

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” - UNESP**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Camila Pereira Puertas

**Caracterização do padrão eletroforético de glândulas salivares
de *Triatoma lecticularia* e *Rhodnius prolixus* (Hemiptera,
Reduviidae, Triatominae) em diferentes tempos pós repasto
sanguíneo.**

Araraquara

2013

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Camila Pereira Puertas

Caracterização do padrão eletroforético de glândulas salivares de
Triatoma lecticularia e *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae,
Triatominae) em diferentes tempos pós repasto sanguíneo.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista, para
obtenção do grau de Farmacêutica
Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mara Cristina Pinto

Araraquara

2013

Aos meus pais Pedro e Márcia e avós

Cida e Pedro, meus exemplos.

Agradecimentos

À minha orientadora Prof^{fa} Dr^a Mara Cristina Pinto por todo apoio, ensinamento e paciência dedicados a mim durante todo o tempo da pesquisa.

À todos do Laboratório de Parasitologia que me deram suporte e amizade: Jader, Juliana, Larissa, Aline, Vagner.

Aos professores Dr. João Aristeu da Rosa e Dr^a Alexandra Ivo de Medeiros que auxiliaram a realização do projeto.

Ao Fábio Carrilho Galvão, do Laboratório de Biologia Molecular, que me auxiliou em grande parte dos experimentos.

À minha família, em especial meus pais Márcia e Pedro e meus avós Cida e Pedro.

À minhas amigas que estiveram do meu lado durante toda esta jornada: Marina, Monique, Clíscea, Carolina, Lenita, etc.

À FAPESP que acreditou e financiou este projeto.

E, acima de todos, a Deus.

SUMÁRIO

RESUMO-----	6
LISTA DE ILUSTRAÇÕES-----	7
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS-----	9
1. INTRODUÇÃO-----	10
1.1 Histórico-----	10
1.2 Triatomíneos-----	11
1.3 Glândulas salivares-----	12
1.4 Hematofagia e Hemostasia-----	14
1.5 Proteínas salivares-----	14
1.6 Eletroforese bidimensional-----	16
2. OBJETIVOS-----	17
3. MATERIAL E MÉTODOS-----	17
3.1. Manutenção das Colônias-----	17
3.2. Extração das glândulas salivares-----	18
3.3. Experimento de padronização com <i>R. prolixus</i> utilizando a técnica de eletroforese bidimensional-----	18
3.4. Eletroforese Bidimensional com <i>R. prolixus</i> e <i>T. lecticularia</i> em dois tempos pós repasto sanguíneo-----	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	22
4.1. Resultados dos dados preliminares e discussão-----	22
4.1.1. Quantificação das Amostras (Experimento padronização)-----	22
4.1.2. Eletroforese bidimensional-----	22
4.2. Resultados finais e discussão-----	23

4.2.1. Quantificação das amostras-----	23
4.2.2. Eletroforese Bidimensional -----	24
5. CONCLUSÕES-----	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	35

Resumo

Estima-se que 7 a 8 milhões de pessoas são portadoras da doença de Chagas no mundo, com maior predominância em países da América Latina.

Os triatomíneos, vetores do agente etiológico *Trypanosoma cruzi*, possuem na saliva substâncias farmacologicamente ativas que auxiliam o processo de hematofagia, com a finalidade de maximizar seu repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados. Estas substâncias estão envolvidas principalmente na ativação e agregação plaquetária, vasoconstrição local e coagulação sanguínea, sendo indutoras ou supressoras de resposta imune do hospedeiro.

Triatoma lecticularia tem grande importância epidemiológica como transmissora da doença de Chagas, por apresentar-se emergente em países não endêmicos em Chagas, como exemplo os Estados Unidos. Assim, a investigação e identificação dos compostos protéicos presentes na saliva deste triatomíneo é uma área de interesse tanto para estudos de biologia básica como para futuros estudos mais complexos que explorem os aspectos imunológicos envolvidos no processo da hematofagia.

Visto que até o momento não existem estudos referentes à composição salivar de *T. lecticularia*, este trabalho tem como objetivo principal caracterizar o perfil eletroforético das proteínas presentes nas glândulas salivares dessa espécie em dois diferentes tempos pós alimentação sanguínea: 7 e 21 dias. A mesma metodologia foi aplicada à espécie *Rhodnius prolixus*. Essa espécie foi utilizada, pois embora existam dados de literatura sobre suas proteínas salivares, é interessante como padrão de comparação com *T. lecticularia*.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Ciclo de vida e <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	10
Figura 2. <i>Triatoma lecticularia</i> adulto-----	12
Figura 3. Vista interna das glândulas salivares em <i>Triatoma vitticeps</i> -----	13
Figura 4. Imagem obtida da análise bidimensional de glândulas salivares do triatomíneo <i>Rhodnius prolixus</i> , após separação bidimensional por meio de IEF com pH 3-10, seguido de SDS-PAGE 12%, com 1 dia após o repasto sanguíneo-----	23
Figura 5. Imagem obtida da análise bidimensional de glândulas salivares do triatomíneo <i>T. lecticularia</i> , após separação bidimensional por meio de IEF com pH 3-10, seguido de SDS-PAGE 12%, com 21 dias após o repasto sanguíneo-----	25
Figura 6. Imagem obtida da análise bidimensional de glândulas salivares do triatomíneo <i>T. lecticularia</i> , após separação bidimensional por meio de IEF com pH 3-10, seguido de SDS-PAGE 12%, com 7 dias após o repasto sanguíneo-----	26
Figura 7. Gel bidimensional de 21 dias da espécie <i>T. lecticularia</i> mostrando spots circulados em verde correspondentes aos spots de 7 dias e spots diferenciais na cor vermelha, após a sobreposição dos géis-----	27
Figura 8. Gel bidimensional de 7 dias da espécie <i>T. lecticularia</i> mostrando spots circulados em verde correspondentes aos spots de 21 dias e spots diferenciais na cor vermelha, após a sobreposição dos géis-----	28

Figura 9. Imagem obtida da análise bidimensional de glândulas salivares do triatomíneo *R. prolixus*, após separação bidimensional por meio de IEF com pH 3-10, seguido de SDS-PAGE 12%, com 21 dias após o repasto sanguíneo---29

Figura 10. Imagem obtida da análise bidimensional de glândulas salivares do triatomíneo *R. prolixus*, após separação bidimensional por meio de IEF com pH 3-10, seguido de SDS-PAGE 12%, com 7 dias após o repasto sanguíneo-----30

Figura 11. Gel bidimensional de 21 dias da espécie *R. prolixus* mostrando spots circulosos em verde correspondentes aos spots de 7 dias e spots diferenciais na cor vermelha, após a sobreposição dos géis-----31

Figura 12. Gel bidimensional de 7 dias da espécie *R. prolixus* mostrando spots circulosos em verde correspondentes aos spots de 21 dias e spots diferenciais na cor vermelha, após a sobreposição dos géis-----32

Lista de Abreviaturas e Siglas

DTT: Ditionitrito

IEF: Focalização Isoelétrica

KDa: Quilodalton

NP: Nitroforina

PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS: Tampão Fosfato Salino

pI: Ponto Isoelétrico

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE: Dodecil Sulfato de Sódio - Eletroforese em gel de poliacrilamida

Tris: tris-hidroximetil-aminometano

WHO: World Health Organization.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A doença de Chagas apresenta um caráter histórico de grande destaque para a ciência brasileira uma vez que, no ano de 1909, Carlos Chagas pesquisador e também médico do Instituto Oswaldo Cruz identificou todo o ciclo da doença: agente etiológico, vetor, reservatório silvestre, e também o primeiro caso humano (KROPF ET AL., 2003) (Figura 1) (WHO, 2013).



Figura 1. Ciclo de vida e *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2013). O triatomíneo, vetor da doença de Chagas, faz o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado e defeca sob sua pele. A presença da forma infectante tripomastigota nas fezes do vetor possibilita a infecção do hospedeiro pela entrada do protozoário por fissuras na pele ou mucosas passando para a corrente sanguínea. Ao passar para a corrente sanguínea, o protozoário invade células e se diferencia na forma amastigota, que se replica. Estas formas amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas, que podem continuar invadindo outras células, ou quando outro triatomíneo realiza o repasto sanguíneo neste hospedeiro vertebrado, acaba infectando-se. Dentro do trato digestório do triatomíneo, o *T. cruzi* diferencia-se em epimastigota, que se replica e volta a diferenciar-se em tripomastigota.

Entretanto, sua existência já ocorria há milhões de anos entre animais silvestres, tornando-se uma zoonose no momento da invasão do homem ao ecótopo silvestre (COURA & BORGES-PEREIRA, 2010). A partir de então, algumas espécies vetoras do agente etiológico *Trypanosoma cruzi*, os triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), passaram a adaptar-se às regiões

peridomiciliares e domiciliares de forma intensa, devido principalmente à devastação da flora natural, e a consequente criação de um espaço aberto artificial que propiciou a sua domiciliação, devido principalmente à procura por alimentação e abrigo (FORATTINI ET AL., 1971; FORATTINI, 1980). Desse modo, ao realizarem uma alimentação sanguínea em vertebrados domésticos, incluindo o ser humano, podem levar à disseminação da doença ao ambiente urbano (VINHAES & DIAS, 2000).

Estimadamente, cerca de 7 a 8 milhões de pessoas estão infectadas com *T. cruzi* em todo o mundo, sendo a grande maioria em países da América Latina. (WHO, 2013).

1.2 Triatomíneos

A classificação dos triatomíneos é a seguinte: Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Hemiptera, Família Reduviidae, Subfamília Triatominae. Dentro da subfamília há a tribo Triatomini, da qual a espécie *Triatoma lecticularia* faz parte. (DE PAULA ET AL., 2005).

Triatoma lecticularia (Figura 2), embora não seja uma espécie presente no Brasil, apresenta características que a tornam de grande interesse epidemiológico, como exemplo, sua flexibilidade em habitar locais com as mais variadas condições climáticas, o seu ecletismo alimentar, sua resistência ao jejum prolongado (JURBERG & COSTA, 1989) e a completa escassez de informações referentes ao tema do projeto. Além disso, é uma das principais espécies transmissoras da doença de Chagas no México, estendendo-se por

várias áreas dos Estados Unidos, e contribuindo desta forma para a proliferação da doença neste país. (MARTÍNEZ-IBARRA ET AL., 2007).



Figura 2: *T. lecticularia*. Retirada de <http://bugguide.net/node/view/590497>.

1.3 Glândulas salivares

O hábito da alimentação sanguínea de artrópodes invertebrados, como os triatomíneos, levou à sofisticadas adaptações nas peças bucais e glândulas salivares dos mesmos (RIBEIRO, 1995). Com relação às glândulas salivares, os gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus* possuem três pares de glândulas, em que cada par é constituído de três unidades: D1 (anterior ou principal), D2 (mediana ou complementar) e D3 (posterior ou acessório) (BARTH, 1954). A D1 costuma ser alongada e esbranquiçada, a D2 tem aspecto mais arredondado e amarelado ao passo que a D3 mostra-se arredondada e translúcida (REIS ET AL., 2003); já o gênero *Rhodnius* apresenta apenas dois pares de glândulas (D1 e D2) de coloração avermelhada (LACOMBE, 1999) (Figura 3). Além disso, a necessidade de combater a hemostasia do hospedeiro vertebrado levou também à evolução de substâncias antihemostáticas presentes em suas glândulas salivares (RIBEIRO, 1995).

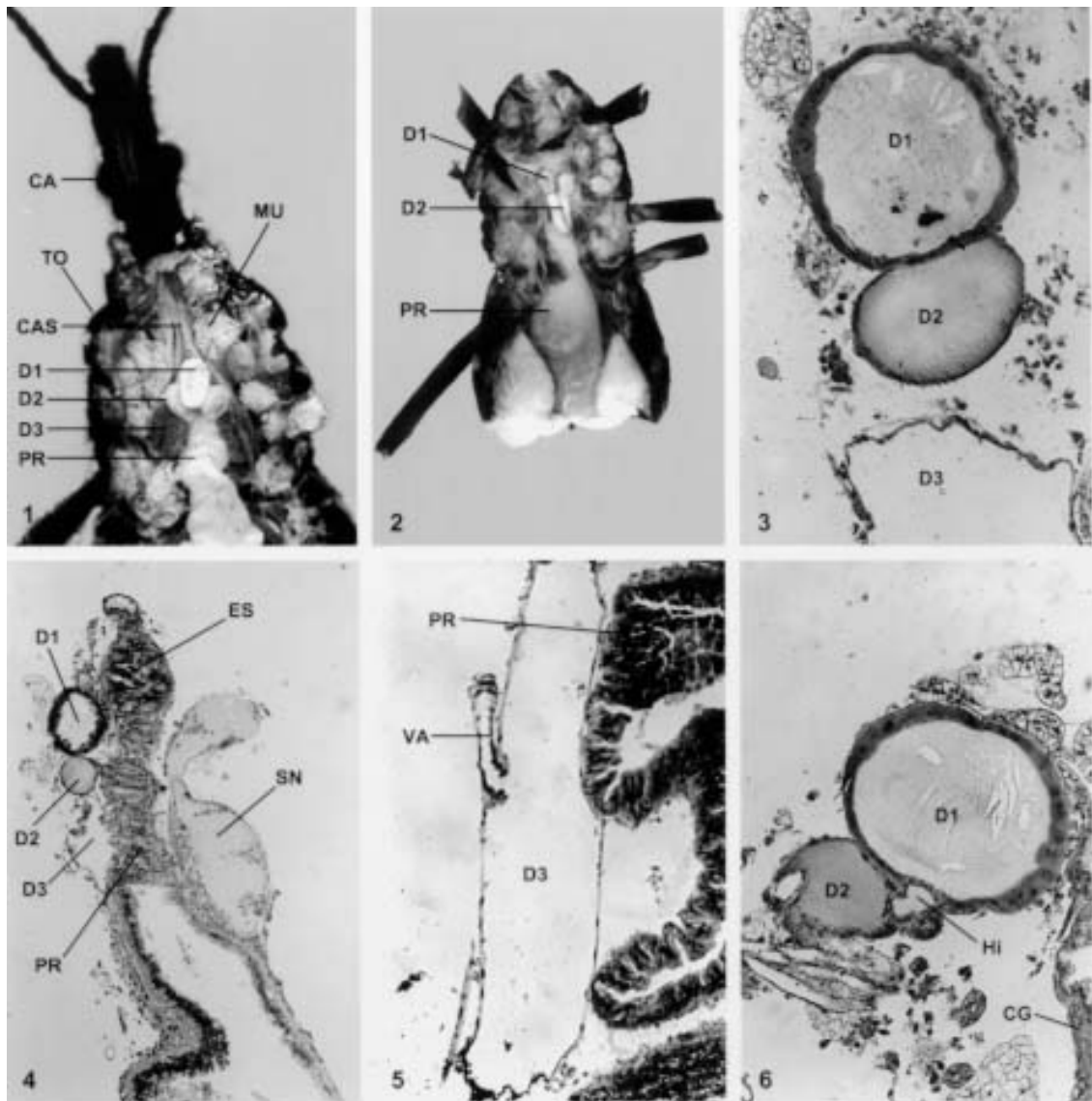


Figura 3: vista interna das glândulas salivares em *Triatoma vitticeps*. CA: cabeça; CAS: canal salivar; D1, D2 e D3: glândulas salivares; MU: musculatura; PR: promesêntero; TO: tórax. Fig. 2: corte longitudinal pelo tórax de *Rhodnius prolixus*. D1 e D2: glândulas alongadas; PR: promesêntero. Fig. 3: corte transversal pelas glândulas salivares em *T. vitticeps*. Coloração: galocianina + cromotrop 2R; D1, D2 e D3: glândulas salivares. 250x. Fig. 4: disposição das glândulas salivares em relação ao aparelho digestivo e ao sistema nervoso. Coloração: hematoxilina + cromotrop 2R; D1, D2 e D3: glândulas salivares; ES: esôfago; PR: promesêntero; SN: sistema nervoso. 100x. Fig. 5: corte longitudinal pela glândula D3 em *Panstrongylus megistus*. Coloração: hematoxilina Delafield + eosina; D3: glândula; PR: promesêntero; VA: válvula. 250x. Fig. 6: corte transversal pelas glândulas D1, D2 e hilo em *Triatoma pessoai*. Coloração: hematoxilina mallory; D1 e D2: glândulas salivares; CG: corpo gorduroso; H: hilo. 250x. (LACOMBE, 1999).

1.4 Hematofagia e Hemostasia

Durante o processo de hematofagia, os hospedeiros vertebrados, em um ato de defesa do organismo, ativam uma série complexa de respostas tais como a ativação e agregação plaquetária, a vasoconstrição local e a coagulação sanguínea que dificultam a alimentação local (RIBEIRO, 1995). Uma grande variedade de moléculas farmacologicamente ativas, como vasodilatadores, inibidores da agregação plaquetária e anticoagulantes, presentes na saliva dos triatomíneos têm como função evitar a rápida coagulação do sangue e facilitar o processo de alimentação (CHAMPAGNE, 2005). Estas moléculas, além de neutralizar a hemostase, possuem atividade no processo inflamatório e na resposta imune do hospedeiro vertebrado (RIBEIRO, 1995).

1.5 Proteínas salivares

Proteínas salivares de insetos hematófagos são capazes de induzir respostas imunológicas, como reações de hipersensibilidade local e sistêmica em hospedeiros vertebrados. Fatores humorais e celulares são reativos em resposta aos antígenos presentes na saliva dos insetos, havendo assim o surgimento de anticorpos, que posteriormente podem ser utilizados como marcadores biológicos recorrentes da exposição à picada dos triatomíneos (NASCIMENTO ET AL., 2001; SCHWARZ ET AL., 2009).

Algumas substâncias presentes na saliva de triatomíneos já foram devidamente identificadas como, por exemplo, as nitroforinas, um grupo de hemeproteínas, encontradas na saliva do triatomíneo *Rhodnius prolixus* com a

função de transportar óxido nítrico (RIBEIRO & WALKER, 1994). Óxido nítrico, por sua vez, atua como um vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária auxiliando assim a alimentação sanguínea em vertebrados. Além disso, possui atuação na neurotransmissão, resposta imune mediada por células e, ainda, no relaxamento muscular (ANDERSEN ET AL., 1997).

Uma das espécies de triatomíneos que concentram mais estudos referentes aos compostos salivares é *R. prolixus*. Foi observada uma variação nos grupos de hemoproteínas representadas pelas nitroforinas NP1-NP4 em diferentes fases de desenvolvimento do *R. prolixus* (CHAMPAGNE ET AL., 1995). Duas outras nitroforinas foram isoladas e parcialmente caracterizadas de ninfas de primeiro estágio e denominadas NP5 e NP6 (MOREIRA ET AL., 2003). Outra nitroforina, NP7, foi recentemente encontrada em uma biblioteca de cDNA obtida a partir de glândulas salivares de insetos no quinto estágio ninfal; entretanto, essa nova hemoproteína nunca foi isolada a partir dos insetos (KNIPP ET AL., 2007). Foi observado também para *R. prolixus* que quanto maior o tempo sem alimentação sanguínea, maior a quantidade de certas substâncias, como fosfolípidos, presentes nas glândulas (GOLODNE ET AL., 2003).

Além dos estudos imunológicos, outra abordagem empregada na investigação de substâncias salivares é a possibilidade de, uma vez identificados seus componentes, oferecerem mais um subsídio para a identificação específica de triatomíneos com grande similaridade fenotípica (ARÉVALO ET AL., 2007). Tornam-se assim uma interessante ferramenta nos estudos evolucionários (RIBEIRO ET AL., 1998; SANTOS ET AL., 2007).

As hemeproteínas salivares de duas espécies fenotipicamente semelhantes, *R. prolixus* e *Rhodnius colombiensis* foram separadas por meio de eletroforese em géis de amido, o que possibilitou a visualização dos padrões eletroforéticos diferenciais entre as duas espécies (ARÉVALO ET AL., 2007).

Uma das espécies de triatomíneos que concentram mais estudos referentes aos compostos salivares é *R. prolixus*; e por isso, esta espécie foi escolhida para este projeto, para sua comparação com *T. lecticularia* que não possui nada descrito em relação ao seu conteúdo salivar.

1.6 Eletroforese bidimensional

Trata-se de uma técnica muito empregada na separação de proteínas que faz uso de duas principais etapas. A Focalização Isoelétrica, IEF ou primeira dimensão, baseia-se no ponto isoelétrico (pI), ou seja, a região de pH que neutralize a carga da proteína. Para isso, as proteínas são transferidas para um gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado, onde sofrem a ação de uma corrente elétrica. A segunda etapa, eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) ou segunda dimensão, é feita, inicialmente, adicionando-se um detergente às proteínas -para que elas fiquem com cargas negativas- sendo em seguida inseridas no gel de poliacrilamida, também sob a ação de uma corrente elétrica. Haverá migração das proteínas para o pólo positivo, de acordo com o peso molecular de cada proteína. No final do processo, para a visualização, as proteínas são coradas, de modo que cada

mancha (*spot*) inicialmente represente uma proteína. (BERKELMAN & STENSDET, 1998; COSTA, 2009).

2. Objetivos

- Retirada das glândulas de *T. lecticularia* e *R. prolixus* de exemplares das colônias mantidas no laboratório de Triatomíneos da FCFAR com 7 e 21 dias após o repasto sanguíneo.
- Caracterização do padrão eletroforético das glândulas salivares de *T. lecticularia* e *R. prolixus* nos diferentes tempos pós alimentação e comparação dos mesmos.

3. Material e Métodos:

3.1. Manutenção das Colônias:

As colônias de *T. lecticularia* e *R. prolixus* foram mantidas a 28°C no Laboratório de Parasitologia da FCFAR/UNESP. A alimentação foi realizada semanalmente, em ratos ou camundongos, por aproximadamente uma hora. O sucesso da alimentação foi verificado pela distensão do abdômen dos triatomíneos. A limpeza das colônias foi feita semanalmente, no mesmo dia da alimentação, com a retirada da exúvia, dos mortos e troca da cuba onde estavam mantidos.

3.2. Extração das glândulas salivares:

Adultos das espécies *T. lexicularia* e *R. prolixus*, com 7 e 21 dias após o repasto sanguíneo, foram anestesiados em um recipiente fechado contendo algodão embebido em clorofórmio. Para a retirada das glândulas salivares, cada inseto foi colocado na posição ventral em uma placa de Petri contendo 100µL de PBS estéril. Com o auxílio de duas pinças, uma fixada na cabeça e outra fixada no tórax, foi retirada a cabeça para a exposição dos pares de glândulas utilizando um microscópio estereoscópio (Opt Medical).

Após as glândulas serem retiradas, foram transferidas para um eppendorf contendo 50µL de PBS estéril, seguindo a proporção de glândulas/PBS utilizado por Mesquita et al (2008). Os eppendorfs foram mantidos em -80°C para evitar a degradação das proteínas.

3.3. Experimento de padronização com *R. prolixus* utilizando a técnica de eletroforese bidimensional:

Com a finalidade de padronizar a técnica de eletroforese bidimensional, glândulas de *R. prolixus* foram retiradas após 1 dia de alimentação sanguínea.

Quantificação Protéica:

As glândulas mantidas em PBS foram sonicadas e centrifugadas a 14.000 g. O sobrenadante deste extrato sonificado foi então coletado para determinação da concentração protéica utilizando o método de Bradford (Bio-Rad), de acordo com as instruções do fabricante.

Eletroforese bidimensional:**-Focalização Isoelétrica (IEF) ou primeira dimensão:**

Para a Focalização Isoelétrica, a strip, ou tira, de 7cm (pH linear de 3-10) foi incubada por 16 horas, de acordo as seguintes especificações: foram adicionados 60µg de proteína total (no caso, extrato de glândulas salivares de *R. prolixus*), 1µL de anfólito carreador e quantidade suficiente do tampão De Streak (GE Healthcare) para atingir o volume final de 125µL.

Para a tira correspondente a um dia após o repasto sanguíneo, foram utilizados: 12,45µL amostra + 1µL anfólito + 111,55µL De Streak.

Em seguida, a tira foi submetida ao processo de focalização isoelétrica, que tem como finalidade separar proteínas de acordo com os diferentes pI (pontos isoelétricos). Para isso, a tira foi submetida à aplicação de uma corrente elétrica, de acordo com os seguintes parâmetros de focalização, utilizando o equipamento Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare): step – 200 V por 12 horas; grad – 1.000 V até acumular 1.000 V/h; grad – 3.500 V até acumular 3.500 V/h; step – 3.500 V até acumular 4.000 V/h, acumulando um total de 10.900 V/h.

-Preparação da eletroforese SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate/ polyacrylamide gel electrophoresis) ou segunda dimensão:

Após a focalização isoelétrica, a tira foi incubada em solução de equilíbrio (Tris, Uréia, SDS, Glicerol), adicionado de DTT (agente redutor, preservando o estado reduzido, por quebrar pontes dissulfeto, desnaturando as proteínas), durante 20 minutos à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, a amostra também foi incubada em solução de equilíbrio, entretanto,

agora, com a adição de iodacetamida (alquila grupos tiol em proteínas, impedindo a sua reoxidação durante a eletroforese), mantida novamente por 20min à temperatura ambiente sob agitação. Em ambas as etapas foi adicionado azul de bromofenol que é o corante de rastreamento, possibilitando acompanhar o andamento da eletroforese. Após essa preparação, a tira foi colocada em gel desnaturante (SDS-PAGE 12%) e realizou-se a segunda dimensão utilizando Mini protean (Bio Rad).

Para visualização das proteínas no gel, foram fixadas, utilizando-se ácido acético 7,5% e metanol 10%, overnight. Após, o gel foi corado com Deep Purple (GE-Healthcare) e lavado com Na_2CO_3 . Em seguida, foi feita uma segunda fixação para limpar o corante que ficou na malha do gel, deixando-o apenas fixado nas proteínas, novamente com acético 7,5% e metanol 10%, overnight. Por fim, o gel foi digitalizado, utilizando o Scanner Typhoon Trio (GE Healthcare), e as proteínas visualizadas no gel.

3.4. Eletroforese Bidimensional com *R. prolixus* e *T. lecticularia* em dois tempos pós repasto sanguíneo:

Foram utilizadas glândulas salivares de *R. prolixus* e *T. lecticularia* com 7 e 21 dias após alimentação sanguínea.

Quantificação Protéica:

Idêntica à quantificação protéica descrita no experimento de padronização.

Eletroforese bidimensional:

-Focalização Isoelétrica (IEF) ou primeira dimensão:

Para a Focalização Isoelétrica, a strip, ou tira, de 13 cm (pH linear de 3-10) foi incubada por 16 horas, de acordo as seguintes especificações: foram adicionadas 240µg de proteína total (no caso, extrato de glândulas salivares de *R. prolixus* e *T. lecticularia*), 2µL de anfólito carreador e quantidade suficiente do tampão De Streak (GE Healthcare) para atingir o volume final de 250µL.

Para as tiras correspondentes ao *R. prolixus*, utilizou-se:

- 7 dias após repasto sanguíneo: 154,69µL amostra + 2µL anfólito + 93,31µL De Streak.

- 21 dias após repasto sanguíneo: 60,43µL amostra + 2µL anfólito + 187,57µL De Streak.

Para as tiras correspondentes ao *T. lecticularia*, utilizou-se:

- 7 dias após repasto sanguíneo: 20,10µL amostra + 2µL anfólito + 227,9µL De Streak.

- 21 dias após repasto sanguíneo: 30,73µL amostra + 2µL anfólito + 217,27µL De Streak.

Em seguida, as tiras sofreram o processo de focalização isoelétrica. Para isso, foram submetidas à aplicação de uma corrente elétrica, de acordo com os seguintes parâmetros de focalização, utilizando o equipamento Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare): step – 200 V por 12 horas; grad – 1.000 V até acumular 1.000 V/h; grad – 8.000 V até acumular 8.000 V/h; step – 8.000 V até acumular 20.000 V/h, acumulando um total de 31.400 V/h.

-Preparação da eletroforese SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis) ou 2ª dimensão:

Idêntica à metodologia descrita no experimento de padronização. Entretanto, para a realização da segunda dimensão, utilizou-se o sistema SE 600 (GE Healthcare), devido à strip de 13 cm.

- Análise de imagens:

Para analisar as imagens obtidas, utilizou-se o software Image Master 2D Platinum.

4. Resultados e discussão

4.1. Resultados dos dados preliminares e discussão:

4.1.1. Quantificação das Amostras (Experimento padronização):

O resultado da quantificação das amostras de glândulas salivares de *R. prolixus* com um dia após o repasto sanguíneo foi de 4,82µg/µL.

4.1.2. Eletroforese bidimensional:

A eletroforese bidimensional foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 3.3. Como observado nos resultados preliminares abaixo, o padrão do conteúdo protéico das glândulas salivares estão de acordo com o encontrado na literatura para algumas espécies já descritas do gênero *Rhodnius* (COSTA ET AL., 2011), sendo observada uma maior intensidade de proteínas com peso molecular entre aproximadamente 10 e 30 kDa, apresentando uma maior distribuição na faixa neutra de pH (Fig. 4). Dessa

forma, a eletroforese bidimensional, a qual foi padronizada neste período, foi útil para a identificação das proteínas que podem estar diferentemente expressas nas diferentes espécies, bem como nos diferentes tempos pós alimentação sanguínea, que foram analisados posteriormente.

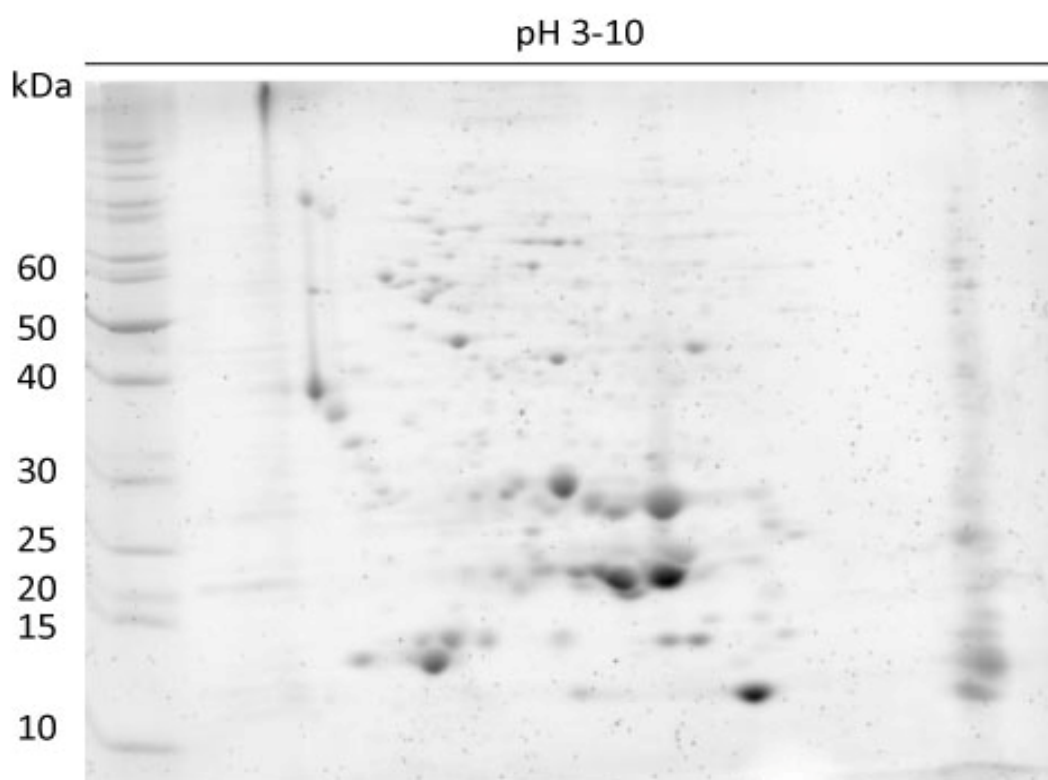


Figura 4. Imagem obtida da análise bidimensional de glândulas salivares do triatomíneo *Rhodnius prolixus*, após separação bidimensional por meio de IEF com pH 3-10, seguido de SDS-PAGE 12%, com um dia após o repasto sanguíneo.

4.2. Resultados finais e discussão:

4.2.1. Quantificação das amostras:

Triatoma lecticularia:

- 7 dias após repasto sanguíneo: 11,94µg/µL

- 21 dias após repasto sanguíneo: 7,81µg/µL

Rhodnius prolixus:

- 7 dias após repasto sanguíneo: 1,42µg/µL; 1,22µg/µL; 2,44µg/µL

- 21 dias após repasto sanguíneo: 4,67µg/µL; 4,51µg/µL; 3,13µg/µL

Observação: Na espécie *R. prolixus*, foram utilizados 80µg de proteína total de cada uma das amostras (*pool*), totalizando 240µg para a realização da focalização isoeletrica e da eletroforese SDS-PAGE.

4.2.2. Eletroforese Bidimensional

A eletroforese bidimensional foi realizada de acordo com a metodologia do item 3.4.

T. lecticularia - 21 dias pós alimentação sanguínea (Fig. 5)

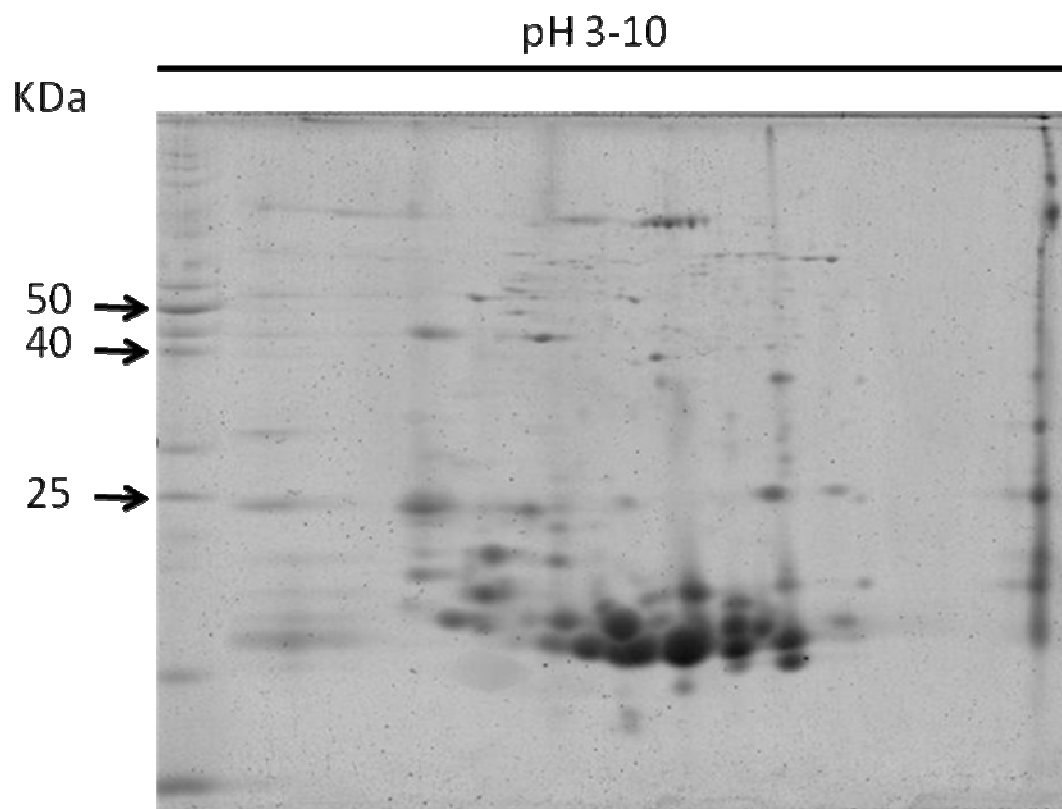


Figura 5. Imagem obtida da análise bidimensional de glândulas salivares do triatomíneo *Triatoma lecticularia*, após separação bidimensional por meio de IEF com pH 3-10, seguido de SDS-PAGE 12%, com 21 dias após o repasto sanguíneo.

Detectou-se a presença de 119 spots no gel bidimensional de glândulas salivares da espécie *T. lecticularia* com 21 dias após alimentação sanguínea.

T. lecticularia – 7 dias pós alimentação sanguínea (Fig. 6)

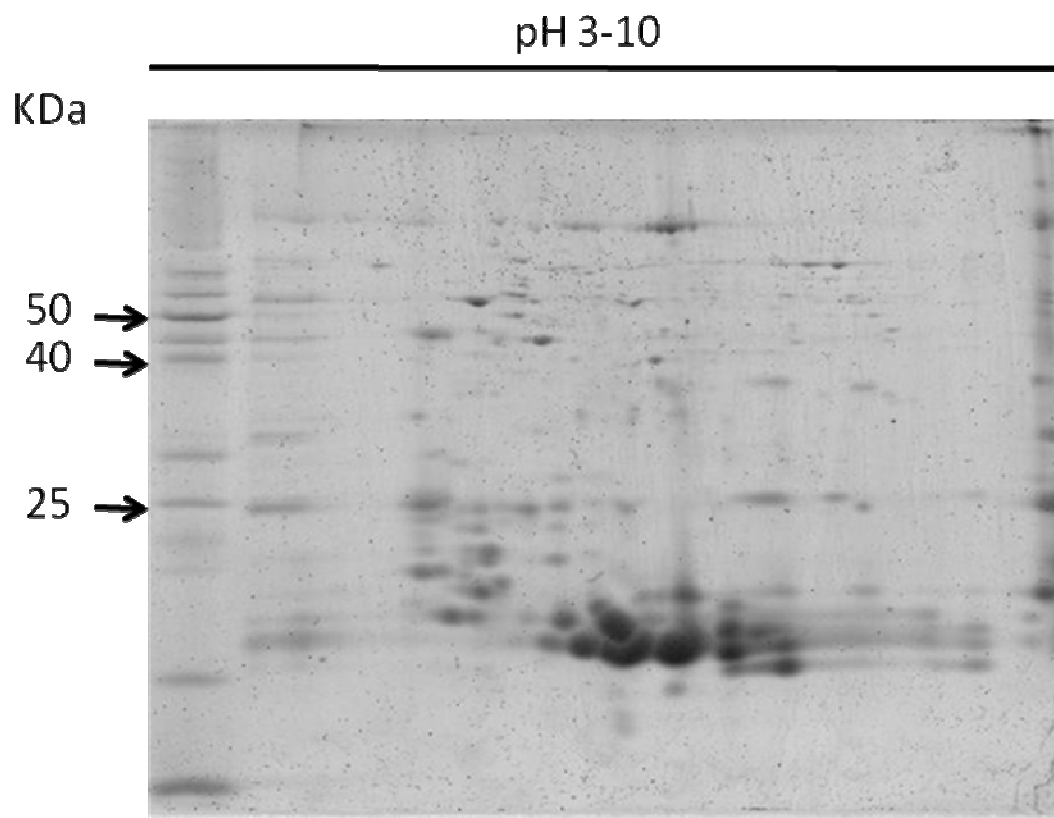


Figura 6. Imagem obtida da análise bidimensional de glândulas salivares do triatomíneo *Triatoma lecticularia*, após separação bidimensional por meio de IEF com pH 3-10, seguido de SDS-PAGE 12%, com sete dias após o repasto sanguíneo.

Detectou-se a presença de 126 spots no gel bidimensional de glândulas salivares da espécie *T. lecticularia* com 7 dias após alimentação sanguínea.

Em ambos os géis, os spots estão mais concentrados na região neutra de pH do gel, entre 15 e 25 KDa.

A quantidade de spots similares entre os dois tempos pós alimentação sanguínea, nos sugere que não há praticamente diferenças qualitativas entre as possíveis proteínas expressas nestes dois diferentes tempos pós repasto sanguíneo. Esta diferença pequena na quantidade de spots pode ser

possivelmente explicada pelo arraste observado no gel de 7 dias, nos spots mais próximos da região básica do gel, assim como observado arraste em outros locais no gel de 21 dias, que podem ser visualizados nas figuras 4 e 5 abaixo, e que por sua vez, mostram a comparação dos spots entre os dois diferentes tempos pós alimentação. Com relação à análise diferencial de expressão protéica, não houve também diferença significativa quando da sobreposição dos dois géis, e consequentemente sobreposição dos spots correspondentes.

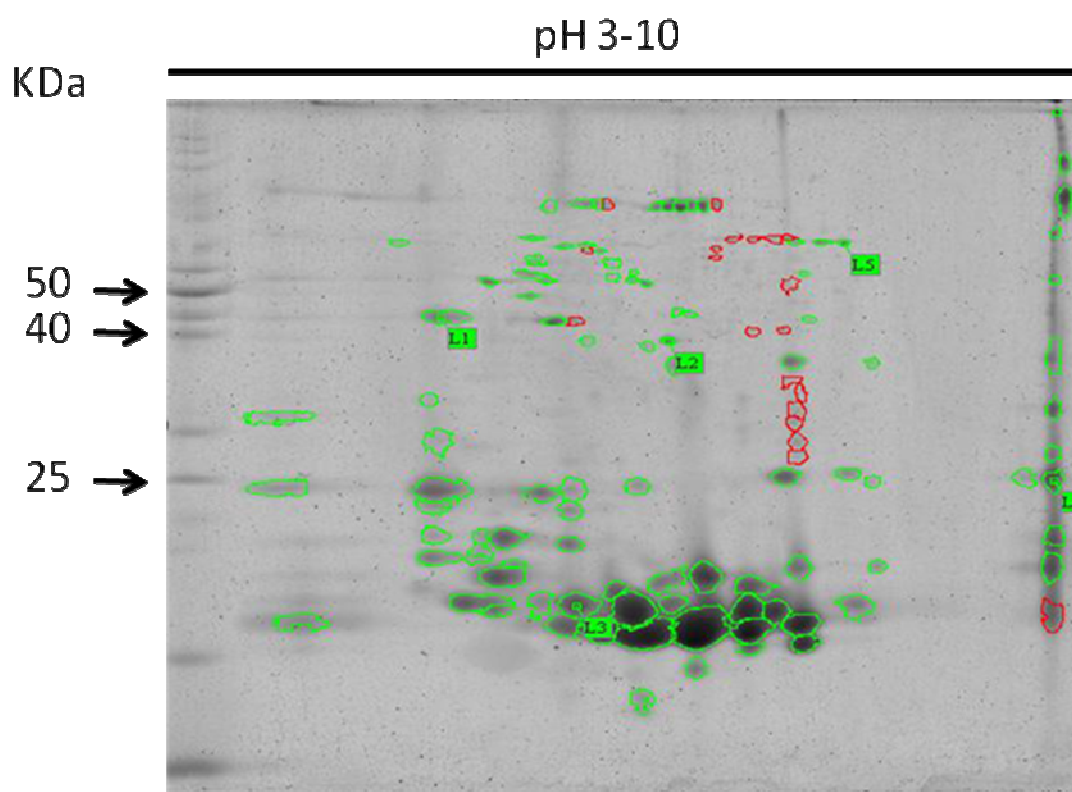


Figura 7. Gel bidimensional de 21 dias de *T. lecticularia* mostrando spots circulos em verde correspondentes aos spots de 7 dias e spots diferenciais na cor vermelha, após a sobreposição dos géis.

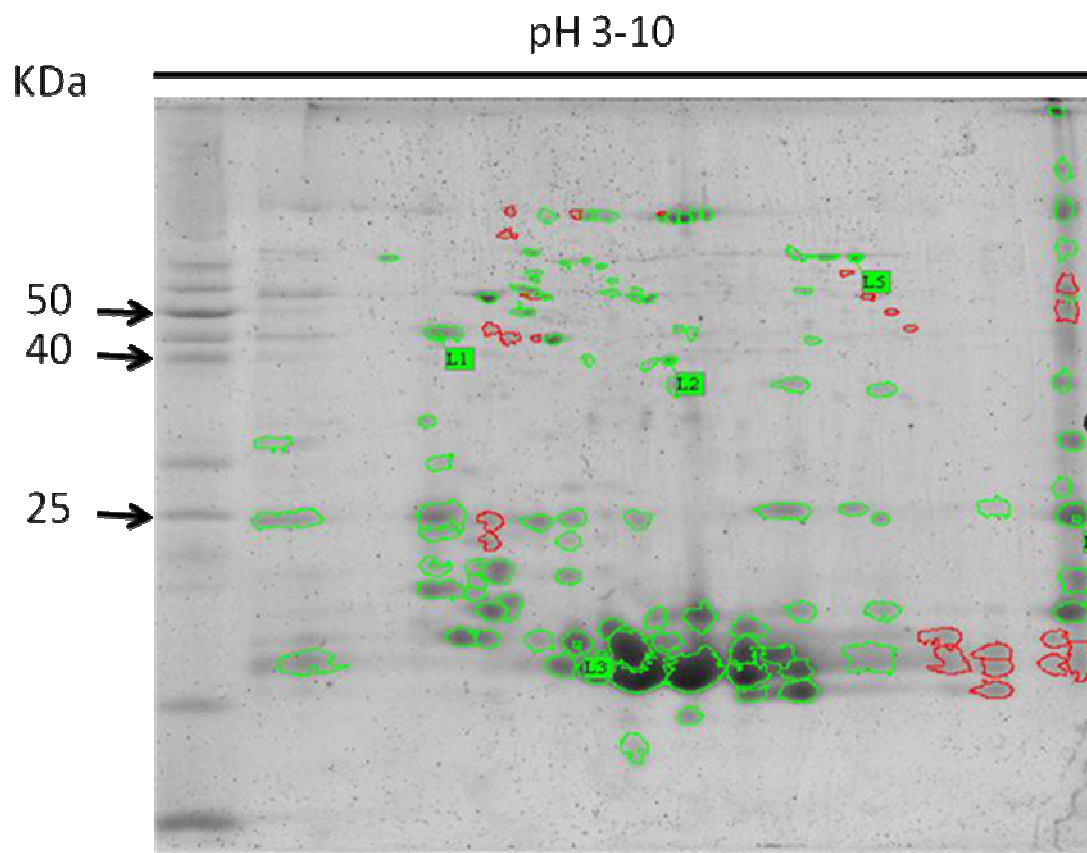


Figura 8. Gel bidimensional de sete dias de *T. lecticularia* mostrando spots circulosos em verde correspondentes aos spots de 21 dias e spots diferenciais na cor vermelha, após a sobreposição dos géis.

Comparando estudo anterior com *Triatoma infestans*, em que foram utilizados extratos salivares de triatomíneos com 7 a 9 dias após alimentação sanguínea, a eletroforese bidimensional apresentou diferenças com relação à concentração e número de spots, que ocorre na região mais básica do gel, e, em 80µg de amostra apresentou 204 spots e em 300µg de amostra apresentou 269 spots (CHARNEAU ET AL., 2007), tendo um maior número de spots e inicialmente um número maior de proteínas expressas. Entretanto, em ambas as espécies, a localização dos spots está na mesma faixa de massa: entre 15 e 25 KDa.

Embora pertençam ao mesmo gênero, a diferença entre *T. infestans* e *T. lecticularia* possivelmente pode ter ocorrido devido às diferenças nas quantidades protéicas utilizadas e no fato de serem espécies distintas, com habitats distintos, sofrendo diferentes pressões ambientais e alimentares, e, como consequência, expressam diferentes genes e proteínas.

R. prolixus – 21 dias pós alimentação sanguínea (Fig. 9)

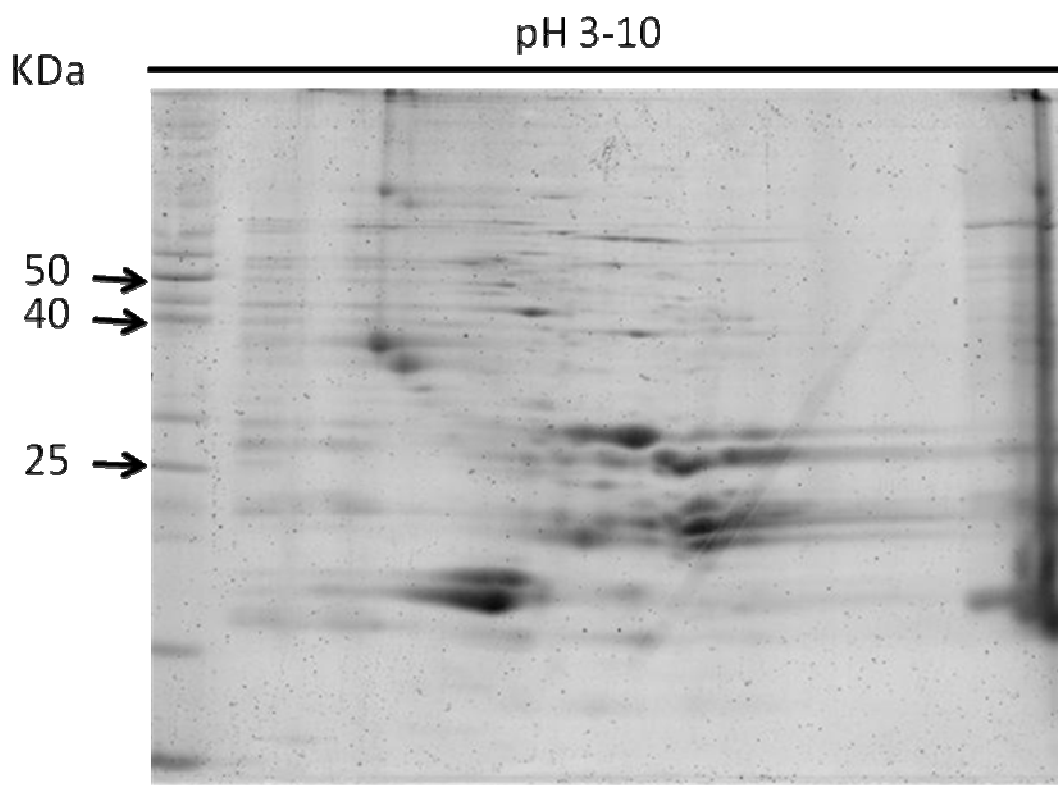


Figura 9. Imagem obtida da análise bidimensional de glândulas salivares de *R. prolixus*, após separação bidimensional por meio de IEF com pH 3-10, seguido de SDS-PAGE 12%, com 21 dias após o repasto sanguíneo.

Detectou-se a presença de 63 spots no gel bidimensional de glândulas salivares da espécie *R. prolixus* com 21 após alimentação sanguínea.

R. prolixus – 7 dias pós alimentação sanguínea (Fig. 10)

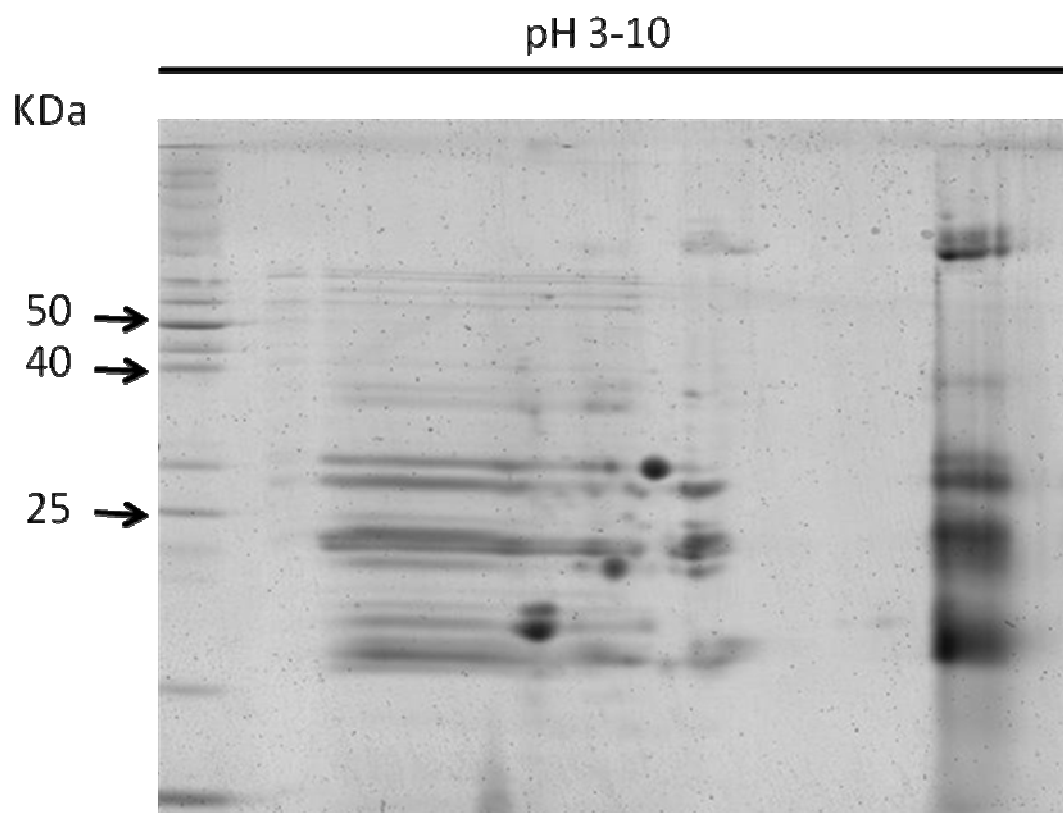


Figura 10. Imagem obtida da análise bidimensional de glândulas salivares de *R. prolixus*, após separação bidimensional por meio de IEF com pH 3-10, seguido de SDS-PAGE 12%, com sete dias após o repasto sanguíneo.

Detectou-se a presença de 64 spots no gel bidimensional de glândulas salivares da espécie *R. prolixus* com 7 dias após alimentação sanguínea.

Em ambos os géis, os spots estão mais concentrados na região neutra de pH do gel, entre 10 e 30 KDa.

Assim como demonstrado anteriormente na espécie *T. lecticularia*, a quantidade de spots similar entre os dois tempos pós alimentação sanguínea, nos sugere que não há praticamente diferenças qualitativas entre as possíveis proteínas expressas nestes dois diferentes tempos pós repasto sanguíneo. E

novamente, como ocorreu em *T. lecticularia*, em relação à análise quantitativa, não houve diferença significativa quando da sobreposição dos dois géis, e, consequentemente, sobreposição dos spots correspondentes. Visualmente, a sobreposição dos géis sugere diferenças nas proteínas expressas entre os períodos de alimentação (Fig.11 e 12), porém o gel de sete dias apresentou grande arraste de spots, podendo ter gerado esse mascaramento. O arraste apresentado neste gel, ocorreu apesar das condições serem as mesmas para todos os géis (mesmos tampões, mesmos reagentes, mesma focalização isoeétrica) e também apesar desta metodologia ter sido aplicada conjuntamente para todas as amostras.

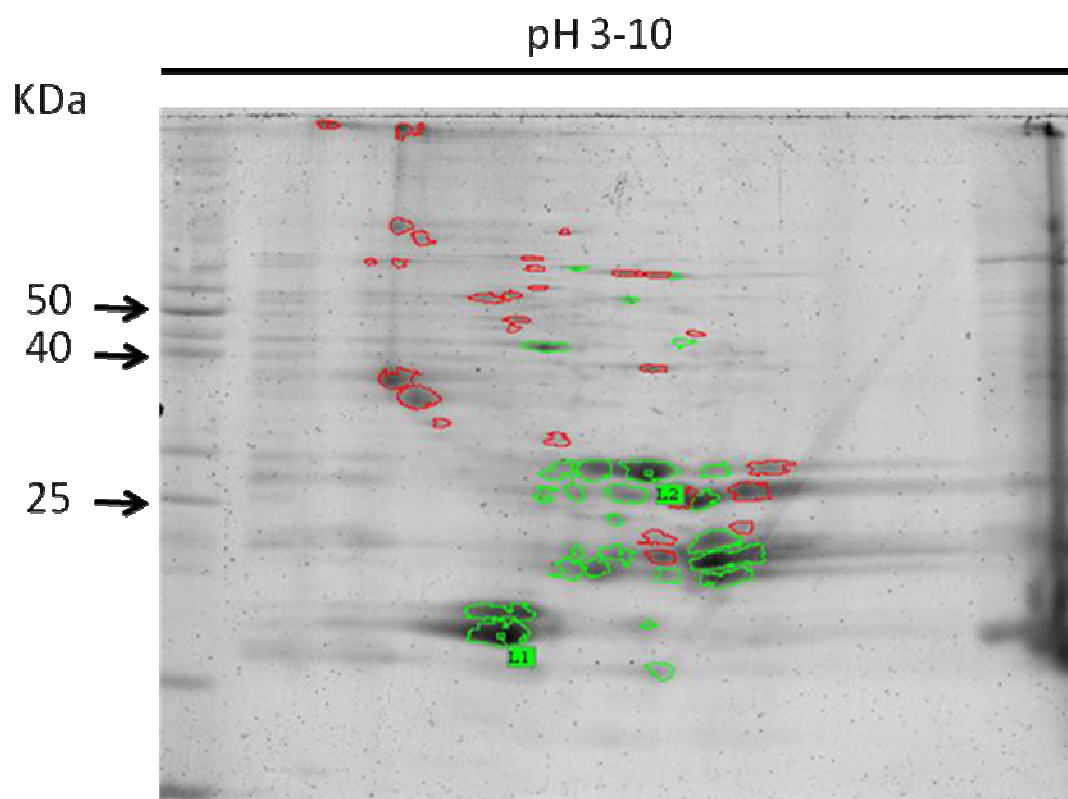


Figura 11. Gel bidimensional de 21 dias de *R. prolixus* mostrando spots circulos em verde correspondentes aos spots de sete dias e spots diferenciais na cor vermelha, após a sobreposição dos géis.

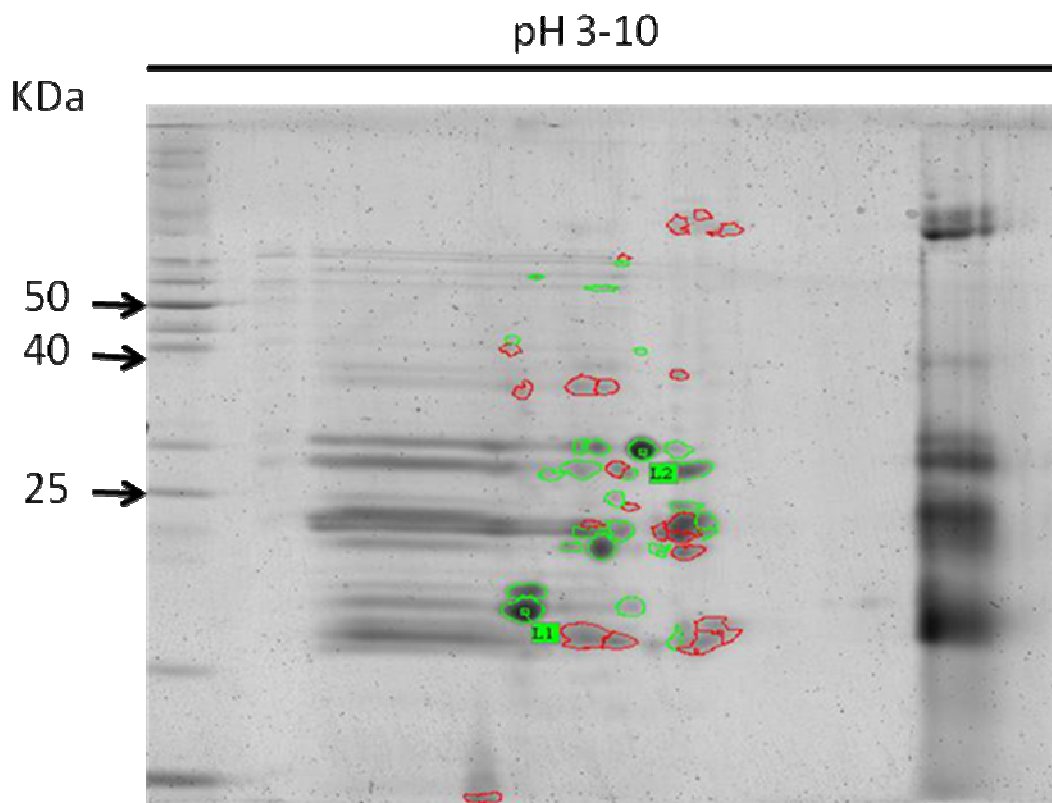


Figura 12. Gel bidimensional de 7 dias de *R. prolixus* mostrando spots circulosos em verde correspondentes aos spots de 21 dias e spots diferenciais na cor vermelha, após a sobreposição dos géis

Comparando *R. prolixus* com as espécies *Rhodnius robustus* e *Rhodnius brethesi*, ambos do mesmo gênero, observa-se que há similaridade com relação à distribuição dos spots, que encontram-se mais intensos na faixa neutra de pH do gel, entre 20 e 30 KDa. Entretanto, ao comparar a quantidade de spots, *R. brethesi* apresentou 129 spots, enquanto *R. robustus* apresentou 135 spots (COSTA ET AL., 2011). Esta diferença na quantidade de spots novamente pode ser explicada pelo fato de apesar de serem do mesmo gênero, são espécies diferentes, com habitats, alimentação e pressões ambientais diferentes, influenciando assim na expressão de genes e proteínas, sobretudo, as salivares.

Em relação às espécies *T. lecticularia* e *R. prolixus*, ambas apresentam diferenças entre si quanto à distribuição e quantidade de spots no gel. Isto nos sugere que, espécies distintas, de gêneros distintos, apresentam menos similaridade em comparação às espécies distintas do mesmo gênero, provavelmente por pertencerem dentro da mesma subfamília Triatominae à tribos diferentes, Triatomini e Rhodniini, respectivamente (COSTA, 2009). Outra diferença anatômico-morfológica que pode influenciar na diferença dos perfis eletroforéticos das glândulas salivares destas duas espécies é a quantidade e composição glandular, visto que o gênero *Triatoma* possui três pares de glândulas representadas por D1, D2 e D3, ao passo que o gênero *Rhodnius* apresenta apenas D1 e D2. A coloração das glândulas salivares também é diferenciada. No gênero *Rhodnius*, as glândulas apresentam coloração avermelhada devido à presença de proteínas chamadas nitroforinas que contém o grupo prostético heme; já no gênero *Triatoma*, os três pares de glândulas são praticamente incolores (RIBEIRO & WALKER, 1994).

5. Conclusões:

Neste projeto, através da análise bidimensional de glândulas salivares das espécies *T. lecticularia* e *R. prolixus*, foi possível elucidar seus perfis eletroforéticos, e compará-los inter e intra-gêneros em dois tempos pós repasto sanguíneo, 7 e 21 dias, em uma ampla faixa de gradiente de pH (3-10). A partir desses perfis, também foi possível comparar a distribuição e quantidade de

spots respectivos em cada gel, nos diferentes tempos pós alimentação das duas diferentes espécies.

Após diferentes tempos pós alimentação sanguínea, as proteínas presentes nas glândulas salivares tanto do triatomíneo *T. lecticularia* quanto do *R. prolixus*, qualitativamente e quantitativamente, não mudaram sua expressão. Isto nos sugere, que, apesar do estresse da falta de alimentação e de acordo com o período sem ela, estas duas espécies de triatomíneos não alteraram os níveis de expressão protéica, nem mesmo apresentaram diferentes proteínas.

Isto nos sugere que, para estudos com proteínas de glândulas salivares destas duas espécies, provavelmente não importa o tempo pós repasto sanguíneo.

O conhecimento sobre proteínas salivares de triatomíneos nos ajuda a elucidar os possíveis mecanismos que o vetor usa para interagir com o hospedeiro potencializando o repasto sanguíneo e como consequência a transmissão do parasito, visto que o sucesso na alimentação está relacionado com o sucesso da infecção pelo parasito.

Elucidar o perfil eletroforético de glândulas salivares destes triatomíneos foi o primeiro passo dado na caracterização e busca por moléculas farmacologicamente ativas presentes nas glândulas salivares, que possivelmente apresentem diversas funções, como antiagregantes plaquetárias, vasodilatadoras, ou estimuladoras e supressoras da resposta imune no hospedeiro.

Além disso, os perfis eletroforéticos diferenciados podem ser utilizados como uma ferramenta na diferenciação de espécies.

6. Referências bibliográficas

ANDERSEN, J.F.; CHAMPAGNE, D.E.; WEICHSEL, A.; RIBEIRO, J.M.; BALFOUR, C.A.; DRESS, V.; MONTFORT, W.R. Nitric oxide binding and crystallization of recombinant nitrophorin I, a nitric oxide transport protein from the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Biochemistry** 36(15):4423-8. 1997.

ARÉVALO, A.; CARRANZA, J.C.; GUHL, F.; VALLEJO, G.A. Electrophoretic patterns of salivary hemeproteins (nitrophorines) of *Rhodnius colombiensis* and *R. prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Biomedica** 27 Suppl 1:137-42. 2007.

BARTH, R. Estudo Anatômico e Histológico sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz** 52, 517–585. 1954.

BERKELMAN, T.; STENSTEDT, T. 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods. **Amersham Pharmacia Biotech**, 50p. 1998.

CHAMPAGNE, D.E. Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods. **Pathophysiol Haemost Thromb.**; 34(4-5):221-7. 2005.

CHAMPAGNE, D.E.; NUSSENZVEIG, R.H.; RIBEIRO, J.M.C. 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. 1995.

CHARNEAU, S.; JUNQUEIRA, M.; COSTA, C.M.; PIRES, D.L.; FERNANDES, E.S.; BUSSACOS, A.C.; SOUSA, M.V.; RICART, C.A.O.; SHEVCHENKO, A.; TEIXEIRA, A.R.L. The saliva proteome of the blood-feeding insect *Triatoma infestans* is rich in platelet-aggregation inhibitors. **Int J Mass Spectrom.** vol. 268, no. 2-3, pp. 265-276. 2007.

COSTA, C.M. Análise proteômica das salivas dos triatomíneos *Rhodnius brethesi*, *Rhodnius robustus* e *Panstrongylus megistus*, vetores da doença de Chagas. 2009. 81p. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília.

COSTA, C.M.; SOUSA, M.V.; RICART, C.A.; SANTANA, J.M.; TEIXEIRA, A.R.; ROEPSTORFF, P.; CHARNEAU, S. 2-DE-based proteomic investigation of the saliva of the Amazonian triatomine vectors of Chagas disease: *Rhodnius brethesi* and *Rhodnius robustus*. **J Proteomics.**; 74(9):1652-63. 2011.

COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Trop.** 115(1-2):5-13. 2010.

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

FORATTINI, O.P.; FERREIRA, A.O.; ROCHA-SILVA, E.O.; RABELLO, E.X.; SANTOS, J.L.F. Aspectos ecológicos da tripanossomose americana. II — Distribuição e dispersão local de triatomíneos em ecótopos naturais e artificiais. **Rev. Saúde públ.**, 5:163-91. 1971.

FORATTINI, O.P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Rev. Saúde públ.**, 14:265-99. 1980.

GOLODNE, D.M.; MONTEIRO, R.Q.; GRACA-SOUZA, A.V.; SILVA-NETO, M.A.; ATELLA, G.C. Lysophosphatidylcholine Acts as an Anti-hemostatic Molecule in the Saliva of the Blood-sucking Bug *Rhodnius prolixus*. **J Biol Chem**. 278(30):27766-71. 2003.

JURBERG, J.; COSTA, J.M. The resistance of fasting and nutritional aspects of *Triatoma lecticularia* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 84(3):393-9. 1989.

KNIPP, M.; YANG, F.; BERRY, R.E.; ZHANG, H.; SHOKHIREV, M.N.; WALKER, F.A. 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(46):13254-68. 2007.

KROPF, S.P.; AZEVEDO, N.; FERREIRA, L.O. Biomedical research and public health in Brazil: the case of Chagas' disease (1909-50). **Soc Hist Med.**; 16(1):111-29. 2003.

LACOMBE, D. Anatomy and histology of salivary glands of Triatominae. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 94(4):557-64. 1999.

MARTÍNEZ-IBARRA, J.A.; ALEJANDRE-AGUILAR, R.; PAREDES-GONZÁLEZ, E.; MARTÍNEZ-SILVA, M.A.; SOLORIO-CIBRIÁN, M.; NOGUEDA-TORRES, B.; TRUJILLO-CONTRERAS, F.; NOVELO-LÓPEZ, M. Biology of three species of North American Triatominae (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) fed on rabbits. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**;102(8):925-30. 2007.

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

MOREIRA, M.F.; COELHO, H.S.; ZINGALI, R.B.; OLIVEIRA, P.L.; MASUDA, H. Changes in salivary nitrophorin profile during the life cycle of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochem Mol Biol.** 33, 23-28. 2003.

NASCIMENTO, R.J.; SANTANA, J.M.; LOZZI, S.P.; ARAÚJO, C.N.; TEIXEIRA, A.R. Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland proteins. **Am J Trop Med Hyg.** ;65(3):219-26. 2001.

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

RIBEIRO, J.M.; WALKER, F.A. High affinity histamine-binding and antihistaminic activity of the salivary nitric oxide-carrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*. **J Exp Med.** ;180(6):2251-7. 1994.

RIBEIRO, J.M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infect Agents Dis.** ;4(3):143-52. 1995.

RIBEIRO, J.M.; SCHNEIDER, M.; ISAIAS, T.; JURBERG, J.; GALVAO, C.; GUIMARAES, J.A. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). **J Med Entomol.** 35: 599–610. 1998.

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

SCHWARZ, A.; STERNBERG, J.M.; JOHNSTON, V.; MEDRANO-MERCADO, N.; ANDERSON, J.M.; HUME, J.C.; VALENZUELA, J.G.; SCHAUB, G.A.; BILLINGSLEY, P.F. Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. **Int J Parasitol.**;39(9):1021-9. 2009.

VINHAES, M.C.; DIAS, J.C. Chagas disease in Brazil. **Cad Saude Publica.** ;16 Suppl 2:7-12. 2000.

WHO. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 29/09/2013 às 13:00hs.

WHO. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases-topics/chagas/chagas_f1.jpg>. Acesso em: 13/10/2013 às 17:12.

Araraquara, 12 de janeiro de 2014

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Mara Cristina Pinto', with a long horizontal stroke extending to the right.

De acordo:

Mara Cristina Pinto

Camila Pereira Puertas