



Universidade de Brasília

Faculdade de Ceilândia

Curso de Graduação em Farmácia

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SALIVAR DE TRIATOMÍNEOS VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS

KAIO LUÍS DA SILVA BENTES

Brasília - DF, 2017.



Universidade de Brasília

Faculdade de Ceilândia

Curso de Graduação em Farmácia

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SALIVAR DE TRIATOMÍNEOS VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS

KAIO LUÍS DA SILVA BENTES

Monografia submetida ao Curso de Farmácia da Faculdade de Ceilândia - UnB como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel.

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. Carla Nunes de Araújo**

Brasília - DF, 2017.

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro (LIPH) do Departamento de Biologia Celular da UnB.

Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF, Processo 193.001.053/2015).

Projeto de Iniciação Científica realizado com bolsa da FUB-DF e CNPq

Kaio Luís da Silva Bentes

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SALIVAR DE TRIATOMÍNEOS VETORES DA
DOENÇA DE CHAGAS**

Banca examinadora

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Nunes de Araújo
(Universidade de Brasília – FCE)**

**Izabela Marques Dourado Bastos
(Universidade de Brasília – UnB/Darcy Ribeiro)**

**Flávia Nader Motta
(Universidade de Brasília – FCE)**

Brasília – DF, 2017

“E se eu voar, ou se eu cair, pelo menos eu posso dizer que eu dei tudo de mim.”

(RuPaul Charles)

*Dedico este trabalho à minha vó Déa, à
minha mãe Lúcia e à minha irmã
Beatriz.*

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio, suporte e não me deixar desistir nos momentos difíceis;

Aos meus amigos da FCe e da UCB pelos momentos que dividimos juntos, tanto os felizes quanto os tristes;

Aos meus amigos do ensino fundamental e médio que tive a honra e a felicidade de reencontrá-los durante a graduação;

À minha orientadora Dr^a Carla Nunes de Araújo por ter me proporcionado esta oportunidade, pela orientação e apoio durante a execução do trabalho;

À equipe do LIPH que me acolheu e recebeu-me de braços abertos e pelos ensinamentos;

À banca examinadora por ter aceitado meu convite e participarem da defesa da monografia;

À Adriana e ao Everton pelo cuidado com os barbeiros no biotério;

À FUB e CNPq pela concessão da bolsa de estudo;

À FAPDF pelo financiamento da pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Doença de Chagas.....	16
1.2 O parasito.....	17
1.3 Tratamento da Doença de Chagas	18
1.4 Triatomíneos	19
1.5 Distribuição geográfica de <i>R. neglectus</i> e <i>R. prolixus</i>	22
1.6 O repasto sanguíneo.....	23
1.7 Proteases	24
1.8 Proteases de artrópodes hematófagos	25
1.9 Justificativa.....	26
2 OBJETIVO	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 METODOLOGIA	28
3.1 Manutenção das colônias de triatomíneos e dissecação das glândulas salivares.....	28
3.1.1 Triatomíneos.....	28
3.1.2 Obtenção da saliva e quantificação	28
3.2 Análise em SDS-PAGE	28
3.3 Zimografia	29
3.4 Ensaio enzimáticos em solução	30
3.5 Ensaio de inibição das atividades proteolíticas	30
4 RESULTADOS	32
4.1 Perfil proteico das salivas de <i>R. prolixus</i> e <i>R. neglectus</i>	32
4.2 Atividade colagenolítica das salivas de <i>R. prolixus</i> e <i>R. neglectus</i>	33
4.3 Atividade enzimática e perfil de inibição sobre o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC	34
5 DISCUSSÃO.....	38

6	CONCLUSÃO	42
7	PERSPECTIVAS	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE ABREVIATURAS

SDS-PAGE – Elefroforese em gel de poliacrialamida contendo dodecil sulfato de sódio

AEBSF – Cloridrato de fluoreto de 4-(2-amino-etil) benzenossulfonilo

E-64 – Trans-Epoxissuccinil-L-leucilamido (4-guanidino) butano

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

TA – Temperatura ambiente

TLCK – Cloridrato de Tosyl-L-lisil-clorometano

TPCK – Tosil fenilalanil clorometil cetona

Z-Phe-Arg-AMC – Z- carbobenzoxi-Phe-Arg-7-amino-4-metilcoumarina

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida do *T. cruzi*. ❶ O triatomíneo ingere o sangue do hospedeiro e libera os tripomastigotas metacíclicos (TM) do *T. cruzi* nas fezes ou urina, e estes entram pelo local da picada ou mucosas; ❷ os TM penetram em vários tipos celulares e se diferenciam em amastigotas; ❸ os amastigotas se multiplicam por divisão binária nas células infectadas; ❹ os amastigotas intracelulares se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos (TS), rompem a membrana celular e caem na corrente sanguínea. Os TS podem invadir novas células; ❺ o triatomíneo ingere o sangue do hospedeiro contendo TS; ❻ os TS se diferenciam em epimastigotas no intestino médio do triatomíneo; ❼ onde se reproduzem por divisão binária; ❽ e se diferenciam em TM no intestino posterior. Fonte: CDC Image Library. Modificado de: <<https://goo.gl/Fx14I4>>. Acessado em: 07/05/2017. 18
- Figura 2.** Estágios de vida de *R. prolixus*. Da esquerda para a direita: ovos; ninfa de 1º estágio; 2º estágio; 3º estágio; 4º estágio; 5º estágio; e inseto adulto. Acervo pessoal. 19
- Figura 3.** Adultos de *R. neglectus* à direita e *R. prolixus* à esquerda. Notar que *R. prolixus* apresenta tons marrons mais escuros, enquanto que *R. neglectus* apresenta tons marrons mais acobreados e as patas mais claras. Acervo pessoal. 20
- Figura 4.** Ovos férteis e eclodidos de *R. neglectus* (A); e ovos férteis de *R. prolixus* (B). Ovos férteis na coloração rósea e ovos eclodidos na coloração esbranquiçada. Notar que os ovos eclodidos não têm opérculo; e o colarinho em formato de anel em *R. neglectus* que é não observado em *R. prolixus*. Fonte: Praça (2016 - A); e acervo pessoal (B). 21
- Figura 5.** Par de glândulas salivares principais de *R. neglectus*. Note um delicado traço de divisão entre as regiões anterior e posterior, de onde emerge o ducto principal. Fonte: Martins (2016). 22
- Figura 6.** Representação esquemática das etapas realizadas durante o estudo. 31
- Figura 7.** Comparação dos perfis proteicos salivares de *R. prolixus* e *R. neglectus* de 05, 12 e 20 dias após o repasto sanguíneo em gel de poliacrilamida 10%. Os números à esquerda indicam as massas moleculares em kDa. Os números acima representam os dias após o repasto. 32
- Figura 8.** Atividade proteolítica salivar em gel de *R. prolixus* em diferentes dias após o repasto sanguíneo. Os números à esquerda indicam as massas moleculares em kDa. Os números acima indicam os dias após o repasto sanguíneo. A letra “F” indica a amostra fervida de seu respectivo dia. Cada poço continha ~50 ug de proteínas salivares. O marcador de peso molecular utilizado foi BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen™. 33
- Figura 9.** Atividade proteolítica em gel salivar de *R. neglectus* em diferentes dias após o repasto sanguíneo. Os números à esquerda indicam as massas moleculares em kDa. Os números acima indicam os dias após o repasto sanguíneo. A letra “F” indica a amostra fervida de seu respectivo dia. Cada poço continha ~50 ug de proteínas salivares, com exceção de 5 dprs, que continha ~25 ug. Os marcadores de peso molecular utilizados foram BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen™ e

PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific™ em A, e em B e C, respectivamente.	34
Figura 10. Influência da concentração de proteínas da saliva de <i>R. prolixus</i> (A) e <i>R. neglectus</i> (B) na proteólise do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC. O ensaio foi realizado em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, em triplicata. Os dados são apresentados em atividade relativa (%).	35
Figura 11. Atividade proteolítica sobre o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC na saliva de <i>R. prolixus</i> 5 (A), 12 (B) e 20 (C) dias após o repasto sanguíneo na presença de inibidores de proteases. Não houve diferença significativa, com exceção da fenantrolina 12 (aumento, $p=0,0001$) e 20 (diminuição, $p=0,001$) dias após o repasto sanguíneo.	36
Figura 12. Atividade proteolítica sobre o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC na saliva de <i>R. neglectus</i> 5 (A), 12 (B) e 20 (C) dias após o repasto sanguíneo na presença de inibidores de proteases. Não houve diferença significativa, com exceção da fenantrolina que 5 (aumento, $p=0,0001$), 12 (aumento, $p=0,0008$) e 20 (diminuição, $p=0,003$) dias após o repasto sanguíneo.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade enzimática presente nas salivas de <i>R. prolixus</i> e <i>R. neglectus</i> sobre o peptídeo fluorogênico sintético Z-Phe-Arg-AMC.	35
--	----

RESUMO

Os triatomíneos hematófagos, vetores da Doença de Chagas, são insetos cujo crescimento, mudas e reprodução são regulados pelo repasto sanguíneo. Alguns RNAs mensageiros de proteases foram descritos em sialotranscriptomas de triatomíneos hematófagos, sugerindo que essas proteínas sejam expressas na saliva desses animais. O objetivo desse estudo foi identificar e caracterizar atividades proteolíticas na saliva de *Rhodnius prolixus* e *R. neglectus* em diferentes dias pós-repasto sanguíneo (dprs). Os triatomíneos foram mantidos em colônia no Biotério do IB, UnB. Cinco, 12 e 20 dprs, as glândulas salivares foram dissecadas para a obtenção da saliva. O perfil proteico foi analisado por eletroforese em SDS-PAGE; a atividade gelatinolítica por zimografia em gel; e a atividade proteolítica sobre o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC em solução, na ausência ou presença de inibidores de proteases. O perfil proteico das salivas nos diferentes períodos após o repasto sanguíneo é semelhante. As proteínas salivares que apresentaram atividade proteolítica no ensaio zimográfico possuem massas moleculares entre 20 e 70 kDa. As salivas apresentaram atividade enzimática sobre o peptídeo fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC, inibidas apenas nas amostras de 20 dias após o repasto sanguíneo por fenantrolina (*R. prolixus*, 48,86%; e *R. neglectus*, 38,43% de inibição). Esses resultados sugerem a presença, principalmente, de metaloproteases na saliva de *R. prolixus* e *R. neglectus*. No entanto, uma investigação mais profunda é necessária e poderá ajudar a elucidar o papel dessas proteases salivares no processamento de peptídeos bioativos presentes na saliva e/ou no hospedeiro vertebrado e suas implicações para o repasto sanguíneo e a transmissão do *T. cruzi*.

Palavras-chave: *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius neglectus*, Zimografia, Proteases, Repasto sanguíneo.

ABSTRACT

Hematophagous triatomines, vectors of Chagas Disease, are insects which growth, molts and reproduction are regulated by blood meal. Some protease mRNAs have been described in sialotranscriptomes of hematophagous triatomines, suggesting these proteins are expressed in their saliva. This study aimed to identify and to characterize proteolytic activities in *Rhodnius prolixus* and *R. neglectus* saliva in different days after the blood meal has been taken (dabm). The triatomines were reared in the Insectarium of the Biological Sciences Institute, UnB. Five, 12 and 20 dabm, salivary glands were dissected to obtain saliva. Protein profile was analyzed by electrophoresis in SDS-PAGE; gelatinolytic activity by gel-zymography; and proteolytic activity on fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-AMC in solution, in protease inhibitors absence or presence. Saliva protein profile in different dabm is similar. Saliva proteins that showed proteolytic activity in gel-zymography have molecular masses ranging from 20-70 kDa. Salivas showed enzymatic activity in fluorogenic peptide Z-Phe-Arg-AMC, inhibited only in 20 dabm by phenanthroline (*R. prolixus*, 48.86 %; *R. neglectus*, 38.43 % of inhibition). These results suggest expression, mainly, of metalloproteases in *R. prolixus* and *R. neglectus* saliva. However, a deep investigation is necessary and may help to elucidate the salivary proteases roles in the generation of bioactive peptides in saliva and/or in the vertebrate host and their implications to blood meal and *T. cruzi* transmission.

Keywords: *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius neglectus*, Zymography, Proteases, Blood meal.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A Doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Esta doença é uma zoonose endêmica da América Latina que, em seu ciclo doméstico e peridoméstico, é transmitida ao homem por triatomíneos adaptados ao ambiente humano (Prata, 2001). Epidemiologicamente distribuída em áreas economicamente pobres, a Doença de Chagas é considerada uma doença negligenciada porque apesar de ser um grave problema de saúde pública, há pouco interesse no desenvolvimento de medicamentos para seu tratamento e prevenção (Lindoso e Lindoso, 2009).

O homem é infectado à noite através do contato com as fezes do barbeiro. Os insetos defecam no hospedeiro enquanto se alimenta, e as fezes contaminadas podem ser passadas para as mucosas do olho, boca, nariz ou no próprio local da picada. A transmissão do parasita através da pele intacta provavelmente não ocorre. Outro mecanismo de transmissão é a transfusão de sangue ou de seus derivados (Prata, 2001; Neves, 2005). A terceira mais importante forma de transmissão é a congênita, que conta com, aproximadamente, 5000-18000 casos por ano. A probabilidade da transmissão congênita em crianças de mães chagásicas varia de menos de 1% a 10%. Um inquérito sobre prevalência da Doença de Chagas realizado nacionalmente em 104.954 menores de cinco anos e suas respectivas mães residentes na zona rural, detectou 20 casos de infecção congênita, ou seja, isto significa uma prevalência de 0,02%. A maioria ocorreu no Rio Grande do Sul com 12 casos, seguida de Minas Gerais com três casos, e um caso em cada um dos seguintes estados: Acre, Alagoas, Bahia, Paraná e Pernambuco. Esse tipo de transmissão pode ocorrer também em áreas não endêmicas (Prata, 2001; Ostermayer *et al.*, 2011). Microepidemias da Doença de Chagas aguda, provavelmente devido à transmissão oral através de comida contaminada como carne, caldo de cana ou açaí (*Euterpe oleracea*), têm sido descritas, especialmente na região Amazônica. Outros mecanismos esporádicos de transmissão incluem a contaminação acidental durante o trabalho em laboratório (que inclui a via conjuntival através de aerossol formado durante a centrifugação e acidentes com seringas contaminadas), e transplante de órgãos (coração, medula óssea, rim e outros) (Prata, 2001).

1.2 O parasito

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado pertencente à família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastida. Os protozoários dessa ordem possuem uma organela chamada cinetoplasto, preenchida com genoma mitocondrial e que se encontra associada à base do flagelo (Cortez *et al.*, 2006; Stuart *et al.*, 2008). No seu ciclo de vida (Figura 1), após penetrar no hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos interagem com as células do sistema fagocitário mononuclear da pele ou mucosas e são internalizados em vacúolos parasitóforos. Dentro desses vacúolos, ocorre a diferenciação dos tripomastigotas em amastigotas, que são as formas replicativas no hospedeiro vertebrado. Os amastigotas escapam do interior desses vacúolos para o citoplasma, onde se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos. Quando o citoplasma está repleto de parasitos, ocorre a lise da membrana celular liberando-os na corrente sanguínea para que possam infectar novas células do hospedeiro, de qualquer tecido ou órgão, em um ciclo infectante contínuo, levando ao aumento da parasitemia. No início da infecção do vertebrado, a parasitemia é mais elevada, podendo levar o hospedeiro ao óbito, o que, na espécie humana, ocorre principalmente em crianças. Durante o repasto, os triatomíneos se infectam ao ingerir sangue contendo parasitos circulantes na forma de tripomastigotas sanguíneos, que no seu estômago se diferenciam em epimastigotas. Os epimastigotas, que são as formas replicativas, se multiplicam e colonizam o intestino médio do inseto. Os epimastigotas migram em direção ao intestino posterior, local onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que poderão infectar novos hospedeiros mamíferos durante repastos subsequentes sendo eliminados nas fezes ou urina do triatomíneo (Coutinho *et al.*, 1999; Neves, 2005).

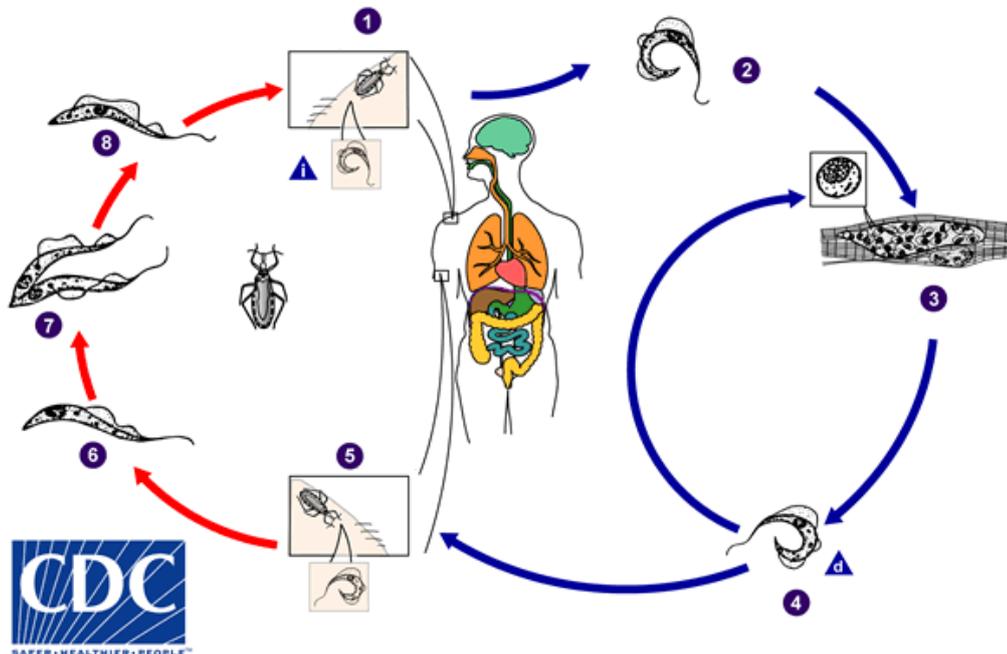


Figura 1. Ciclo de vida do *T. cruzi*. ❶ O triatomíneo ingere o sangue do hospedeiro e libera os tripomastigotas metacíclicos (TM) do *T. cruzi* nas fezes ou urina, e estes entram pelo local da picada ou mucosas; ❷ os TM penetram em vários tipos celulares e se diferenciam em amastigotas; ❸ os amastigotas se multiplicam por divisão binária nas células infectadas; ❹ os amastigotas intracelulares se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos (TS), rompem a membrana celular e caem na corrente sanguínea. Os TS podem invadir novas células; ❺ o triatomíneo ingere o sangue do hospedeiro contendo TS; ❻ os TS se diferenciam em epimastigotas no intestino médio do triatomíneo; ❼ onde se reproduzem por divisão binária; ❽ e se diferenciam em TM no intestino posterior. Fonte: CDC Image Library. Modificado de: <<https://goo.gl/Fx14l4>>. Acessado em: 07/05/2017.

1.3 Tratamento da Doença de Chagas

A Doença de Chagas deve ser tratada com benzonidazol ou com nifurtimox. O uso desses medicamentos pode resultar na cura da doença, caso ela seja tratada logo no início da infecção. No entanto, a eficácia das duas drogas diminui durante a fase crônica. Os adultos infectados, especialmente aqueles assintomáticos, também devem realizar o tratamento, pois os antiparasitários podem prevenir ou reduzir a progressão da doença. Nesses casos, os benefícios potenciais da medicação para prevenir ou retardar o desenvolvimento da Doença de Chagas devem ser ponderados em relação à longa duração do tratamento (até dois meses) e possíveis reações adversas, que ocorrem em até 40% dos pacientes tratados. O benzonidazol e o nifurtimox são contra-indicados para mulheres grávidas, pessoas com

insuficiência renal ou hepática, e o último também é contraindicado para pessoas com distúrbios neurológicos ou psiquiátricos (Who, 2016). Devido à eficácia limitada das duas drogas disponíveis durante a fase crônica da doença, aos efeitos colaterais e ao acesso limitado dos pacientes aos medicamentos, o tratamento da Doença de Chagas é um desafio (Dumonteil e Herrera, 2017).

O controle do vetor é o método mais efetivo na prevenção da doença na América Latina, pois não existe vacina para a doença de Chagas. A triagem sanguínea é necessária para prevenir a infecção através de transfusão e transplante de órgão (Who, 2016). No Brasil, o sangue total e seus componentes não podem ser transfundidos antes da obtenção de resultados finais negativos para Doença de Chagas (ANVISA, 2004). A grande quantidade de animais silvestres reservatórios do *T. cruzi* impede a erradicação do parasito (Who, 2016).

1.4 Triatomíneos

Os triatomíneos, também conhecidos como barbeiros, são insetos que pertencem à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Todos os membros desta subfamília são hematófagos (Tartarotti *et al.*, 2006). Eles são classificados como hemimetábolos e têm cinco estágios de ninfa e um estágio adulto (Figura 2). A muda, crescimento e a reprodução são regulados pelo repasto sanguíneo. A maioria dos triatomíneos possui pico de atividade no período noturno (Teixeira, 2007).



Figura 2. Estágios de vida de *R. prolixus*. Da esquerda para a direita: ovos; ninfa de 1º estágio; 2º estágio; 3º estágio; 4º estágio; 5º estágio; e inseto adulto. Acervo pessoal.

A subfamília Triatominae possui cinco tribos, uma delas é denominada Rhodniini, a qual possui dois gêneros, sendo eles *Rhodnius* e *Psammolestes* (Monteiro *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2014). O gênero *Rhodnius* compreende 20 espécies descritas atualmente (Souza *et al.*, 2016). No presente estudo, duas espécies foram utilizadas: *Rhodnius prolixus* e *R. neglectus*. Basicamente, a diferença morfológica entre *R. neglectus* e *R. prolixus* é a sua coloração, sendo que a primeira espécie tem a coloração marrom claro, com marcas marrom escuro na cabeça, e áreas amarelas no abdome ventral; enquanto que a segunda possui coloração marrom claro amarelada, com marcas marrom escuro em várias regiões do corpo e apêndices (Lent e Wygodzinsky, 1979). Por serem muito parecidas (Figura 3) e serem bem difíceis de serem diferenciadas morfológicamente, elas foram classificadas, juntamente com mais duas espécies, *Rhodnius robustus* e *Rhodnius nasutus*, como membros do “complexo *Rhodnius prolixus*” por Barrett (1988). Recentemente, as espécies *Rhodnius domesticus* e *Rhodnius montenegrensis* também foram acrescentadas a esse complexo (Da Rosa *et al.*, 2014).



Figura 3. Adultos de *R. neglectus* à direita e *R. prolixus* à esquerda. Notar que *R. prolixus* apresenta tons marrons mais escuros, enquanto que *R. neglectus* apresenta tons marrons mais acobreados e as patas mais claras. Acervo pessoal.

Embora a diferenciação morfológica não seja fácil, alguns autores sugerem que é possível distinguir as espécies do complexo *R. prolixus* através dos ovos e

genitália (Forattini e Barata, 1974). Os ovos de *R. neglectus* são esbranquiçados com cascas pouco translúcidas. Quando recém postos possuem, frequentemente, coloração rosa clara devido ao embrião. Alguns embriões possuem coloração amarelo-pálida, conferindo essa coloração ao ovo, mas à medida que evoluem adquirem a coloração rosa, e ao término do desenvolvimento embrionário, apresentam-se praticamente iguais aos primeiros. Eles possuem uma formação bastante evidente, à maneira de um anel, que contorna a região abaixo do opérculo, a qual Forattini e Barata (1974) chamaram de “colarinho” (Figura 4). O opérculo dos ovos de *R. prolixus* tem a coloração salmão claro, sempre em tom mais forte que o da casca e de maneira mais clara que a de *R. neglectus*. Os embriões maduros podem, raramente, apresentar coloração rosa alaranjada (Barata, 1981). Os ovos de *R. prolixus* não possuem “colarinho”, apesar de compartilharem semelhanças com os de *R. neglectus* quanto ao tamanho e textura (Forattini e Barata, 1974).

Quanto à genitália, a masculina de *R. neglectus* possui o processo mediano do pigóforo subtriangular curto e largo na base, enquanto que a de *R. prolixus* é estreito, mas ambos são projetados apicalmente (Lent e Wygodzinsky, 1979). A diferenciação pode ser realizada ainda por métodos bioquímicos (Soares *et al.*, 2000) ou por técnicas moleculares (Dujardin *et al.*, 1999).

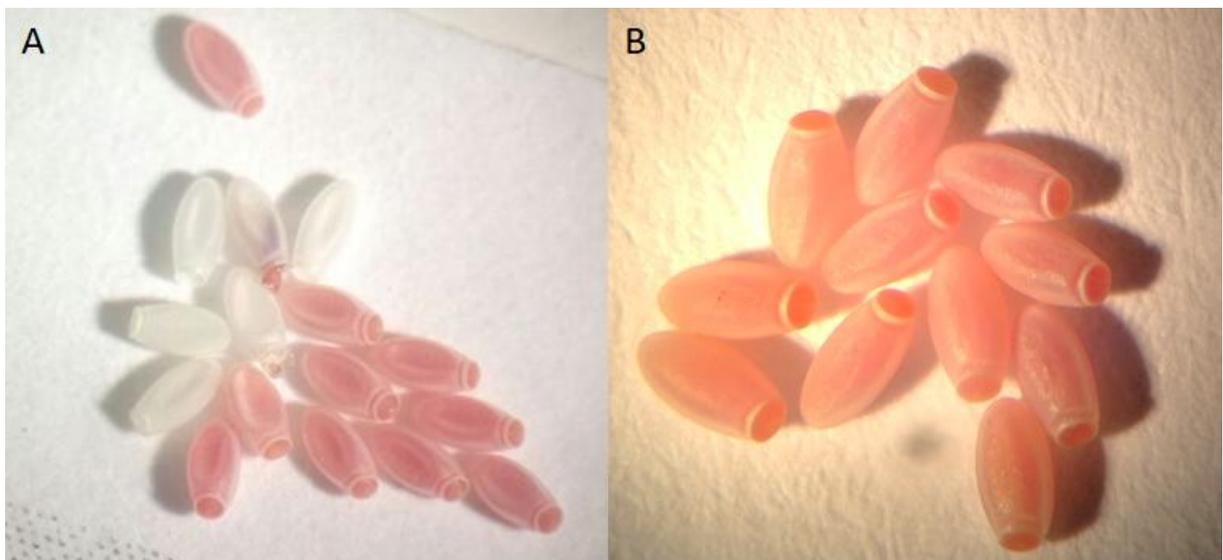


Figura 4. Ovos férteis e eclodidos de *R. neglectus* (A); e ovos férteis de *R. prolixus* (B). Ovos férteis na coloração rósea e ovos eclodidos na coloração esbranquiçada. Notar que os ovos eclodidos não têm opérculo; e o colarinho em formato de anel em *R. neglectus* que é não observado em *R. prolixus*. Fonte: Praça (2016 - A); e acervo pessoal (B).

Todas as espécies de *Rhodnius* têm como característica a coloração vermelha em suas glândulas salivares (Figura 5), o que não ocorre nas glândulas de outros gêneros de triatomíneos. Esta coloração avermelhada se dá pela presença de hemeproteínas. As nitroforinas são hemeproteínas responsáveis por muitas atividades anti-hemostáticas da saliva de *Rhodnius* como ação vasodilatadora pela liberação de óxido nítrico, anticoagulante e anti-histamínica (Soares *et al.*, 2000).



Figura 5. Par de glândulas salivares principais de *R. neglectus*. Note um delicado traço de divisão entre as regiões anterior e posterior, de onde emerge o ducto principal. Fonte: Martins (2016).

Os barbeiros são classificados como insetos solenófagos, pelo fato de retirarem sangue diretamente dos vasos sanguíneos, onde utilizam sua probóscide longa e flexível, e não provocam micro-hemorragias (Silva, 2009). Em Hemiptera, os machos alimentados devem prover fatores/nutrientes que auxiliam no desenvolvimento e aumento do tamanho da bateria de ovos. As fêmeas de *Rhodnius* que se reproduzem com machos não alimentados, produzem cerca de 25 % a menos de ovos. *Rhodnius* completa o ciclo de vida de três a quatro meses (Lent e Wygodzinsky, 1979; Rosa, 2014).

1.5 Distribuição geográfica de *R. neglectus* e *R. prolixus*

A distribuição do *R. prolixus* compreende o norte do Brasil, o estado de Goiás e os países Bolívia, Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Equador, Guatemala, Guiana, Guiana Francesa, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Suriname e Venezuela. Esta espécie está bem estabelecida em habitações humanas e é um importante vetor da Doença de Chagas. Esta espécie já foi encontrada em tocas de pacas (*Agouti paca*), galinheiros, gaiolas de pombos, e tocas onde porcos-espinhos (*Coendou prehensilis*) vivem. *R. prolixus* também tem sido associado com várias

aves, como o *Jabiru mycteria* (jaburu) e *Mycteria americana* (cabeça-seca), sendo que já foram encontrados ovos nas penas dessas aves, facilitando a dispersão do triatomíneo (Lent e Wygodzinsky, 1979). Ele foi coletado em várias espécies de palmeiras, como do gênero *Attalea*, *Acrocomia sclerocarpa*, *Copernicia tectorum* e *Leopoldina piassaba* (Lent e Wygodzinsky, 1979; Ricardo-Silva *et al.*, 2012). A presença dessas palmeiras próxima ao ambiente doméstico pode ser um indicativo da presença do vetor e do risco da transmissão da Doença de Chagas (Lent e Wygodzinsky, 1979; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2003; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2004; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2012; Ricardo-Silva *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2014).

A presença de *R. neglectus* foi relatada na Bahia, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo e Tocantins (Lent e Wygodzinsky, 1979; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2012). Esta espécie é predominantemente silvestre e tem sido encontrada na copa de palmeiras, como babaçu (*Orbignya maritima*), macaubeira (*Acrocomia macrocarpa*), buriti (*Mauritia vinifera* e *M. flexuosa*), aricuri (*Scheelea phalerata*) e palmeira australiana (*Livistona australis*) (Lent e Wygodzinsky, 1979; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2014). Ela pode ser encontrada raramente em ninhos de pássaros da família Furnariidae (*Anumbius annumbi*) e algumas vezes em aglomerados de piteira (*Furcraea gigantea*) ou em árvores ocas (Lent e Wygodzinsky, 1979). Esta espécie já foi relatada em ambiente intra e peridomiciliares nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Tocantins (Oliveira e Silva, 2007; Almeida *et al.*, 2008; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2014). *R. neglectus* é considerado como um potencial vetor secundário da Doença de Chagas, onde realiza a transmissão enzoótica do *T. cruzi* e do *T. rangeli*, este último protozoário flagelado avirulento, no Distrito Federal (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2004; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2012). *R. neglectus* e *R. nasutus* estão restritos, geralmente, ao cerrado e à caatinga, respectivamente, e *R. robustus* se encontra na região amazônica (Sant'anna *et al.*, 2001).

1.6 O repasto sanguíneo

Durante o repasto sanguíneo, o triatomíneo perfura a pele do hospedeiro com sua probóscide e injeta saliva no tecido do hospedeiro e no vaso sanguíneo local. A

lesão vascular e tecidual causada pela picada do inseto desencadeia a resposta fisiológica do hospedeiro para evitar a perda de sangue, o processo inflamatório e a resposta imunológica. Como a resposta fisiológica do hospedeiro pode ser extremamente rápida, um mecanismo sofisticado em oposição deve estar presente durante o repasto para que os insetos consigam se alimentar adequadamente. A estratégia para enfrentar esse desafio consiste na produção de moléculas com atividades farmacológicas que são capazes de contrapor a hemostasia, a inflamação e modular a resposta imune do hospedeiro (Ribeiro, 1995; Champagne, 2004; 2005). Já foi demonstrado que a saliva de *R. prolixus* apresenta lisofosfatidilcolina, uma molécula lipídica presente que pode atuar como uma molécula anti-hemostática durante o repasto, bloqueando a agregação plaquetária, modulando macrófagos e facilitando a transmissão do *T. cruzi*, além de induzir a produção de óxido nítrico em culturas de células endoteliais (Mesquita *et al.*, 2008). Entre as proteínas presentes na saliva dos triatomíneos hematófagos, membros das seguintes famílias foram descritos: lipocalinas, triabinas, apirases, hemolisinas, antígenos 5, inibidores de proteases, proteases, entre outras, além de proteínas com função desconhecida (De Araújo *et al.*, 2012). Entretanto, até o momento, há pouca informação a respeito das proteases salivares de triatomíneos e dos seus papéis no repasto sanguíneo e na transmissão do *T. cruzi* para seus hospedeiros vertebrados.

1.7 Proteases

As proteases ou peptidases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas em sequências de resíduos de aminoácidos, uma reação importante tanto para os processos fisiológicos quanto patológicos (Motwani *et al.*, 2015). Quando a catálise ocorre em ligações peptídicas internas de uma proteína, elas são chamadas de endopeptidases; quando a clivagem de uma ligação peptídica ocorre na região amino (N) ou carboxi (C) terminal de uma cadeia polipeptídica, essas enzimas são denominadas exopeptidases. A classificação das proteases se dá pelo agrupamento de sequências relacionadas em famílias (Rawlings *et al.*, 2015).

Atualmente, existem sete principais famílias de proteases: aspártico, cisteíno, glutâmico, metalo, serino, treonino protease e asparagino liase, todas agrupadas de acordo com a composição molecular dos seus sítios ativos. Uma ou mais famílias podem ser agrupadas em clãs em algumas situações: 1) quando seus membros possuem relações evolutivas evidenciadas por suas estruturas terciárias; ou 2) se as

estruturas terciárias não estão disponíveis, pela ordem dos resíduos de aminoácidos no sítio catalítico e/ou pelas sequências comuns próximas a ele (Rawlings *et al.*, 2015).

As enzimas proteolíticas podem ser sintetizadas como zimogênios (precursores inativos) ou como formas inativas ligadas a inibidores naturais. Essas estratégias servem para prevenir degradação proteica indesejada, assim como para facilitar a organização espacial e temporal da atividade proteolítica. A conversão de um zimogênio em enzima ativa ocorre pela proteólise limitada e pela remoção de um segmento de ativação da sua estrutura terciária dentro de um compartimento subcelular apropriado ou no ambiente extracelular. A proteólise do segmento de ativação pode ser realizada por outra peptidase ou por autocatálise, requerendo, por exemplo, a acidificação do pH (Khan e James, 1998).

Para manter a hemostasia, as vias de coagulação e fibrinolítica regulam o reparo vascular formando ou degradando fibrina, respectivamente (Versteeg *et al.*, 2013). Os zimogênios de proteases coagulantes e fibrinolíticas circulantes no sangue penetram nos tecidos danificados em decorrência da ruptura vascular e são ativados para iniciarem a coagulação ou fibrinólise. Uma protease da família serino envolvida em processos fisiológicos e patológicos, incluindo a coagulação, a ativação das vias clássica e alternativa do sistema complemento (Ghebrehiwet *et al.*, 1981; Toossi *et al.*, 1992; Phipps *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2009) e presente no sangue e tecidos é a calicreína, pertencente ao sistema calicreína-cinina. A calicreína plasmática, entre outras funções, também está envolvida na liberação de elastase por neutrófilos e na conversão da pró-uroquinase em uroquinase para iniciar a fibrinólise (Kaplan *et al.*, 1972; Discipio, 1982; Wachtfogel *et al.*, 1983; Ichinose *et al.*, 1986), e assim manter o sangue fluido (Stephens *et al.*, 1999).

1.8 Proteases de artrópodes hematófagos

Recentemente, uma revisão sobre proteases de artrópodes hematófagos (Santiago *et al.*, 2017) mostrou que elas estão envolvidas no repasto sanguíneo, digestão, imunidade e na formação do embrião desses animais. As proteases digestivas realizam a digestão do sangue para fornecer a energia necessária aos processos biológicos vitais, garantindo a sobrevivência, assim como o desenvolvimento biológico e a reprodução (Sojka *et al.*, 2013). Alguns artrópodes hematófagos tendem a ingerir grande quantidade de sangue durante o repasto,

reduzindo o número de visitas ao hospedeiro e garantindo o fornecimento de nutrientes por um longo período (Lehane, 2005). Como as proteínas representam cerca de 95 % do sangue (Lehane, 2005), 80% desse total são albumina e hemoglobina, é necessário que esses animais apresentem proteases como as principais enzimas para digerir o sangue (Lehane, 2005; Sojka *et al.*, 2016). As principais proteases descritas em triatomíneos, mosquitos e carrapatos pertencem às famílias serino, metalo, cisteíno e aspártico proteases. Elas foram encontradas em locais diferentes como saliva, intestino, hemolinfa, tecido adiposo, entre outros (Santiago *et al.*, 2017).

1.9 Justificativa

Uma das prioridades em pesquisas voltadas para a Doença de Chagas é o estudo dos vetores e de suas características visando o controle vetorial e consequentemente, da transmissão da doença por essa via. O perfil de atividades proteolíticas presente na saliva de vetores da Doença de Chagas não foi investigado. Sabe-se ainda que algumas moléculas salivares podem ser mais ou menos expressas de acordo com o tempo decorrido após um repasto sanguíneo (Santiago *et al.*, 2017). Portanto, a investigação de atividades proteolíticas na saliva de *R. neglectus*, uma das espécies de ocorrência no cerrado e de *R. prolixus*, uma das principais espécies transmissoras do *T. cruzi*, em diferentes períodos após o repasto sanguíneo é importante para auxiliar a compreensão do papel biológico das proteases nesse processo e a identificação de possíveis alvos moleculares para o controle vetorial.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar a atividade proteolítica na saliva de triatomíneos adultos das espécies *R. prolixus* e *R. neglectus* em diferentes tempos após o repasto sanguíneo, usando análises zimográficas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e ensaios de atividade em solução.

2.2 Objetivos específicos

1. Realizar a manutenção das colônias de *R. prolixus* e *R. neglectus*;

2. Dissecar as glândulas salivares e obter o conteúdo salivar dos triatomíneos;
3. Testar a atividade colagenolítica das salivas 5, 12 e 20 dias após o repasto sanguíneo; e
4. Testar a atividade enzimática sobre o substrato fluorogênico sintético da calicreína plasmática na ausência e presença de inibidores de proteases 5, 12 e 20 dias após o repasto sanguíneo.

3 METODOLOGIA

3.1 Manutenção das colônias de triatomíneos e dissecação das glândulas salivares

3.1.1 Triatomíneos

Os triatomíneos das espécies *R. neglectus* e *R. prolixus* são provenientes de colônias mantidas no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, onde são conservados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, com umidade relativa de $70 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12h. Para o trabalho, os insetos adultos de ambos os sexos foram utilizados aos 5, 12 e 20 dias após o repasto sanguíneo em galinhas, *Gallus gallus domesticus*.

3.1.2 Obtenção da saliva e quantificação

Para obtenção das glândulas salivares, os triatomíneos foram anestesiados por resfriamento a -20°C por 5 min e posteriormente cada um foi posicionado ventralmente em uma lâmina de vidro. Com auxílio de um estereomicroscópio, a cabeça foi deslocada com uma pinça cirúrgica a fim de expor o par de glândulas salivares que foi rinsado em 1 mL de água milliQ gelada (4°C), coletado e colocado na parede interna de um microtubo contendo 50 μL de água milliQ gelada (4°C). Cada glândula foi perfurada com o auxílio de uma agulha para liberação da saliva no tubo. Pools de 10 glândulas salivares de cada espécie de triatomíneo foram coletados nos diferentes períodos após o repasto. Em seguida, os homogeneizados de saliva foram centrifugados a $16.000 \times g$ por 15 min a 4°C para a remoção do material insolúvel. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos e utilizados nos experimentos ou estocados a -80°C até o uso.

As amostras foram quantificadas em nanodrop (NanoDrop™ Lite Spectrophotometer, Thermo Scientific™), seguindo as instruções do fabricante. Cada par de glândulas de *R. prolixus* continha aproximadamente 50 μg de proteínas e cada par de *R. neglectus* continha aproximadamente 25 μg de proteínas.

3.2 Análise em SDS-PAGE

A fim de avaliar o perfil proteico salivar de *R. prolixus* e *R. neglectus*, os extratos salivares obtidos em diferentes momentos após o repasto sanguíneo foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (Laemmli, 1970). Foi adicionado às amostras tampão de amostra (Tris 125 mM pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,002%). As amostras foram

fervidas por 5 min e aplicadas em gel SDS-PAGE 10%. Foram aplicados ~50 µg e ~25 µg de cada amostra de *R. prolixus* e *R. neglectus*, respectivamente, por poço do gel. A eletroforese foi realizada em TA. Após a eletroforese, o gel foi corado com uma solução contendo Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2%, metanol 40% e ácido acético 10% por 2h e descorado com solução contendo metanol 30% e ácido acético 10% de 30-45 min. As massas moleculares das proteases foram estimadas por comparação com o padrão de massas moleculares BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen™.

3.3 Zimografia

A fim de avaliar a hidrólise de gelatina em gel pelas proteases da saliva de *R. neglectus* e *R. prolixus*, os extratos salivares obtidos em diferentes momentos após o repasto sanguíneo foram submetidos à eletroforese em gel de poliácridamida 10% (Laemmli, 1970) contendo gelatina 0,1%. Às amostras salivares obtidas 5, 12 e 20 dias após o repasto sanguíneo, foi adicionado tampão de amostra (Tris 125 mM pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20% e azul de bromofenol 0,002%) sem agente redutor. As amostras foram mantidas a TA por 10 min e aplicadas em gel SDS-PAGE 10% copolimerizado com gelatina porcina 0,1%. Foram aplicadas as proteínas equivalentes a 1 par de glândulas de *R. prolixus* (~50 µg) e 2 pares de glândulas de *R. neglectus* (~50 µg), de cada período após o repasto sanguíneo por poço do gel sem fervura e a amostra utilizada como controle positivo foi saliva humana contendo 60 µg de proteínas, não fervida. Além do exposto, para avaliar a termoestabilidade das amostras, as mesmas foram fervidas por 5 min na ausência de agente redutor e analisadas. A eletroforese foi realizada a 4 °C com voltagem constante de 90 V. Após a eletroforese, o gel foi lavado duas vezes em 100 mL de Tris-HCl 100 mM pH 7,5 contendo Triton X-100 2,5%, com agitação leve, por 30 min a TA. Em seguida, para a detecção das atividades proteolíticas, o gel foi incubado em 100 mL do tampão de reação Tris-HCl 100 mM, pH 7,5 por 16h a 37° C. O gel foi corado com uma solução contendo Coomassie Blue R-250 0,2%, metanol 40% e ácido acético 10% por 2h e descorado com solução contendo metanol 30% e ácido acético 10% por pelo menos 30 min, ou até ser possível visualizar as bandas com atividade. As áreas com atividade proteolítica apareceram como bandas claras contra um fundo azul escuro (Liotta e Stetler-Stevenson, 1990). As massas moleculares das proteases foram estimadas por comparação com o padrão de massas moleculares

utilizado BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen™ ou PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific™. Os experimentos foram repetidos 3 vezes independentemente.

3.4 Ensaio enzimático em solução

As atividades proteolíticas presentes na saliva dos triatomíneos foram avaliadas em solução utilizando o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC. Os ensaios foram realizados em triplicata. As reações foram iniciadas diluindo-se o homogeneizado de saliva proveniente de um par de glândulas em Tris-HCl 100 mM pH 7,5 na ausência de inibidores de proteases. Em seguida, adicionou-se 10 µL de uma solução estoque do substrato para obtenção de uma concentração final de 20 µM em um volume final de 100 µL. A intensidade da fluorescência foi medida a cada 1 min durante 30 min por espectrofluorometria (SpectraMax, Molecular Devices, CA) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 360 e 460 nm, respectivamente. Para obtenção dos brancos, o substrato foi diluído nos tampões de reação sem a presença da saliva. Esse valor foi automaticamente descontado pelo *software* do espectrofluorômetro no momento da aquisição dos dados. Todos os ensaios foram realizados a 37 °C.

3.5 Ensaio de inibição das atividades proteolíticas

Os efeitos de inibidores de proteases sobre as atividades proteolíticas presentes na saliva dos triatomíneos foram avaliados *in vitro* com a utilização do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC. Os ensaios foram realizados em triplicata. As reações foram iniciadas diluindo-se o homogeneizado de saliva proveniente de um par de glândulas em Tris-HCl 100 mM pH7,5 na presença dos seguintes inibidores de proteases: 1) TLCK 100 µM; 2) TPCK 100µM; 3) fenantrolina 10mM; e 4) Pepstatina A 10µM. Em seguida, 10 µL de uma solução estoque do substrato Z-Phe-Arg-AMC para obtenção de uma concentração final de 20 µM em um volume final de 100 µL foram adicionados ao ensaio. A intensidade da fluorescência foi medida conforme descrito no item anterior. Os controles sem saliva, sem inibidores, sem substrato foram realizados. Todos os ensaios foram realizados a 37 °C. Para as análises estatísticas, foi realizado o teste *t* de Student.



Figura 6. Representação esquemática das etapas realizadas durante o estudo.

4 RESULTADOS

4.1 Perfil proteico das salivas de *R. prolixus* e *R. neglectus*

As proteínas totais das salivas de *R. prolixus* e *R. neglectus* foram analisadas em gel SDS-PAGE corado por Coomassie Blue e apresentaram perfis proteicos amplos e similares (Figura 7). Pelo menos dez bandas de proteínas salivares foram visualizadas para ambas as espécies. Os pesos moleculares dessas bandas foram estimados em 80, 75, 65, 45, 42, 38, 32, 30, 26 e 23 kDa, consecutivamente, sendo que a maioria das proteínas se concentrou entre 20-30 kDa. Na saliva de *R. prolixus* coletada 20 dias após o repasto sanguíneo é possível observar uma banda de ~30 kDa e outra de ~80 kDa que não foram observadas nos outros dois períodos. Na saliva de *R. neglectus* coletada 20 dias após o repasto sanguíneo é possível observar uma diminuição da banda de ~80 kDa em comparação com os outros dois períodos. As amostras de saliva coletadas 20 dias após o repasto sanguíneo (Figura 7) diferiram levemente das amostras coletadas 5 e 12 dias após o repasto sanguíneo em ambas as espécies e entre as espécies.

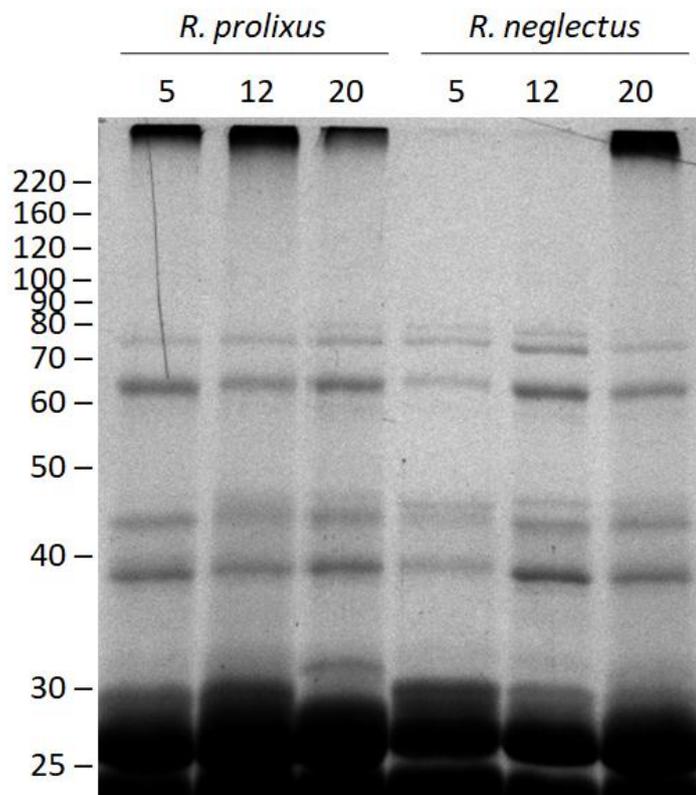


Figura 7. Comparação dos perfis proteicos salivares de *R. prolixus* e *R. neglectus* de 05, 12 e 20 dias após o repasto sanguíneo em gel de poliácridamida 10%. Os números à esquerda indicam as massas moleculares em kDa. Os números acima representam os dias após o repasto.

4.2 Atividade colagenolítica das salivas de *R. prolixus* e *R. neglectus*

O perfil proteolítico da saliva de *R. prolixus* coletada 5 dias após o repasto sanguíneo consiste de pelo menos seis bandas de aproximadamente 20 a 60 kDa., onde é possível observar sobreposição das bandas entre 20 e 30 kDa (Figura 8). Curiosamente, a amostra de saliva que foi fervida também apresentou atividade proteolítica, com uma banda intensa de 30 kDa e outra de menor intensidade de 70 kDa. A banda de 30 kDa também foi visualizada nas amostras de saliva não fervidas, embora em menor intensidade, enquanto que a banda de 70 kDa não foi visualizada em nenhuma das concentrações de saliva não fervida testadas. Esse perfil proteolítico da saliva de *R. prolixus* foi alterado 12 (Figura 8) e 20 dias após o repasto sanguíneo (Figura 8). Nesses períodos foi possível identificar atividade proteolítica apenas para as bandas de 20 e 30 kDa. As amostras fervidas de saliva de 12 e 20 dias após o repasto sanguíneo também apresentaram atividade proteolítica na altura de 30 kDa.

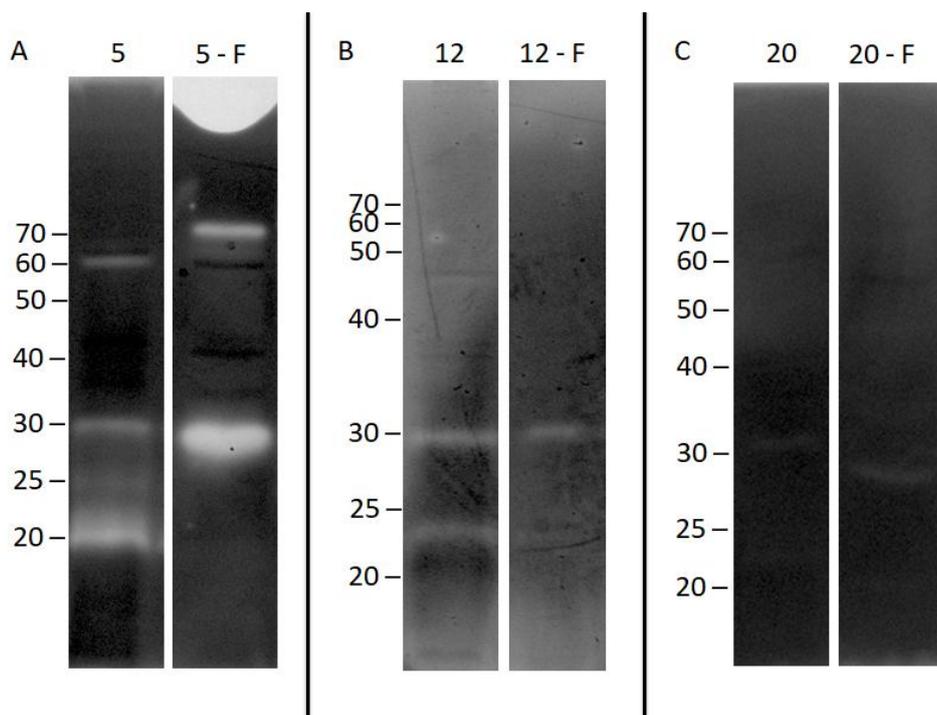


Figura 8. Atividade proteolítica salivar em gel de *R. prolixus* em diferentes dias após o repasto sanguíneo. Os números à esquerda indicam as massas moleculares em kDa. Os números acima indicam os dias após o repasto sanguíneo. A letra “F” indica a amostra fervida de seu respectivo dia. Cada poço continha ~50 ug de proteínas salivares. O marcador de peso molecular utilizado foi BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen™.

A amostra de saliva de *R. neglectus* cinco dias após o repasto sanguíneo, tanto não fervida como fervida, apresentou apenas uma banda de aproximadamente

25 kDa com atividade proteolítica (Figura 9). Esse perfil proteolítico da saliva de *R. neglectus* foi alterado 12 e 20 dias após o repasto sanguíneo (Figura 9). Doze dias após o repasto sanguíneo foi possível identificar atividade proteolítica para as bandas de ~20, ~30 e 55 kDa. Já 20 dias após o repasto sanguíneo a banda de 55 kDa não foi visualizada. As amostras fervidas de saliva de 12 e 20 dias após o repasto sanguíneo apresentaram atividade proteolítica nas alturas de 35 kDa e 70 kDa (Figura 9).

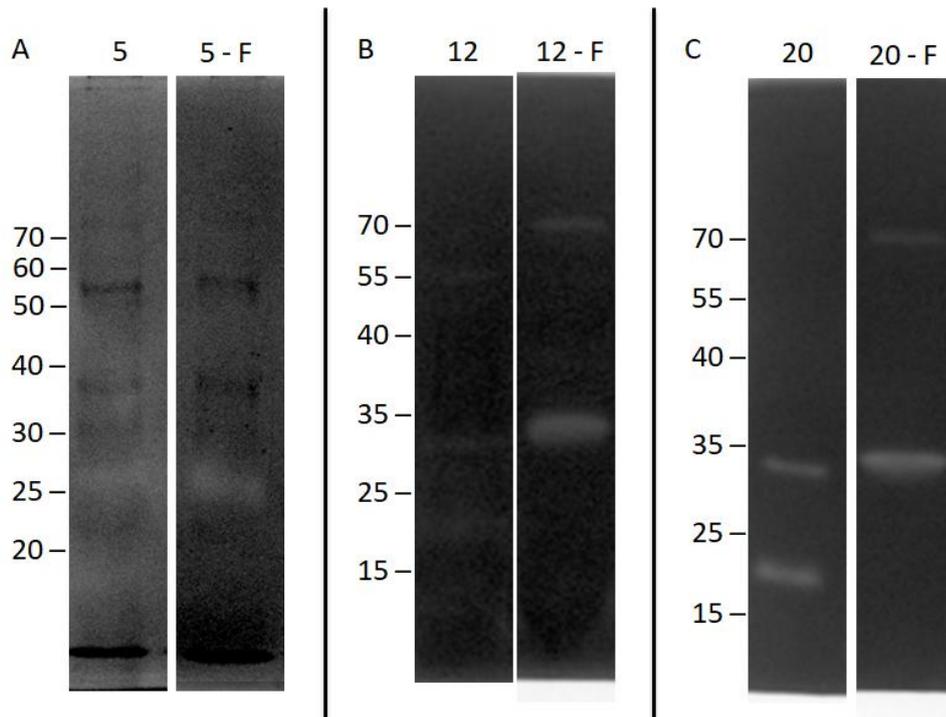


Figura 9. Atividade proteolítica em gel salivar de *R. neglectus* em diferentes dias após o repasto sanguíneo. Os números à esquerda indicam as massas moleculares em kDa. Os números acima indicam os dias após o repasto sanguíneo. A letra “F” indica a amostra fervida de seu respectivo dia. Cada poço continha ~50 ug de proteínas salivares, com exceção de 5 dprs, que continha ~25 ug. Os marcadores de peso molecular utilizados foram BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen™ e PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific™ em A, e em B e C, respectivamente.

4.3 Atividade enzimática e perfil de inibição sobre o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC

Visando identificar nas salivas de *R. prolixus* e *R. neglectus* uma atividade enzimática semelhante à de calicreína plasmática, as proteínas presentes nas salivas dos triatomíneos foram incubadas com o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC, inicialmente na ausência de inibidores de proteases. O peptídeo Z-Phe-Arg-AMC foi hidrolisado por todas as amostras de saliva, independente da espécie, entretanto houve variação de acordo com o período após o repasto sanguíneo,

sendo a atividade máxima, entre os três períodos, observada 20 dias após o repasto sanguíneo (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade enzimática presente nas salivas de *R. prolixus* e *R. neglectus* sobre o peptídeo fluorogênico sintético Z-Phe-Arg-AMC.

Amostra	Atividade (Vmax - U/seg)	Atividade relativa (%)
<i>R. prolixus</i>		
5 dias após o repasto sanguíneo	1,30	29
12 dias após o repasto sanguíneo	1,90	42
20 dias após o repasto sanguíneo	4,51	100
<i>R. neglectus</i>		
5 dias após o repasto sanguíneo	1,58	36
12 dias após o repasto sanguíneo	1,34	30
20 dias após o repasto sanguíneo	4,47	100

U/seg = unidades de fluorescência liberadas por segundo.

A concentração de proteínas nas amostras de saliva nos diferentes períodos após o repasto sanguíneo foi diretamente proporcional à atividade proteolítica para ambas as espécies de *Rhodnius* (Figura 10).

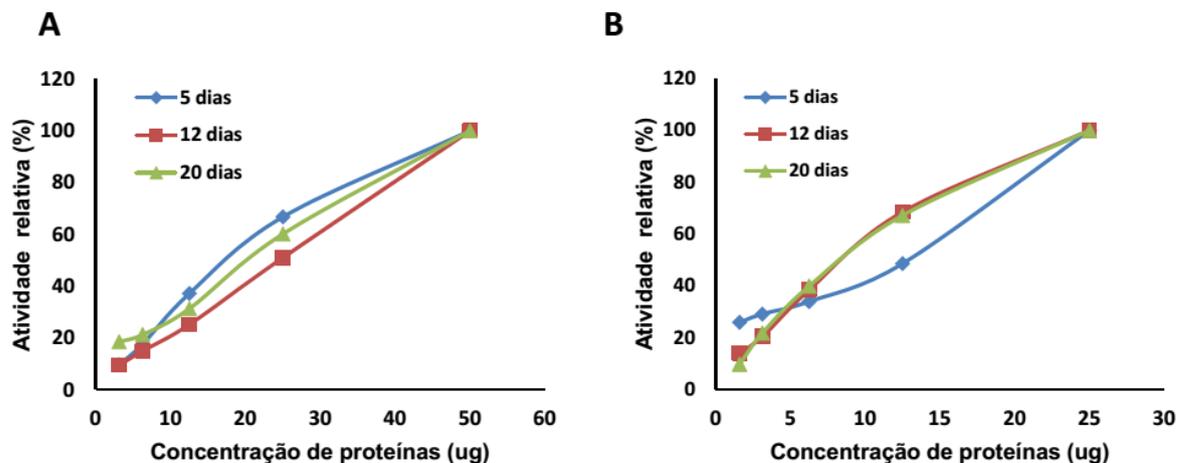


Figura 10. Influência da concentração de proteínas da saliva de *R. prolixus* (A) e *R. neglectus* (B) na proteólise do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC. O ensaio foi realizado em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, em triplicata. Os dados são apresentados em atividade relativa (%).

A atividade enzimática sobre o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC, também foi avaliada na presença de inibidores de proteases. Não houve inibição significativa da atividade sobre esse peptídeo por nenhum dos inibidores testados em nenhum dos períodos avaliados para a saliva de *R. prolixus*, com exceção da

fenantrolina que foi responsável por 48,86% da inibição ($p=0,001$) 20 dias após o repasto sanguíneo. Surpreendentemente, a fenantrolina aumentou em 37,68% ($p=0,0001$) a atividade 12 dias após o repasto sanguíneo (Figura 11). Resultados semelhantes foram observados para a saliva de *R. neglectus* (Figura 12). A fenantrolina também aumentou a atividade 5 (65,24%, $p=0,0001$) e 12 (72,91%, $p=0,0008$) dias após o repasto sanguíneo e foi responsável por 38,43% de sua inibição ($p=0,003$) 20 dias após a alimentação (Figura 10).

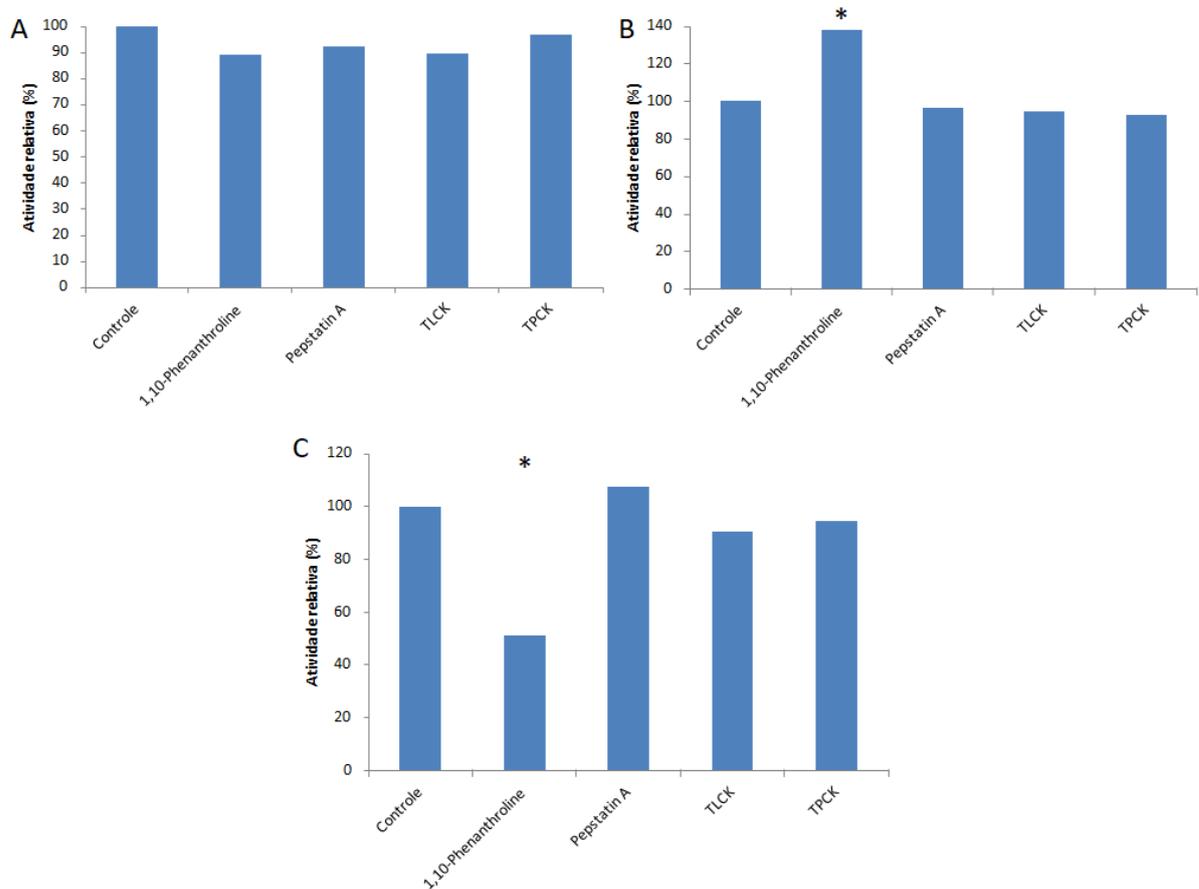


Figura 11. Atividade proteolítica sobre o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC na saliva de *R. prolixus* 5 (A), 12 (B) e 20 (C) dias após o repasto sanguíneo na presença de inibidores de proteases. Não houve diferença significativa, com exceção da fenantrolina 12 (aumento, $p=0,0001$) e 20 (diminuição, $p=0,001$) dias após o repasto sanguíneo.

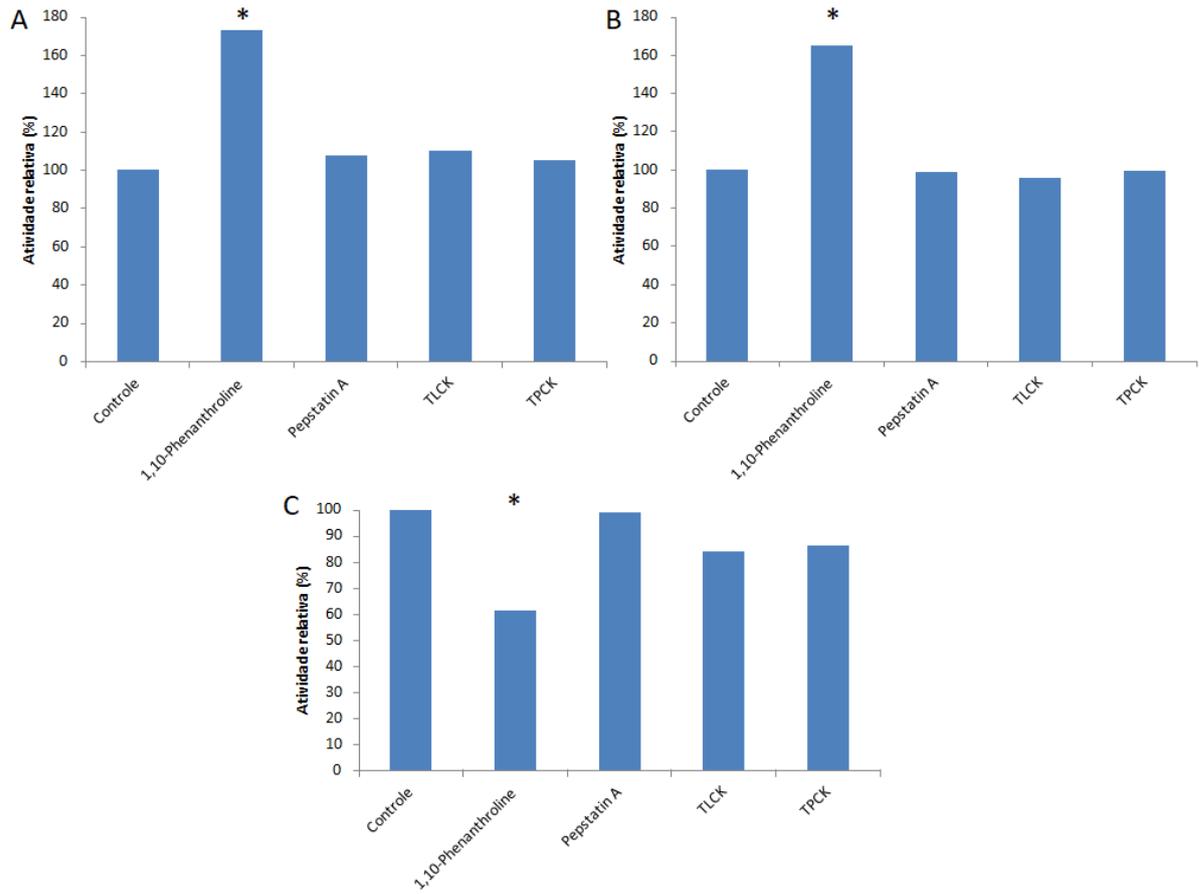


Figura 12. Atividade proteolítica sobre o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC na saliva de *R. neglectus* 5 (A), 12 (B) e 20 (C) dias após o repasto sanguíneo na presença de inibidores de proteases. Não houve diferença significativa, com exceção da fenantrolina que 5 (aumento, $p=0,0001$), 12 (aumento, $p=0,0008$) e 20 (diminuição, $p=0,003$) dias após o repasto sanguíneo.

5 DISCUSSÃO

As proteases de artrópodes hematófagos vetores de doenças atuam em diversos processos biológicos. Na saliva desses animais têm sido descritos RNAs mensageiros que codificam para proteases, embora a presença dessas sequências nucleotídicas não seja garantia de que as proteases sejam realmente expressas (Santiago *et al.*, 2017). No entanto, apesar das informações ainda serem escassas, algumas proteases salivares de triatomíneos hematófagos vetores da Doença de Chagas têm sido descritas (Amino *et al.*, 2001; Meiser *et al.*, 2010; Santiago *et al.*, 2016) que poderiam, talvez, influenciar a competência desses vetores para transmitir o *T. cruzi* aos seus hospedeiros vertebrados.

Nas espécies de triatomíneos pertencentes à tribo Triatomini, cinco transcritos que codificam serino proteases foram identificados no sialotranscriptoma de *Triatoma brasiliensis* (Santos *et al.*, 2007), cinco no de *Triatoma matogrossensis* (Assumpção *et al.*, 2012), três que codificam versões truncadas de uma serino protease do tipo tripsina e seis sequências codificantes para serino proteases no de *Panstrongylus megistus* (Ribeiro *et al.*, 2015). Para esta última espécie, Meiser *et al.* (2010) haviam descrito uma serino protease salivar com atividade fibrinolítica e denominaram o gene que codifica essa protease de PmSgP1. Ribeiro *et al.* (2015) confirmaram a sua presença no sialotranscriptoma realizado para esta espécie.

Na saliva de *T. infestans*, Amino *et al.* (2001) purificaram e caracterizaram uma serino protease do tipo tripsina, à qual denominaram triapsina. Ela é sintetizada e estocada como um zimogênio no conteúdo salivar do par D2 de glândulas salivares de *T. infestans* e é ativada no momento da ejeção da saliva durante a picada do triatomíneo. A triapsina perde sua atividade após a incubação com agente redutor, o que indica que a presença de pontes dissulfeto é essencial para sua atividade. Essa protease cliva gelatina e substratos fluorogênicos sintéticos com preferência para resíduos de arginina na posição P1 do sítio de clivagem. Posteriormente, Assumpção *et al.* (2008) confirmaram a presença dessa enzima no sialotranscriptoma dessa espécie. Assumpção *et al.* (2012) e Ribeiro *et al.* (2015) também identificaram dois transcritos que codificam metaloproteases na saliva de *T. matogrossensis* e *P. megistus*; respectivamente.

Entre os sialomas de triatomíneos descritos (Assumpção *et al.*, 2008; Assumpção *et al.*, 2011; Santiago *et al.*, 2016), apenas no sialoma de *R. neglectus*,

além dos transcritos identificados codificando para serino proteases e metaloproteases, essas peptidases também foram identificadas na análise proteômica realizada (Santiago *et al.*, 2016). Por esse motivo, optou-se pelas estratégias metodológicas realizadas nesse estudo.

A análise do padrão de bandas após a eletroforese não revelou muitas alterações importantes do conteúdo proteico salivar nos diferentes períodos após o repasto sanguíneo para cada espécie estudada, e nem entre as duas espécies. Apenas duas bandas proteicas de aproximadamente 80 kDa e 32 kDa foram diferencialmente visualizadas na amostra de saliva de *R. prolixus* coletada 20 dias após o repasto sanguíneo em comparação com as amostras de 5 e 12 dias após o repasto sanguíneo da mesma espécie. Essas bandas podem representar: 1) proteínas que estavam presentes nos outros dois períodos em concentrações inferiores dificultando a detecção por Coomassie; 2) proteínas que foram sintetizadas recentemente em decorrência da fome/jejum; e 3) proteínas que foram convertidas em outros peptídeos nos dois períodos anteriores. A banda de 32 kDa é mais intensa que a de 80 kDa e poderia vir a ser recortada do gel para identificação das proteínas por espectrometria de massas. Das duas, apenas a banda de 80 kDa está presente nas três amostras salivares de *R. neglectus*. A similaridade entre os perfis proteicos das duas espécies está de acordo com a análise comparativa realizada utilizando o programa blastp por Santiago *et al.* (2016), que demonstraram que ambas as espécies estudadas aqui apresentam no mínimo 80% de identidade entre suas sequências salivares.

A ideia de estudar a expressão proteica e a presença de proteases em diferentes períodos após a alimentação sanguínea surgiu em decorrência do fato que os triatomíneos ficam digerindo o sangue ingerido na primeira semana após o repasto. Uribe (1926) mostrou que os adultos de *R. prolixus* procuraram se alimentar a cada 15 dias, em média, após a ecdise, e que uma fêmea conseguiu sobreviver por sete meses sem se alimentar. Uribe (1926) e Guerenstein e Núñez (1994) também mostraram que as ninfas de *R. prolixus* conseguem ficar muitas semanas sem realizar o repasto: as ninfas de 5^o estágio podem ficar sem se alimentar por 19 semanas após sua ecdise. Desta forma, esperava-se que as proteases salivares destes triatomíneos ficassem mais ativas proporcionalmente ao tempo sem alimentação, não sendo necessária a secreção dessas proteases na saliva até por

volta do 12^o dia após o repasto sanguíneo, como se pretendeu analisar neste trabalho.

Foi observada uma diferença na concentração de proteínas por par de glândulas salivares entre as duas espécies de *Rhodnius* estudadas, sendo que *R. neglectus* apresentou aproximadamente metade da concentração de proteínas observada nas glândulas salivares de *R. prolixus*. Essa diferença pode ser devida ao hábito alimentar. *R. prolixus* é mais comumente encontrado em ambiente peridoméstico, enquanto que *R. neglectus* é predominantemente silvestre, onde está mais associado com aves do que mamíferos. Hipótese semelhante foi levantada por Assumpção *et al.* (2011) ao compararem o sialotranscriptoma de *Dipetalogaster maxima* com o de *Triatoma infestans*, sendo que este se alimenta de sangue de mamíferos e o outro de lagartos. Embora pertençam a uma mesma tribo, algumas famílias de proteínas salivares não foram encontradas no sialoma de *D. maxima* em comparação com o de *Triatoma*.

Na busca por proteases na saliva de *R. prolixus* e *R. neglectus*, foi observada atividade proteolítica em géis SDS-PAGE contendo gelatina. Uma amostra de saliva de cada período após a alimentação sanguínea foi diluída em tampão de amostra contendo agente redutor e em seguida, fervida. Essas amostras não apresentaram atividade colagenolítica (dados não mostrados). Portanto, a presença de pontes dissulfeto deve ser essencial para as atividades proteolíticas observadas em gel com gelatina. As bandas de proteínas salivares de *R. prolixus* que apresentaram atividade proteolítica possuem aproximadamente 20, 25, 30 e 60 kDa. Quando as amostras foram desnaturadas por fervura, duas bandas bem delimitadas de aproximadamente 30 e 70 kDa foram visualizadas, sugerindo a presença de proteases termoestáveis.

As mesmas bandas com atividade colagenolítica observadas para *R. prolixus* foram observadas nas amostras salivares de *R. neglectus*, embora aparentemente em menor intensidade. Não foi possível fazer um paralelo entre as bandas com atividade colagenolítica e as bandas de proteínas observadas no SDS-PAGE corado por Coomassie. Essa dificuldade pode ser devida ao fato de que: 1) a presença de gelatina pode afetar a mobilidade da proteína (Almeida *et al.*, 2002); 2) o ensaio proteolítico em gel com gelatina é altamente sensível e capaz de detectar níveis picomolares de enzimas (Kelleher e Juliano, 1984), não visualizados por coloração por Coomassie; 3) as bandas com atividade proteolítica têm um peso molecular

maior, provavelmente devido ao fato de que durante o preparo da amostra, as proteínas não são completamente desnaturadas nem reduzidas, pois o tampão não contém agente redutor (nem mesmo nas amostras fervidas) possibilitando agregação proteica e/ou oligomerização, que diminui a velocidade da migração eletroforética. Por esse motivo a massa molecular aparente das proteases pode ser maior na I zimografia em gel (Borges-Veloso *et al.*, 2012; Dias-Lopes *et al.*, 2015). Esse fato também foi visualizado quando Amino *et al.* (2001) caracterizaram a tripsina; essa protease apresentou aproximadamente 40 kDa no gel SDS sem agente redutor e 33 kDa no gel SDS com agente redutor. As atividades proteolíticas das proteínas presentes nas bandas observadas não são dependentes de íons divalentes, uma vez que foram detectadas em tampão que não os continha.

A atividade enzimática presente nas salivas de *R. prolixus* e *R. neglectus* foi analisada sobre um peptídeo fluorogênico sintético contendo um resíduo de arginina na posição P1 do sítio de clivagem, o substrato Z-Phe-Arg-AMC de caliceínas. Esses ensaios foram realizados também na presença de inibidores de proteases. Os inibidores de serino proteases testados TLCK (capaz de inibir serino protease do tipo tripsina) e TPCK (capaz de inibir serino protease do tipo quimiotripsina) (Beynon e Bond, 2001), não reduziram significativamente a atividade enzimática sobre o substrato testado. Os inibidores específicos de serino proteases PMSF e AEBSF ainda serão testados. Dessa forma, não foi possível confirmar o achado de Santiago *et al.* (2016) no que concerne à presença de uma serino protease na saliva de *R. neglectus*. A atividade enzimática sobre Z-Phe-Arg-AMC também não foi inibida na presença de pepstatina A, um inibidor de aspártico proteases do tipo pepsina, quimosina, catepsina D e renina. Entretanto, foi inibida na presença de fenantrolina, um inibidor de metaloproteases, no período de 20 dias após o repasto sanguíneo em ambas as espécies.

A atividade enzimática da saliva de *R. neglectus* foi testada sobre os substratos fluorogênicos Arg-Arg-AMC, Suc-Gly-Pro-AMC, N-Suc-Gly-Pro-AMC, N-Suc-Leu-Tyr-AMC, Gly-Arg-AMC, N-Gly-Gly-Arg-AMC e N-Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC. A atividade proteolítica foi maior sobre os dois últimos substratos, o primeiro para serino proteases do tipo tripsina e o segundo para serino proteases do tipo quimiotripsina e calpaínas. A atividade enzimática foi inibida por EDTA, inibidor de metaloproteases e E-64, inibidor de cisteíno proteases (Martins, 2014; dados não publicados).

Uma hipótese a ser considerada acerca da potência das atividades proteolíticas salivares em artrópodes hematófagos é a de que as proteases não são ativas em sua totalidade nas condições testadas, embora durante o repasto sanguíneo sua atividade possa ser ótima. Saboia-Vahia *et al.* (2014) sugeriram essa hipótese ao identificar um gene para quimotripsina por espectrometria de massa (MS/MS) no intestino médio de *Aedes albopictus*, cuja proteína e atividade enzimática não conseguiram identificar por zimografia em gel.

O papel dessas proteases de triatomíneos ainda não é muito claro no repasto sanguíneo, apesar de terem sido descritas serino proteases com atividade fibrinolítica (Amino *et al.*, 2001; Meiser *et al.*, 2010). Entretanto, essa atividade não é muito elevada, mas elas podem atuar como ativadoras de outros zimogênios que ficam estocados no lúmen das glândulas salivares dos triatomíneos (Amino *et al.*, 2001) e/ou prolongar ligeiramente o tempo de coagulação (Meiser *et al.*, 2010).

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram identificar bandas que contêm proteínas que apresentam atividade gelatinolítica em SDS-PAGE e atividade enzimática em solução sobre um peptídeo fluorogênico sintético específico para calicreína plasmática, uma serino protease que tem como uma de suas funções manter a fluidez do sangue ativando a cascata de fibrinólise. Os resultados sugerem que a primeira atividade possa ser devido à presença de proteases da família das metaloproteases, enquanto que a segunda possa indicar a presença de serino proteases, ambas as famílias nas salivas de *R. prolixus* e *R. neglectus*. O fato dessas proteases serem possivelmente liberadas no sítio da picada sugere que elas apresentem uma função no repasto sanguíneo.

7 PERSPECTIVAS

1. Testar os efeitos de diferentes inibidores de proteases sobre a atividade gelatinolítica. As amostras de saliva serão diluídas em tampão de amostra contendo os diferentes inibidores de proteases antes de serem separadas por eletroforese. Após as lavagens para retirada do SDS, os géis serão incubados em tampão de atividade contendo os inibidores nas mesmas concentrações utilizadas;
2. Testar a inibição da atividade enzimática sobre Z-Phe-Arg-AMC por inibidores específicos de serino proteases, por exemplo, PMSF e AEBSF;
3. Testar a atividade enzimática sobre outros peptídeos fluorogênicos sintéticos na ausência e presença de inibidores de proteases para determinar as classes de proteases presentes nas salivas das duas espécies estudadas;
4. Identificar as proteínas presentes na banda de 32 kDa por espectrometria de massas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. et al. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. **Toxicon**, v. 40, n. 7, p. 1041-1045, 2002. ISSN 0041-0101.

ALMEIDA, P. S. D. et al. Levantamento da fauna de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) em ambiente domiciliar e infecção natural por Trypanosomatidae no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 374-380, 2008. ISSN 0037-8682.

AMINO, R.; TANAKA, A. S.; SCHENKMAN, S. Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Biochem Mol Biol**, v. 31, n. 4-5, p. 465-72, Mar 2001. ISSN 0965-1748. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222956> >.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada – **RDC nº 153**, de 14 de junho de 2004. Disponível em: < www.sbpc.org.br/upload/noticias_gerais/320100416113458.pdf >. Acesso em 03 de abril de 2017.

ASSUMPÇÃO, T. C. et al. Insight into the salivary transcriptome and proteome of *Dipetalogaster maxima*. **Journal of proteome research**, v. 10, n. 2, p. 669-679, 2011. ISSN 1535-3893.

_____. An insight into the sialotranscriptome of *Triatoma matogrossensis*, a kissing bug associated with fogo selvagem in South America. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 6, p. 1005-1014, 2012. ISSN 0002-9637.

_____. An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 2, p. 213-232, 2008. ISSN 0965-1748.

BARATA, J. M. S. Aspectos morfológicos de ovos de triatominae: II- Características macroscópicas e exocoriais de dez espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera-Reduviidae). **Revista de Saúde pública**, v. 15, n. 5, p. 490-542, 1981. ISSN 1518-8787.

BARRETT, T. V. Current research on Amazonian Triatominae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 441-447, 1988. ISSN 0074-0276.

BEYNON, R.; BOND, J. S. **Proteolytic Enzymes: A Practical Approach**. Second Edition. New York: Oxford University Press, 2001.

BORGES-VELOSO, A. et al. Proteolytic profiling and comparative analyses of active trypsin-like serine peptidases in preimaginal stages of *Culex quinquefasciatus*. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 123, 2012. ISSN 1756-3305.

CARVALHO, D. B. et al. A novel association between *Rhodnius neglectus* and the *Livistona australis* palm tree in an urban center foreshadowing the risk of Chagas disease transmission by vectorial invasions in Monte Alto City, Sao Paulo, Brazil. **Acta tropica**, v. 130, p. 35-38, 2014. ISSN 0001-706X.

CHAMPAGNE, D. E. Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods. **Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders**, v. 4, n. 4, p. 375-396, 2004. ISSN 1568-0061.

_____. Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods. **Pathophysiol Haemost Thromb**, v. 34, n. 4-5, p. 221-7, 2005. ISSN 1424-8832. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16707932> >.

CORTEZ, M. R. et al. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae): ecology of the transmission cycle in the wild environment of the Andean valley of Cochabamba, Bolivia. **Experimental parasitology**, v. 114, n. 4, p. 305-313, 2006. ISSN 0014-4894.

COUTINHO, M.; FREIRE JR, O.; DIAS, J. C. P. The noble enigma: Chagas' nominations for the Nobel Prize. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 123-129, 1999. ISSN 0074-0276.

DA ROSA, J. A. et al. Study of the external female genitalia of 14 *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) using scanning electron microscopy. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 17, Jan 2014. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24405517> >.

DE ARAÚJO, C. N. et al. Interactome: Smart hematophagous triatomine salivary gland molecules counteract human hemostasis during meal acquisition. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 13, p. 3829-3841, 2012. ISSN 1874-3919.

DIAS-LOPES, G. et al. Expression of active trypsin-like serine peptidases in the midgut of sugar-feeding female *Anopheles aquasalis*. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 296, 2015. ISSN 1756-3305.

DISCIPIO, R. G. The activation of the alternative pathway C3 convertase by human plasma kallikrein. **Immunology**, v. 45, n. 3, p. 587-95, Mar 1982. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6916710> >.

DUJARDIN, J.-P. et al. Comparison of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Journal of medical entomology**, v. 36, n. 6, p. 653-659, 1999. ISSN 0022-2585.

DUMONTEIL, E.; HERRERA, C. Ten years of Chagas disease research: Looking back to achievements, looking ahead to challenges. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005422, 2017. ISSN 1935-2735.

DÍAZ, S. et al. Genetic, cytogenetic and morphological trends in the evolution of the *Rhodnius* (Triatominae: Rhodniini) trans-Andean group. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e87493, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24498330> >.

FORATTINI, O. P.; BARATA, J. M. S. Nota sobre a diferenciação de ovos de *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus*. **Revista de Saúde Pública**, v. 8, n. 4, p. 447-450, 1974. ISSN 1518-8787.

GHEBREHIWET, B.; SILVERBERG, M.; KAPLAN, A. P. Activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. **J Exp Med**, v. 153, n. 3, p. 665-76, Mar 1981. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7252410> >.

GUERENSTEIN, P. G.; NÚÑEZ, J. Feeding response of the haematophagous bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* to saline solutions: a comparative study. **Journal of insect physiology**, v. 40, n. 9, p. 747-752, 1994. ISSN 0022-1910.

GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in central Brazil? **Acta tropica**, v. 107, n. 2, p. 90-98, 2008. ISSN 0001-706X.

_____. Infestation of *Mauritia flexuosa* palms by triatomines (Hemiptera: Reduviidae), vectors of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian savanna. **Acta tropica**, v. 121, n. 2, p. 105-111, 2012. ISSN 0001-706X.

_____. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 6, p. 323-330, 2004. ISSN 0036-4665.

GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Sampling *Rhodnius neglectus* in *Mauritia flexuosa* palm trees: a field study in the Brazilian savanna. **Medical and veterinary entomology**, v. 17, n. 3, p. 347-350, 2003. ISSN 1365-2915.

ICHINOSE, A.; FUJIKAWA, K.; SUYAMA, T. The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. **J Biol Chem**, v. 261, n. 8, p. 3486-9, Mar 1986. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3081506> >.

KAPLAN, A. P.; KAY, A. B.; AUSTEN, K. F. A prealbumin activator of prekallikrein. 3. Appearance of chemotactic activity for human neutrophils by the conversion of human prekallikrein to kallikrein. **J Exp Med**, v. 135, n. 1, p. 81-97, Jan 1972. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5009705> >.

KELLEHER, P. J.; JULIANO, R. L. Detection of proteases in polyacrylamide gels containing covalently bound substrates. **Analytical biochemistry**, v. 136, n. 2, p. 470-475, 1984. ISSN 0003-2697.

KHAN, A. R.; JAMES, M. N. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. **Protein Science**, v. 7, n. 4, p. 815-836, 1998. ISSN 1469-896X.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> >.

LEHANE, M. J. **The Biology of Blood-Sucking in Insects**. Cambridge University Press, 2005. ISBN 9780521836081.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163, n. 3, p. 123-520, 1979.

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009. ISSN 0036-4665.

LIOTTA, L.; STETLER-STEVENSON, W. Metalloproteinases and cancer invasion. *Seminars in cancer biology*, 1990. p.99-106.

MEISER, C. et al. A salivary serine protease of the haematophagous reduviid *Panstrongylus megistus*: sequence characterization, expression pattern and characterization of proteolytic activity. **Insect molecular biology**, v. 19, n. 3, p. 409-421, 2010. ISSN 1365-2583.

MESQUITA, R. D. et al. Trypanosoma cruzi infection is enhanced by vector saliva through immunosuppressant mechanisms mediated by lysophosphatidylcholine. **Infect Immun**, v. 76, n. 12, p. 5543-52, Dec 2008. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18794282> >.

MONTEIRO, F. A. et al. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Am J Trop Med Hyg**, v. 62, n. 4, p. 460-5, Apr 2000. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11220761> >.

MOTWANI, H. V. et al. Aspartic protease inhibitors containing tertiary alcohol transition-state mimics. **European journal of medicinal chemistry**, v. 90, p. 462-490, 2015. ISSN 0223-5234.

NEVES, D. P. Parasitologia humana. 11^a. **São Paulo: Atheneu**, 2005.

OLIVEIRA, A. W. S. D.; SILVA, I. G. D. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. Suppl 2, p. 204-208, 2007.

OSTERMAYER, A. L. et al. O inquérito nacional de soroprevalência de avaliação do controle da doença de Chagas no Brasil (2001-2008). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. suppl 2, p. 108-121, 2011. ISSN 0037-8682.

PHIPPS, J. A. et al. Plasma Kallikrein Mediates Angiotensin II Type 1 Receptor–Stimulated Retinal Vascular Permeability. **Hypertension**, v. 53, n. 2, p. 175-181, 2009. ISSN 0194-911X.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001. ISSN 1473-3099.

QIN, X. P. et al. Involvement of prolylcarboxypeptidase in the effect of rutaecarpine on the regression of mesenteric artery hypertrophy in renovascular hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 36, n. 3, p. 319-324, 2009. ISSN 1440-1681.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; FINN, R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic acids research**, p. gkv1118, 2015. ISSN 0305-1048.

RIBEIRO, J. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infectious agents and disease**, v. 4, n. 3, p. 143-152, 1995. ISSN 1056-2044.

RIBEIRO, J.; SCHWARZ, A.; FRANCISCHETTI, I. A deep insight into the sialotranscriptome of the Chagas disease vector, *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Heteroptera). **Journal of medical entomology**, v. 52, n. 3, p. 351-358, 2015.

RICARDO-SILVA, A. H. et al. Correlation between populations of *Rhodnius* and presence of palm trees as risk factors for the emergence of Chagas disease in Amazon region, Brazil. **Acta tropica**, v. 123, n. 3, p. 217-223, 2012. ISSN 0001-706X.

RODRIGUES, V. L. C. C. et al. Colonization of palm trees by *Rhodnius neglectus* and household and invasion in an urban area, Araçatuba, São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 3, p. 213-218, 2014. ISSN 0036-4665.

ROSA, M. C. D. Purificação parcial e caracterização da apirase salivar de *Rhodnius prolixus*. 2014.

SABOIA-VAHIA, L. et al. The midgut of *Aedes albopictus* females expresses active trypsin-like serine peptidases. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 253, 2014. ISSN 1756-3305.

SANT'ANNA, M. C. R. V. et al. Feeding behaviour of morphologically similar *Rhodnius* species: influence of mechanical characteristics and salivary function. **Journal of insect physiology**, v. 47, n. 12, p. 1459-1465, 2001. ISSN 0022-1910.

SANTIAGO, P. B. et al. A Deep Insight into the Sialome of *Rhodnius neglectus*, a Vector of Chagas Disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 4, p. e0004581, 2016. ISSN 1935-2735.

_____. Proteases of haematophagous arthropod vectors are involved in blood-feeding, yolk formation and immunity - a review. **Parasit Vectors**, v. 10, n. 1, p. 79, Feb 2017. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28193252> >.

SANTOS, A. et al. The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 7, p. 702-712, 2007. ISSN 0965-1748.

SILVA, F. S. A importância hematofágica e parasitológica da saliva dos insetos hematófagos. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 3, n. 3, p. 4, 2009.

SOARES, R. et al. Identification of morphologically similar *Rhodnius* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by electrophoresis of salivary heme proteins. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 62, n. 1, p. 157-161, 2000. ISSN 0002-9637.

SOJKA, D. et al. New insights into the machinery of blood digestion by ticks. **Trends in parasitology**, v. 29, n. 6, p. 276-285, 2013. ISSN 1471-4922.

_____. Multienzyme degradation of host serum albumin in ticks. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, n. 4, p. 604-613, 2016. ISSN 1877-959X.

SOUZA, E. D. et al. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. n. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Pará State, Brazil. **Zookeys**, n. 621, p. 45-62, 2016. ISSN 1313-2989. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27833419> >.

STEPHENS, R. W. et al. Plasma urokinase receptor levels in patients with colorectal cancer: relationship to prognosis. **J Natl Cancer Inst**, v. 91, n. 10, p. 869-74, May 1999. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10340907> >.

STUART, K. et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301-1310, 2008. ISSN 0021-9738.

TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. D.; CERON, C. Phylogenetic approach to the study of triatomines (Triatominae, Heteroptera). **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 2B, p. 703-708, 2006. ISSN 1519-6984.

TEIXEIRA, A. Doença de Chagas e evolução. In: (Ed.). **Doença de Chagas e evolução**: Editora da UNB/Finatec, 2007.

TOOSSI, Z. et al. Induction of expression of monocyte interleukin 1 by Hageman factor (factor XII). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 24, p. 11969-72, Dec 1992. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1465426> >.

URIBE, C. On the biology and life history of *Rhodnius prolixus* Stahl. **The Journal of Parasitology**, v. 13, n. 2, p. 129-136, 1926. ISSN 0022-3395.

VERSTEEG, H. H. et al. New fundamentals in hemostasis. **Physiological reviews**, v. 93, n. 1, p. 327-358, 2013. ISSN 0031-9333.

WACHTFOGEL, Y. T. et al. Human plasma kallikrein releases neutrophil elastase during blood coagulation. **J Clin Invest**, v. 72, n. 5, p. 1672-7, Nov 1983. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6556194> >.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). **Fact sheet N 340**, 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> >. Acesso em: June 14, 2016.