| PREDICTED: similar to AGAP001217-PA... 302  3e-086
gi|156547919|ref|XP_001604339.1| PREDICTED: similar to apyrase [... 301  8e-086

==> gi|4185746|gb|AAD09177.1| apyrase [Cimex lectularius]
      Length = 364

Score = 358 bits (920), Expect = e-103
Identities = 178/333 (53%), Positives = 235/333 (70%), Gaps = 9/333 (2%)

Query: 43  EVGDNSLEKTSVYNSTYPTKSEADGDKIVFKIAIISDMDK--LSATVSNWRSLYKKG 100
          E+G S E + NS YP+T + K+ FKI +ISD DK +S SNTW S Y GT
Sbjct: 37  ELGHASGETNA--NSKYPLTTPVEENLKVRFKIGVISDDDKNAVSKDESNTWVSTYL TGT 94

Query: 101  LTWDKTSEKVDVWDE-EDRDLKSKYSYSGRMELSELVTFNGKLFSPDDRTGIVYLIEN 159
          L W+K+++K+ V WD+ ++ +KSKYSY GRMELSELVTFNG L + DDRTG+VY++++
Sbjct: 95  LEWEKSTDKITVQWDKGNEKVKSKYSYGGRMELSELVTFNGNLLTFDDRTGLVYILKD 154

Query: 160  GNFPYVWMLLDGPGNINKGFKSEWATVKDEHLVYGSSGMEWVTN-GTIDNYNAMWVKRVN 218
          YPWV+L DG G +KGFKSEWAT K +LYVGSSG EW T GTI+NYN MWVK +N
Sbjct: 155  DKVYPVWVLADGDGKNSKGFKSEWATEKAGNLVYGSSGKEWTTKEGTIENYNPMWVKMIN 214

Query: 219  RYGNKTNINWQNNYEALRKKLKVTYPGYMWHEAVVWSDIHKWFFLPRKMSRKAYDSKKD 278
          + G T++NwQ NYE +R + +T+PGYMWHEA WSD + KWFFLPR +S++AYDSKK
Sbjct: 215  KNGEVTSLNwQTNYEKIRSSMNITFPGYMWHEAACWSDKYNKWFFLPRALSQEAYDSKKF 274

Query: 279  EKKGTNKLITSDFKDIKVLIIHYIIVGEKNPEHGFSSFKFIPNTEDKVIIVALKSVEVGN 338
          E +G N ++I+ D K K I G+ + GFS+FKF+P +EDK+IV LK+VE +
Sbjct: 275  ETQGAN-VIISCDKFEKCEPTQ--IQGKTEDKRGFSNFKFVPTSEDKIIVGLKTVEADD 331

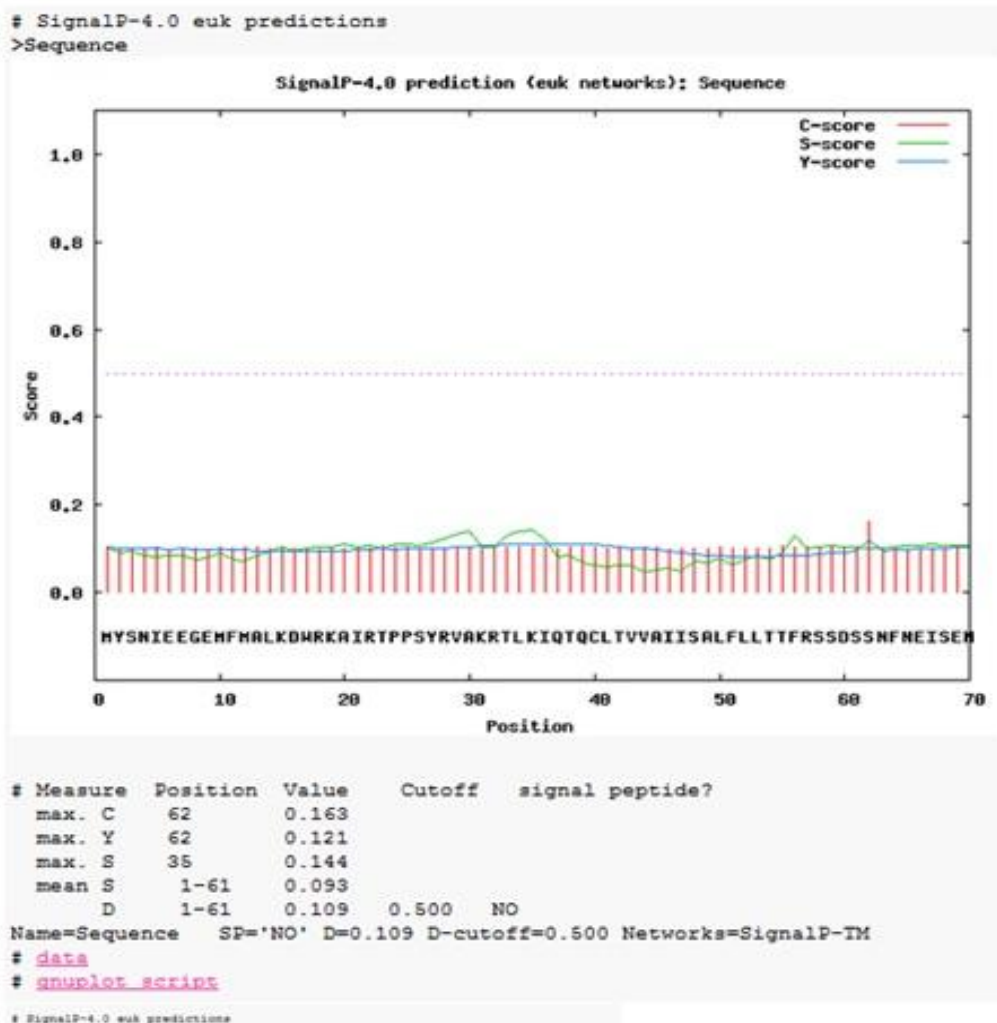
Query: 339  LAETYILAFITIDGKTLLEDKMGVGDIKYEGIEFI 371
          ETY AF ++GK LL+E K+ D KYEG++F+
Sbjct: 332  TTETYFTAFDLEGKVLLEETKIDDKHYEGVDFV 364

```

Figura 17 – Alinhamento das sequências da apirase 2 (apirase salivar) de *R. prolixus* com a apirase de *C. lectularius* (AAD09177).

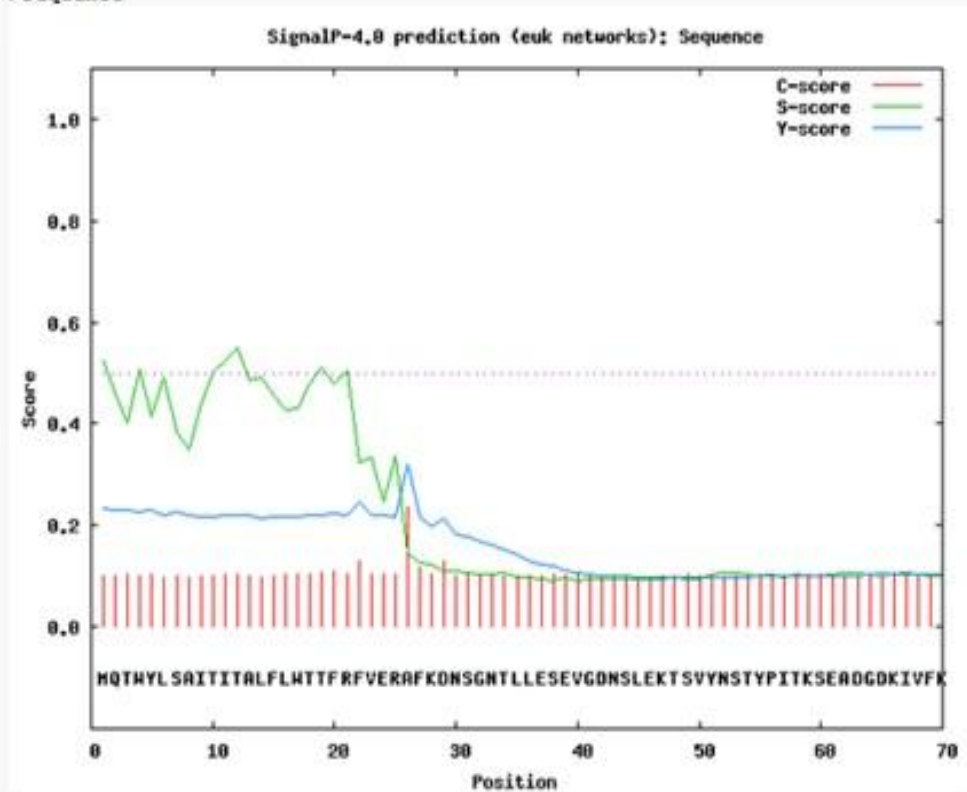
Uma análise das sequências realizadas pelo SignalP classificou ambas apirases como não secretadas, isto é, sem peptídeo sinal (Fig. 18). Entretanto os resultados da apirase salivar foram próximos do limite de identificação de peptídeo sinal e, somados aos resultados de homologia, sugerem que esta proteína possa realmente ser a apirase presente na saliva do *R. prolixus*. Estes resultados sugerem que o *R. prolixus* possui duas apirases, uma secretada e uma endógena.

A



B

```
# SignalP-4.0 euk predictions
>Sequence
```



```
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 26 0.238
max. Y 26 0.321
max. S 12 0.550
mean S 1-25 0.442
D 1-25 0.369 0.500 NO
Name=Sequence SP='NO' D=0.369 D-cutoff=0.500 Networks=SignalP-TM
# data
# gnuplot_script
```

Figura 18 – Resultados da avaliação da presença de peptídeo sinal nas apirases de *R. prolixus* pela ferramenta SignalP. (A) apirase endogenal, (B) apirase salivar.

A partir dos resultados obtidos nos bancos de dados, foram confeccionados iniciadores para cada uma das apirases a fim de identificar, por PCR, os órgãos onde são expressas (Tab. 3). Os resultados das PCRs demonstraram que estas sequências são expressas tanto na glândula salivar quanto no intestino médio anterior de *R. prolixus* (Fig. 19). Conforme esperado, estas não são expressas na glândula salivar de *T. infestans* ou *T. brasiliensis*, que foram usados como controle negativo.

Tabela 3 - Sequência de iniciadores usados nas PCRs.

Primers	Nome do iniciador	Sequência de 5' para 3'
1	RpApyEnd-F	GAGGCATGGAGCTTTCTGAG
2	RpApyEnd-R	TCCTTTCCCACACTTCCAAC
3	RpApySec-F	ATGGGCTACCGTGAAAGATG
4	RpApySec-R	ATGCCACATGTATCCTGGGT

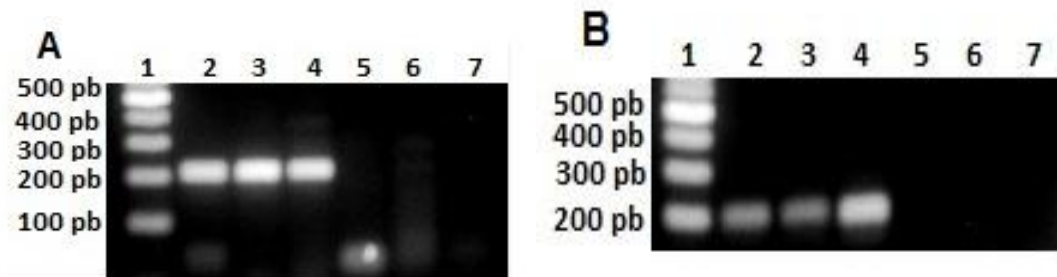


Figura 19 - Expressão da apirase na glândula salivar e intestino médio anterior de ninfas de 3^o estágio de triatomíneos em gel de agarose 2%. (A) Expressão da apirase endógena; (B) Expressão da apirase salivar. 1- marcador de peso molecular; 2- glândula salivar de *R. prolixus*; 3- intestino médio anterior de *R. prolixus*; 4- intestino médio anterior de *R. prolixus* ; 5- glândula salivar de *T. infestans* ; 6- glândula salivar de *T. brasiliensis*; 7- controle negativo;

6. Discussão

A doença de Chagas ainda não está totalmente controlada e sua re-emergência continua sendo uma constante ameaça (Araujo et al. 2009). Altas taxas de transmissão do *T. cruzi* ainda são encontradas em várias áreas endêmicas e de infestação recente como na Bolívia onde taxas de infecção chegam a 90% (Chippaux et al. 2008). Além disso, vários países ainda precisam desenvolver programas de vigilância e de intervenção em larga escala (Chippaux et al. 2008; Dias et al. 2002b; Ramsey & Schofield 2003). Em áreas da Argentina e do Uruguai onde o controle foi obtido e são hoje consideradas livres da doença, ainda existe o risco de recrudescência devido à redução dramática nas atividades de vigilância (Gurtler et al. 2007).

Após a eliminação das espécies domésticas das residências, as populações silvestres e peridomésticas ainda vão existir e podem substituir as populações domésticas devido a modificações no balanço ecológico de cada região (Cecere et al. 2002). Além disso, um novo desafio é representado pelas populações de triatomíneos resistentes a piretróides que persistem após as borrifações e promovem uma rápida re-infestação dos domicílios (Gurtler et al. 2007; Toloza et al. 2008). Desta forma, novas metodologias são necessárias para detectar a re-emergência de populações, detectar a colonização em estágio inicial e para um monitoramento sustentável e em longo prazo de regiões endêmicas para a doença de Chagas (Schofield et al. 2006).

Um dos principais procedimentos preconizados pelo PCDCh é baseado na localização de residências infestadas e eliminação dos triatomíneos vetores (CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS 2005; Ministério da Saúde 1980). Com a queda no número de chagásicos e do índice de incidência da doença, como vem acontecendo em vários países (Schofield et al. 2006), é esperado que os recursos destinados à vigilância epidemiológica e o número de agentes de saúde aptos a realizarem a busca ativa fiquem cada vez mais escassos e novas ferramentas serão necessárias como alternativa.

Como a saliva dos triatomíneos entra em contato direto com o sistema imune do hospedeiro, uma alternativa atraente é o monitoramento do nível de anticorpos séricos de indivíduos de regiões endêmicas contra antígenos salivares dos triatomíneos a fim de estimar o contato e, conseqüentemente, a presença e o nível populacional dos triatomíneos nas residências. Caso

possível, a avaliação dos níveis séricos seria considerado um método consideravelmente mais barato e mais fácil de ser implementado que a busca ativa, pois, ele se basearia na coleta de sangue, que apresenta diversas vantagens: não precisa ser realizada nos locais endêmicos, pois os indivíduos poderiam se deslocar para os centros de saúde; caso a coleta de sangue seja feita nas residências, o número de residências avaliadas por dia, isto é, de indivíduos cujo sangue foi coletado, poderia ser consideravelmente maior que a busca ativa; e o soro coletado poderia ser utilizado para pesquisa e controle de agentes infecciosos causadores de outras patologias.

A busca de marcadores moleculares para triatomíneos vem sendo feita por diferentes grupos de pesquisa (Nascimento et al. 2001; Schwarz et al. 2009b; Volf et al. 1993), porém todos eles foram focados na espécie *T. infestans*. No presente trabalho, avaliamos o reconhecimento de proteínas salivares do *R. prolixus* por anticorpos da subclasse IgG presentes no soro de camundongos previamente expostos a altas e baixas taxas de infestação por três espécies de triatomíneos. Identificamos uma proteína imunogênica na saliva do *R. prolixus*, que não reage com anticorpos IgG do soro de animais infestados por outras espécies de triatomíneos e apresenta potencial para ser utilizada como marcador de contato.

Além do IgG sérico, as imunoglobulinas IgA e IgM também podem ser avaliadas (Ratcliffe 2006; Sharma 1999). Enquanto IgG é a classe predominante em uma resposta humoral secundária, IgM é produzida como a primeira subclasse na resposta humoral primária (Leslie & Clem 1969; Ratcliffe 2006). Desta forma, IgM poderia ser usado como um indicador de exposição recente e IgG como apenas indicador de exposição (Orlandi-Pradines et al. 2007).

6.1. Reconhecimento de antígenos salivares de *R. prolixus* por anticorpos IgG presentes no soro de camundongos

A principal finalidade dos ensaios iniciais, onde foram utilizados pools de soros de camundongos, foi avaliar se havia reconhecimento de antígenos pelos anticorpos IgG de animais expostos a picadas de cada espécie e definir qual a diluição dos soros a ser utilizada nos ensaios com soros individuais. Os resultados mostraram que a picada dos triatomíneos desencadeia uma resposta humoral contra as proteínas salivares de modo que os anticorpos IgG presentes no soro são capazes de reconhecer estas proteínas em ensaios imunoenzimáticos. Existe um reconhecimento espécie específico, isto é, anticorpos IgG do soro dos camundongos reconhecem antígenos salivares da espécie usada na imunização, porém os resultados de reação cruzada entre as espécies foram diversificados. Foi interessante notar que anticorpos IgG anti-saliva de *T. infestans* e *T. brasiliensis* não reconhecem proteínas da saliva do *R. prolixus* indicando a ausência de reação cruzada. Por outro lado, anticorpos IgG anti-saliva de *R. prolixus* são capazes de reconhecer proteínas salivares de *T. infestans*.

Não foram feitos ensaios que pudessem explicar ou identificar quais proteínas salivares de *T. infestans* estão sendo reconhecidas por anticorpos IgG do soro de camundongos expostos ao *R. prolixus*. É provável que uma das proteínas reconhecidas seja o antígeno de 14,6 kDa da saliva de *T. infestans* que foi descrito como imunogênico por Schwarz et al. (2009a). Este antígeno é reconhecido por anticorpos IgG do soro de animais expostos ao *T. infestans* e a quatro outras espécies de triatomíneos, incluindo o *R. prolixus* (Schwarz et al. 2009a).

Trabalhos anteriores demonstraram que, apesar de pertencerem à mesma subfamília, o conteúdo salivar do *R. prolixus* apresenta diferenças quantitativas e qualitativas em relação ao *T. infestans* (Assumpcao et al. 2008; Ribeiro et al. 2004). Como exemplo, podemos citar as NPs que constituem em torno de 50% das proteínas salivares de *R. prolixus* (Champagne et al. 1995a) e estão ausentes na saliva de *T. infestans* (Ribeiro & Francischetti 2003; Ribeiro et al. 1998).

Quanto à escolha da diluição a ser usada, os resultados indicaram que todos os títulos dos soros poderiam ser utilizados, uma vez que todas

discriminam os soros de animais sensibilizados dos soros de animais controle. Entretanto, nos ensaios subsequentes, optamos por utilizar a diluição de 1:160, uma vez que esta apresentou valores de absorvância aceitáveis e utilizam menores quantidades de soro nos ensaios.

Nos ensaios onde os soros dos animais foram testados individualmente, observamos que todos os camundongos dos grupos RpA e RpB apresentaram valores de absorvância superiores aos controles e aos grupos imunizados com antígenos salivares de outras espécies de triatomíneos. Estes resultados confirmam que a identificação de marcadores para contato com *R. prolixus* poderia ser mais fácil e provavelmente mais efetiva do que para outras espécies, pois nos ensaios realizados até então, não houve nenhum soro com resultado falso positivo ou falso negativo.

Ao tentar identificar os antígenos salivares mais imunogênicos e que poderiam ser utilizados como marcadores de contato para *R. prolixus*, observamos que, apesar de sua saliva apresentar uma grande quantidade de moléculas que variavam de 120 a menos que 10 kDa, apenas duas foram reconhecidas pelos soros dos camundongos imunizados. Estas moléculas possuíam pesos moleculares aproximados de 48,5 e 18,2 kDa. Os próximos passos seriam purificar estas moléculas e testá-las quanto ao reconhecimento pelos soros dos grupos imunizados. Como observado no SDS-PAGE da saliva do *R. prolixus* e nos resultados do sialoma, que mostram que dentre os 31 cDNAs de sequência completa descritos no sialoma de *R. prolixus*, apenas dois possuem peso molecular acima de 30 kDa (Ribeiro et al. 2004), a maior parte das proteínas salivares possui peso molecular inferior a 30 kDa, faixa que inclui as NPs (Champagne et al. 1995a). Sendo assim, decidimos focar na purificação da molécula de 48,5 kDa que poderia apresentar resultados satisfatórios utilizando uma coluna de exclusão molecular por apresentar peso molecular diferente da maioria das proteínas salivares do *R. prolixus*.

6.2. Identificação das moléculas imunogênicas presentes na saliva do *R. prolixus*

Para confirmar a identidade da proteína de 48,5 kDa, nossa ideia era de purificar a molécula por HPLC e em seguida submetê-la para espectrometria de massas. Porém, os resultados do HPLC não foram satisfatórios, pois não foi possível obter uma amostra pura, isto é, apenas com a proteína de 48,5 kDa. Todas as amostras apresentaram moléculas de outros pesos moleculares que indicavam ou contaminação da amostra ou degradação da proteína de interesse que atrapalhariam sua identificação.

Uma vez que a purificação por HPLC não apresentou resultados satisfatórios, optamos por trabalhar com uma coluna de Blue Sepharose. Esta coluna consiste na ligação de Cibacron Blue 3G (Amersham) com a Sepharose 6 Fast Flow (Amersham) (Lowe & Pearson 1984). Esta coluna se liga fortemente a certos tipos de proteína incluindo aquelas que interagem com nucleotídeos (Lowe & Pearson 1984), que é o caso das apirases (Sarkis et al. 1995). Entretanto, os resultados novamente não foram satisfatórios indicando contaminação ou degradação da proteína ativa.

Os resultados da purificação em colunas foram importantes para confirmar que a proteína de 48,5 kDa possuía atividade apirásica. Vários fatos nos levaram a ligar a atividade apirásica à proteína de 48,5 kDa. As apirases de insetos hematófagos descritas até então possuem peso molecular que varia de 36,5 a 88 kDa (Francischetti 2010), sugerindo que a apirase do *R. prolixus* poderia ter tamanho semelhante. A saliva do *R. prolixus* apresenta um nível relativamente alto de atividade apirásica (Sarkis et al. 1986), sugerindo que a apirase salivar seja expressa em altos níveis e sua banda seja facilmente visível no SDS-PAGE. Como o SDS-PAGE apresentou apenas duas bandas majoritárias acima de 30 kDa, elas seriam suspeitas de serem as apirases salivares do *R. prolixus*. Esta suspeita facilitou os estudos, uma vez que as frações da cromatografia com a molécula de 48,5 kDa foram testadas diretamente no ensaio biológico para atividade apirásica.

Os resultados ainda indicam que a proteína de 83 kDa também possui atividade apirásica sugerindo que o *R. prolixus* possui duas apirases salivares ou uma apirase que forma um dímero. De fato, as duas hipóteses são possíveis e já foram observadas em outros insetos hematófagos. O *T. infestans*

possuem 5 isoformas de apirase em sua saliva (Faudry et al. 2004), enquanto o *C. lectularius*, cuja apirase foi que apresentou maior homologia com a apirase de *R. prolixus*, é uma molécula que pode formar dímeros (Valenzuela et al. 1998).

A forma mais eficiente de purificar a molécula de 48,5 kDa foi o tradicional método de remover a porção do gel contendo a banda alvo seguida de eletroeluição para remover a proteína do gel. Usando este método conseguimos purificar uma amostra com quase 1 mg da proteína de 48,5 kDa praticamente sem contaminantes e sem degradação, em quantidade suficiente para ser utilizada nos ensaios imunoenzimáticos. Com esta metodologia, ainda conseguimos estimar a quantidade de apirase presente na saliva do *R. prolixus*. O resultado de 3,83% é bem coerente com a atividade apirásica presente na saliva e, considerando que 50% das proteínas salivares são nitroforinas, a apirase aparece como uma das proteínas mais expressas o que corrobora resultados anteriores (Sarkis et al. 1986). Vale lembrar que a eletroeluição foi realizada apenas para a proteína de 48,5 kDa e, se considerarmos que a molécula de 83 kDa também é uma apirase, a quantidade de apirase na glândula salivar será maior que os 3,83% calculados, podendo, pela intensidade da banda de 83 kDa visualizada no SDS-PAGE, chegar a mais de 5% das proteínas salivares totais.

6.3. Avaliação da apirase salivar como marcador de contato de camundongos com *Rhodnius prolixus*

Os resultados do ELISA utilizando a proteína de 48,5 kDa como antígeno mostraram que a apirase é um bom marcador de contato para *R. prolixus*. Foi observado que o antígeno pode ser utilizado em testes imunoenzimáticos, pois é imunogênico e não apresenta reação cruzada com anticorpos IgG do soro de animais expostos à picadas pelo *T. infestans* e *T. brasiliensis*. Para os grupos analisados a sensibilidade e a especificidade do método foram de 100%. Estes resultados são promissores, entretanto muitos ensaios ainda deverão ser realizados para avaliar sua possível utilização. O primeiro passo seria avaliar quanto a possível presença de reação cruzada com o soro de indivíduos utilizados como fonte alimentar por outros insetos hematófagos. Experimentos futuros serão realizados inicialmente com o soro

de camundongos expostos a picadas de *L. longipalpis*, *Ae. aegypti*, *Cu. quinquefasciatus* e *Amblyomma cajennense*, que são os artrópodes hematófagos encontrados nas regiões tropicais e subtropicais das Américas onde o *R. prolixus* também está presente. Em seguida, o antígeno também deve ser testado em condições de campo, utilizando soros de indivíduos, moradores de áreas endêmicas expostos às picadas de triatomíneos e indivíduos de regiões livres de triatomíneos.

Um resultado inesperado foi o fato do grupo de camundongos imunizado com baixas infestações de *R. prolixus* apresentar densidades ópticas nos ELISAs estatisticamente semelhantes ao grupo imunizado com altas infestações. Estes resultados podem indicar que este antígeno não serve como indicativo dos níveis de infestação por triatomíneos. Outra hipótese seria o fato do número de insetos utilizados em cada um dos grupos não ter sido diferente o suficiente para identificar diferença significativa nas absorvâncias dos soros no ELISA. Para confirmar estas hipóteses, seria necessário a realização de novas imunizações com diferentes números de triatomíneos. Neste trabalho, o número de insetos nas imunizações foi estimado baseado nas imunizações realizadas em cobaias por Shwarz et al. (2009b), reduzindo o número de insetos de acordo com a diferença de peso entre camundongos e cobaias. Camundongos Swiss adultos pesam em torno de 20 a 25 gramas e exposição a um número maior de triatomíneos do que o usado no presente trabalho poderia causar a morte dos animais.

Outro ponto que deveria ser investigado no futuro é o nível de reconhecimento em diferentes estádios e populações de triatomíneos. Trabalhos anteriores já demonstraram que existe uma grande variabilidade no perfil eletroforético de proteínas salivares de populações coletadas em diferentes regiões (Barbosa et al. 1999; Soares et al. 2000) e entre os estádios de desenvolvimento (Guarneri et al. 2003; Moreira et al. 2003).

6.4. Identificação da sequência de nucleotídeos e aminoácidos da apirase salivar do *R. prolixus*

Uma análise mais detalhada da apirase salivar do *R. prolixus* como marcador molecular demandaria uma grande quantidade de apirase purificada. A melhor estratégia para resolver este problema seria a produção da proteína *in vitro* em larga escala como feito com o antígeno de 14,6 kDa utilizado por Schwarz et al. (2009a). Para isto, é necessário conhecer a sequência de nucleotídeos da proteína para que possa ser produzida a proteína recombinante utilizando qualquer sistema *in vitro* apropriado. A partir de diversas análises nos banco de dados utilizando como molde a apirase de outros insetos hematófagos, verificamos que moléculas homologas não estavam presentes nos banco de dados de nucleotídeos, proteínas e EST de *R. prolixus*. Mesmo entre as sequencias disponíveis no sialoma de *R. prolixus* não foi possível identificar uma molécula com similaridade às apirases salivares de insetos hematófagos (Ribeiro et al. 2004), o que é um fato curioso uma vez que a quantidade de apirase na saliva é grande (3,8% em relação às proteínas salivares totais) era de se esperar vários ESTs referentes ao gene que codifica a proteína. Dentre as sequencias publicadas no sialoma do *R. prolixus* existem 2 “contigs” que estão designados como “apirases”, porém sua maior similaridade no banco de dados de “domínios conservados (CDD)” do NCBI foi com “inositol phosphatases”. Entretanto, o Dr. J. M. Ribeiro, autor do trabalho, informou que as sequencias encontradas não eram referentes à apirase salivar, mas provavelmente a inositol fosfatases presentes na saliva e que os contigs foram anotados erradamente no trabalho.

A sequência da apirase somente foi encontrada quando os resultados do sequenciamento do genoma de *R. prolixus* foram depositadas no bando de dados genômicos do NCBI. Em colaboração com o Dr. Ribeiro foram encontradas duas proteínas de 39,9 e 42,8 kDa que poderiam ser as apirases salivares do *R. prolixus*. Os resultados de similaridade com as apirases de outros insetos hematófagos sugere que o *R. prolixus* possui uma apirase típica (a apirase salivar) e uma da classe 5' nucleotidase (apirase endógeno) (Francischetti 2010).

Os resultados da identificação de peptídeo sinal indicam que estas duas proteínas poderiam ser uma apirase endógena e uma secretada. A apirase

endógena poderia ter a função relacionada às funções fisiológicas de cada tecido, como por exemplo, o catabolismo de neurotransmissores (Battastini et al. 1991). A apirase secretada seria importante para facilitar a ingestão de sangue pelo inseto pela degradação de ATP e ADP em AMP e consequente inibição da agregação plaquetária, uma vez que o AMP não induz agregação enquanto o ADP é um potente indutor (Champagne 2004, 2005; Sarkis et al. 1986).

Os resultados da PCRs que mostraram a presença da apirase endógena na glândula salivar e no intestino são coerentes, uma vez que esta proteína pode estar envolvida no metabolismo interno das células e provavelmente é expressa em vários tecidos do corpo do inseto. Entretanto, a presença de expressão da apirase salivar no intestino médio anterior, além da glândula salivar, é um achado controverso. Trabalhos anteriores já demonstraram que o conteúdo intestinal não apresenta atividade apirásica (Barros et al. 2009; Ribeiro & Garcia 1980). Estes resultados precisam ser confirmados principalmente para verificar a possibilidade de contaminação do cDNA utilizado nas PCR por tecido glandular.

A apirase secretada encontrada no genoma de *R. prolixus* apresentou peso molecular de 42,8 kDa, que é diferente da molécula de 48,5 kDa observada nos SDS-PAGE. Esta diferença entre os pesos moleculares reforça a idéia de que a apirase salivar esteja truncada na extremidade 5', por isso a proteína traduzida se inicia com uma lisina e possui apenas 42,8 kDa, além disso, não existe nenhuma evidência forte que indique que a metionina encontrada na posição 5 seja a metionina inicial.

7. Conclusões

- Camundongos expostos à infestação por *R. prolixus* e *T. infestans* apresentam em seu soro anticorpos IgG que reconhecem proteínas salivares.

- Anticorpos IgG presentes no soro de camundongos expostos à infestação por *R. prolixus* reconhecem antígenos salivares de *T. infestans*.

- Não há diferença entre os níveis de IgG no soro de camundongos expostos a altos e baixos níveis de infestação pelo *R. prolixus*.

- Os antígenos mais imunogênicos da saliva de *R. prolixus* são duas proteínas de 48,5 e 18,2 kDa.

- A proteína de 48,5 kDa é reconhecida por IgG presentes no soro de camundongos expostos a infestação por *R. prolixus*, mas não é reconhecida por anticorpos IgG presentes no soro de camundongos expostos a infestação por *T. infestans* e *T. brasiliensis*.

- O banco de dados de *R. prolixus* possui duas sequências de proteínas com homologia a apirases, sendo uma endógena e uma secretada.

8. Referências bibliográficas

- Abad-Franch F, Monteiro FA 2007. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1: 57-70.
- Alencar JE 1987, História Natural da Doença de Chagas no Estado do Ceará. Imprensa Universitária, 341 p.
- Amino R, Martins RM, Procopio J, Hirata IY, Juliano MA, Schenkman S 2002. Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. *J Biol Chem* 277: 6207-6213.
- Amino R, Tanaka AS, Schenkman S 2001. Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem Mol Biol* 31: 465-472.
- Andersen JF, Francischetti IM, Valenzuela JG, Schuck P, Ribeiro JM 2003. Inhibition of hemostasis by a high affinity biogenic amine-binding protein from the saliva of a blood-feeding insect. *J Biol Chem* 278: 4611-4617.
- Andersen JF, Hinnebusch BJ, Lucas DA, Conrads TP, Veenstra TD, Pham VM, Ribeiro JM 2007. An insight into the sialome of the oriental rat flea, *Xenopsylla cheopis* (Rots). *BMC genomics* 8: 102.
- Araujo CA, Waniek PJ, Jansen AM 2009. An overview of Chagas disease and the role of triatomines on its distribution in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9: 227-234.
- Assis GF, Azeredo BV, Carbajal de la Fuente AL, Diotaiuti L, de Lana M 2007. Domiciliation of *Triatoma pseudomaculata* (Correa e Espinola 1964) in the Jequitinhonha Valley, State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 391-396.
- Assumpcao TC, Alvarenga PH, Ribeiro JM, Andersen JF, Francischetti IM 2010. Dipetalodipin, a novel multifunctional salivary lipocalin that inhibits platelet aggregation, vasoconstriction, and angiogenesis through unique binding specificity for TXA₂, PGF₂α, and 15(S)-HETE. *J Biol Chem* 285: 39001-39012.
- Assumpcao TC, Charneau S, Santiago PB, Francischetti IM, Meng Z, Araujo CN, Pham VM, Queiroz RM, de Castro CN, Ricart CA, Santana JM,

- Ribeiro JM 2011. Insight into the salivary transcriptome and proteome of *Dipetalogaster maxima*. *J Proteome Res* 10: 669-679.
- Assumpcao TC, Francischetti IM, Andersen JF, Schwarz A, Santana JM, Ribeiro JM 2008. An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 213-232.
- Azambuja P, Feder D, Mello C, Gomes S, Garcia E 1999. Immunity in *Rhodnius prolixus*: trypanosomatid-vector interactions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1: 219-222.
- Barbosa SE, Diotaiuti L, Braga EM, Pereira MH 2004. Variability of the salivary proteins of 20 Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Acta Trop* 92: 25-33.
- Barbosa SE, Diotaiuti L, Soares RP, Pereira MH 1999. Differences in saliva composition among three Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae). *Acta Trop* 72: 91-98.
- Barral A, Honda E, Caldas A, Costa J, Vinhas V, Rowton ED, Valenzuela JG, Charlab R, Barral-Netto M, Ribeiro JM 2000. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg* 62: 740-745.
- Barros VC, Assumpcao JG, Cadete AM, Santos VC, Cavalcante RR, Araujo RN, Pereira MH, Gontijo NF 2009. The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of triatomines and mosquitoes. *PLoS One* 4: e6047.
- Battastini AM, da Rocha JB, Barcellos CK, Dias RD, Sarkis JJ 1991. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochemical research* 16: 1303-1310.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Campos IT, Amino R, Sampaio CA, Auerswald EA, Friedrich T, Lemaire HG, Schenkman S, Tanaka AS 2002. Infestin, a thrombin inhibitor presents in *Triatoma infestans* midgut, a Chagas' disease vector: gene cloning,

- expression and characterization of the inhibitor. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 991-997.
- Carcavallo RU 1999. Climatic factors related to Chagas disease transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1: 367-369.
- Cavalcante RR, Pereira MH, Gontijo NF 2003. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology* 127: 87-93.
- Cecere MC, Gurtler RE, Canale DM, Chuit R, Cohen JE 2002. Effects of partial housing improvement and insecticide spraying on the reinfestation dynamics of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. *Acta Trop* 84: 101-116.
- Chagas C 1909. Nova tripanomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1:159-218.
- Champagne DE 2004. Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 4: 375-396.
- Champagne DE 2005. Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods. *Pathophysiol Haemost Thromb* 34: 221-227.
- Champagne DE, Nussenzveig RH, Ribeiro JM 1995a. Purification, partial characterization, and cloning of nitric oxide-carrying heme proteins (nitrophorins) from salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem* 270: 8691-8695.
- Champagne DE, Smartt CT, Ribeiro JM, James AA 1995b. 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: 694-698.
- Charlab R, Valenzuela JG, Rowton ED, Ribeiro JM 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: 15155-15160.
- Chippaux JP, Postigo JR, Santalla JA, Schneider D, Brutus L 2008. Epidemiological evaluation of Chagas disease in a rural area of southern Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 578-584.

- CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS 2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38 (Suplemento III): 29.
- Cornelie S, Remoue F, Doucoure S, Ndiaye T, Sauvage FX, Boulanger D, Simondon F 2007. An insight into immunogenic salivary proteins of *Anopheles gambiae* in African children. *Malar J* 6: 75.
- Costa J, Almeida CE, Dotson EM, Lins A, Vinhaes M, Silveira AC, Beard CB 2003. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 443-449.
- Costa J, Peterson AT 2012. Ecological niche modeling as a tool for understanding distributions and interactions of vectors, hosts, and etiologic agents of Chagas disease. *Adv Exp Med Biol* 710: 59-70.
- Cutrim FS, Almeida IA, Goncalves Eda G, Silva AR 2010. [Chagas' disease in the State of Maranhão, Brazil: record of acute cases from 1994 to 2008]. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 705-708.
- Dan A, Pereira MH, Pesquero JL, Diotaiuti L, Beirao PS 1999. Action of the saliva of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) on sodium channels. *J Med Entomol* 36: 875-879.
- Dias JC 1982. Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Estudo clínico-epidemiológico a partir da fase aguda entre 1940 e 1982. PhD. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Dias JC 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: 11-18.
- Dias JC, Prata A, Schofield CJ 2002a. [Chagas' disease in the Amazon: an overview of the current situation and perspectives for prevention]. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 669-678.
- Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ 2002b. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 603-612.
- Dias JCP, Diotaiuti L 1998, Vectores secundarios de la enfermedad de Chagas en el Brasil y perspectivas para su control, In: Guhl, F., Jaramillo, C.A. (Eds.) Curso Taller. Control de Tripanosomiasis Americana y

- Leishmaniosis: Aspectos Biológicos, Genéticos y Moleculares. Corcas Editores Ltda, Santafé de Bogotá, Colombia, pp. 154-159.
- Diotaiuti L, Faria Filho OF, Carneiro FC, Dias JC, Pires HH, Schofield CJ 2000. Operational aspects of *Triatoma brasiliensis* control. *Cad Saude Publica* 16 Suppl 2: 61-67.
- Faudry E, Lozzi SP, Santana JM, D'Souza-Ault M, Kieffer S, Felix CR, Ricart CA, Sousa MV, Vernet T, Teixeira AR 2004. *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. *J Biol Chem* 279: 19607-19613.
- Feliciangeli MD, Sanchez-Martin MJ, Suarez B, Marrero R, Torrellas A, Bravo A, Medina M, Martinez C, Hernandez M, Duque N, Toyo J, Rangel R 2007. Risk factors for *Trypanosoma cruzi* human infection in Barinas State, Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 76: 915-921.
- Fox I, Bayona IG 1968. Circulating precipitating antibodies in the rabbit from the bites of *Rhodnius prolixus* as shown by agar-gel tests. *J Parasitol* 54: 1239-1240.
- Francischetti IM 2010. Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. *Toxicon* 56: 1130-1144.
- Francischetti IM, Andersen JF, Ribeiro JM 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: 3810-3818.
- Francischetti IM, Ribeiro JM, Champagne D, Andersen J 2000. Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem* 275: 12639-12650.
- Garcia E, Gonzalez M, Azambuja P 1999. Biological factors involving *Trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate vector, *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1: 213-216.
- Garcia ES, Mello CB, Azambuja P, Ribeiro JM 1994. *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. *Exp Parasitol* 78: 287-293.
- Gonçalves TC, Freitas AL, Freitas SP 2009. Surveillance of Chagas disease vectors in municipalities of the state of Ceara, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1159-1164.

- Guarneri AA, Diotaiuti L, Gontijo NF, Gontijo AF, Pereira MH 2003. Blood-feeding performance of nymphs and adults of *Triatoma brasiliensis* on human hosts. *Acta Trop* 87: 361-370.
- Gurgel-Goncalves R, Galvao C, Costa J, Peterson AT 2012. Geographic distribution of chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *Journal of tropical medicine* 2012: 705326.
- Gurtler RE, Kitron U, Cecere MC, Segura EL, Cohen JE 2007. Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16194-16199.
- Haendler B, Becker A, Noeske-Jungblut C, Kratzschmar J, Donner P, Schleuning WD 1995. Expression of active recombinant pallidipin, a novel platelet aggregation inhibitor, in the periplasm of *Escherichia coli*. *Biochem J* 307 (Pt 2): 465-470.
- Hecker H, Schwarzenbach M, Rudin W 1990. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. *Parasitol Res* 76: 311-318.
- Hellmann K, Hawkins RI 1964. Anticoagulant and Fibrinolytic Activities from *Rhodnius Prolixus* Stal. *Nature* 201: 1008-1009.
- Hellmann K, Hawkins RI 1965. Prolixins-S and prolixin-G; two anticoagulants from *Rhodnius prolixus* Stal. *Nature* 207: 265-267.
- Hudson A 1970. Notes on the piercing mouthparts of three species of mosquitoes (Diptera: Culicidae) viewed with the scanning electron microscope. *Can Entomol* 102: 501-509.
- Jones CJ 1996, Immune responses do fleas, bugs and sucking lice, In: Wikel, S.K. (Ed.) The immunology of host-ectoparasitic arthropod relationships. CAB International, Wallingford, p. 331.
- Kalvachova P, Hribalova V, Kodym P, Volf P 1999. Modulation of murine lymphocyte responsiveness by the saliva of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol* 36: 341-344.
- Kato H, Jochim RC, Gomez EA, Sakoda R, Iwata H, Valenzuela JG, Hashiguchi Y 2010. A repertoire of the dominant transcripts from the salivary glands of the blood-sucking bug, *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease. *Infect Genet Evol* 10: 184-191.

- klug F 1834. Reise um die, in den Jahren 1830, 1831 und 1832 ausgeführt von F. J.FMeyen. Teil 1, Berlin, C. W. Eichhoff (Reduvius infestans).
- Knipp M, Yang F, Berry RE, Zhang H, Shokhirev MN, Walker FA 2007a. Spectroscopic and functional characterization of nitrophorin 7 from the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus* reveals an important role of its isoform-specific N-terminus for proper protein function. *Biochemistry* 46: 13254-13268.
- Knipp M, Zhang H, Berry RE, Walker FA 2007b. Overexpression in Escherichia coli and functional reconstitution of the liposome binding ferriheme protein nitrophorin 7 from the bloodsucking bug *Rhodnius prolixus*. *Protein expression and purification* 54: 183-191.
- Laemmli UK 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lavoipierre MM, Dickerson G, Gordon RM 1959. Studies on the methods of feeding of blood-sucking arthropods. I. The manner in which triatomine bugs obtain their blood-meal, as observed in the tissues of the living rodent, with some remarks on the effects of the bite on human volunteers. *Ann Trop Med Parasitol* 53: 235-250.
- Law JH, Ribeiro JM, Wells MA 1992. Biochemical insights derived from insect diversity. *Annual review of biochemistry* 61: 87-111.
- Lent H, Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Reduviidae, Hemiptera) and their significance as vector of Chagas'disease (Bull Am Mus Nat Hist), pp. 125-520.
- Leslie GA, Clem LW 1969. Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. *J Exp Med* 130: 1337-1352.
- Liyou N, Hamilton S, Elvin C, Willadsen P 1999. Cloning and expression of ecto 5-nucleotidase from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Insect Mol Biol* 8: 257-266.
- Lombardo F, Di Cristina M, Spanos L, Louis C, Coluzzi M, Arca B 2000. Promoter sequences of the putative *Anopheles gambiae* apyrase confer salivary gland expression in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 275: 23861-23868.
- Lowe CR, Pearson JC 1984. Affinity chromatography on immobilized dyes. *Methods in enzymology* 104: 97-113.

- Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira AC, da Silva FM, Pinto AY, Naiff RD, Campaner M, Coura JR, Camargo EP, Miles MA, Teixeira MM 2009. Trypanosoma cruzi in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, Rhodnius spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol* 39: 615-623.
- Mellanby K 1946. Man's reaction to mosquito bites. *Nature* 158: 554.
- Ministério da Saúde 1980. Manual de normas técnicas da campanha de controle da Doença de Chagas., Chagas, S.d.c.d.s.p.S.-D.d.D.d., ed. (Brasília, Centro de documentação do Ministério da Saúde), p. 167.
- Montilla M, Soto H, Parra E, Torres M, Carrillo P, Lugo L, Colorado J, Arias MT 2011. Infestation by triatomine bugs in indigenous communities of Valledupar, Colombia. *Rev Saude Publica* 45: 773-780.
- Moreira MF, Coelho HS, Zingali RB, Oliveira PL, Masuda H 2003. Changes in salivary nitrophorin profile during the life cycle of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 23-28.
- Morita A, Isawa H, Orito Y, Iwanaga S, Chinzei Y, Yuda M 2006. Identification and characterization of a collagen-induced platelet aggregation inhibitor, triplatin, from salivary glands of the assassin bug, *Triatoma infestans*. *Febs J* 273: 2955-2962.
- Nascimento RJ, Santana JM, Lozzi SP, Araujo CN, Teixeira AR 2001. Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland proteins. *Am J Trop Med Hyg* 65: 219-226.
- Noeske-Jungblut C, Haendler B, Donner P, Alagon A, Possani L, Schleuning WD 1995. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. *J Biol Chem* 270: 28629-28634.
- Noeske-Jungblut C, Kratzschmar J, Haendler B, Alagon A, Possani L, Verhallen P, Donner P, Schleuning WD 1994. An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. *J Biol Chem* 269: 5050-5053.
- Noireau F, Carbajal-de-la-Fuente AL, Lopes CM, Diotaiuti L 2005. Some considerations about the ecology of Triatominae. *An Acad Bras Cienc* 77: 431-436.

- Orlandi-Pradines E, Almeras L, Denis de Senneville L, Barbe S, Remoue F, Villard C, Cornelié S, Penhoat K, Pascual A, Bourguin C, Fontenille D, Bonnet J, Corre-Catelin N, Reiter P, Pages F, Laffite D, Boulanger D, Simondon F, Pradines B, Fusai T, Rogier C 2007. Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa. *Microbes Infect* 9: 1454-1462.
- Palosuo K, Brummer-Korvenkontio H, Mikkola J, Sahi T, Reunala T 1997. Seasonal increase in human IgE and IgG4 antisaliva antibodies to *Aedes* mosquito bites. *International archives of allergy and immunology* 114: 367-372.
- Paula MB, Costa IN, Freitas Pde A, Limongi JE, Pajuaba Neto Ade A, Pinto Rde M, Goncalves AL, Costa-Cruz JM 2010. Occurrence of positivity for *Trypanosoma cruzi* in triatomine from municipalities in Southeastern Brazil, from 2002 to 2004. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 9-14.
- Pereira MH, Souza ME, Vargas AP, Martins MS, Penido CM, Diotaiuti L 1996. Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera: Triatominae). *Acta Trop* 61: 255-261.
- Poinsignon A, Cornelié S, Remoue F, Grebaut P, Courtin D, Garcia A, Simondon F 2007. Human/vector relationships during human African trypanosomiasis: initial screening of immunogenic salivary proteins of *Glossina* species. *Am J Trop Med Hyg* 76: 327-333.
- Ponce C 2007. Current situation of Chagas disease in Central America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1: 41-44.
- Ramsey JM, Schofield CJ 2003. Control of Chagas disease vectors. *Salud Publica Mex* 45: 123-128.
- Rassi A, Jr., Rassi A, Marin-Neto JA 2010. Chagas disease. *Lancet* 375: 1388-1402.
- Ratcliffe MJ 2006. Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Developmental and comparative immunology* 30: 101-118.
- Reddy VB, Kouniga K, Mariano F, Lerner EA 2000. Chrysoptin is a potent glycoprotein IIb/IIIa fibrinogen receptor antagonist present in salivary gland extracts of the deerfly. *J Biol Chem* 275: 15861-15867.

- Reunala T, Brummer-Korvenkontio H, Palosuo K, Miyanij M, Ruiz-Maldonado R, Love A, Francois G, Palosuo T 1994. Frequent occurrence of IgE and IgG4 antibodies against saliva of *Aedes communis* and *Aedes aegypti* mosquitoes in children. *International archives of allergy and immunology* 104: 366-371.
- Ribeiro JM, Andersen J, Silva-Neto MA, Pham VM, Garfield MK, Valenzuela JG 2004. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 61-79.
- Ribeiro JM, Francischetti IM 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol* 48: 73-88.
- Ribeiro JM, Garcia ES 1981. Platelet antiaggregating activity in the salivary secretion of the blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Experientia* 37: 384-386.
- Ribeiro JM, Hazzard JM, Nussenzveig RH, Champagne DE, Walker FA 1993. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. *Science* 260: 539-541.
- Ribeiro JM, Marinotti O, Gonzales R 1990. A salivary vasodilator in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Br J Pharmacol* 101: 932-936.
- Ribeiro JM, Nussenzveig RH 1993. Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland. *FEBS Lett* 330: 165-168.
- Ribeiro JM, Schneider M, Guimaraes JA 1995. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochem J* 308 (Pt 1): 243-249.
- Ribeiro JM, Schneider M, Isaias T, Jurberg J, Galvao C, Guimaraes JA 1998. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). *J Med Entomol* 35: 599-610.
- Ribeiro JM, Walker FA 1994. High affinity histamine-binding and antihistaminic activity of the salivary nitric oxide-carrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*. *J Exp Med* 180: 2251-2257.
- Ribeiro JMC, Garcia ES 1980. The salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol* 26: 303-307.
- Ribeiro JMC, Sarkis JJF 1982. Anti-thromboxane activity in *Rhodnius prolixus* salivary secretion. *J Insect Physiol* 28: 655-660.

- Rocha FF 2010. Cultivo primário da glândula salivar, canal salivar e intestino médio anterior de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) para o estudo moléculas bioativas relacionadas com a hematofagia. UFMG, Belo Horizonte.
- Rohousova I, Ozensoy S, Ozbel Y, Volf P 2005. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* 130: 493-499.
- Sanders ML, Glass GE, Scott AL, Schwartz BS 1998. Kinetics and cross-species comparisons of host antibody responses to lone star ticks and American dog ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 35: 849-856.
- Santana Kde S, Bavia ME, Lima AD, Guimaraes IC, Soares ES, Silva MM, Mendonca J, Martin Mde S 2011. Spatial distribution of triatomines (Reduviidae: Triatominae) in urban areas of the city of Salvador, Bahia, Brazil. *Geospat Health* 5: 199-203.
- Santos A, Ribeiro JM, Lehane MJ, Gontijo NF, Veloso AB, Sant' Anna MR, Nascimento Araujo R, Grisard EC, Pereira MH 2007. The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). *Insect Biochem Mol Biol* 37: 702-712.
- Santos Junior JE, Diotaiuti L, Dias JC 2011. First report of *Panstrongylus megistus* sylvatic focus in municipality of Bambui, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 510-513.
- Sarkis JJ, Battastini AM, Oliveira EM, Frassetto SS, Dias RD 1995. ATP diphosphohydrolases: An overview. *Ciência e Cultura* 47: 131-135.
- Sarkis JJ, Guimaraes JA, Ribeiro JM 1986. Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*. Kinetics and purification. *Biochem J* 233: 885-891.
- Schofield CJ 1994, Triatominae, biología y control, 1 Edition. Eurocommunica Publications, 76 p.
- Schofield CJ, Dias JC 1999. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol* 42: 1-27.
- Schofield CJ, Galvao C 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110: 88-100.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* 22: 583-588.

- Schwartz BS, Nadelman RB, Fish D, Childs JE, Forseter G, Wormser GP 1993. Entomologic and demographic correlates of anti-tick saliva antibody in a prospective study of tick bite subjects in Westchester County, New York. *Am J Trop Med Hyg* 48: 50-57.
- Schwarz A, Helling S, Collin N, Teixeira CR, Medrano-Mercado N, Hume JC, Assumpcao TC, Marcus K, Stephan C, Meyer HE, Ribeiro JM, Billingsley PF, Valenzuela JG, Sternberg JM, Schaub GA 2009a. Immunogenic salivary proteins of *Triatoma infestans*: development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of triatomines. *PLoS neglected tropical diseases* 3: e532.
- Schwarz A, Medrano-Mercado N, Billingsley PF, Schaub GA, Sternberg JM 2010. IgM-antibody responses of chickens to salivary antigens of *Triatoma infestans* as early biomarkers for low-level infestation of triatomines. *Int J Parasitol* 40: 1295-1302.
- Schwarz A, Sternberg JM, Johnston V, Medrano-Mercado N, Anderson JM, Hume JC, Valenzuela JG, Schaub GA, Billingsley PF 2009b. Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. *Int J Parasitol* 39: 1021-1029.
- Sharma JM 1999. Introduction to poultry vaccines and immunity. *Advances in veterinary medicine* 41: 481-494.
- Soares AC, Carvalho-Tavares J, Gontijo Nde F, dos Santos VC, Teixeira MM, Pereira MH 2006. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. *J Insect Physiol* 52: 468-472.
- Soares RP, Sant'Anna MR, Gontijo NF, Romanha AJ, Diotaiuti L, Pereira MH 2000. Identification of morphologically similar *Rhodnius* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by electrophoresis of salivary heme proteins. *Am J Trop Med Hyg* 62: 157-161.
- Stal C 1859. Monographie der Gattung *Conorhius* and *Verwadten*. *Berliner Ent. Zeitschr* 3: 93-117
- Stutzer C, Mans BJ, Gaspar AR, Neitz AW, Maritz-Olivier C 2009. *Ornithodoros savignyi*: soft tick apyrase belongs to the 5'-nucleotidase family. *Exp Parasitol* 122: 318-327.

- Tolosa AC, Germano M, Cueto GM, Vassena C, Zerba E, Picollo MI 2008. Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol* 45: 421-426.
- Valenzuela JG, Belkaid Y, Rowton E, Ribeiro JM 2001. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel *Cimex* family of apyrases. *J Exp Biol* 204: 229-237.
- Valenzuela JG, Charlab R, Galperin MY, Ribeiro JM 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: 30583-30590.
- Villela MM, Souza JB, Mello VP, Azeredo BV, Dias JC 2005. Vigilância entomológica da Doença de Chagas na região centro-oeste de Minas Gerais, Brasil, entre os anos de 2000 e 2003. *Cad Saude Publica* 21: 878-886.
- Volf P, Grubhoffer L, Hosek P 1993. Characterisation of salivary gland antigens of *Triatoma infestans* and antigen-specific serum antibody response in mice exposed to bites of *T. infestans*. *Vet Parasitol* 47: 327-337.
- Watson SP, Auger JM, McCarty OJ, Pearce AC 2005. GPVI and integrin α IIb β 3 signaling in platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 3: 1752-1762.

9. Anexo I - Carta de aprovação do CETEA - UFMG