

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM**  
**COORDENAÇÃO DE PESQUISAS EM ENTOMOLOGIA - CPEN**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E**  
**RECURSOS NATURAIS – PPG-BTRN**

ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE EXTRATOS DE GLÂNDULAS  
SALIVARES DE *Thyrsopelma guianense* (DIPTERA: SIMULIIDAE),  
PRINCIPAL VETOR DE *Onchocerca volvulus* (NEMATODA:  
ONCHOCERCIDAE) NO BRASIL

**ANDREZZA CAMPOS CHAGAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais – INPA / UFAM, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Entomologia.

MANAUS – AMAZONAS

2005

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM**  
**COORDENAÇÃO DE PESQUISAS EM ENTOMOLOGIA - CPEN**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E**  
**RECURSOS NATURAIS – PPG-BTRN**

ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE EXTRATOS DE GLÂNDULAS  
SALIVARES DE *Thyrsopelma guianense* (DIPTERA: SIMULIIDAE),  
PRINCIPAL VETOR DE *Onchocerca volvulus* (NEMATODA:  
ONCHOCERCIDAE) NO BRASIL

**ORIENTADOR: Dr VICTOR PY- DANIEL**

**CO-ORIENTADOR: Dr SPARTACO ASTOLFI FILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais – INPA / UFAM, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Entomologia.

MANAUS – AMAZONAS

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Chagas, Andrezza Campos

Atividade anticoagulante de extratos de glândulas salivares de *Thyrsopelma guianense* (Diptera:Simuliidae), principal vetor de *Onchocerca volvulus* (Nematoda: Onchocercidae) no Brasil / Andrezza Campos Chagas – Manaus: INPA/UFAM, 2005.

Xx + 104p

Dissertação de Mestrado

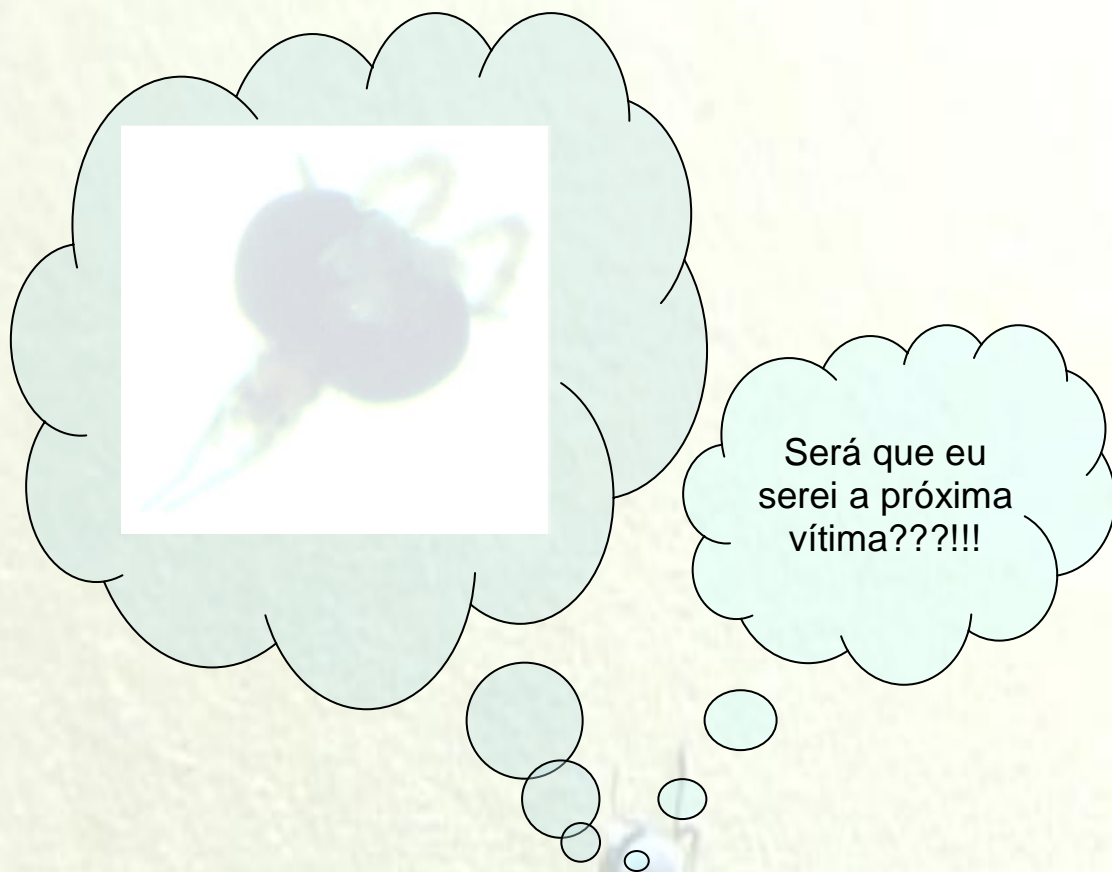
1. Simuliidae 2. *Thyrsopelma guianense* 3. Oncocercose 4. Glândulas salivares 5. Proteínas salivares 6. Anticoagulantes

**Sinopse:**

Este trabalho apresenta um levantamento pioneiro sobre as proteínas salivares presentes no principal vetor (*Thyrsopelma guianense*) da oncocercose no Brasil. A quantidade de proteína total solúvel é de 1,07µg por par de glândula, apresentando um baixo perfil protéico com 12 bandas de massas moleculares variando de 69 – 14 kDa, às quais estão presentes desde o primeiro dia de vida embora menos abundante, e não sugerem diferenciação até as primeiras 72h. Ensaios de coagulação sanguínea com extratos salivares são capazes de inibir as duas vias de coagulação (intrínseca, extrínseca e comum), prolongando o tempo de recalcificação do plasma, tempo de protrombina, tempo de trombina e tempo de tromboplastina parcial ativada.

**Palavras-chaves:** Simuliidae, *Thyrsopelma guianense*, Oncocercose, Glândulas salivares, Proteínas salivares, Anticoagulante

**Key words:** Simuliidae, *Thyrsopelma guianense*, Onchocerciasis, Salivary glands, Salivary proteins, Anticlotting



Será que eu  
serei a próxima  
vítima???!?

Chagas, 2004

À DEUS, que nunca se ausentou da  
minha vida e me segurou nos braços, nos  
momentos que eu achava que nada ia dá  
certo.....

Aos meus pais “EDSON e SANDRA” que nunca mediram esforços para que  
nunca parasse de estudar!

Aos meus irmãos (Sheila, Steffen, Edsandra e Abraão) que sempre estiveram  
presentes, me motivando a vencer as barreiras no decorrer desse mestrado!

As minhas três sobrinhas “super poderosas” (Steffany, Raquel e  
Emanuelle) que sempre me proporcionavam momentos de relaxamento com  
suas brincadeiras de criança; e a próxima que está chegando para fazer parte  
dessa família maravilhosa a que tanto amo!!!

E ao meu namorado D.A.B. Júnior por fazer parte da minha vida! !!!  
pela amizade, apoio, carinho e incentivo, sempre!

### **Dedicatória Especial**

À amiga Bióloga, Ana Cristina Rosa Guimarães, que foi para o lado de nosso Pai em 2004, desenvolver seus experimentos e escrever sua dissertação ao lado dele. Amém!

## **Agradecimentos**

À Deus;

Ao meu orientador e co-orientador, Victor Py-Daniel e Spartaco Astolfi-Filho que me ensinaram os requisitos necessários para ser uma verdadeira pesquisadora: determinação, coragem, perseverança, conhecimento e compromisso. Ensinaamentos dos quais aprendi a usá-los em cada etapa por mim enfrentada;

Ao INPA, em especial para o curso de pós-graduação em Entomologia;

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento do projeto;

Ao CNPq pela bolsa de mestrado a mim concedida;

Ao Dr. Éder Mesquita e ao Dr. Dultevir Balestrassi da mineração Taboca S/A pelo apoio logístico em Pitinga indispensável para a realização das coletas de campo;

Ao Dr. Marcos Horácio pelos ensinamentos fornecidos para o desenvolvimento do trabalho;

A Dra. Mary Cupp que me ajudou tirando dúvidas no decorrer do trabalho e incentivando a continuar nessa linha de pesquisa;

Ao Dr. Levy Gomes e MSc. Edsandra Chagas da Embrapa Amazônia Ocidental por terem me fornecido o laboratório de Piscicultura (AQUALAB) para a realização de uma parte de meus experimentos;

Ao Dr. Maia pelas dicas de laboratório sobre como trabalhar com proteínas, que Deus o guarde ao seu lado;

A minha melhor amiga e irmã SAMANTHA AQUINO PEREIRA, que esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis nesses últimos dois anos, sempre me encorajando, dando forças e enxugando as minhas lágrimas quando foi preciso;

Ao amigo e irmão, ARTUR BICELLI COIMBRA, que me incentivou desde a primeira coleta, quando “dissecar glândula de borrachudo” era algo impossível para mim;

Ao amigo, ASSIS BRITO, da mineração taboca que muito me ajudou nas coletas;

Aos Amigos JANSEN e FELIPE, por terem mostrado ser verdadeiros amigos no momento em que mais precisei;

Aos amigos do Laboratório de Filarioses e Vetores: Orlando, Ulisses, Júnior, Jorge, Maura, Hugo pela amizade, descontração, e carinho;

Aos amigos do Laboratório de Genética: Márcia, Larissa, Dina, Jonso, Francisco, Alessandra, Angela, Isabel, Elza pela amizade e pelas doações de sangue para treinamento dos ensaios;

Aos amigos do rio Jauaperi em Roraima: Sr. PAULINHO e família que me ofereceram morada durante o período que estava aprendendo a dissecar glândula de simulídeo; Ao fazendeiro Luis Osmar Carlos pelo apoio.

Aos amigos da hidrelétrica de Pitinga: ZÉ MARIA, JOSEILDO, JEAN, CAPETA, TATU, ARNALDO, Lima, Gruenzo, Francisco, Lulu, Zé Filho, Adilton, Miquéias, AMARAL, Deuzimar pela amizade, carinho, apoio, e respeito;

As amigas: Maryellen (pela força, ensinamentos e amizade), Luciana e Analú pela amizade.

A turma de mestrado: Sheila, Teiamar, Sérgio, Jorge, Joseleide, Júlia, Joana, Eneida;

E a todos que direta ou indiretamente me ajudaram nesse mestrado.

Enfim, muito obrigada!!!!!!!



## RESUMO

*Thyrsopelma guianense* (Diptera:Simuliidae) é o principal vetor da Oncocercose no único foco brasileiro (índios Yanomami e Ye'Kuana). Entretanto, já existem indícios da introdução da oncocercose na área indígena Waimiri-Atroari/ Presidente Figueiredo/AM. Essa doença está entre as principais doenças tropicais de impacto social com cerca de 18 milhões de pessoas infectadas no mundo, e como a segunda causa de cegueira depois da catarata. A doença é causada através da picada do simulídeo caso esteja infectado com o filarídeo, *Onchocerca volvulus* (Nematoda:Onchocercidae). A alimentação e transmissão são facilitadas devido à presença de uma variedade de compostos presentes na saliva, com as mais diversificadas funções biológicas: anticoagulantes, antiplaquetários, vasodilatadores, imunomoduladores, entre outras. Nesse trabalho, descrevemos um estudo pioneiro sobre as proteínas salivares do principal vetor da oncocercose no Brasil (*Thyrsopelma guianense*) sendo detectado 1,07 $\mu$ g de proteína total solúvel por par de glândula. O perfil protéico apresentou 12 polipeptídeos, com 3 bandas de massa molecular acima de 69 kDa; 2 bandas entre 69 – 45 kDa; 4 bandas entre 45 – 30 kDa (com 2 bandas abundantes, e principalmente na idade de 24 e 48h); 1 banda entre 30 – 20 kDa também abundante e 2 bandas na faixa de 20 – 14 kDa, apresentando serem proteínas pequenas, abundantes e presente até 72h. Ensaio de coagulação mostraram que extratos de glândulas salivares (EGS) atuam nas duas vias de coagulação (intrínseca, extrínseca e comum), prolongando o tempo de recalcificação do plasma, tempo de protrombina e tempo de trombina e tempo de tromboplastina parcial ativada, e que a quantidade de proteína afeta diretamente na inibição da formação do coágulo. Esse trabalho representa a primeira investigação de anticoagulantes em glândulas salivares de *Thyrsopelma guianense*, sugerindo que futuros estudos devem ser incentivados no intuito de compreender melhor as funções das proteínas salivares e assim auxiliar no entendimento dos mecanismos da alimentação sanguínea e da transmissão do parasito; gerando subsídios para futuras pesquisas de drogas que bloqueiem a transmissão das doenças tropicais e em especial, da oncocercose.

## ABSTRACT

*Thyrsopelma guianense* (Diptera:Simuliidae) is the main Onchocerciasis vector in the single Brazilian foci (Yanomani and Ye'Kuana Indians). However, there is already some evidence of the introduction of onchocerciasis in the Indian area Waimiri-Atroari/ Presidente Figueiredo/AM. This disease is among the main tropical diseases of social impact, with estimated 18 million people infected world wide, and as the second cause of blindness after cataract. The disease is caused through the bite of the simuliid infected with the filarial worm, *Onchocerca volvulus* (Nematoda:Onchocercidae). The feeding and transmission are facilitated due to the presence of a variety of compounds of the saliva, with the most diverse biological functions: anti-coagulants, anti-platelets, vase expanders, immune modulators, among others. In this work, is described a pioneer study about the salivary proteins of the main onchocerciasis vector in Brazil (*T. guianense*) in which it was detected 1.07 µg/par of gland of total soluble protein. The protein profile showed 12 polypeptides, with three bands of molecular weight above 69 kDa; two bands between 69 - 45 kDa; four bands between 45 – 30 kDa (with two abundant bands, mainly in the ages of 24 and 48 hours); one band between 30-20 kDa also abundant and two bands in the range of 20-14 kDa, small proteins, abundant and present up to 72 hours. Coagulating bioassays showed that salivary gland extracts (SGE) act in the two ways of coagulation (intrinsic, extrinsic and common), extending the plasma recalcification time, prothrombin time, thrombin time, partially activated thromboplastin time, and that the amount of protein affects directly the inhibition of the coagulate formation. This work is the first investigation of anti-coagulants in salivary glands of *Thyrsopelma guianense*, suggesting that future studies should be supported with the aim to understand the function of salivary proteins, to help in understanding the blood feeding mechanisms and the transmission of the parasite. This knowledge will be subsiding for future research of drugs that block tropical disease transmission and specially the onchocerciasis.

## ÍNDICE

### 1. Introdução

1.1. Aspectos gerais.....	01
1.2. Distribuição geográfica.....	03
1.3. Importância médica dos simúlídeos.....	06
1.4. Modo de alimentação/glândulas salivares de insetos hematófagos.....	09
1.5. Cascata de coagulação sanguínea.....	10
1.6. Importância da ação da saliva de insetos hematófagos.....	13

### 2. Objetivo

2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20

### 3. Material e Métodos

3.1. Local de coleta.....	21
3.2. Método de coleta e criação de simúlídeos .....	22
3.3. Dissecção e preparação dos extratos de glândulas salivares de <i>Thyrsopelma guianense</i> (EGS).....	23
3.4. Dosagem de proteína.....	24
3.5. Perfil eletroforético de extratos salivares em gel de poliacrilamida...	25
3.5.1. Preparação de amostras de glândulas salivares.....	27

3.5.2.	Preparação do gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	28
3.6.	Ensaio de coagulação	
3.6.1.	Plasma.....	29
3.6.2.	Tempo de recalcificação do plasma.....	29
3.6.3.	Tempo de protrombina.....	30
3.6.4.	Tempo de trombina.....	31
3.6.5.	Tempo de tromboplastina parcial ativada.....	32
3.7.	Análises.....	33
<b>4.</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	
4.1.	Criadores de <i>Thyrsofelma guianense</i> .....	34
4.2.	Quantificação de proteínas salivares.....	36
4.3.	Perfil protéico dos extratos de glândulas salivares.....	39
4.4.	Atividade anticoagulante.....	42
<b>6.</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>58</b>
<b>7.</b>	<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>59</b>
<b>8.</b>	<b>Anexos</b>	
8.1.	Soluções.....	71
8.2.	Resultados finais dos ensaios de coagulação.....	75
8.3.	Gráficos de ensaios de coagulação (controle e extratos) ....	85

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. ASPECTOS GERAIS

Os simulídeos são pequenos dípteros, pertencentes à Infraordem Culicomorpha, Superfamília Chironomoidea, Família Simuliidae. O significado da palavra simulídeo deriva do seu gênero tipo *Simulium* (= que simula, imita). No norte do Brasil são conhecidos vulgarmente como pium, pinhum (do tupi = pi'u, o que come a pele) e no sul do país como borrachudo (devido quase não conseguirem voar após um grande repasto sanguíneo, ficando parecido com um borracho, em espanhol, bêbado).

Algumas espécies apresentam importância médica devido às fêmeas possuírem comportamento hematofágico em humanos, por exemplo *Thyrsopelma guianense* (Wise, 1911) veiculando filárias, como *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893) no momento da picada, agente etiológico da oncocercose que gerar a perda da elasticidade da pele com o tempo e como consequência final levando a cegueira que pode ser parcial ou total.

A oncocercose é conhecida como “river blindness” ou “cegueira dos rios” presente no Brasil apenas ao norte do Estado do Amazonas e oeste / noroeste do Estado de Roraima, entre as comunidades indígenas Yanomami e Ye'kuana.

Os simulídeos também são conhecidos pela forma característica de suas picadas deixando visível uma gotícula de sangue logo após a picada (figura 1) e pela forte reação alérgica (figura 2). Essas fortes reações geraram inclusive

mortes como relatada para a síndrome de Altamira no Estado do Pará (Pinheiro *et al.*, 1974) e para uma síndrome similar na Bolívia (Nobel *et al.*, 1974).



Figura 1 – *Thyrsopelma guianense*, momento após a picada mostrando o local da picada. Foto: Chagas, 2003.



Figura 2 – Reação alérgica ocasionada devido a grande quantidade de picadas de fêmeas de *Thyrsopelma guianense* a um hospeiro nunca exposto anteriormente a essa família de hematófago. Foto: Chagas, 2003.

Apresentam importância econômica por serem pragas de animais domésticos e de criação, causando prejuízos devido a perda de peso e na produção de leite no gado e perdas na postura de ovos das aves (Crosskey, 1990), além de afetarem indiretamente o potencial turístico de riachos com cachoeiras, onde os simúlídeos são encontrados em abundância.

## 1.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Os simuliídeos são insetos cosmopolitas com exceção para o continente antártico, alguns arquipélagos e locais desprovidos de água corrente. Seu primeiro registro fóssil data do período Jurássico Médio, em torno de 160 milhões de anos (Crosskey, 1990). A simulidiofauna conhecida até 2002 foi de aproximadamente 1798 espécies, incluindo descrições de novos gêneros e espécies conservadas em âmbar fossilizado (Crosskey & Howard, 2004).

Ainda hoje, a família Simuliidae apresenta divergências nomenclaturais. Segundo Crosskey & Howard (2004), essa família está dividida em duas sub-famílias: Parasimuliinae e Simuliinae, onde a última possui duas tribos: Prosimuliini e Simuliini. Para esse trabalho foi aceita a nomenclatura proposta por (Py-Daniel & Moreira-Sampaio, 1994), à qual tem fundamentação em conceitos filogenéticos. Onde os autores revisaram gêneros e subgêneros da família Simuliidae da região Neotropical, eliminando os níveis tribais (Prosimuliini e Simuliini) da sub-família Simuliinae elevando os subgêneros ao nível de gênero.

A espécie em estudo, *Thyrsopelma guianense sensu stricto*, é o principal vetor de *Onchocerca volvulus* no foco Yanomami e Ye'Kuana (Py-Daniel, 1997) colonizando terrenos de características geológicas muito antigas (Pré-cambriano: Escudo das Guianas, Escudo do Brasil Central) não ocorrendo em áreas do Terciário ou Quaternário da Amazônia (figura 3).

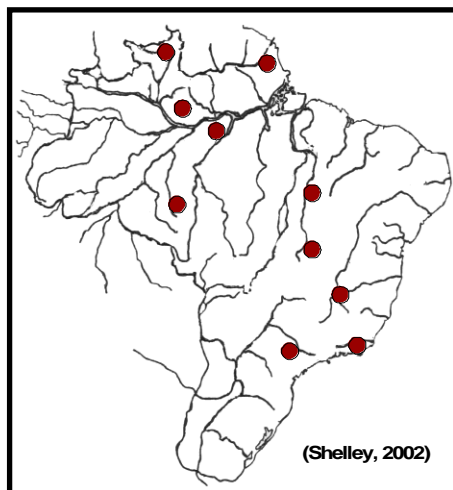


Figura 3 – Distribuição geográfica de *T. guianense* no Brasil

Os estádios imaturos (larvas e pupas, figura 4 e 5 respectivamente) dessa espécie apresentam uma relação estreita com macrófitas aquáticas da família Podostemaceae do gênero *Rhyncholacis* (figura 6) (Py-Daniel, 1994) utilizando a mesma como substrato e criadouro, enquanto os adultos concentram-se na vizinhança das corredeiras.



Figura 4 – Larvas de simúlideo coletadas em galhos presos na correnteza da Cachoeira 40 Ilhas, Pitinga, Presidente Figueiredo/AM. Foto: Chagas, 2003.





Figura 5 – Pupas de simúlideo coletadas em folhas caídas presas na correnteza da Cachoeira 40 Ilhas, Pitinga, Presidente Figueiredo/AM. Foto: Chagas, 2003.



Figura 6 – Macrófita aquática pertencente a família Podostemaceae, criadouro natural de imaturos de *T. guianense* na Cachoeira do Paredão, Nova Colina, Roraima. Foto: Chagas, 2003.

### 1.3. IMPORTÂNCIA MÉDICA DOS SIMULÍDEOS

A principal importância dessa família de hematófagos está relacionada ao seu comportamento hematofágico em hospedeiros vertebrados, ingerindo sangue que é fonte de proteína para o sucesso reprodutivo. Além de auxiliar no ciclo de transmissão de doenças. Esse hábito é comum para mais de 400 gêneros de artrópodes e cerca de 14.000 espécies (Ribeiro, 1995).

A oncocercose está entre uma das principais doenças tropicais de impacto social com cerca de 18 milhões de pessoas infectadas no mundo, e como a segunda causa de cegueira depois da catarata.

A doença é transmitida através da picada do simulídeo infectado com o filarídeo, onde uma fêmea ingere juntamente com o sangue microfílarias que sofrem mudanças evolutivas quanto ao seu desenvolvimento e tamanho ( $L_1$ ,  $L_2$ ) até a forma infectante  $L_3$ , podendo transmitir essas filárias para seu único hospedeiro vertebrado - ser humano (figura 7). Onde formam nódulos oncocercóticos e nesse local pode-se encontrar o casal desse verme que estarão produzindo mais microfílarias.

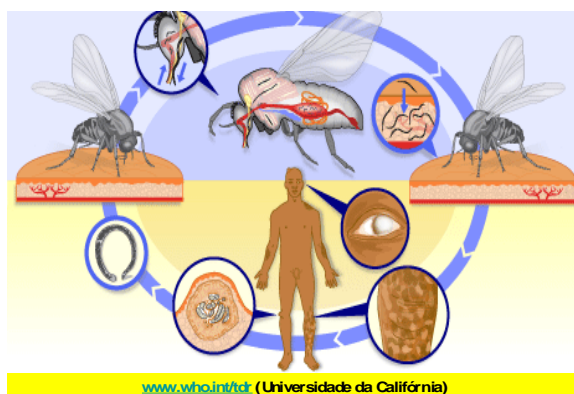


Figura 7 – Ciclo completo de transmissão da Oncocercose no hospedeiro invertebrado e vertebrado.

A oncocercose está entre as principais doenças de impacto social, ocorrendo principalmente no continente africano como o maior foco mundial presente em aproximadamente 26 países. Nas Américas, a doença é encontrada na Guatemala, México, Colômbia, Equador, Venezuela e Brasil. Até 1998, foram registrados, segundo a OEPA (Programa de Eliminação da Oncocercose para as Américas), cerca de 18 milhões de pessoas infectadas no mundo, 123 milhões sob o risco de se infectarem com *O. volvulus* e cerca de 1 milhão já com problemas visuais e quase 270.000 cegas (WHO,2003).

O primeiro caso da oncocercose no Brasil foi relatado por Beazorti *et al.* (1967). A partir de 1970, estudos realizados por Moraes *et al.* (1973), Moraes & Chaves (1974) demonstraram que a área de ocorrência da oncocercose estava restrita aos Yanomamis e famílias de missionários que habitavam a área. Gerais & Ribeiro (1986) relataram um caso autóctone da oncocercose no município de Minaçu (GO), região Centro-Oeste do Brasil. Py-Daniel (1989) citou um caso da oncocercose em um missionário francês, que veio da África Ocidental, e viveu desde 1938 até 1972, na cidade de Tefé/AM, Brasil. Py-Daniel (1994) relata três casos de oncocercose em funcionários da Fundação Nacional do Índio (FUNAI), e Py-Daniel (1997) com base em dados de um inquérito na área Yanomami e Ye'kuana confirmou casos nos indígenas Yanomami e Ye'kuana, Makuxi e Wapichana, e também, em funcionários da FUNAI, FUNASA e de organizações não governamentais.

Na área Yanomami/Ye'kuana, foram assinaladas 26 espécies de simuliídeos, sendo que 12 possuem hábitos antrópofílicos (Py-Daniel, 1997), e

destas, quatro: *Thyrsopelma guianense*, *Psaroniocompsa incrustata*, *Cerqueirellum oyapockense* e *Notolepria exigua* já foram assinaladas como transmissoras da filária *O. volvulus* (Py-Daniel, 1997; Medeiros & Py-Daniel, 1999; Andrezza & Py-Daniel, 1999; Py-Daniel *et al.*, 2000).

No estado do Amazonas, já há indícios de um possível foco na área indígena Waimiri-Atroari/AM, no município de Presidente Figueiredo/AM. Nessa localidade ocorreu a transferência de um casal de servidores da FUNAI, portadores de oncocercose, e que viveram junto com esses indígenas por um período de 15 anos, podendo ter gerado um novo foco mas até o momento não foi investigado (Py-Daniel *et al.*, 1999).

Como a oncocercose, é uma doença de evolução lenta e com um ciclo de aproximadamente 15 anos, provavelmente novos focos da doença só apareçam com mais tempo; e se a dispersão, dela, realmente continuar, principalmente para áreas dos rios Solimões e Purus. Pois nesses rios há abundância de simúlideos e caso os mesmos apresentem capacidade vetorial para essa filária a oncocercose pode se tornar uma doença de grande repercussão na Amazônia como um todo.

#### 1.4. MODO DE ALIMENTAÇÃO / GLÂNDULAS SALIVARES DE INSETOS HEMATÓFAGOS

As fêmeas de simulídeos realizam o repasto sanguíneo em animais de sangue quente, como: humano, boi, ave, cachorro, diferindo seu comportamento hematofágico de espécie para espécie de acordo com o seu hospedeiro. O modo de alimentação das fêmeas ocorre em 4 fases: 1) penetração das mandíbulas na pele; 2) consolidação das partes bucais envolvendo o “syntrophium” (mandíbulas, lacinia maxilar, hipofaringe e labro) dentro da pele; 3) formação do sugador funcional (por onde o sangue é ingerido e 4) liberação das partes bucais e do syntrophium do ferimento (Sutcliffe & McIver, 1984).

Os simulídeos tem aparelho bucal curto (“pool feeders”) e durante a alimentação precisam evitar a hemostasia do hospedeiro e provocar uma pequena hemorragia (“pool” de sangue), devido não conseguirem penetrar diretamente os vasos sanguíneos, como fazem outros hematofagos. Para isso, as fêmeas secretam uma variedade de moléculas salivares com propriedades farmacológicas que impedem que o sangue coagule e que o trombo seja formado (Ribeiro, 1987).

As glândulas salivares dos simulídeos apresentam-se pareadas e localizadas dorsalmente no protórax e lateralmente ao esôfago. Nas fêmeas, cada glândula consiste de duas partes principais: um braço glandular distal conectado a um reservatório não-glandular proximal (Gosbee *et al.*, 1969). Durante a alimentação sanguínea, as secreções salivares são quase totalmente perdidas. Entretanto, logo após uma alimentação sanguínea, ocorre uma re-sintetização das secreções (principalmente após 48h) proporcionando que o mesmo indivíduo possa executar uma nova alimentação (Gosbee *et al.*, 1969).

## 1.5. CASCATA DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Desde 1904, quando data a primeira teoria sobre o mecanismo da coagulação sanguínea, vários fatores de reação de coagulação vêm sendo descobertos, como: proteína C, S, precalicreína. A coagulação sanguínea é um processo dinâmico de reações bioquímicas e enzimáticas (figura 8) envolvendo proteínas plasmáticas, lipídios e íons, que transformam o sangue circulante em um gel insolúvel pela conversão do fibrinogênio em fibrina. Esses fatores são agrupados de acordo com sua função e propriedades bioquímicas (Verrastro, 1996).

A coagulação pode acontecer através de duas vias, onde ambas convergem para a ativação do Fator X (Xa), enzima da classe das serino-endopeptidases que converte protrombina em trombina. A via intrínseca se inicia com a ativação do fator XII (XIIa), que por sua vez ativa o fator XI (XIa), que ativa o fator IX (IXa). O fator XII também ativa o sistema complemento, o plasminogênio e converte o fator VII em sua forma ativada da via extrínseca de coagulação. O fator IX forma com o fator VIII,  $\text{Ca}^{++}$  e fosfolipídios da plaqueta, um complexo que ativa o fator X (Xa). A via extrínseca é o meio alternativo para ativar o fator X sem a participação dos fatores XII, XI, IX e VIII. Assim, o fator liberado do tecido lesado, fator tissular, se liga ao fator VII e ao cálcio ( $++$ ), ativando o fator X (Xa) (Verrastro, 1996; Lorenzi, 1999).

A partir da ativação do fator X ambas as vias seguem o mesmo caminho. A via extrínseca é mais rápida para a produção de pequenas quantidades de trombina (enzima responsável pela conversão do fibrinogênio em fibrina, uma serino-endopeptidase com grande especificidade por seus substratos), a qual age

sobre os fatores V e VIII, transformando-os em formas ativadas e, portanto, acelerando a via intrínseca. Dessa forma, o fator Xa se liga ao fator V, cálcio e fosfolípido formando um segundo complexo, que ativa o fator II (IIa) o qual converte o fibrinogênio em fibrina (Verrastro, 1996; Lorenzi, 1999).

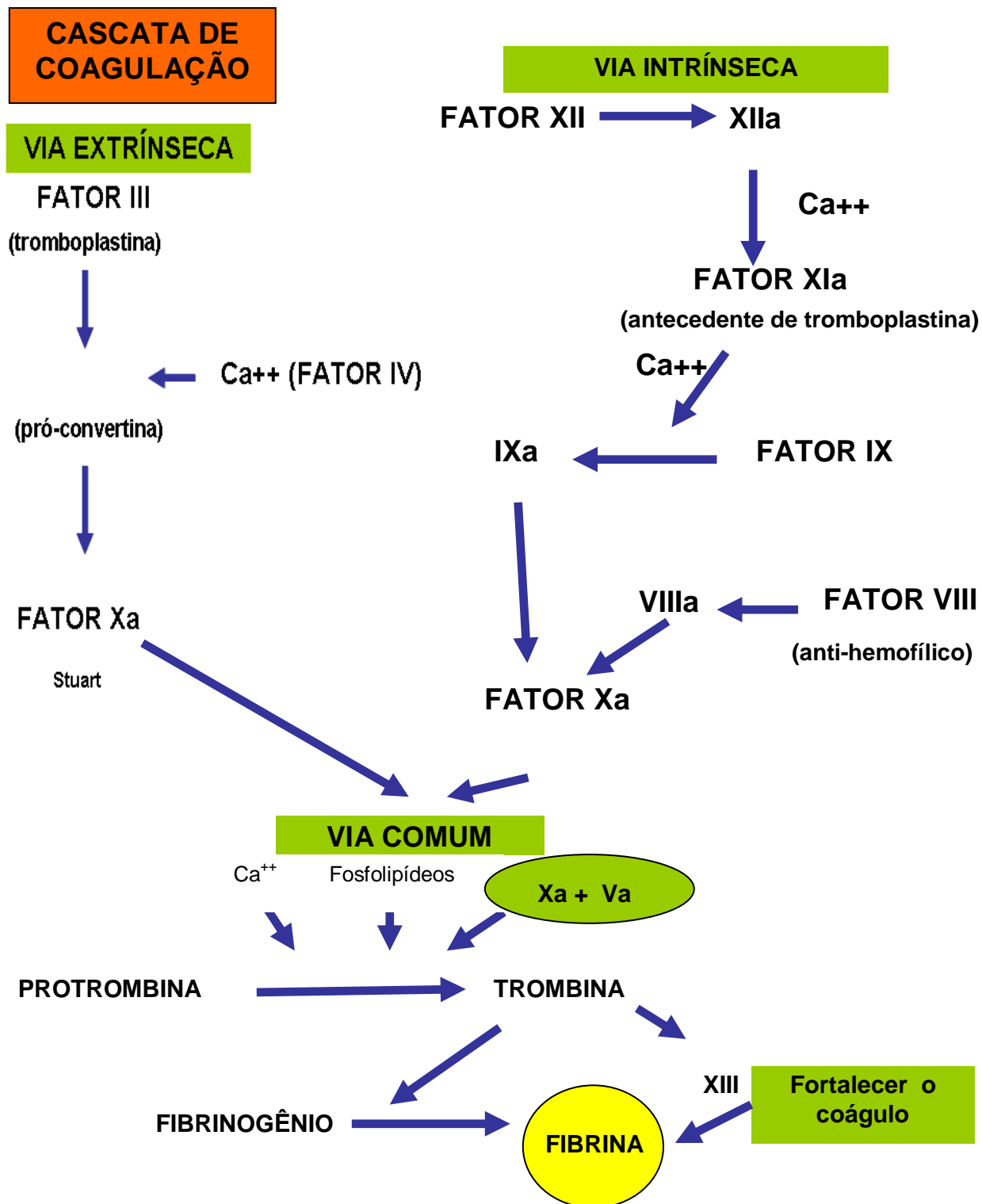


Figura 8 – Diagrama da cascata de coagulação sanguínea (vias intrínseca, extrínseca e comum)( Verrastro, 1996).



## **1.6. IMPORTÂNCIA DA AÇÃO DA SALIVA DE INSETOS HEMATÓFAGOS**

Entre as principais doenças veiculadas por insetos destacam-se a malária, leishmaniose, dengue, oncocercose e doença de Chagas; que causam altos índices de morbidade e mortalidade no mundo (Stark & James, 1995). Na Amazônia podemos encontrar uma grande diversidade de insetos e também a presença de várias doenças tropicais.

As doenças parasitárias humanas, como malária, oncocercose, leishmaniose são transmitidas no momento da alimentação sanguínea realizada pelos insetos hematófagos quando os mesmos encontram-se infectados pelos seus respectivos parasitas. Esse processo pode ser influenciado pela presença de uma variedade de substâncias salivares capazes de afetar diretamente os sistemas hemostático, inflamatório e imune que auxiliam na alimentação do inseto e também a transmissão (Ribeiro 1987, 1995).

A saliva de insetos hematófagos auxilia na transmissão dos patógenos no momento do repasto sanguíneo, principalmente por proporcionar dentre outras situações a: anticoagulação do sangue e vasodilatação do tecido. Assim, a entrada do parasito no hospedeiro é também facilitada de acordo com as atividades desempenhadas pela saliva dos mesmos insetos.

O estudo da hematofagia e dos constituintes da saliva de insetos hematófagos têm apresentado um ritmo de pesquisa acelerado nos últimos anos, no intuito de gerar subsídios que colaborem com conhecimento do comportamento alimentar do inseto e da transmissão de doenças (Titus & Ribeiro, 1990).

Ao longo da evolução, os hospedeiros vertebrados desenvolveram vários mecanismos para impedir a perda de sangue, ainda que em menores proporções como em picadas de insetos. Os artrópodos hematófagos têm co-evoluído juntamente com seus respectivos hospedeiros com compostos para sobrepor esses mecanismos hemostáticos (Gillespie *et al.*, 2000). Algumas famílias e até gêneros divergiram antes do aparecimento dos mamíferos, de modo que espécies muito próximas podem apresentar diferentes compostos que facilitam o bloqueio da hemostasia dos respectivos hospedeiros (Ribeiro, 1995).

Atualmente, com os avanços na genômica e proteômica várias substâncias têm despertado interesses no campo biotecnológico para confecção de futuras drogas para o uso terapêutico ou em pesquisas biomédicas (Ciprandi *et al.*, 2003).

Como essas substâncias são encontradas em quantidades diminutas nos organismos de interesse (o que dificulta o estudo), novas descobertas de potentes proteínas vêm ocorrendo com avanços biotecnológicos, permitindo que essas substâncias sejam clonadas e produzidas em larga escala para serem utilizadas em investigações bioquímicas, farmacológicas e imunológicas (Markwardt, 1994; Ciprandi *et al.*, 2003).

Várias atividades foram descritas na saliva de artrópodes: anticoagulantes, antiplaquetários, vasodilatadores, imunomoduladores, antihistamínicos, alergênicos, inibidores do sistema complemento, inibidores de canais de sódio, entre outros. Os antihemostáticos encontrados na saliva impedem a vasoconstrição (Cupp *et al.*, 1994; Beerntsen *et al.*, 1999; Lanzaro *et al.*, 1999), coagulação (Jacobs *et al.*, 1990; Abebe *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 1996; Perez de Leon *et al.*, 1998; Kazimirová *et al.*, 2002), agregação plaquetária (Ribeiro &

Garcia, 1980; Ribeiro *et al.*, 1984,1985; Rossignol *et al.*, 1984; Ribeiro 1989; Cupp *et al.*, 1995; Marinotti *et al.*, 1996; Ribeiro & Francischetti, 2001), além de atuarem como moduladores da resposta imune do hospedeiro (Titus & Ribeiro, 1988; Cross *et al.*, 1993; Quereshi *et al.*, 1996).

Devido a grande biodiversidade de compostos, os mais diversos grupos de insetos hematófagos são alvos de estudos, principalmente: culicídeos (incluindo vetores da malária e dengue), psicodídeos (vetores da leishmaniose), triatomíneos (vetores da doença de Chagas) e simulídeos (vetores da oncocercose e mansonelose). Um dos primeiros hemostáticos estudados foram os compostos com atividade anticoagulante devido interferirem nos fatores das vias intrínseca, extrínseca e comum da cascata de coagulação (Champagne & Valenzuela, 1996), afetando a hemostasia. Essa função também fornece informações bioquímicas sobre a competência vetorial, além de contribuir no entendimento da interação vetor/hospedeiro/parasito (Marinotti *et al.*, 1996).

A principal importância dos estudos dos anticoagulantes está relacionada ao isolamento desses compostos de hematófagos ou análogos confeccionados a partir deles, no intuito de fabricar drogas mais específicas e seguras, com menos efeitos colaterais sistêmicos como hipotensão e prolongamento do tempo de sangramento. Esta perspectiva é assegurada pelos estudos pré-clínicos e clínicos já realizados com algumas dessas moléculas, em especial ao emprego da hirudina em doenças cardiovasculares (Ciprandi *et al.*, 2003).

Um grande número diferenciado de moléculas com propriedades inibitórias, imunológicas e farmacocinéticas asseguram que as drogas anticoagulantes com

propriedades mais adequadas para uso clínico estejam disponíveis em um futuro não distante (Ciprandi *et al.*, 2003).

Para *Phlebotomus papatasi*, vetor da leishmaniose visceral no Velho Mundo, foram caracterizadas nove proteínas de glândulas salivares capazes de proteger ratos contra *Leishmania* (Valenzuela *et al.*, 2001), sugerido que essas proteínas apresentam um importante potencial para vacina contra leishmaniose (Kawhawi, 2000; Enserink, 2001).

A incriminação de um bom vetor para uma determinada doença baseia-se não só nos conceitos de epidemiologia clássica como também na composição química da saliva (Ribeiro, 1987), onde o efeito anticoagulante dessas proteínas são um dos parâmetros estudado para insetos hematófagos.

Um dos primeiros trabalhos com saliva de simúlideos foram realizados por Yang & Davies, 1968a, 1968b, 1968c; mas somente no trabalho de Yang & Davies (1974) foi demonstrado que fêmeas recém emergidas não possuem aglutinina e nem apresentam atividade anticoagulante, colaborando com observações de que os simúlideos não se alimentam dentro de 24-48h após a emergência (Davies & Peterson, 1956). Nesse período já se sabia que a saliva de simúlideo era tóxica. Essa natureza tóxica decorre das baixas concentrações de histamina detectadas em extratos de tórax e cabeça de fêmeas de *Psilozia vittata* (Fallis, 1964).

Diferentemente de outras famílias de insetos criados em colônias sob condições de laboratório (colônias); a única espécie de simúlideo já colonizada é a *P. vittata*, uma espécie zoófila e autógena (Bernardo *et al.*, 1986). Por isso, essa espécie é utilizada como modelo para ensaios de infecção experimental (Cross *et al.*, 1993a; 1993b, 1994). A saliva dessa espécie apresenta atividade anti-trombina

e anti-fator Xa (Jacobs *et al.*, 1990; Abebe *et al.*, 1994), além de atuar na inibição do fator V (pró-acelerina) que representa ser um cofator da via intrínseca e extrínseca da cascata de coagulação (Abebe *et al.*, 1995).

A atividade anti-trombina já foi detectada também para *Psilozia arga*, zoófila e anautógena e atividade anti-fator Xa para *P. arga*, *Aspathia metallica* - zoófila e anautógena (vetor de oncocercose na Venezuela e México); e *Ectemnaspis ochracea* - antropófila e vetor de oncocercose na Guatemala (Abebe *et al.*, 1994).

Embora a atividade anti-trombina tenha sido encontrada tanto em espécies autógenas, ou seja, que não precisam de sangue para produção de óvulos; como as que precisam que são consideradas como anautógenas; assim como em espécies antropófilas e zoófilas observou-se que para simulídeos antropófilos essa atividade possui níveis mais elevados, fortalecendo a idéia que essas proteínas estejam relacionadas com a competência vetorial (Cupp & Cupp, 1997).

A proteína anti-trombina com 11kDa em *P. vittata* possui uma estrutura única de acordo com a sequência N-terminal tendo sido denominada de simulidina. Essa foi a primeira proteína descrita para simulídeos sugerindo inclusive que ela seja restrita para essa família de insetos (Abebe *et al.*, 1995).

Em *P. vittata*, a saliva atua interferindo na ativação do fator X com um potente polipeptídeo de massa de 18 kDa (Jacobs *et al.*, 1990), e também sobre o fator V.

Com o auxílio de novas técnicas de cDNA/sequenciamento foi descoberta a SVEP, "Proteína Eritrema" de *P. vittata*, com atividade vasoativa à qual pode apresentar uma função essencial no processo de transmissão de filárias (Cupp *et al.*, 1998). Para os simulídeos estudados, foi observado que a saliva apresenta

habilidade para modular componente do sistema imune do hospedeiro favorecendo o aumento da transmissão de patógenos durante a alimentação sanguínea, sendo por isso que esforços na identificação de proteínas salivares de simuliídeos (tabela 1) foram investigados como parte de um coquetel de vacinas para a oncocercose (Cupp & Cupp, 1997).

**Tabela 1- Proteínas salivares de simuliídeos**

<b>Proteína encontrada</b>	<b>Espécie</b>	<b>Função</b>	<b>Massa molecular</b>	<b>Referências</b>
Anti-trombina	<i>P. arga</i>	Anticoagulante	11kDa	Abebe <i>et al.</i> , 1994
	<i>P. vittata</i>			Abebe <i>et al.</i> , 1995
Anti-fator Xa	<i>P. vittata</i>	Anticoagulante	18 kDa	Jacobs <i>et al.</i> , 1990
	<i>P. arga</i>			Abebe <i>et al.</i> , 1994
	<i>A. metallica</i>			
	<i>E. ochracea</i>			
Anti-fator V	<i>P. vittata</i>	Anticoagulante		Abebe <i>et al.</i> , 1996
Proteína eritrema (SVEP)	<i>P. vittata</i>	Vasodilatadora	15 kDa	Cupp <i>et al.</i> , 1998
Apirase	<i>P. vittata</i>	Anti-plaquetário	66kDa	Cupp <i>et al.</i> , 1995
	<i>E. ochracea</i>			
	<i>E. bivittata</i>			
	<i>A. metallica</i>			

Embora já se tenha conhecimento de algumas atividades desempenhadas pela saliva de algumas espécies de Simuliidae, não há nenhum trabalho enfocando aspectos sobre as proteínas salivares das espécies vetoras (*T. guianense*, *Psaroniocompsa incrustata*, *Cerqueirellum oyapockense* e *Notolepria exigua*) da oncocercose no Brasil. Para a espécie *T. guianense*, objeto desse estudo é importante conhecer aspectos da biologia tendo em vista que é

incriminada como o principal vetor de oncocercose no Brasil (Py-Daniel *et al.*, 2000).

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Estudar a atividade anticoagulante de extratos de glândulas salivares de *T. guianense*, principal vetor de *O. volvulus* no Brasil.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar o perfil protéico de extratos de glândulas salivares de fêmeas de *T. guianense*;
- Verificar a atividade inibitória do extrato de glândulas salivares de fêmeas de *T. guianense* sobre o tempo de Trombina – TT, tempo de Protrombina –TAP, e tempo de Tromboplastina Parcial Ativada – TTPA.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local de coleta

As fêmeas de *T. guianense* foram coletadas na cachoeira 40 Ilhas (figura 9) ( $0^{\circ}28'48''$  N /  $60^{\circ}29'49''$  O), localizada no rio Pitinga, distante 80 Km da vila do Pitinga, município de Presidente Figueiredo, estado do Amazonas. A vila de Pitinga está localizada em uma área de exploração de minérios (sob gerenciamento da Mineração Taboca S/A). O local de coleta foi baseado na disponibilidade de imaturos dessa espécie.



Figura 9 – Local de coleta de imaturos (larvas e pupas) de simuliídeos na Cachoeira 40 Ilhas em Pitinga, município de Presidente Figueiredo/AM. Os caminhos destacados em vermelho na foto indicam os locais explorados para a obtenção das amostras. Foto: Balestrassi, 2003.

### 3.2. Método de coleta e criação de simúlídeos

Para a obtenção dos simúlídeos foram realizadas coletas de pupas de simúlídeos nas margens das ilhas. As pupas encontravam-se aderidas a diversos tipos de substratos tais como: folhas caídas, galhos, raízes submersas (figura 10 A, B e C).



Figura 10 - Substratos encontrados para larvas e pupas de simúlídeos coletados na Cachoeira 40 ilhas em Pitinga, no município de Presidente Figueiredo/AM. A – Folhas presas na correnteza; B – Galhos submersos; C – Raízes de plantas submersas. Foto: Chagas, 2004.

Todo material coletado foi acondicionado em sacolas plásticas transportados até o alojamento da Hidrelétrica do Pitinga, onde foi montado um pequeno laboratório para criação desses insetos, em condições determinantes de temperatura (25°C) e umidade (90%). Após a emergência (figura 11 A), as fêmeas de *T. guianense* (figura 11 B) foram identificadas segundo as chaves de Shelley *et al.* (1997) e transferidas para gaiolas de filó, onde foi oferecido um chumaço de algodão embebido de xarope de glicose, Karo® diluído e algodão com água para alimentação, por um período de 12 horas, até o momento da dissecação das glândulas salivares.



Figura 11 A – Momento da emergência dos adultos no laboratório; B – Identificação das fêmeas de *T. guianense*. Foto: Chagas, 2004.

### 3.3. Dissecção e preparação dos extratos das glândulas salivares (EGS)

As fêmeas de *T. guianense* foram previamente anestesiadas em gelo, e as glândulas salivares (GS) (figura 12) foram extraídas em NaCl 0.15M, pH 7.2 com o auxílio de microestiletos e microscópio estereoscópico em uma lâmina escavada.

Foram preparadas amostras com 1, 5, 10, 20 pares de glândulas salivares, onde para cada par de glândula foi adicionado um volume de 4 $\mu$ L de NaCl 0.15M, pH = 7.2. Durante a preparação das amostras, as glândulas foram mantidas em gelo seco até o armazenamento em freezer a temperatura de - 75°C localizado no laboratório de Tecnologias de DNA da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Antes dos ensaios, as amostras foram maceradas com bastão de vidro por 30 segundos, 4°C. Em seguida, centrifugadas a 10.000 g, 4°C, durante 10 minutos. A partir desse momento, somente o sobrenadante foi transferido para

novos tubos eppendorfs, e denominados como extratos de glândulas salivares (EGS). Para os ensaios experimentais de coagulação, as amostras foram utilizadas após diluições seriadas: 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,325; 0,156; 0,078; 0,039 par de glândula.

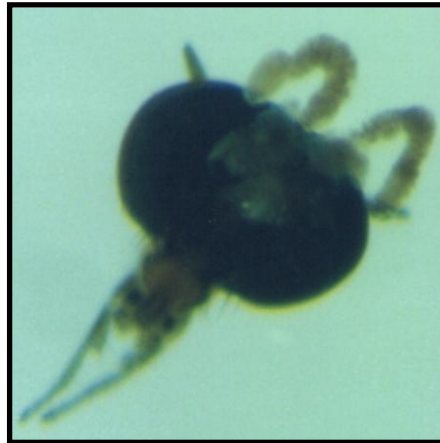


Figura 12 – Cabeça de *T. guianense* mostrando as glândulas salivares dissecadas após um período de 12h depois da emergência. Foto: Chagas, 2003.

### 3.4. Dosagem de Proteína

A proteína total solúvel (presente nos EGS) foi determinada de acordo com o microensaio do método descrito por Bradford (1976). Vide: Anexos: Soluções.

#### **Microensaio:**

Detecta proteína de 1 a 10  $\mu\text{g}$  para um volume 100  $\mu\text{L}$  que foi ajustado com o tampão. Adicionar 1 mL de reagente de Bradford.

Branco = 100 mL de tampão + 1 mL reagente de Bradford

Inicialmente, foi elaborada uma curva de calibração utilizando como padrão o “BSA” (albumina de soro bovino), para quantificações das amostras de proteína total solúvel presentes nos extratos de glândulas salivares de *T. guianense*.

O ensaio foi realizado em triplicata para o BSA e para os extratos de glândulas salivares (EGS) foram testadas quinze repetições. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 595 nm.

### **3.5. Perfil eletroforético de extratos salivares em gel de poliacrilamida**

O perfil protéico dos extratos salivares foi analisado em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, sob condições desnaturantes segundo (Laemmli, 1970). Este método utiliza um detergente aniônico forte denominado de dodecil sulfato de sódio (SDS) em combinação com agente redutor,  $\beta$ -mercaptoetanol, e temperatura de aquecimento da amostra a 100°C. Nessas condições, as proteínas da amostra tornam-se completamente dissociadas ou desagregadas, preservando apenas a estrutura primária.

Os polipeptídeos desnaturados ligam-se ao SDS e tornam-se carregados negativamente. A migração do complexo SDS-proteína através do gel de poliacrilamida dá-se em função do tamanho do polipeptídeo e pode ser separado de acordo com a concentração do gel (tabela 2).

Inicialmente foram preparados dois diferentes géis: o concentrador 5% cuja função de compactar a amostra em um pequeno volume e o separador de 15% que separa os complexos SDS-proteína em função de suas massas moleculares. (Vide: Anexos: Soluções).

O sistema SDS-PAGE foi realizado com um sistema de tampão descontínuo, ou seja, o tampão nos reservatórios da cuba de eletroforese apresentava pH e força iônica diferente do tampão usado para confeccionar o gel. Assim, após a aplicação da amostra os complexos SDS-proteína foram arrastados por uma fronteira de íons em movimento que foi criada quando a corrente elétrica passava através do gel, do pólo negativo em direção ao pólo positivo.

**Tabela 2. Faixa efetiva de separação de proteínas no sistema SDS-PAGE**

Concentração do gel de poliacrilamida* (%)	Faixa linear de separação de proteínas (kDa)
15	12 – 43

- A relação molar acrilamida/bisacrilamida é de 29:1.

O marcador de massa molecular usado foi Low – Range Rainbow Molecular Weight markers (RPN 755) (2500 – 45000) da Amersham Biosciences. A composição do marcador usado de baixa faixa de massa molecular para SDS-PAGE está descrita na tabela 3.

Após a separação pelo sistema SDS-PAGE, as proteínas foram visualizadas através do método de coloração por nitrato de prata. (Vide: Anexos: Soluções). A coloração com prata foi usada devido ser cerca de cem a mil vezes mais sensível do que a com azul brilhante de Coomassie, podendo assim detectar moléculas em quantidade de 0,1 a 1,0 ng de proteína em uma única banda (Bradford, 1976).

**Tabela 3. Faixa de massa molecular do marcador usado (Low – Range Rainbow Molecular Weight markers)**

<b>Proteína</b>	<b>Massa molecular (Da)</b>
Ovoalbumina	45000
Anidrase carbônica	30000
Inibidor de Tripsina	20100
Lisozima	14300
Aprotinina	6500
Insulina (cadeia b)	3500
Insulina (cadeia a)	2500

### **3.5.1. Preparação de amostras de glândulas salivares**

Nesse experimento foram analisadas amostras de cinco pares de glândulas salivares em diferentes idades fisiológicas: < 12h; 24; 48 e 72h após a emergência, para tal as seguintes etapas foram realizadas:

1. Macerar por 30 segundos, 4°C;
2. Centrifugar 10.000g, 10 min, 4°C;
3. Transferir o sobrenadante para um novo tubo “ependorf”;
4. Precipitar as proteínas solúveis com TCA (ajustar a concentração do TCA para 10%);
5. Agitar por 30 segundos;
6. Incubar a amostra a 4°C, 10 minutos (para precipitar as proteínas);
7. Centrifugar 10.000g, 10 minutos, 4°C;

8. Remover o sobrenadante;
9. Ressuspender o sedimento em 10  $\mu$ L tampão 4X;
10. Ferver a amostra, 5 minutos, 100°C;
11. Aplicar a amostra no gel.

### **3.5.2. Preparação do gel de poliacrilamida SDS-PAGE**

1. Preparo de soluções, montagem do aparato de eletroforese;
2. Confeção do gel separador 15%, verter imediatamente na placa após a adição dos catalisadores e cobrir delicadamente sua superfície com butanol saturado com água;
3. Manter as placas de vidro contendo o gel na posição vertical e esperar cerca de trinta minutos para que ocorra a reação de polimerização;
4. Remover o butanol, lavando exaustivamente a superfície do gel com água destilada e secá-la delicadamente com papel de filtro;
5. Preparar o gel concentrador 5%, vertê-lo sobre o gel separador e imediatamente introduzir o pente para formação dos poços;
6. Após a polimerização (cerca de dez minutos), remover o pente e limpar os poços;

Após a preparação do gel e das amostras:

1. Adicionar o tampão de corrida 1X nos reservatório superior e inferior da cuba de eletroforese;



2. Conectar os eletrodos à fonte de tensão elétrica. Verificar a passagem de corrente elétrica através da formação de pequenas bolhas ao longo do eletrodo situado na cuba inferior;

3. Aplicar a amostra e o padrão de massa molecular nos poços;

4. As condições de migração usadas foram de 25mA (miliampéres) e 200V, com um tempo de corrida de aproximadamente 4 horas;

5. Após a corrida, procedeu-se a coloração e revelação das bandas protéicas com nitrato de prata (vide: Anexos).

### **3.6. Ensaio de Coagulação**

#### **3.6.1. Plasma**

O plasma humano (HEMOSTAT CONTROL PLASMA NORMAL) utilizado nos experimentos foi obtido na IN VITRO DIAGNÓSTICA, produzido por HUMAN GMBH, MAX-PLANK-RING, GERMANY.

O plasma foi obtido sob a forma de liofilizado consistindo de plasma citratado (4% p/v) e ázida sódica 0,9 g/l. O reagente foi reconstituído com água miliQ.

#### **3.6.2. Tempo de Recalcificação do plasma**

O ensaio de tempo de recalcificação do plasma citratado foi realizado como descrito anteriormente por (Valenzuela *et al.*, 1996), com algumas modificações.

As atividades de coagulação foram mensuradas a partir do “Biotrak II plate reader” (Amersham Biosciences) com o módulo cinético à temperatura ambiente.

**Protocolo:**

1. 20  $\mu$ L de plasma citratado humano pobre em plaquetas previamente aquecido a 37°C;
2. 20  $\mu$ L de 0,15 M NaCl, pH 7,2 contendo ou não extratos de glândulas salivares de *T. guianense*, em diferentes diluições;
3. Incubar por 5 minutos, 37°C;
4. Adicionar 20  $\mu$ L de 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 37°C, pré-aquecido;
5. Após a adição do CaCl<sub>2</sub>, ler a placa em intervalos de 10 segundos, em 620 nm.

**3.6.3. Tempo de Protrombina**

O “kit” HEMOSTAT THROMBOPLASTIN-SI foi obtido da IN VITRO DIAGNÓSTICA, produzido por HUMAN GMBH, MAX-PLANK-RING, GERMANY.

O ensaio de tempo de protrombina *in vitro* foi realizado para avaliar a via extrínseca e comum de coagulação, após a adição de uma fonte tissular (tromboplastina) e cálcio. A recalcificação na presença desses fatores gera o fator Xa e posteriormente um coágulo de fibrina.

O reagente tromboplastin-SI® (Quick) foi obtido sob forma de liofilizado de extrato de cérebro de coelho e cloreto de cálcio e reconstituído com 2 mL de água miliQ e mantido a 2 - 8°C durante o uso.

**Protocolo:**

1. 20  $\mu$ L de plasma citratado humano pobre em plaquetas previamente aquecido a 37°C;
2. 20  $\mu$ L de 0,15 M NaCl, pH 7,2 contendo ou não extratos de glândulas salivares de *T. guianense*, em diferentes diluições;
3. Incubar por 5 minutos, 37°C;
4. Adicionar 20  $\mu$ L do reagente de protrombina, pré-aquecido 37°C ;
5. Ler a placa em intervalos de 10 segundos, em 620 nm.

**3.6.4. Tempo de trombina**

O “kit” HEMOSTAT THROMBIN TIME foi obtido da IN VITRO DIAGNÓSTICA, produzido por HUMAN GMBH, MAX-PLANK-RING, GERMANY.

O tempo de trombina (PT) *in vitro* foi usado para avaliar a fase final da via comum da coagulação na presença de extrato de glândula salivar (EGS). Esse teste consistiu de análise de condições que possam interferir na conversão de fibrinogênio em fibrina.

Nos ensaios foi utilizada trombina liofilizada de origem bovina de baixa potência, que foi reconstituída com água destilada e mantida a 2 - 8° C durante o uso.

**Protocolo:**

1. 20  $\mu$ L de plasma citratado humano pobre em plaquetas previamente aquecido a 37°C;
2. 20  $\mu$ L de 0,15 M NaCl, pH 7,2 contendo ou não extratos de glândulas salivares de *T. guianense*, em diferentes diluições;
3. Incubar por 5 minutos, 37°C;
4. Adicionar 20  $\mu$ L do reagente de trombina ;
5. Ler a placa em intervalos de 10 segundos, em 620 nm.

**3.6.5. Tempo de tromboplastina parcial ativada**

O tempo de tromboplastina parcial ativada *in vitro* detecta deficiências em todos os fatores de coagulação, exceto o fator VII. Entretanto, é utilizado para detectar deficiências no estágio 1 do mecanismo de coagulação que envolve os fatores VIII, IX, XI, XII. O reagente contém um ativador plasmático e fosfolipídios; onde o último atua como substituto de plaquetas.

O HemoStat aPTT – EL® não foi preciso ser reconstituído. É constituído de extrato de cérebro de coelho, fornecendo plaqueta substituta. Possui o ácido elágico como ativador, o qual fornece uma superfície carregada negativamente propiciando contato para ativação dos fatores de coagulação. Além disso, esse kit contém ázida sódica 1g/L. O CaCl<sub>2</sub> contém 0,02 mol/L; ázida sódica 1g/L.

**Protocolo:**

1. 20  $\mu$ L de plasma citratado humano pobre em plaquetas previamente aquecido a 37°C;
2. 20  $\mu$ L de 0,15 M NaCl, pH 7,2 contendo ou não extratos de glândulas salivares de *T. guianense*, em diferentes diluições;
3. Incubar por 5 minutos à 37°C;
4. Adicionar 20  $\mu$ L de aPTT, pré-aquecido à 37°C;
5. Incubar por 3 minutos à 37°C;
6. Ler a placa em intervalos de 10 segundos, em 620 nm.

**3.7. ANÁLISES**

Todos os testes foram feitos em duplicata com quatro repetições, e diferentes diluições: 5;2,5;1,25;0,625;0,312;0,156;0,078;0,039 par de glândula. Para a análise estatística foi realizado uma ANOVA e um teste de Tukey com as médias obtidas (Zar, 1996).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Criadouros de *T. guianense*

Para *T. guianense*, os criadouros estão relacionados a macrófitas aquáticas da família Podostemaceae (Py-Daniel, 1994). Os criadouros de simúlídeos apresentam uma relação direta com o nível da água, assim na época da seca há uma baixa na disponibilidade de substratos reduzindo a população de imaturos e na cheia aumenta os substratos e conseqüentemente a quantidade de imaturos, respectivamente figura 13 e 14) (Py-Daniel, 1998).



Figura 13 – Coleta de imaturos de simúlídeos na época da cheia em podostemaceae (substrato natural da espécie *T. guianense*), no rio Jauaperi, Nova Colina, Roraima.



Figura 14 – rio Jauaperi, Nova Colina, Roraima na época da seca - não há podostemaceae para os imaturos de simúlídeos.

Entretanto, no local de coleta desse dessa pesquisa, o criadouro está localizado logo abaixo de uma hidrelétrica no rio Pitinga, onde as podostemáceas foram quase que completamente eliminadas devido à presença da hidrelétrica sendo substituídos atualmente por outros substratos, como: folhas caídas, troncos, raízes submersas. Essa mudança de substrato não é comum, e até o momento é única para esse criadouro. Essa troca de substrato foi relatada anteriormente por (Py-Daniel *et al.*, 1999), onde reforçam a estreita relação existente entre as formas dos imaturos de *T. guianense* e as podostemáceas.

Além disso, em Pitinga, devido o local de coleta está situado a jusante de uma hidrelétrica favorece a disponibilização de imaturos de simúlídeos durante todo o ano, pois o nível de água as cachoeiras abaixo permanece quase que constante, o que não ocorre para os rios da Amazônia.

Nas coletas de imaturos em Pitinga, foram obtidos 2.596 indivíduos adultos de duas espécies: *T. guianense* e *Psilopelmia iracouboense*, sendo 91,7% de *T. guianense* (72% de fêmeas e 28% de macho) e 8,3% de *P. iracouboense* (50% para ambos os sexos).

Embora seja visível a abundância das formas imaturas de simúlídeos nos criadouros, não se pode afirmar o mesmo para as formas adultas quando utilizou-se o método de atratividade em colaborador voluntário (o qual o material coletado foi usado para treinamento de dissecação e testes iniciais), em função da baixa densidade de fêmeas coletadas (tabela 4). Em coletas realizadas durante quatro dias consecutivos em três meses de observação, obteve-se um total de 943 fêmeas, com 34,78% para o mês de maio, 59,49% para junho e 5,72% para

agosto. Essa baixa densidade de fêmeas adultas, coletadas nesse período também foi relatada por Py-Daniel *et al.* (1999).

**Tabela 4. Quantidade de fêmeas de *T. guianense* coletadas pelo método de atratividade em humanos, colaborador voluntário em Pitinga/AM.**

	Maio	Junho	Agosto	Total
Número de fêmeas	328	561	54	943

Embora essa espécie apresente o caráter antropófilo em algumas regiões possivelmente essa espécie exerça hematofagia principalmente em outros animais (zoofilia).

#### **4.2. Quantificação de proteínas salivares de *T. guianense***

Inicialmente foi construída uma curva padrão com albumina de soro bovino (BSA) com base nas absorvâncias lidas em espectrofotômetro 595 nm (método de Bradford). A equação foi ajustada para a curva de calibração utilizada nos ensaios de quantificação de proteínas foi:  $y = 0.055x + 0.1174$ ,  $r^2 = 0.99$ .

A quantidade de proteína total solúvel presente nos extratos de glândulas salivares de fêmeas foi estimada em  $1,07 \pm 0,03 \mu\text{g}$  de proteína por par de glândula ( $n=15$ ). Para as espécies de simúlideos já estudadas (Abebe *et al.*, 1994, 1995), foi observado que espécies antropófilas apresentaram uma maior quantidade de proteína total solúvel em extratos de glândulas salivares, fato que pode ser confirmado para *T. guianense*. Quando se compara a quantidade de



proteína de *T. guinense* com *Ecteminaspis ochracea* (principal vetor na Guatemala) ambas antropófilas, é encontrado uma quantidade de proteína semelhante com 1,07 e 1,08 µg de proteína/ par de glândula, respectivamente.

Para outras espécies de simulídeos foi encontrado: 0,85 µg de proteína/ par de glândula em *Aspathia metallica*; 0,80 µg de proteína/ par de glândula em *Psilozia arga* e 0,74 µg de proteína/ par de glândula para *P. vittata* (Abebe *et al.*, 1994). Em *P. vittata*, a quantidade de proteína foi observada em diferentes situações. Logo na emergência, a proteína total de glândula salivar foi de  $0,7 \pm 0,1$  µg/par de glândula equivalente, sendo que este nível não aumentou nas 72h seguintes (Cupp *et al.*, 1993). O fato de não diferir a quantidade proteína durante as primeiras 72 horas facilita estudos com a saliva desses insetos, uma vez que para simulídeos só existe colônias em condições de laboratório, para *P. vittata*.

Em glândulas salivares de machos de *P. vittata* foi encontrado  $0,2 \pm 0,04$  µg/par de glândula equivalente. Para fêmeas de *P. vittata* a quantidade de proteína pré-oviposição foi de  $1,5 \pm 0,1$  µg/par de glândula; pós-oviposição foi de  $1,4 \pm 0,03$  µg/par de glândula e em 96 horas após a emergência foi de  $2,2 \pm 0,2$  µg/par de glândula (Cupp *et al.*, 1993).

Essa quantidade de proteínas pode variar dentro da mesma família, dentro de um mesmo gênero e também nas mesmas espécies de regiões geográficas diferentes, sugerindo assim a existência de diferentes estratégias na obtenção da alimentação sanguínea pelo hematófago de acordo com o hospedeiro onde busca como fonte sanguínea (Cupp & Cupp, 1997).

Em *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), principal vetor de Leishmaniose Visceral no Brasil foi encontrada uma baixa quantidade de proteína

com 0,18  $\mu\text{g}/\text{glândula}$ ; e em *P. papatasi*, principal vetor de leishmaniose visceral no Velho Mundo foi encontrada 0,51  $\mu\text{g}/\text{glândula}$ . Essa diferença também foi observada ao nível de espécie com 0,78 $\mu\text{g}$  para *Phlebotomus dubosqi* e 0,41  $\mu\text{g}$  para *Phlebotomus halepensis*; e também para a mesma espécie proveniente de colônias mantidas em diferentes regiões geográficas com 0,51  $\mu\text{g}/\text{glândula}$  em *P. papatasi* da colônia de Cyprus e 0.33  $\mu\text{g}/\text{glândula}$  para a colônia de Turkish; embora essas quantidades de proteína também sejam diferentes para essas espécies conforme os resultados publicados previamente, o que pode ser devido ao lugar, método e condições onde foi realizadoo experimento (Ribeiro *et al.*, 1986; Volf *et al.*, 2000).

A quantidade de proteína pode variar de acordo com a idade fisiológica, como no caso de *P. dubosqi* que aumenta gradualmente com a idade das fêmeas (Volf *et al.*, 2000).

Para *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae), as proteínas salivares começam a se acumular no primeiro dia de vida e podem ser observadas até o décimo dia (Moreira *et al.*, 2001) com  $0,53 \pm 0,04 \mu\text{g}$  de proteína (n=10) para fêmeas e aproximadamente 0,03  $\mu\text{g}$  (n=2) para machos. Em *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) a quantidade de proteína foi de 0,26  $\mu\text{g}$  após o primeiro dia de emergência e aproximadamente 1,4  $\mu\text{g}$  no sétimo dia. Em *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) observou-se uma variação diária, sendo a quantidade máxima no quarto dia após a emergência (Marinotti *et al.*, 1996). Em *A. aegypti* foi encontrada em média 3  $\mu\text{g}$  de proteína (Marinotti *et al.*, 1990).

Para barbeiros (Hemiptera: Reduviidae), vetores de doença de Chagas, a quantidade média de proteína é muito maior, com aproximadamente 2,3 µg para *Triatoma infestans* e 4,4 µg na saliva de *Panstrongylus megistus* (Pereira *et al.*, 1996).

#### **4.3. Perfil protéico de extratos de glândulas salivares de *T. guianense***

O perfil protéico de extratos de glândulas salivares de *T. guianense* apresentou 12 polipeptídeos (tabela 5), com três bandas de massas moleculares acima de aproximadamente 69 kDa (BSA). Duas bandas protéicas com massas moleculares variando entre 69 – 45 kDa (69, 64 kDa); quatro bandas entre 45 – 30 kDa (41, 39, 33, 31 kDa); duas apresentam como bandas abundantes, e principalmente na idade de 24 e 48h; uma entre 30 – 20 kDa (28 kDa) e duas bandas na faixa de 20 – 14 kDa (16, 15 kDa), apresentando ser proteínas pequenas, abundantes e presente em todos as idades fisiológicas estudadas. Esses resultados indicam que as proteínas começaram a ser acumuladas nas glândulas salivares a partir do primeiro dia após a emergência, não diferindo qualitativamente até o terceiro dia (figura 15).

Em insetos hematófagos, análises eletroforéticas tanto de saliva como de extratos de glândulas salivares demonstraram, em geral, uma baixa complexidade protéica.

Para outras espécies de simulídeos já estudadas também foi possível visualizar um perfil protéico semelhante ao encontrado para *T. guianense*.

Entretanto, uma maior quantidade de bandas de proteína foi encontrada para espécies zoófilas com 19 – 20 bandas para os simulídeos *P. vittata* e *P. arga*, respectivamente; e semelhante para espécies vetoras com onze e doze bandas para *E. ochracea* e *A. metallica*, respectivamente (Cross *et al.*, 1993). Onde essas massas moleculares variam de ~ 80 KDa para < 14 KDa para as quatro espécies analisadas (Cross *et al.*, 1993).

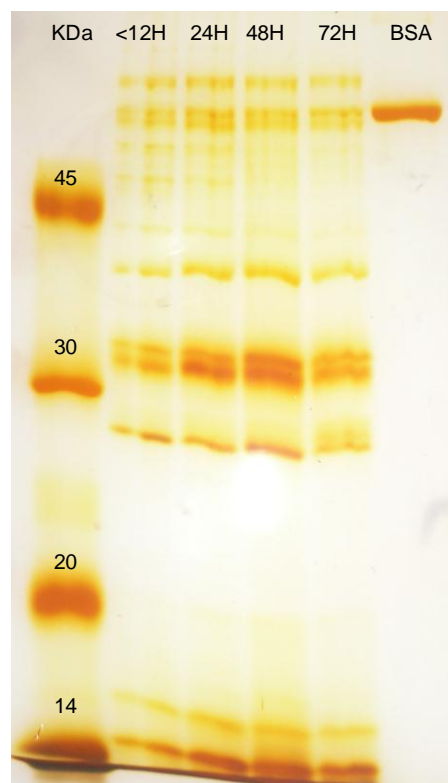


Figura 15 – Perfil protéico de extratos de glândulas salivares de *T. guianense*, cinco pares, coloração e revelação com nitrato de prata. Em 72h foram aplicados três pares de glândulas.

Em mosquitos, as quantidades de bandas protéicas variam de dezenove a vinte e cinco polipeptídeos (Al-Ahdal *et al.*, 1990, Brennan *et al.*, 2000, Nascimento *et al.*, 2000). É interessante que a síntese dessas proteínas começa logo depois da emergência do adulto, e o perfil protéico de glândulas salivares de fêmeas não variam qualitativamente durante os dez primeiros dias da vida adulta, fato observado para *T. guianense* até as primeiras 72 h de observação.

As diferenças na quantidade de proteína em cada idade refletem um aumento na quantidade de proteína em glândulas de mosquitos mais velhos (Moreira *et al.*, 2001). Entretanto, análises no perfil protéico de diferentes mosquitos revelam que em algumas espécies todos os polipeptídeos estão presentes em glândulas salivares desde o primeiro dia de vida adulta, enquanto em outras glândulas somente começam maturação, apresentando todas as proteínas salivares somente no terceiro ou quinto dia depois da emergência (Racioppi & Spielman, 1987; Al-ahdal *et al.*, 1990; Brennan *et al.*, 2000).

Ao comparar o perfil protéico de fêmeas de *Anopheles darlingi* que realizaram alimentação sanguínea e alimentação com açúcar não foi observado diferenças, sugerindo que não haja proteína específica induzida pela alimentação sanguínea (Moreira *et al.*, 2001).

Para flebotomíneos, Volf *et al.* (2000) observaram distintos perfis eletroforéticos de proteínas salivares entre diferentes espécies e distintas populações de origens geográficas diferentes. Além de uma alta variabilidade de sequência de aminoácidos do peptídeo salivar “maxadilan” no complexo *L. longipalpis* (Lanzaro *et al.*, 1999).

Em triatomíneos, variações na composição da saliva segundo Barbosa *et al.* (1999) sugerem que esta variação seja uma consequência de seleção favorecendo uma melhor adaptação para hospedeiros locais.

Para a saliva de *Triatoma infestans* foram encontradas vinte e quatro bandas distintas: cinco acima de 66 kDa, oito entre 45 e 24 kDa, cinco entre 24 e 18 kDa, cinco entre 18 e 14 kDa e uma abaixo de 14 kDa. O perfil de *P. megistus* demonstrou dezenove bandas: três acima de 66 kDa, uma entre 66 e 45 kDa, nove entre 45 e 24 kDa, três entre 24 e 18 kDa, uma entre 18 e 14 kDa, e duas abaixo de 14 kDa (Pereira *et al.*, 1996).

Em triatomíneos, trabalhos com proteínas salivares também podem ser utilizados como ferramenta de marcador populacional (Barbosa *et al.*, 2004).

#### **4.4. Atividade anticoagulante de *T. guianense***

O estudo foi iniciado, no intuito de verificar o papel das proteínas totais presentes nos extratos de glândulas salivares desse vetor em ensaios de atividade de coagulação em plasma humano comercial. Esses ensaios visaram verificar se existia ou não proteínas capazes de inibir a coagulação sanguínea, assim como, que uma concentração maior do extrato é necessário para ocorrer essa atividade.

No primeiro ensaio, tempo de recalcificação do plasma (figura 16) foi observado que os extratos salivares foram capazes de prolongar o tempo (seg) de formação do coágulo de fibrina em relação ao controle (o qual apresenta todos os componentes do ensaio nas mesmas quantidades, com exceção da presença do extrato salivar). Nesse teste, observou-se que a maior quantidade analisada (cinco

pares de glândulas de *T. guianense*) foi capaz de inibir totalmente a formação do coágulo de fibrina por um período de uma hora, o que indica que essas proteínas apresentam atividade anticoagulante.

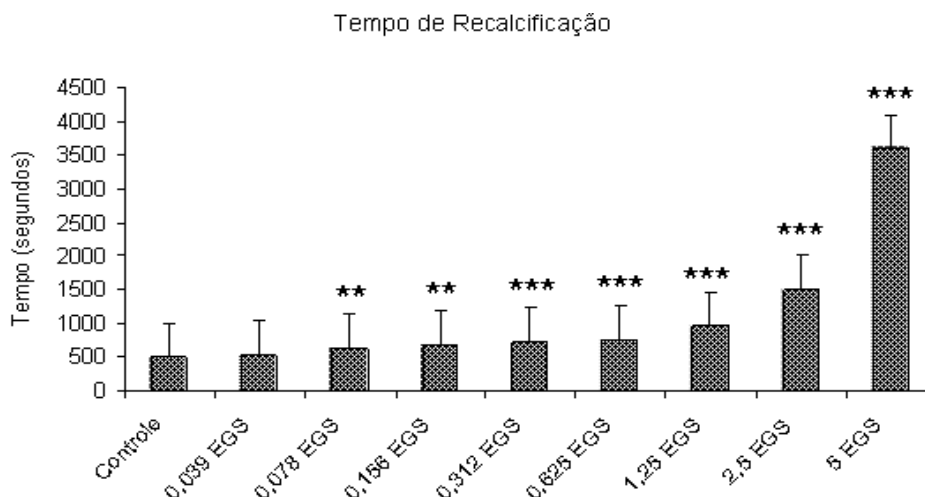


Figura 16 - Tempo de recalcificação do plasma na presença de extratos de glândulas salivares de *T. guianense*. Os asterísticos referem-se às diferenças entre o controle e as quantidades de pares de glândulas: 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 EGS (\*\* $P < 0,001$ ); 0,156; 0,078 EGS (\*\* $P < 0,01$ ); 0,039 EGS ( $P = 0,405$ ).

Ainda nesse ensaio, foram observadas diferenças estatisticamente significantes ( $P < 0,001$ ) a partir de 0,312 par de glândula com uma quantidade duas vezes menor do que representa um único simulídeo. Quantidades menores de extratos (0,156 – 0,078) prolongam o tempo de recalcificação, porém sem diferença estatisticamente significante ( $P < 0,01$ ).

Para habitantes de algumas áreas endêmicas, uma pessoa pode chegar a levar mais de mil picadas/por dia de simulídeos (Grillet *et al.*, 2001). Para que um

simulídeo seja capaz de realizar com êxito o repasto sanguíneo, e conseqüentemente transmitir filarídeos ao hospedeiro vertebrado o mesmo deve possuir quantidades suficientes de proteínas salivares com atividades capazes de atuar sobre o processo de coagulação sanguínea no tecido lacerado do hospedeiro (Abebe *et al.*, 1994).

A partir desses resultados, verificou-se influência desses extratos salivares em ensaios de atividade de trombina (figura 17). A trombina atua na etapa final da coagulação sanguínea (via comum) hidrolizando o fibrinogênio transformando-o em fibrina, e conseqüentemente estabelece a formação do coágulo. Verificou-se que a quantidade de extrato salivar mínima necessária para prolongar o tempo de trombina foi de apenas um par de glândula (um simulídeo), entretanto uma diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,001$ ) em relação ao controle só foi observada para uma quantidade a partir de 2,5 EGS. O que representa uma quantidade três vezes maior de adição dos extratos ao ensaio em relação ao teste de recalcificação.

A presença de atividade para trombina também foi verificada para *P. vittata* (Jacobs *et al.*, 1990), assim como para outros hematófagos: *T. pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae), *Rhodnius prolixus* e *Anopheles albimanus* (Diptera: Culiicidae) (Noeske-Jungblut *et al.*, 1994; Francischetti *et al.*, 1999; Valenzuela *et al.*, 1999). A atividade para essa proteína confirma para os resultados observados no ensaio geral de coagulação (recalcificação), demonstrando a eficiência de inibição e fortalecendo a idéia de que ocorre a presença de importantes proteínas que auxiliam a alimentação e conseqüentemente a transmissão.



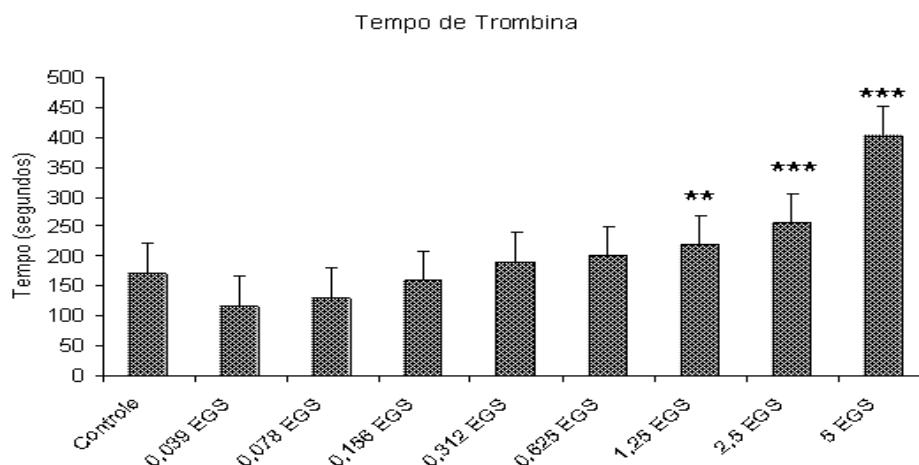


Figura 17 – Tempo de trombina do plasma na presença de extratos de glândulas salivares de *T. guianense*. Os asterísticos referem-se às diferenças entre o controle e as quantidades de pares de glândulas: 5; 2,5 EGS (\*\*\*)  $P < 0,001$ ); 1,25 EGS ( $P < 0,01$ ); 0,625; 0,312 0,156; 0,078; 0,039 EGS ( $P < 0,05$ ).

A interferência na via extrínseca de coagulação foi analisada através do ensaio de protrombina, no intuito de determinar em que via de coagulação onde as proteínas presentes na saliva estão exercendo efeito anticoagulante. Esse ensaio baseou-se no fundamento de que a lesão do tecido do hospedeiro, realizada pelo simulídeo durante a alimentação sanguínea, promove a interação entre o fator tissular (tromboplastina) com outros componentes da cascata de coagulação, resultando na formação do coágulo de fibrina no local da alimentação. E nesse ensaio, o teste de tempo de protrombina mede o tempo de coagulação do plasma após a adição de tromboplastina e cálcio.

Nesse ensaio, foi constatado que menos do que um par de glândula (0,625) aumentou de maneira significativa ( $P < 0,001$ ) o tempo de protrombina (figura 18)

sugerindo inibição da via extrínseca de coagulação. A prolongação no tempo de protrombina foi proporcional ao número de EGS no ensaio. Além disso, quantidades inferiores a 0,625 EGS não apresentam diferença estatística ( $P=0,149$ ). A atividade de anti-protrombina também foi encontrada para *P. vittata* (Abebe *et al.*, 1995) e *A. aegypti* (Stark & James, 1995).

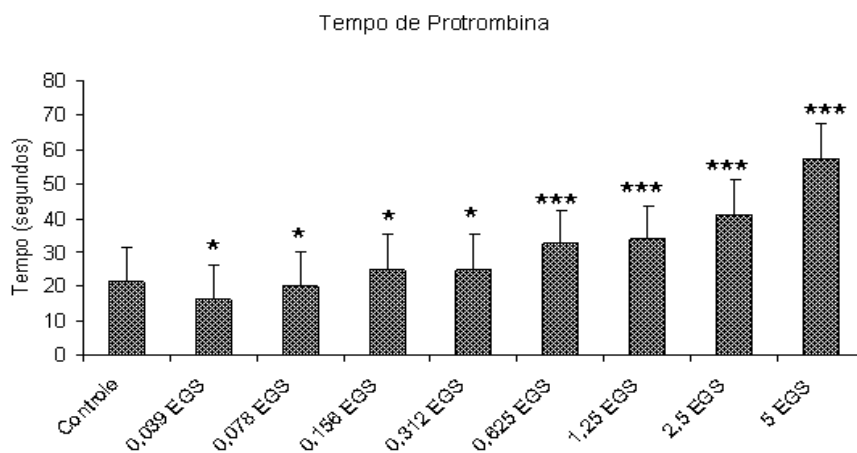


Figura 18 – Tempo de protrombina do plasma na presença de extratos de glândulas salivares de *T. guianense*. Os asterísticos referem-se às diferenças entre o controle e as quantidades de pares de glândulas: 5; 2,5; 1,25; 0,625 EGS (\*\*\*)  $P < 0,001$ ; 0,312; 0,156; 0,078 ; 0,039 EGS (\*  $P = 0,149$ ).

O ensaio de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) (figura 19) difere do ensaio de recalcificação devido à adição de um ativador plasmático – ácido elágico. Em geral, esse ensaio é sensível para deficiências de todos os fatores de coagulação exceto para o fator VII. Assim, foi constatado que os resultados foram similares ao tempo de recalcificação do plasma, onde o prolongamento deu-se a partir da mesma quantidade de extratos adicionada

(0,312 EGS) no tempo de recalcificação, com diferença estatisticamente significativa de ( $P < 0,001$ ). Quantidades de EGS de 0,156 a 0,078 também revelaram diferença estatística com ( $P < 0,01$ ).

Com os resultados obtidos, verificou-se que os extratos de glândulas salivares de *T. guianense* podem atuar diretamente sob as duas vias de coagulação (intrínseca, extrínseca e comum), prolongando o tempo de recalcificação do plasma, tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT), tempo de protrombina (PT) e tempo de trombina (TT) em relação ao controle. Essa atividade de anticoagulação está diretamente ligada com a quantidade de proteína salivar adicionada ao ensaio.

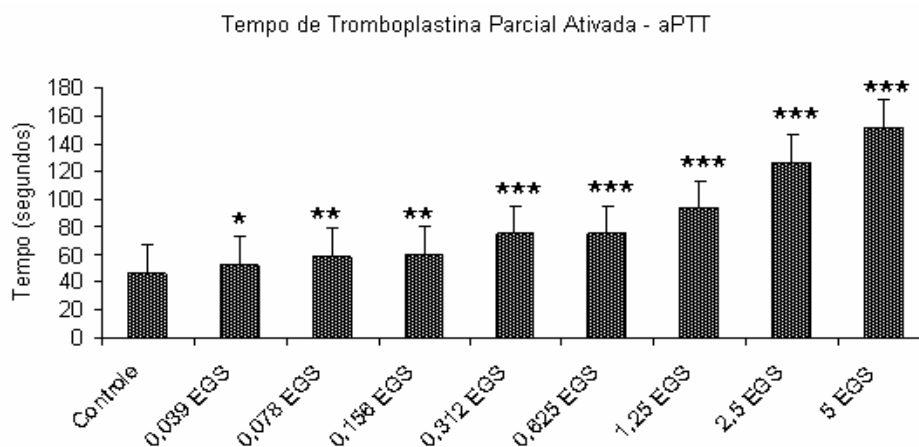


Figura 19 – Tempo de tromboplastina parcial ativada na presença de extratos de glândulas salivares de *T. guianense*. Os asterísticos referem-se às diferenças entre o controle e as quantidades de pares de glândulas: 5; 2,5; 1,25; 0,625 EGS (\*\* $P < 0,001$ ); 0,312; 0,156; 0,078 ( $P < 0,01$ ); 0,039 EGS (\*  $P < 0,05$ ).

Em virtude da atuação dos extratos sob as duas vias de coagulação (intrínseca, extrínseca e comum) comprovada pelos ensaios, possivelmente a atividade anti-coagulante tenha como alvos o fator X e a trombina, visto que essas duas enzimas são comuns para ambas às vias e finalizam na suas atividades na via comum. Mas para essa comprovação, seria importante teste com plasmas deficientes nesses fatores assim como realizar ensaios com substratos cromogênicos específicos.

Para *T. guianense*, foi observado que os extratos de glândulas salivares de fêmeas de 12h após a emergência já apresentam quantidades de proteínas suficientes para inibir a coagulação sanguínea do hospedeiro, sendo que essa atividade ocorreu até mesmo para quantidades de extratos referentes a duas vezes menos do que a quantidade de proteína referente para um único simúlideo. A atividade anticoagulante dessa espécie deve ser considerada muito maior, levando-se em conta que a saliva só é totalmente secretada 48 horas após a emergência (Cupp *et al.*, 1993), e a atividade mostrada nesses ensaios foi realizada para fêmeas com idade entre 12 – 24 horas.

Além disso, esse aumento de atividade é esperado de acordo como o modo da alimentação da fêmea, à qual é “pool feeders”, ou seja, não realizam sua alimentação sanguínea diretamente no vaso, além disso, essa atividade deve ser ainda muito maior devido ao fato desses insetos não se alimentarem num tempo muito próximo após a emergência.

A presença de antihemostático em saliva de *T. guianense* deve ainda ser melhor explorada, principalmente para a identificação das funções biológicas das proteínas verificadas no perfil protéico (figura 15), visto que algumas apresentam

massas moleculares muito próximas das encontradas para a saliva de outros simulídeos já estudados (tabela 1), sugerindo que novas proteínas possam também ser descobertas e analisada mais a fundo sua função, além de obter informações se elas são únicas ou não em estrutura em função.

Todos os dados bioquímicos obtidos para ensaios de coagulação na presença de extratos de proteínas salivares refletem o que se observa em campo durante a alimentação da fêmea de simulídeo. Visto que, se na saliva desse inseto não existisse proteínas capazes de prolongar por um determinado tempo a formação do coágulo, incapacitaria a alimentação e conseqüentemente a transmissão.

Resultados similares foram encontrados para esses ensaios usando extratos de *T. infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Para essa espécie foram constatados prolongamentos nos tempos de trombina, protrombina e tromboplastina parcial ativada. Enquanto que extratos de *P. megistus* foi observado perda somente de tempo de trombina e tempo parcial de tromboplastina parcial ativada (Pereira *et al.*, 1996). Essas diferenças encontradas para diferentes espécies mostram como esses hematofagos podem atuar diferencialmente na coagulação do hospedeiro.

Para extratos de *R. prolixus*, vetor de doença de Chagas foi detectado aumentos no tempo de tromboplastina parcial ativada e diminuição no tempo de protrombina, porém não estatisticamente significativa (Pereira *et al.*, 1996). Essas diferenças foram diretamente relacionadas também com a quantidade de proteína utilizada nos ensaios.

Diferenças também foram observadas ainda para triatomíneos, quando os mesmos ensaios foram realizados na presença de saliva no lugar dos extratos salivares. Para *P. megistus* observou-se um prolongamento no tempo parcial de tromboplastina parcial ativada, enquanto que para a saliva de *T. infestans* ocorreu um prolongamento do tempo de tromboplastina parcial ativada e tempo de protrombina, provavelmente por interferir originalmente na atividade para o fator VIII (via intrínseca) e fator V (via comum) (Pereira *et al.*, 1996).

Para a família Tabanidae (Diptera) foram observados em alguns gêneros (*Atylotus*, *Haematopota*, *Heptaoma*, *Hybomitra* e *Tabanus*) que a atividade anticoagulante está baseada principalmente na presença de um potente inibidor de trombina, com forte atividade para *T. bovinus* (Kazimirová *et al.*, 2002), que provavelmente está relacionada a um peptídeo de 7kDa denominado de Tabanina (Markwardt, 1994).

Para extratos de glândulas salivares de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) observaram interferências na coagulação normal com um prolongamento de TT, PT a APTT. Após esses resultados, foram testados plasmas deficientes nos fatores de coagulação e verificaram perdas em plasmas deficientes no fator V, VII e XIII indicando que outros fatores na cascata de coagulação também foram inibidos (Cupp *et al.*, 2000).

Para os simulídeos já estudados, foram observadas correlações positivas entre as quantidades de proteína e as percentagens de inibição do fator Xa. Para *E. ochracea* foi encontrado 98.8% de inibição, seguido de 93.8% para *A. metallica*, 89.8% para *P. arga* e 82.9% para *P. vittata*. Para ensaios de trombina foi

encontrada inibição de 59.8% para *P. arga* e com 53.8% para *P. vittata* (Abebe *et al.*, 1994).

Além disso, a atividade anticoagulante em geral, apresenta uma associação positiva com a antropofilia, podendo variar de acordo com a espécie (Cupp & Cupp, 1997). Já no caso específico para a atividade anti-trombina, ela pode variar dentro de espécies e exibem uma correlação positiva com a zoófilia (Cupp & Cupp, 1997).

Em *Culicoides variipennis sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) a atividade anticoagulante foi observada devido um prolongamento no tempo de recalcificação do plasma; onde a retardação no tempo de formação do coágulo foi observada em ensaios os quais foram adicionais fatores da via intrínseca e extrínseca; além da atividade ter sido positivamente relacionada com a dose aplicada (Perez de Leon *et al.*, 1998).

Para *Cimex lectularis* (Hemiptera: Cimicidae) foi observado prolongamento no tempo de recalcificação de plasma citratado humano, onde apenas um par de glândula salivar com o equivalente de 3,4 µg de proteína foi capaz de dobrar o tempo do plasma humano normal, enquanto que para o tempo de tromboplastina foram necessários três pares de glândulas (Valenzuela *et al.*, 1996) .

De acordo com os trabalhos realizados com extratos salivares de hematófagos, observa-se que a maioria dos anticoagulantes isolados são proteínas de massas moleculares de ~ 5 – 65 kDa (Stark & James, 1996; Kazimírová *et al.*, 2002), atuando em uma ou mais vias de coagulação sanguínea

(intrínseca, extrínseca e comum) inibindo a hemostasia com diminuição do tempo de alimentação (Champagne & Valenzuela, 1996).

Para *T. guianense* foi observado proteínas com massas moleculares semelhantes para outra espécie estudada (tabela 5), com exemplo, uma banda com 15 kDa com função vasoativa, podendo inclusive exercer a mesma atividade biológica. Outra proteína similar encontrada de ~ 64 kDa pode ser a relatada com atividade de apirase, enzima responsável pela atividade anti-agregante presente em quase todos hematófagos. Em *P. vittata*, um anti-fator Xa (anticoagulante) apresentou massa de 18 kDa, enquanto *T. guianense* apresentou uma proteína de 16 kDa. Outras proteínas abundantes (31, 33 e 39 kDa) devem ser também explorada no intuito de se determinar suas funções.

Outro fato relacionado refere-se a respeito da quantidade de proteína necessária para executar a atividade anticoagulante. O fato de um inseto apresentar uma baixa quantidade de proteína não significa que ele não possa apresentar uma alta atividade anticoagulante. Em tabanídeos, por exemplo, a atividade hemostática não tem correlação com a quantidade de proteína total (Kazimírová *et al.*, 2002), diferente de *An. albimanus* (Diptera: Culicidae), que apresenta uma baixa quantidade de proteína e uma alta atividade anticoagulante e vasodilatadora. Enquanto que *A. aegypti* (Diptera: Culicidae) apresenta alta quantidade de proteína e baixa atividade anticoagulante de apirase e vasodilatadora (Ribeiro, 2000).

Segundo Abebe *et al.* (1994) e Ribeiro (2000) as diferentes estratégias antihemostáticas dependem diretamente dos hospedeiros os quais estão adaptados a realizar a alimentação sanguínea, por exemplo, para *P. vittata*



(Diptera: Simuliidae) ao utilizar diferentes plasmas deficientes em fatores de coagulação (V, VIII, IX, XI, XII) na presença de saliva foi verificado um prolongamento no tempo de formação do coágulo, com exceção para o plasma deficiente no fator V (Abebe *et al.*, 1996), enquanto que Jacobs *et al.* (1990), encontraram para os outros fatores atividade somente para o plasminogênio e de não inibição para o fator VII.

**Tabela 5 – Massas moleculares das proteínas salivares encontradas em *T. guianense* e em *P. vittata***

Espécie	Massa molecular (kDa)	Função biológica	Fonte
<i>T. guianense</i>	69	-	
	64	-	
	41	-	
	39	-	
	33	-	
	31	-	
	28	-	
	16	-	
	15	-	
<i>P. vittata</i>		Anti-fator V	Abebe <i>et al.</i> , 1996
	66	Apirase	Cupp <i>et al.</i> , 1995
	18	Anti-fator Xa	Jacobs <i>et al.</i> , 1990
			Abebe <i>et al.</i> , 1994
	15	Proteína eritrema (SVEP)	Cupp <i>et al.</i> , 1998
	11	Anti-trombina	Abebe <i>et al.</i> , 1994
		Abebe <i>et al.</i> , 1995	

Obs: *T. guianense* apresenta três bandas com massas moleculares acima de 69 kDa, demonstrado no gel 15%.

*P. vittata* é a espécie de simulídeo mais estudada até o momento, devido ser a única criada e mantida sob condições de laboratório, e embora não esteja envolvida na transmissão de parasitas, já foram encontradas diferentes proteínas,

entre as quais: apirase, simulidina com massa de 11kDa, anti-fator Xa com 18 kDa, anti-fator V com 300 kDa e SVEP que possui atividade vasodilatadora com massa molecular de 15kDa (Jacobs *et al.*, 1990; Abebe *et al.*, 1995; Cupp *et al.*, 1998). Para *T. guianense* as proteínas observadas apresentaram massas moleculares muito próximas as que apresentam atividade anticoagulante para outros simulídeos, fato que deve ser mais explorado para a espécie em questão.

Para a família Culicidae, a atividade anticoagulante também pode variar de acordo com a espécie: para *An. albimanus*, o qual apresenta 1,0 µg de proteína por par de glândula, foi observado um prolongamento no tempo de recalcificação, além de que para o extrato de glândula salivar dessa espécie foi constatado a presença de um potente inibidor de trombina que induz a agregação plaquetária (Stark & James, 1998; Valenzuela *et al.*, 1999). Enquanto que em *A. aegypti* foi encontrado um inibidor de fator Xa (Stark & James, 1998).

Para *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), os extratos salivares não inibem a agregação plaquetária através da apirase (enzima anti-agregante), e também não foi detectada atividade vasodilatadora, sugerindo que essa espécie apresenta um repertório de fatores antihemostáticos muito limitado (Cupp *et al.*, 1998). Além disso, essa espécie apresenta um inibidor de trombina com massa de 16 kDa denominado de Trombostasina (TS), refletindo que esses potentes inibidores encontrados na saliva podem facilmente ser usados como agentes terapêuticos e reagentes para o tratamento e para a compreensão da hemostasia em humanos e animais (Zhang *et al.*, 2002).

Para triatomíneos, já foram identificadas várias proteínas, como: diferentes lipocalinas em *R. prolixus*, as quais servem como anticoagulantes (Ribeiro *et al.*, 1995), como carreadores de óxido nítrico (Champagne *et al.*, 1995), ligadores de ADP (Francischetti *et al.*, 2000) onde cada um afeta diferentes aspectos da hemostasia ou inflamação dos seus hospedeiros. Enquanto que em *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) foi purificado um inibidor de trombina denominado de Triabina, o qual inibe a agregação plaquetária, induzida por trombina, prolongando o tempo de trombina e o tempo parcial de tromboplastina parcial ativada com massa molecular de 21 kDa; além da Pallidipina que inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno (Noeske-Junglut *et al.*, 1995).

Para Tse-tse, *Glossina morsitans morsitans* foi encontrado um potente inibidor de trombina de massa molecular de 3.530 kDa (Capello *et al.*, 1998).

A saliva de *L. longipalpis* (Diptera: Psychodidae) possui propriedades imunomodulatórias, tais como: inibição da proliferação de células T, formação da hipersensibilidade do tipo tardia, inibição de TNF- $\alpha$  e estimulação de IL-6 e IL-10. Essas propriedades são importantes no processo de infecção das leishmanioses (Bezerra *et al.*, 1996; Belkaid *et al.*, 2000; Kamhawi, 2000; Bezerra & Teixeira, 2001; Morris *et al.*, 2001; Zer *et al.*, 2001).

Essa intensa busca na descoberta de novas proteínas na saliva de vetores tem aumentado muito envolvendo prováveis descobertas de novos compostos nos próximos anos. Principalmente com os avanços da biologia molecular, à qual proporciona que essas substâncias sejam produzidas em quantidades necessárias para investigações bioquímicas, farmacológicas e imunológicas; além de que

essas pesquisas ganharam nos últimos anos novas abordagens no estudo proteomas e engenharia de proteínas (Markwardt, 1994; Zavalova *et al.*, 2000; Ciprandi *et al.*, 2003).

Em anos de pesquisa com compostos anticoagulantes a principal substância utilizada ainda hoje é a heparina (à qual inibi a trombina via ativação da antitrombina); porém ainda apresenta problemas no uso, tais como necessidade de antitrombina para ação anticoagulante, incapacidade de inativar a trombina ligada ao coágulo e ligação inespecífica a outras proteínas plasmáticas que não a trombina. Nos últimos anos tem sido realizado um grande esforço para desenvolver novas drogas anticoagulantes (Ciprandi *et al.*, 2003). É interessante notar que essas atividades biológicas são desempenhadas por quantidades muito pequenas de compostos presentes nas glândulas salivares desses insetos.

A função da saliva ainda é parcialmente entendida em poucas espécies de artrópodos, tendo em vista que à alimentação sanguínea é altamente especializada por cada grupo de hematófago (Ribeiro, 1995).

Atualmente, sabe-se que a saliva pode modular diferentes componentes do sistema imune, aumentando assim a oportunidade da transmissão dos patógenos durante a alimentação sanguínea, sugerindo inclusive que no futuro possa ser confeccionada uma vacina que atue diretamente contra um ou mais componentes salivares, servindo como uma alternativa para o controle da cegueira dos rios (Cupp & Cupp, 1997).

Embora as glândulas salivares apresentem importantes funções, não existe nenhum conhecimento na literatura tanto nos aspectos morfológicos das glândulas salivares quanto bioquímicos para o principal vetor da oncocercose no Brasil,

sendo este o primeiro estudo nessa linha de pesquisa. É possível que essas proteínas sejam agentes promissores para tratamento de diversas doenças. Tais moléculas estão sendo descobertas, e fazem parte de uma “farmácia natural”, por isto é razoável investir e dar continuidade nessa linha de pesquisa para insetos amazônicos; para que num futuro seja possível, por exemplo, buscar medidas alternativas no tratamento das doenças tropicais a partir de substâncias presentes em uma biodiversidade ainda pouco explorada.

Sugere-se, com base nesse estudo, que sejam implementados estudos sobre proteínas de *T. guianense*, com ênfase nos aspectos da caracterização morfológica das glândulas salivares para se reconhecer as células secretoras de saliva e as maneiras e momentos de secreção. Como também, em pesquisas que visem purificação, isolamento e caracterização dos compostos presentes na saliva e suas respectivas funções biológicas para que metas aplicáveis à saúde pública tais como confecção de vacinas viáveis a diminuir ou bloquear a transmissão das doenças parasitárias, e em especial da oncocercose no Brasil.

## 6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos para *T. guianense* conclui-se que:

- O principal vetor da oncocercose no único foco brasileiro, *T. guianense* apresenta nas glândulas salivares proteínas com atividades anticoagulantes para plasma humano comercial.
- A quantidade média de proteína total presente nas glândulas salivares de *T. guianense* foi de 1,07µg.
- As proteínas salivares apresentam uma baixa complexidade protéica, com 12 bandas, sendo um perfil semelhante a *E. ochracea*, vetor da oncocercose na Guatemala.
- As proteínas salivares mostraram atividade de inibição perante todos os ensaios de coagulação realizados. Concluindo que extratos de proteínas totais de fêmeas de 12 horas após a emergência já apresentam uma ou mais proteínas responsáveis para exercer atividade anticoagulante.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abebe, M.; Cupp, M.S.; Ramberg, F.B.; Cupp, E.W. 1994. Anticoagulant activity in salivary gland extracts of black flies (Diptera: Simuliidae). *Journal of Medical Entomology*, 31: 908 - 911.
- Abebe, M.; Cupp, M.S.; Champagne, D.; Cupp, E.W. 1995. Simulidin: a black fly (*Simulium vittatum*) salivary gland protein with anti-thrombin activity. *Journal of Insect Physiology*, 41 (11): 1002 – 1006.
- Abebe, M.; Ribeiro, J.M.C.; Cupp, M.S.; Cupp, E.W. 1996. Novel anticoagulant from salivary glands of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) inhibits activity of coagulation factor V. *Journal of Medical Entomology*, 33 (1): 173 - 176.
- Al-Ahdal, M.N.; Al-Hussain, K.; Thorogood, R.J.; Reilly, H.C.; Wilson, J.D. 1990. Protein constituents of mosquito saliva: studies on *Culex molestus*. *Journal of Tropical Medical Hygiene*, 93: 98 - 105.
- Andreazze, R.; Py-Daniel, V. 1999. Atividade hematofágica mensal e infecção natural de *Psaroniocompsa incrustata* (Lutz, 1910) (Diptera, Culicomorpha, Simuliidae) vetor de *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1983) em Xitei/Xidea, área indígena Yanomami, Roraima, Brasil. *Entomologia y Vectores*, 6 (4): 416 - 440.
- Barbosa, S.E.; Diotaiuti, L.; Soares, R.P.P.; Pereira, M.H. 1999. Differences in saliva composition among three Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Tropica*, 72: 91 - 98.
- Barbosa, S.E.; Diotaiuti, L.; Braga, E.M.; Pereira, M.H. 2004. Variability of the salivary proteins of 20 Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Acta Tropica*, 92: 25 - 33.

- Beazorti, P.; Lane, E.; Menezes, Jr. 1967. Relato de um caso de oncocercose adquirida no Brasil. *Revista Paulista de Medicina*, 70: 102.
- Beerntsen, B.T.; Champagne, D.E.; Coleman, J.L.; Campos, Y.A.; James, A.A. 1999. Characterization of the Sialokinin I gene encoding the salivary vasodilator of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, 8 (4): 459 - 467.
- Belkaid, Y.; Valenzuela, J.; Kamhawi, S.; Rowton, E.; Sacks D.L.; Ribeiro, J.M.C. 2000. Delayed-type hypersensitivity of *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97: 6704 - 6709.
- Bezerra, H.S.; Viana, J.R.; Teixeira, M.J.; Chaves, C.S.; Bastos de Araújo, B.; Lima Filho, J.H. 1996. Evaluation of direct agglutination tests in the detection of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* in possible reservoirs of cutaneous American leishmaniasis in the state of Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 29 (2): 181 - 184.
- Bezerra, H.S.; Teixeira, M.J. 2001. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera:Psychodidae) salivary glands lysates on *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* infection in Balb/c mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 349 - 351.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248 - 254.
- Brennan, J.D.; Kent, M.; Dhar, R.; Fujioka, H.; Humar, N. 2000. *Anopheles gambiae* salivary glands as putative targets for blocking transmission of



malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97 (5): 13859 - 13864.

Cappelo, M.; Song, L.; Xiaoi, C.; Chang-Ben, L.; Harrison, L.; Narashimhan, S.; Beard, C.B.; Aksoy, S. 1998. Tse tse thrombin inhibitor: bloodmeal - induced expression of an anticoagulant in salivary glands and gut tissue of *Glossina morsitans morsitans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95, 14290 -14295.

Champagne, D.E.; Smartt, C.T.; Ribeiro, J.M.C.; James, A.A. 1995. The salivary glands-specific apyrase of the mosquito, *Aedes aegypti*, is a member of the 5'nucleotidase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92: 694 - 698.

Champagne, D.; Valenzuela, J.G. 1996. Pharmacology of hematophagous arthropod saliva. In: *Immunology of Host-Ectoparasite Arthropod Relationships* (S.K. Wikel, Ed.), CAB International, Wallingford England, pp. 85-106.

Ciprandi, A.; Horn, F.; Termignoni, C. 2003. Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 25 (4): 250-262.

Cross, M.L.; Cupp, M.S.; Cupp, E.W.; Ramberg, F.B.; Enriquez, E.J. 1993a. Antibody responses of Balb/c mice to salivary antigens of hematophagous black flies (Diptera: Simuliidae). *Journal of Medical Entomology*, 30 (4): 725 - 734.

Cross, M.L.; Cupp, M.S.; Cupp, E.W.; Galloway, A.L.; Enriquez, E.J. 1993b. Modulation of murine immunological responses by salivary gland extracts of

- Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *Journal of Medical Entomology*, 30: 928 - 935.
- Cross, M.L.; Cupp, M.S.; Cupp, E.W.; Enriquez, E.J. 1994. Modulation of murine cellular immune responses and cytokines by salivary gland extracts of black fly *Simulium vittatum*. *Tropical of Medical Parasitology*, 45: 119 - 124.
- Crosskey, R.W. 1990. The natural history of blackflies. Edit. John Wiley & Sons, New York, 711p.
- Crosskey, R.W.; Howard, T.M. 2004. A revised taxonomic and geographical inventory of world blackflies (Diptera: Simuliidae). *The Natural History Museum*, 81p.
- Cupp, M.S.; Ribeiro, J.M.C.; Cupp, E.W. 1994. Vasodilative activity in black fly salivary glands. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50: 241 - 246.
- Cupp, M.S.; Cupp, E.W.; Ochoa-a, J.O.; Moulton, J.K. 1995. Salivary apyrase in New World black flies and its relationship to onchocerciasis vector status. *Medical Veterinary Entomology*, 9: 325 - 330.
- Cupp, E.W.; Cupp, M.S. 1997. Black fly (Diptera: Simuliidae) salivary secretions: Importance in vector competence and disease. *Journal of Medical Entomology*, 34 (2): 87 - 94.
- Cupp, M.S.; Ribeiro, J.M.C.; Champagne, D.E.; Cupp, E.W. 1998. Analyses of cDNA and recombinant protein for a potent vasoactive protein in saliva of a blood-feeding black fly, *Simulium vittatum*. *Journal of Experimental Biology*, 201: 1553 - 1561.

- Cupp, M.S.; Zhang, D.; Cupp, E.W. 2000. Horn fly saliva targets thrombin action in hemostasis. *Journal of Medical Entomology*, 37,416 - 421.
- Davies, D.M.; Peterson, B.V. 1956. Observations on the mating, feeding, ovarian development and oviposition of adult black flies (Simuliidae: Diptera). *Canadian Journal of Zoology*, 34: 615 - 655.
- Enserink, M. 2001. Infectious diseases, sand fly saliva may be key to new vaccine. *Science*, 293 (5532): 1028.
- Fallis, A.M. 1964. Feeding and related behavior of female Simuliidae (Diptera). *Experimental Parasitology*, 15: 439 - 470.
- Francischetti, I.M.; Valenzuela, J.Z.; Ribeiro, J.M.C. 1999. Anophelin: kinetics and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry*, 38: 16678 - 16685.
- Francischetti, I.M.; Ribeiro, J.M.C.; Champagne, D.; Andersen, J. 2000. Purification, cloning, expression and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 12639 - 12650.
- Gerais, B.B.; Ribeiro, T.C. 1986. Oncocercose primeiro caso autóctone da região centro – oeste do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 19 (2): 105 - 107.
- Gillespie, R.D, Mbow M. L.; Titus R.G. 2000. The immunomodulatory factors of blood feeding arthropod saliva. *Parasite Immunology*, 22: 319 - 331.
- Gosbee, J.; Allen, J.R.; West, A.S. 1969. The salivary glands of adult blackflies. *Canadian Journal of Zoology*, 47: 1341 - 1344.
- Grillet, M.E.; Besanez, M.G.; Vivas-Martinez, S.; Villamizan, N.; Frontado, H.; Cortez, J.; Coronel, P.; Botto, C. 2001. Human onchocerciasis in the

- Amazonian area of southern Venezuela: spatial and temporal variations in biting and parity rates of black fly (Diptera: Simuliidae) vectors. *Journal of Medical Entomology*, 38 (4): 520 - 530.
- Jacobs, J.W.; Cupp, E.W.; Sardana, M.; Friedman, P. 1990. Isolation and characterization of a coagulation factor Xa inhibitor from black fly salivary glands. *Thrombosis and Haemostasis*, 64: 235 - 238.
- Kamhawi, S. 2000. The biological and immunomodulatory properties of sand fly and its role in the establishment of Leishmania infections. *Microbes and Infection*, 2: 1765 - 1773.
- Kazimírová, M.; Sulanová, M.; Trimmell, A.R.; Kozánek, M.; Vidlicka, L.; Labuda, M.; Nuttall. 2002. Anticoagulant activities in salivary glands of tabanid flies. *Medical Veterinary Entomology*, 16: 301 - 309.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of the structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680 - 685.
- Lanzaro, G.C.; Lopes, A. H. C.S.; Ribeiro, J.M.C.; Shoemaker, C.B.; Warburg, A.; Soares, M.; Titus, R.G. 1999. Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Insect Molecular Biology*, 8 (2): 267 - 275.
- Lorenzi, T.F. 1999. Manual de Hematologia – *Propedêutica e Clínica*. 2 Edição. MEDSI.
- Marinotti, O.; James, A. A.; Ribeiro, J.M.C. 1990. Diet and salivation in female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*, 36: 545 - 548.

- Marinotti, O., Brito, M.; Moreira, C.K. 1996. Apyrase and  $\alpha$ -glucosidase in the salivary glands of *Aedes albopictus*. *Comparative Biochemistry Physiology*, 113B (4): 675-679.
- Markwardt, F. 1994. Inventory of coagulation inhibitors from animals feeding on blood. *Thrombosis and Haemostasis*, 72: 477 - 480.
- Medeiros, J.F.; Py-Daniel, V. 1999. Atividade hematofágica e infecção natural de três espécies de Simuliidae (Diptera: Culicomorpha) em Xitei/Xidea, área indígena Yanomami, Roraima, Brasil. *Entomologia y Vectores*, 6(3): 210 - 226.
- Moraes, M.A.P.; Fraiha, h.I.; Chaves, G.M. 1973. Onchocerciasis in Brazil. Pan American Health Organization Bulletin, 7(4):50 - 56.
- Moraes, M.A.P.; Chaves, G.M. 1974. Um caso de oncocercose no Território de Roraima, Brasil. *Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo*, 16: 110 - 113.
- Moreira, C.K.; Marrelli, M.T.; Lima, S.P.; Marinotti, O. 2001. Analysis of salivary gland proteins of the mosquito *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *Journal Medical Entomology*, 38 (5): 763 - 767.
- Nascimento, E.P.; dos Santos Malafrente, R.; Marinotti, O. 2000. Salivary gland proteins of the mosquito *Culex quinquesfasciatus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 43: 9 - 15.
- Nobel, J.; Jr.; Valverde, L.; Equia, O.E.; Serrate, O.; Autezana, E. 1974. Hemorrhagic exanthema of Bolívia. *American Journal of Epidemiology*, 99: 123-130.
- Noeske-Jungblut, C.; Kratzschmar, J.; Haendler, B.; Alagon, A.; Possani, L.; Verhallen, P.; Donner, P.; Schleuning, W.D. 1994. An inhibitor of collagen-

- induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (7): 5050 - 5053.
- Noeske-Jungblut, C.; Haendler, B.; Donner, P.; Alagon, A.; Possani, L.; Schleuning, W.D.; 1995. Triabin a highly potent exosite inhibitor of thrombin. *Journal of Biological Chemistry*, 270 (48): 28629 - 28634.
- Pereira, M.H.; Souza, M.E.L.; Vargas, A.P.; Martins, M.S.; Penido, C.M.; Diotaiuti, L. 1996. Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/Triatomine). *Acta Tropica*, 61: 255 - 261.
- Pérez de Leon, A.A.; Valenzuela, J.G.; Tabachnick, W.J. 1998. Anticoagulant activity in salivary glands of the insect vector *Culicoides variipennis sonorensis* by an inhibitor of factor Xa. *Experimental Parasitology*, 88: 121 - 130.
- Pinheiro, F.P.; Bensabath, G.; Costa, D.; Maroja, O.M.; Lins, Z.C.; Andrade, A.H. 1974. Hemorrhagic Syndrome of Altamira. *The Lancet*, 13: 639 - 642.
- Py-Daniel, V. 1989. Oncocercose no Solimões. *Revista de Saúde Pública*, 23 (3): 260.
- Py-Daniel, V. 1994. Algumas considerações sobre o Programa de Eliminação da Oncocercose para as Américas, *Memórias Del CAICET IV* (1,2): 157 - 161.
- Py-Daniel, V. 1997. Oncocercose, uma endemia focal no Hemisfério norte da Amazônia, 111-155. In: *Homem, Ambiente e Ecologia no Estado de Roraima*, Eds. Barbosa, R.I.; Ferrera, E. & Castellón, E. INPA 613p.
- Py-Daniel, V.; Moreira-Sampaio, R.T. 1994. *Jalacimgomyia* Gen. (Culicomorpha); A ressurreição de *Gymnopauidinae*; a Eliminação do Nível Tribal, Apresentação de Novos Caracteres e a Redescrção dos Estágios larval e

- pupal de *Simulium colombaschense* (Fabricius, 1787) (Diptera, Simuliidae). *Memorias del CAICET IV*, (1,2): 101 - 148.
- Py-Daniel, V.; Passos, M.C.V.; Medeiros, J.F. 1999. Dinâmica da atividade hematofágica (preferências horárias-tópicas) e estado reprodutivo das fêmeas de *Thyrsopelma guianense* (Wise,1911) (Diptera,Simuliidae,Culicomorpha) principal vetor da filária *Onchocerca volvulus* (Leuckart,1893) no Brasil. *Entomologia y Vectores*, 6 (4): 339 - 360.
- Py-Daniel, V.; Andreazze, R.; Medeiros, J.F. 2000. Projeto piloto Xitei/Xidea (Roraima). Índices epidemiológicos da transmissão de *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893) para os anos de 1995-1996. *Entomologia y Vectores*, 7 (4): 389 - 444.
- Quereshi, A.A.; Asahina, A.; Ohnuma, M.; Tajima, M.; Granstein, R.D.; Lerner, E.A. 1996. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 54: 665 - 675.
- Racioppi, J.V.; Spielman, A. 1987. Secretory proteins from the salivary glands of adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochemistry*, 17: 503.
- Ribeiro, J.M.C. 1987. Role of arthropod saliva in blood-feeding. *Annual Review of Entomology*, 32: 463 - 478.
- Ribeiro, J.M.C. 1989. Vector saliva and its role in parasite transmission. *Experimental Parasitology*, 69: 104 - 106.
- Ribeiro, J.M.C. 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infectious Agents and Disease*, 4: 143 – 152.

- Ribeiro, J.M.C. 2000. Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-hemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). *Medical Veterinary Entomology*, 14: 142 - 148.
- Ribeiro, J.M.C.; Garcia, E.S. 1980. The salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. *Journal Insect Physiology*, 26: 303 - 307.
- Ribeiro, J.M.C.; Sarkis, J.J.F.; Rossignol, P.A.; Spielman, A. 1984. Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. *Comparative Biochemistry Physiology*, 79B: 81 - 86.
- Ribeiro, J.M.C.; Rossignol, P.A.; Spielman, A. 1985. Salivary gland apyrase determines probing time in *Anopheline* mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*, 31: 689 - 692.
- Ribeiro, J.M.C.; Rossignol, P.A.; Spielman, A. 1986. Blood-feeding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Comparative Biochemistry Physiology*, 83A: 683-686.
- Ribeiro, J.M.C.; Francischetti, I.M.B. 2001. Platelet-activating-factor-hydrolyzing phospholipase C in the salivary glands and saliva of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Experimental Biology*, 204: 3887 - 3894.
- Rossignol, P.A.; Ribeiro, J.M.C.; Spielman, A. 1984. Increased intradermal probing time in sporozoite-infected mosquitoes. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 33: 17 - 20.
- Shelley, A.J.; Lowry, C.A.; Maia-Herzog, M.; Luna Dias, A.D.A.; Moraes, M.A.P. 1997. Biosystematic studies on the Simuliidae (Diptera) of the Amazonia Onchocerciasis Focus. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology*, 66(1): 1 - 121.



- Stark, K.R.; James, A.A. 1995. A factor Xa-directed anticoagulant from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Experimental Parasitology*, 81: 321 - 331.
- Stark, K.R.; James, A.A. 1996. Salivary gland anticoagulants in Culicine and Anopheline mosquitoes (Diptera, Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 33 (4): 645 - 650.
- Stark, K.R.; James, A.A. 1998. Isolation and characterization of the gene incoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of Tropical Chemistry*, 273: 20802 - 20809.
- Sutcliffe, J.F.; Mclver, S.B. 1984. Mechanics of blood-feeding in black flies (Diptera: Simuliidae). *Journal of Morphology*, 180: 125 - 144.
- Titus, R.G.; Ribeiro, J.M.C. 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivite. *Science*, 239: 1306 - 1308.
- Titus, R.G.; Ribeiro, J.M.C. 1990. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. *Parasitology Today*, 6 (5): 157 – 160.
- Valenzuela, J.G.; Guimarães, J.A.; Ribeiro, J.M.C. 1996. A novel inhibitor of factor X activation from the salivary glands of the bed bug *Cimex lectularius*. *Experimental Parasitology*, 83: 184 - 190.
- Valenzuela, J.G.; Francischetti, I.M.B.; Ribeiro, J.M.C.; 1999. Purification, cloning and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*. *Biochemistry*, 38:11209 - 11215.
- Valenzuela, J.G.; Belkaid, Y.; Garfield, M.K.; Mendez, S.; Kamahawi, S.; Rowton, E.; Sacks, D.L.; Ribeiro, J.M.C. 2001. Toward a defined anti-*Leishmania*

- vaccine targeting vector antigens: Characterization of a protective salivary protein. *Journal of Experimental Medicine*, 194 (3): 331 -342.
- Verrastro, T. 1996. Hematologia e hemoterapia – *Fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica*. Editora Atheneu, São Paulo.
- Volf, P.; Tesarová, P.; Nohynkova, E. 2000. Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. *Medical Veterinary Entomology*, 14: 251 - 256.
- WHO. 2003. River Blindness Foudation - RBF. *Eye of the Eagle*. 4(1): 1 - 11.
- Yang, Y.J.; Davies, D.M. 1968a. Amylase activity in black-flies and mosquitoes (Diptera). *Journal of Medical Entomology*, 5: 9 - 13.
- Yang, Y.J.; Davies, D.M. 1968b. Digestion, emphasizing trypsin activity in simuliids (Diptera) fed blood, blood-sucrose mixtures and sucrose. *Journal of Insect Physiology*, 14: 205 - 222.
- Yang, Y.J.; Davies, D.M. 1968c. Occurrence and nature of invertase activity in adult black-flies (Simuliidae). *Journal of Insect Physiology*, 14: 1221 - 1232.
- Yang, Y.J.; Davies, D.M. 1974. The saliva of adult female blackflies (Simuliidae: Diptera). *Canadian Journal of Zoology*, 52: 749 – 753.
- Zer, R.; Yaroslavski, I.; Rosen, L.; Warburg, A. 2001. Effect of sand fly saliva on Leishmania uptake my murine macrofages. *International Journal of Parasitology*, 31: 810 - 814.
- Zhang, D.; Cupp, M.S.; Cupp, E.W. 2002. Thrombostasin: purification molecular cloning and expression of a novel anti-thrombin protein from horn fly saliva. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 32 (3): 321 - 30.

## **8. ANEXOS:**

### **8.1. SOLUÇÕES**

#### **A) Procedimento: Preparação do reagente de Bradford, 1976**

1. Pesar 100 mg de comassie-blue G-250
2. Diluir o corante em 500 mL H<sub>2</sub>O miliq
3. Adicionar 50 mL etanol 95%
4. Adicionar 100 mL ácido fosfórico 85%
5. Elevar o volume à 1L
6. Filtrar antes de estocar
7. Guardar em vidro âmbar

A concentração final do reagente foi de 0,01% (p/v) comassie-blue G-250, 4,7% (p/v) etanol, 8,5 % (p/v) de ácido fosfórico.

#### **B) Procedimento: Preparação do gel de poliacrilamida SDS-PAGE**

1. Acrilamida/bisacrilamida (29:1) 30% (p/v)
  - Usar luvas e máscara, devido ser um material neurotóxico.
2. Tris-HCl 1,5 M; pH 8,8
3. Tris-HCl 1,0 M; pH 6,8
4. SDS 10% (p/v)
5. Catalisadores:
  - a) Persulfato de amônio (APS) 10% (p/v), preparado na hora do uso.
  - b) TEMED (adquirido como uma solução pronta para o uso)
6. Tampão de amostra 4X
7. Tampão de corrida (5X) (estoque)

Tris – 15,1g ou 125mM

Glicina - 72,06g ou 0,96M

SDS – 5g ou 0,5% (p/v)

#### 8. Solução corante

Azul brilhante de Coomassie R-250 0,25% (p/v)

Metanol 30% (v/v)

Ácido acético glacial 7% (v/v)

H<sub>2</sub>O<sub>miliq</sub>

Agitar bem (agitador magnético)

Filtrar em papel de filtro

#### 9. Solução descorante

Metanol 30% (v/v)

Ácido acético glacial 7% (v/v)

H<sub>2</sub>O<sub>miliq</sub>

### **C) Procedimento: Coloração com nitrato de prata**

1. Após o término da eletroforese, retirar o gel e colocar em um refratário com H<sub>2</sub>O<sub>miliq</sub>;

2. Lavar o gel em água por 5 minutos;

3. Colocar o gel em solução fixadora Metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído por 2h;

Solução fixadora:

- 200 mL de metanol
- 48 mL de ácido acético

- 300  $\mu$ L formaldeído
- Volume final = 300 mL

4. Três trocas de 20' cada, sob agitação, com solução etanol 50%

- Utilizar 300 mL em cada troca

5. Solução de Tiosulfato de sódio por 1'

- Solução = 0,06g/300 mL H<sub>2</sub>O

OBS: \* Guardar 16 mL desta solução para a solução reveladora

6. Três trocas de 20" com H<sub>2</sub>O

7. Solução com nitrato de prata por 20' com H<sub>2</sub>O

- AgNO<sub>3</sub> – 0,6g
- Formaldeído – 225  $\mu$ L
- Volume final = 300 mL

8. Três trocas de 20" com H<sub>2</sub>O

9. Solução reveladora

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – 24g
- Formaldeído – 200  $\mu$ L
- \* Solução Tiosulfato de Na (anteriormente preparada) -

16 mL. Aplicar somente no momento da aplicação.

- Volume final = 400 mL

10. Interrupção com ácido acético 5% por 10'

- Volume final = 200 mL

**D) Composição do gel de poliacrilamida 15%**

Reagente	Gel separador 15%	Gel concentrador 5%
<i>H<sub>2</sub>O</i>	6,9 mL	4,1 mL
<i>Ac/B 30% (29:1)</i>	15,0 mL	1,0 mL
<i>Tris-HCl 1,5M; pH 8,8</i>	7,5 mL	XXX
<i>Tris-HCl 1,0M; pH 6,8</i>	XXX	0,75 mL
<i>SDS 10%</i>	0,3 mL	0,06 mL
<i>TEMED</i>	0,012 mL	0,006 mL
<i>APS 10%</i>	0,3 mL	0,06 mL
<b>Volume final</b>	30,0 mL	6 mL

## 8. ANEXOS:

### 8.2. RESULTADOS FINAIS DOS ENSAIOS DE COAGULAÇÃO

#### I) Ensaio de controle – Tempo de Recalcificação do plasma comercial humano (segundos)

Repetição	Tempo formação do coágulo (seg)	Absorbância 620 nm
1	440	0,38
2	440	0,398
3	600	0,392
4	520	0,393
5	600	0,403
6	600	0,403
7	400	0,387
8	400	0,394
Média	500	-

#### II) Ensaio de controle – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada - aPTT (segundos)

Repetição	Tempo formação do coágulo (seg)	Absorbância 620 nm
1	40	0,237
2	50	0,21
3	60	0,195
4	60	0,201
5	40	0,198
6	40	0,189
7	40	0,207
8	40	0,199
Média	46,25	-

**III) Ensaios de controle – Tempo de Protrombina (segundos)**

<b>Repetição</b>	<b>Tempo formação do coágulo (seg)</b>	<b>Absorbância 620 nm</b>
1	20	0,275
2	30	0,275
3	20	0,299
4	20	0,27
5	20	0,278
6	20	0,264
7	20	0,231
8	20	0,242
Média	21,25	-

**IV) Ensaios de controle – Tempo de Trombina (segundos)**

<b>Repetição</b>	<b>Tempo formação do coágulo (seg)</b>	<b>Absorbância 620 nm</b>
1	120	0,455
2	200	0,465
3	160	0,579
4	160	0,497
5	180	0,433
6	190	0,509
7	200	0,506
8	160	0,538
Média	171,25	-



**VI) Ensaios de extratos de glândulas salivares (EGS) de *T. guianense* – Tempo de Recalcificação do Plasma (segundos)**

<b>Repetição</b>	<b>5 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>	<b>2,5 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>	<b>1,25 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>	<b>0,625 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>
1	-	1600	960	760
2	-	1400	1040	680
3	-	1500	1000	840
4	-	1500	920	960
5	-	1300	960	600
6	-	1500	880	680
7	-	1600	1000	760
8	-	1600	920	800
Média	-	1500	960	760

<b>Repetição</b>	<b>0,3125 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>	<b>0,156 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>	<b>0,078 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>	<b>0,039 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>
1	760	640	600	440
2	760	720	680	640
3	880	560	640	640
4	760	520	840	560
5	640	760	760	520
6	720	680	520	640
7	600	600	560	400
8	720	760	520	480
Média	730	680	640	540

VII) Ensaios de extratos de glândulas salivares (EGS) de *T. guianense* – Absorbância 620 nm do Tempo de Recalcificação do Plasma

Repetição	5 (par de glândula) ABS 620 nm	2,5 (par de glândula) ABS 620 nm	1,25 (par de glândula) ABS 620 nm	0,625 (par de glândula) ABS 620 nm
1	-	0,362	0,346	0,342
2	-	0,345	0,369	0,356
3	-	0,341	0,338	0,348
4	-	0,352	0,359	0,352
5	-	0,358	0,358	0,360
6	-	0,361	0,362	0,348
7	-	0,360	0,365	0,354
8	-	0,354	0,358	0,356

Repetição	0,3125 (par de glândula) ABS 620 nm	0,156 (par de glândula) ABS 620 nm	0,078 (par de glândula) ABS 620 nm	0,039 (par de glândula) ABS 620 nm
1	0,335	0,285	0,323	0,282
2	0,362	0,386	0,313	0,373
3	0,361	0,379	0,332	0,279
4	0,337	0,369	0,312	0,301
5	0,358	0,395	0,324	0,297
6	0,352	0,360	0,289	0,336
7	0,356	0,357	0,301	0,304
8	0,349	0,356	0,328	0,298

VIII) Ensaios de extratos de glândulas salivares (EGS) de *T. guianense* – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada – aPTT (segundos)

Repetição	5 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)	2,5 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)	1,25 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)	0,625 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)
1	150	170	90	70
2	180	150	110	90
3	110	200	100	100
4	180	90	120	70
5	190	110	110	60
6	150	90	90	60
7	150	150	70	70
8	100	50	60	80
Média	151,25	126,25	93,65	75

Repetição	0,3125 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)	0,156 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)	0,078 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)	0,039 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)
1	80	70	60	50
2	90	80	70	60
3	90	80	60	40
4	60	50	50	60
5	90	60	60	60
6	60	40	50	50
7	60	50	60	50
8	70	50	60	50
Média	75	60	58,75	52,5

**IX) Ensaios de extratos de glândulas salivares (EGS) de *T. guianense* – Absorbância 620 nm do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada - aPTT**

<b>Repetição</b>	<b>5 (par de glândula) ABS 620 nm</b>	<b>2,5 (par de glândula) ABS 620 nm</b>	<b>1,25 (par de glândula) ABS 620 nm</b>	<b>0,625 (par de glândula) ABS 620 nm</b>
1	0,237	0,277	0,256	0,206
2	0,279	0,277	0,251	0,245
3	0,189	0,206	0,213	0,256
4	0,22	0,231	0,255	0,219
5	0,241	0,229	0,205	0,223
6	0,246	0,237	0,221	0,202
7	0,283	0,223	0,217	0,246
8	0,277	0,254	0,25	0,243

<b>Repetição</b>	<b>0,3125 (par de glândula) ABS 620 nm</b>	<b>0,156 (par de glândula) ABS 620 nm</b>	<b>0,078 (par de glândula) ABS 620 nm</b>	<b>0,039 (par de glândula) ABS 620 nm</b>
1	0,229	0,21	0,205	0,202
2	0,243	0,239	0,227	0,205
3	0,246	0,225	0,216	0,202
4	0,218	0,218	0,202	0,182
5	0,206	0,22	0,213	0,231
6	0,222	0,22	0,241	0,203
7	0,216	0,226	0,219	0,22
8	0,233	0,237	0,231	0,235

**X) Ensaio de extratos de glândulas salivares (EGS) de *T. guianense* – Tempo de Protrombina (segundos)**

<b>Repetição</b>	<b>5 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>	<b>2,5 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>	<b>1,25 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>	<b>0,625 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>
1	70	40	30	30
2	70	30	30	30
3	40	40	50	40
4	60	80	30	30
5	50	30	30	30
6	60	50	40	40
7	50	30	30	30
8	60	30	30	30
Média	57,5	41,25	33,75	32,5

<b>Repetição</b>	<b>0,3125 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>	<b>0,156 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>	<b>0,078 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>	<b>0,039 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>
1	20	20	20	20
2	30	20	20	20
3	20	20	20	20
4	20	30	20	10
5	30	20	20	10
6	30	30	20	20
7	20	30	20	20
8	30	30	20	10
Média	25	25	20	16,25

**XI) Ensaios de extratos de glândulas salivares (EGS) – Absorbância 620 nm do Tempo de Protrombina**

<b>Repetição</b>	<b>5 (par de glândula) ABS 620 nm</b>	<b>2,5 (par de glândula) ABS 620 nm</b>	<b>1,25 (par de glândula) ABS 620 nm</b>	<b>0,625 (par de glândula) ABS 620 nm</b>
1	0,291	0,278	0,249	0,29
2	0,262	0,261	0,261	0,262
3	0,34	0,268	0,259	0,285
4	0,275	0,294	0,299	0,296
5	0,288	0,28	0,266	0,282
6	0,309	0,326	0,333	0,327
7	0,297	0,305	0,351	0,303
8	0,304	0,311	0,294	0,314

<b>Repetição</b>	<b>0,3125 (par de glândula) ABS 620 nm</b>	<b>0,156 (par de glândula) ABS 620 nm</b>	<b>0,078 (par de glândula) ABS 620 nm</b>	<b>0,039 (par de glândula) ABS 620 nm</b>
1	0,265	0,284	0,269	0,271
2	0,253	0,261	0,263	0,26
3	0,285	0,269	0,279	0,293
4	0,288	0,268	0,296	0,291
5	0,333	0,287	0,294	0,309
6	0,321	0,368	0,34	0,27
7	0,313	0,326	0,296	0,302
8	0,311	0,305	0,315	0,297

**XII) Ensaios de extratos de glândulas salivares (EGS) de *T. guianense* – Tempo de Trombina (segundos)**

<b>Repetição</b>	<b>5 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>	<b>2,5 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>	<b>1,25 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>	<b>0,625 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>
1	360	210	150	160
2	250	280	240	110
3	390	220	180	130
4	310	270	270	250
5	220	220	160	280
6	530	330	320	170
7	510	220	240	170
8	640	290	200	330
Média	401,25	255	220	200

<b>Repetição</b>	<b>0,3125 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>	<b>0,156 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>	<b>0,078 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>	<b>0,039 (par de glândula) Tempo formação coágulo (seg)</b>
1	210	150	140	120
2	170	90	120	110
3	240	70	160	150
4	150	140	100	90
5	180	290	130	140
6	250	340	170	140
7	210	110	140	80
8	110	80	80	110
Média	190	158,75	130	117,5

**XIII) Ensaio de extratos de glândulas salivares (EGS) de *T. guianense* – Absorbância 620 nm do Tempo de Trombina**

<b>Repetição</b>	<b>5 (par de glândula) ABS 620 nm</b>	<b>2,5 (par de glândula) ABS 620 nm</b>	<b>1,25 (par de glândula) ABS 620 nm</b>	<b>0,625 (par de glândula) ABS 620 nm</b>
1	0,426	0,417	0,432	0,457
2	0,463	0,472	0,51	0,492
3	0,359	0,469	0,447	0,447
4	0,412	0,425	0,426	0,237
5	0,228	0,231	0,227	0,246
6	0,268	0,262	0,269	0,264
7	0,255	0,265	0,268	0,28
8	0,258	0,28	0,295	0,274

<b>Repetição</b>	<b>0,3125 (par de glândula) ABS 620 nm</b>	<b>0,156 (par de glândula) ABS 620 nm</b>	<b>0,078 (par de glândula) ABS 620 nm</b>	<b>0,039 (par de glândula) ABS 620 nm</b>
1	0,538	0,536	0,547	0,528
2	0,572	0,455	0,502	0,521
3	0,498	0,415	0,494	0,46
4	0,238	0,243	0,513	0,217
5	0,232	0,244	0,512	0,384
6	0,214	0,268	0,439	0,49
7	0,453	0,312	0,389	0,512
8	0,408	0,435	0,401	0,542



## 8. ANEXOS

### 8.3. Gráficos de ensaios de coagulação (controle e extratos) de glândulas salivares de *Thyrsopelma guianense*

Obs: Todos os ensaios de coagulação foram realizados a temperatura de aproximadamente 25°C, devido a leitor não possuir um controle de temperatura interno.

- 1) Tempo de recalcificação do plasma
- 2) Tempo de tromboplastina parcial ativada – apTT
- 3) Tempo de protrombina
- 4) Tempo de trombina

Abaixo, estão um exemplo de cada ensaio para determinada quantidade de extrato salivar. Vale ressaltar que para cada quantidade de ensaio foram realizadas oito repetições. Perfazendo 64 ensaios para recalcificação (oito em cada diluição), 64 para tromboplastina, 64 para protrombina e 64 para trombina.

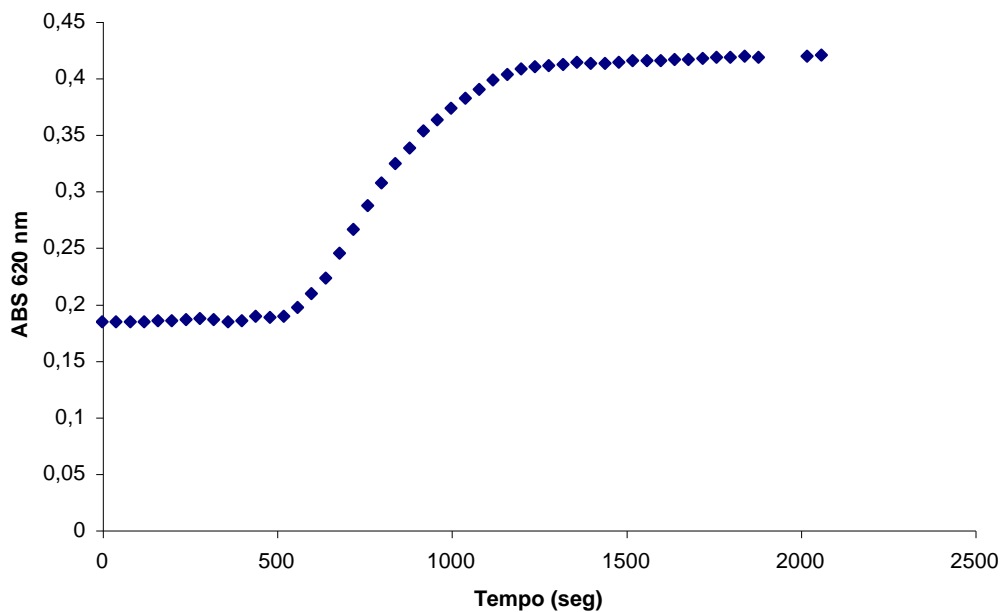


Figura 20 - Tempo de Recalcificação do plasma comercial humano – controle

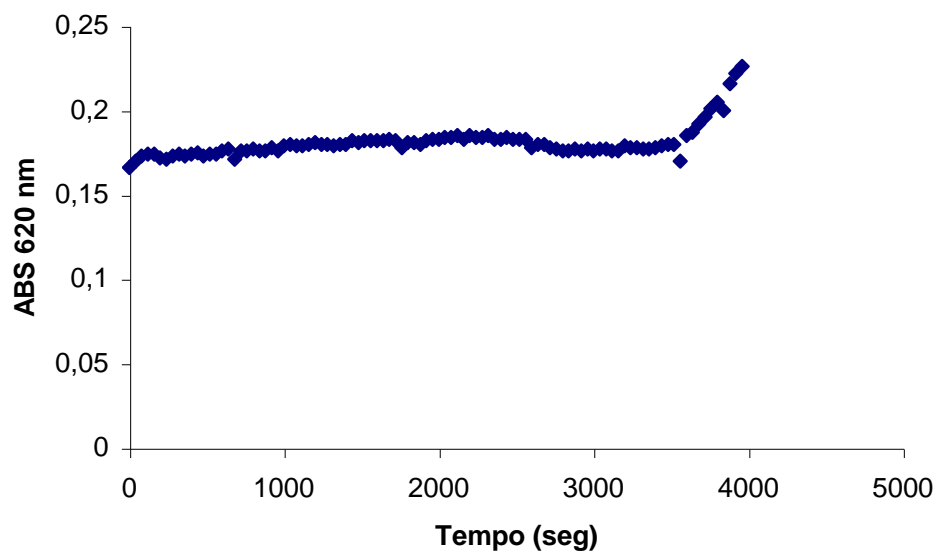


Figura 21 – Tempo de recalcificação dos plasma comercial humano na presença de extratos de glândulas salivares (5 pares) de *T. guianense*.

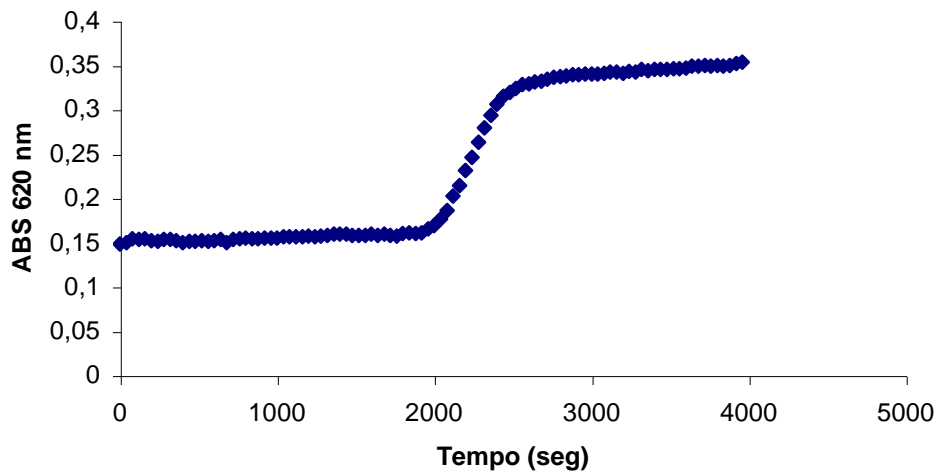


Figura 22 - Tempo de recalcificação dos plasma comercial humano na presença de extratos de glândulas salivares (2,5 pares) de *T. guianense*.

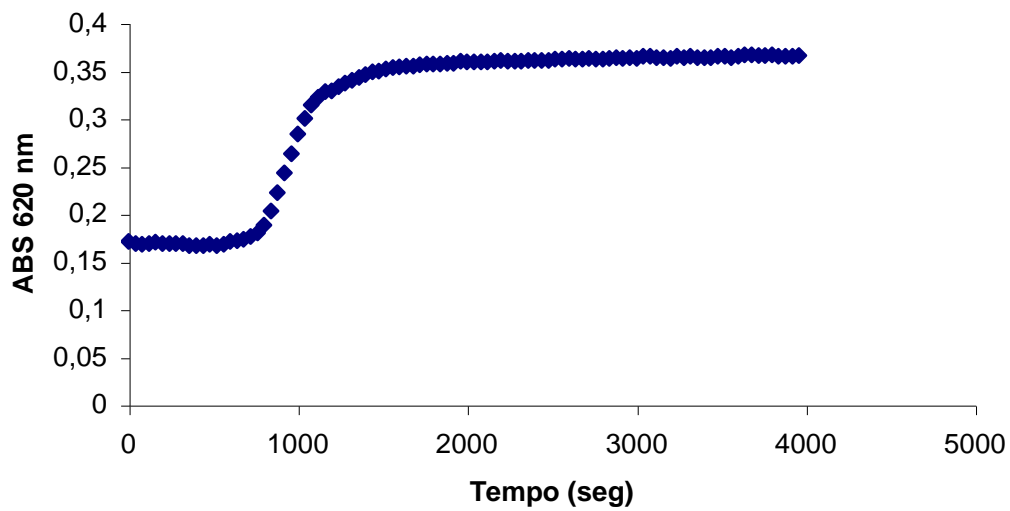


Figura 23 - Tempo de recalcificação dos plasma comercial humano na presença de extratos de glândulas salivares (1,25 pares) de *T. guianense*.

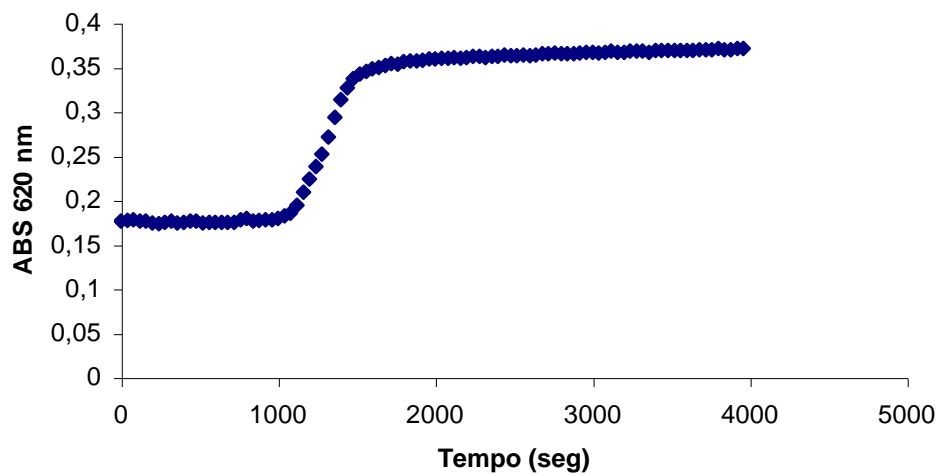


Figura 24 - Tempo de recalcificação dos plasma comercial humano na presença de extratos de glândulas salivares (0,625 par) de *T. guianense*.

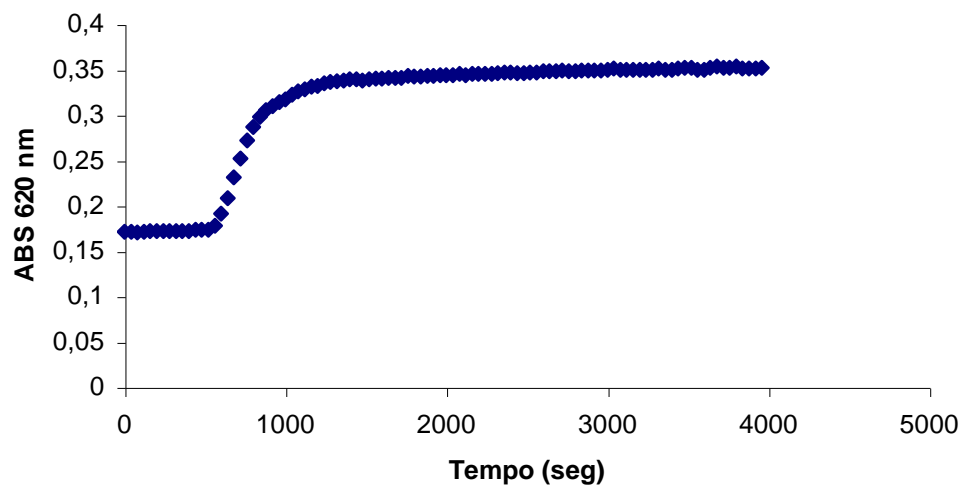


Figura 25 - Tempo de recalcificação dos plasma comercial humano na presença de extratos de glândulas salivares (0,325 par) de *T. guianense*.

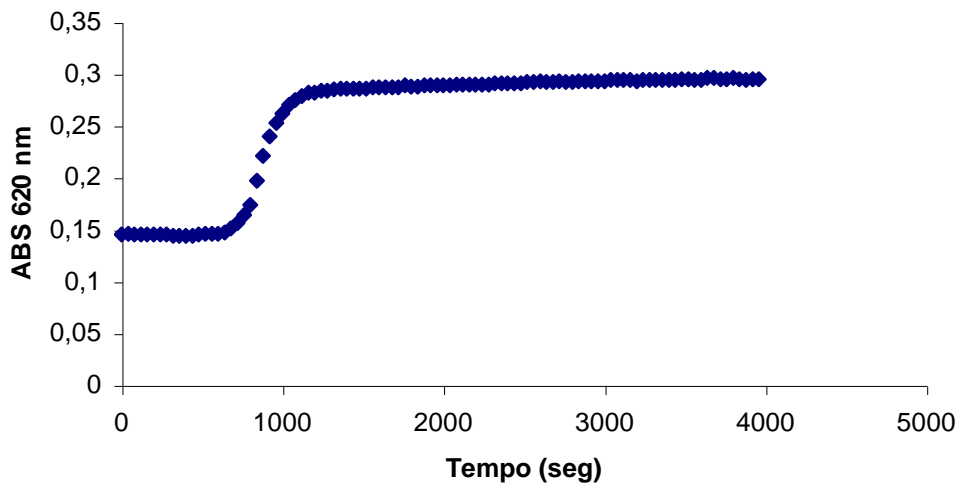


Figura 26 - Tempo de recalcificação dos plasma comercial humano na presença de extratos de glândulas salivares (0,156 par) de *T. guianense*.

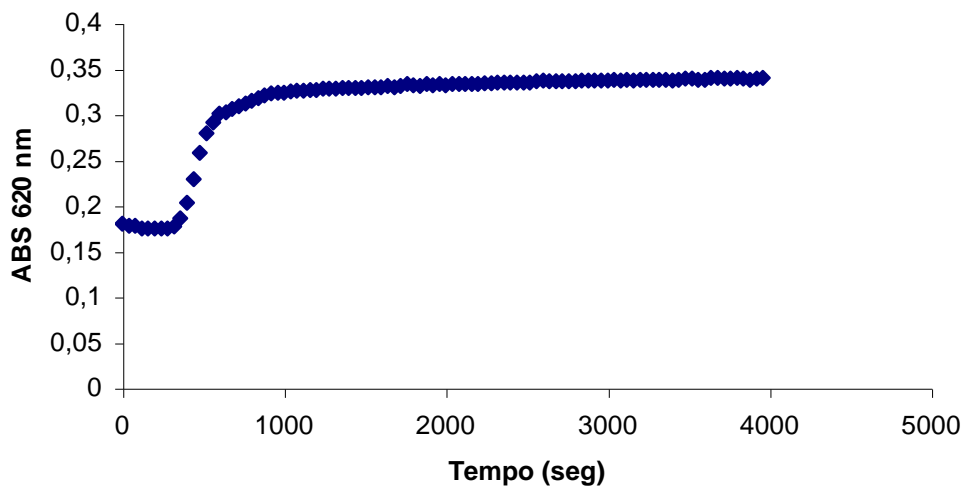


Figura 27 - Tempo de recalcificação dos plasma comercial humano na presença de extratos de glândulas salivares (0,078 par) de *T. guianense*.

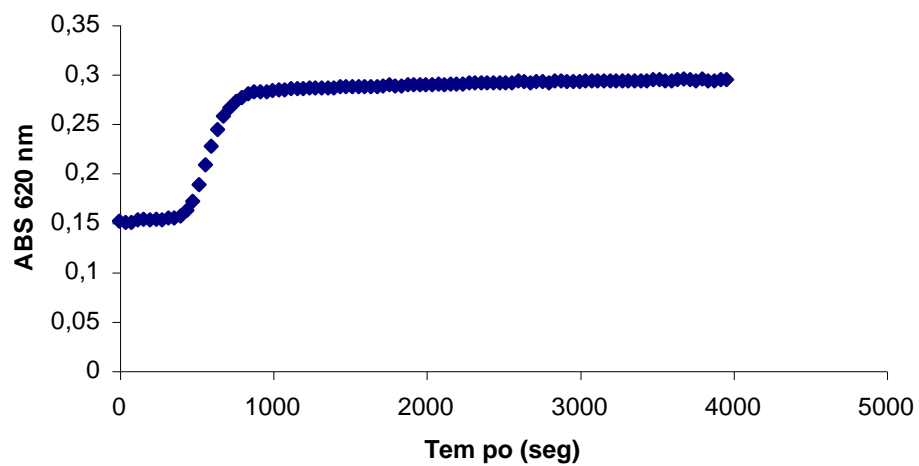


Figura 28 - Tempo de recalcificação dos plasma comercial humano na presença de extratos de glândulas salivares (0,039 par) de *T. guianense*.

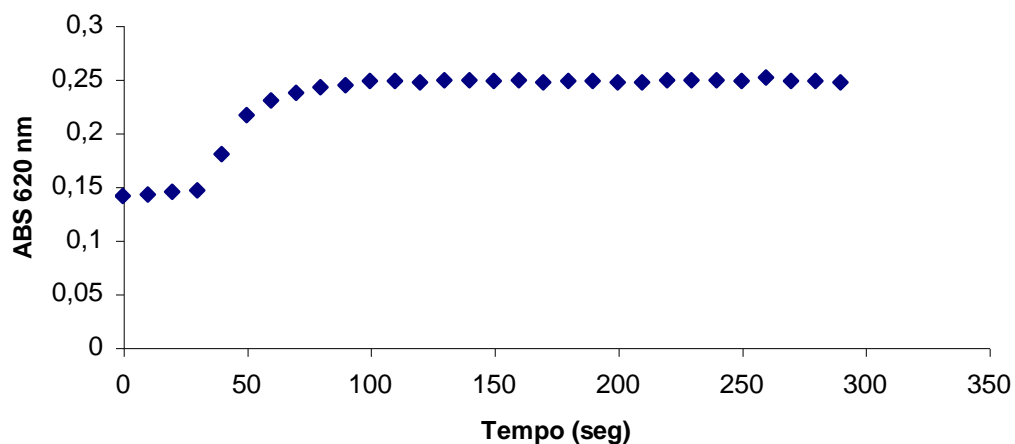


Figura 29 - Tempo de Tromboplastina parcial ativada (aPTT) em plasma comercial humano - controle

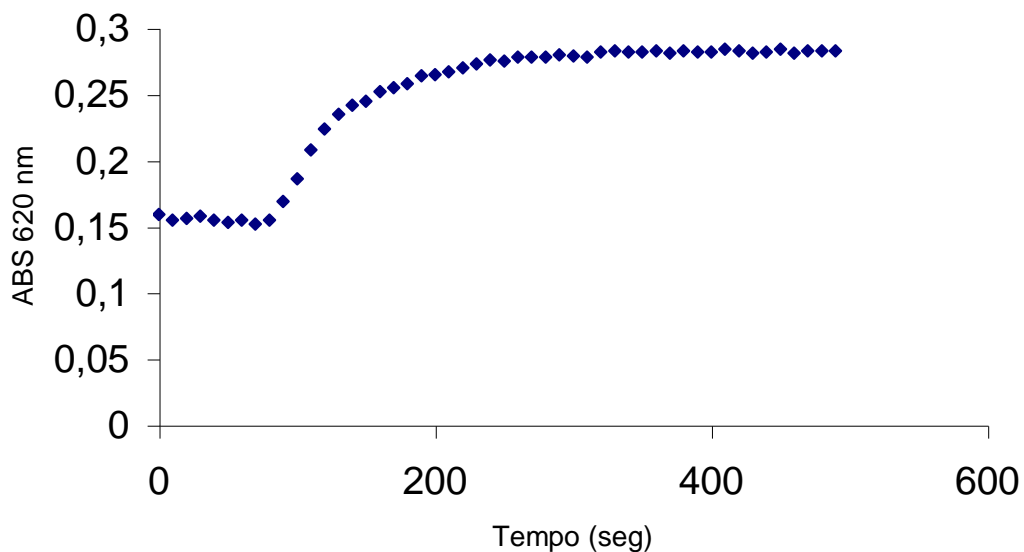


Figura 30 - Tempo de Tromboplastina parcial ativada (aPTT) em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (5 pares) de *T. guianense*.

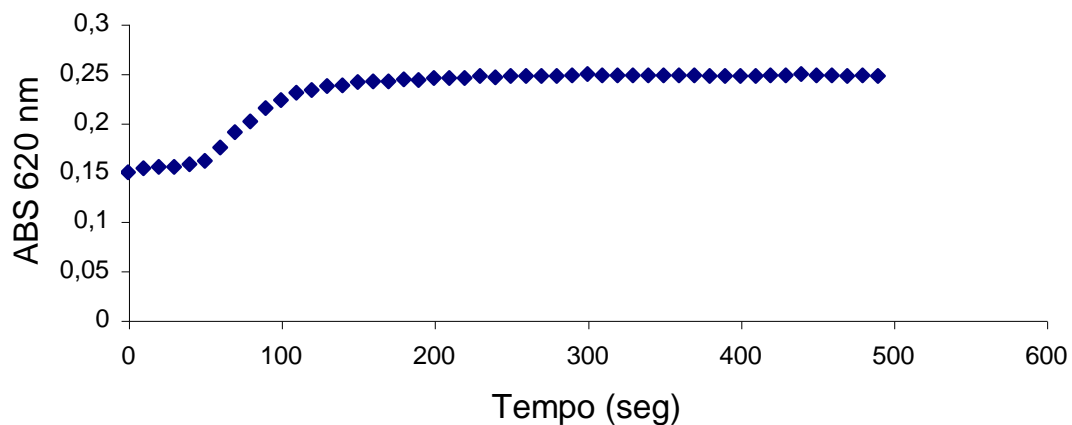


Figura 31- Tempo de Tromboplastina parcial ativada (aPTT) em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (2,5 pares) de *T. guianense*.

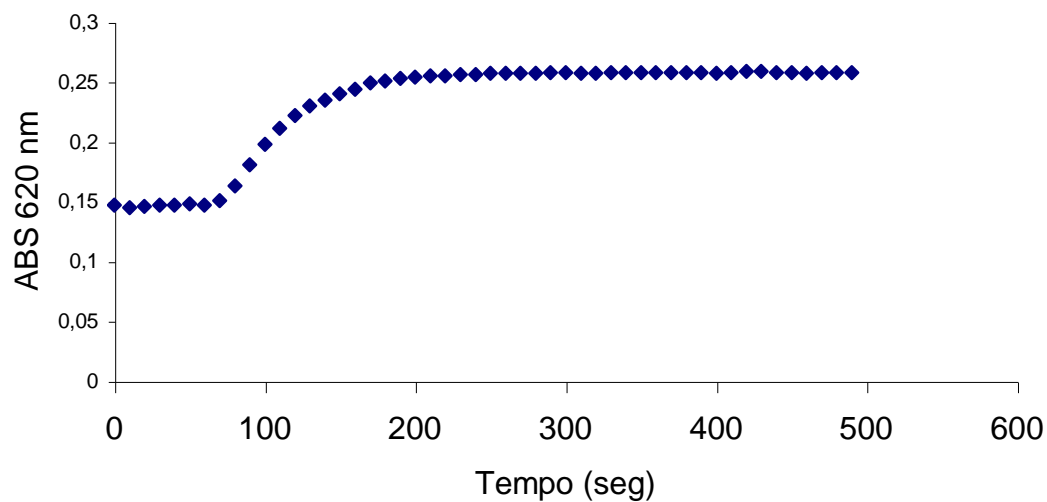


Figura 32 - Tempo de Tromboplastina parcial ativada (aPTT) em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (1,25 pares) de *T. guianense*.



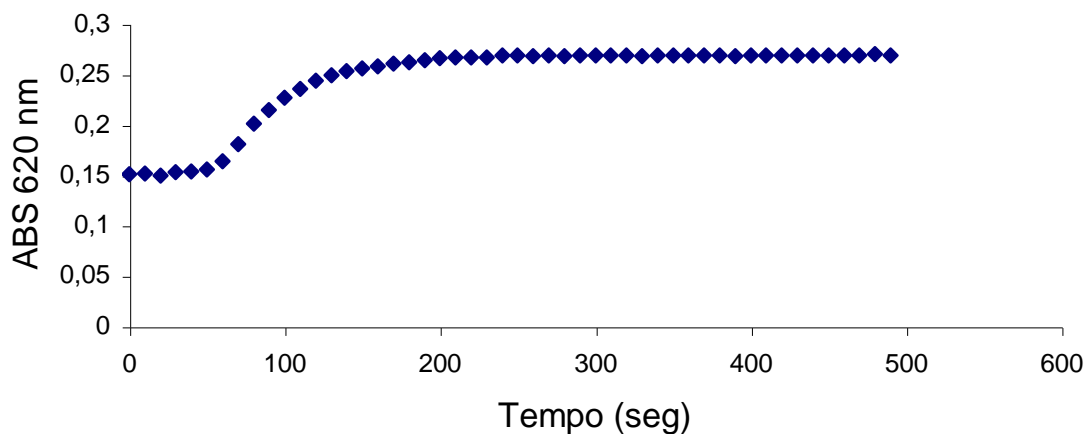


Figura 33 - Tempo de Tromboplastina parcial ativada (aPTT) em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (0,625 par) de *T. guianense*.

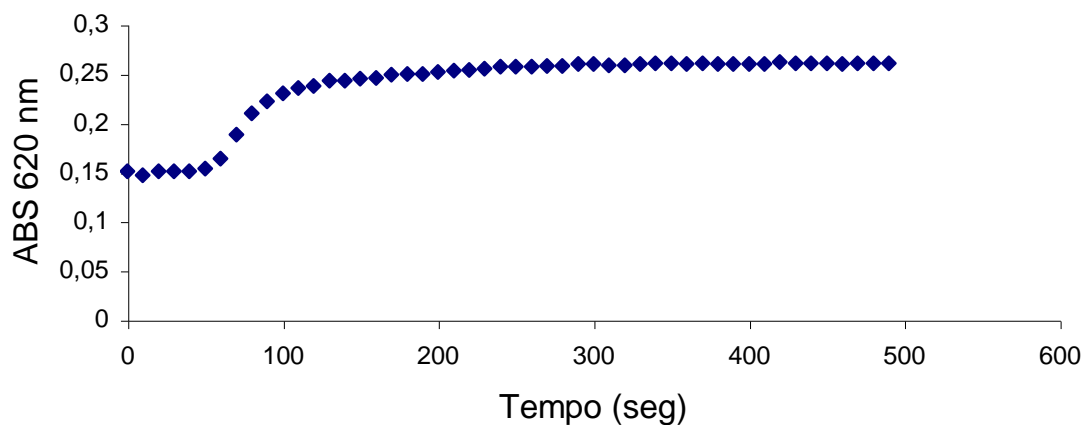


Figura 34 - Tempo de Tromboplastina parcial ativada (aPTT) em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (0,3125 par) de *T. guianense*.

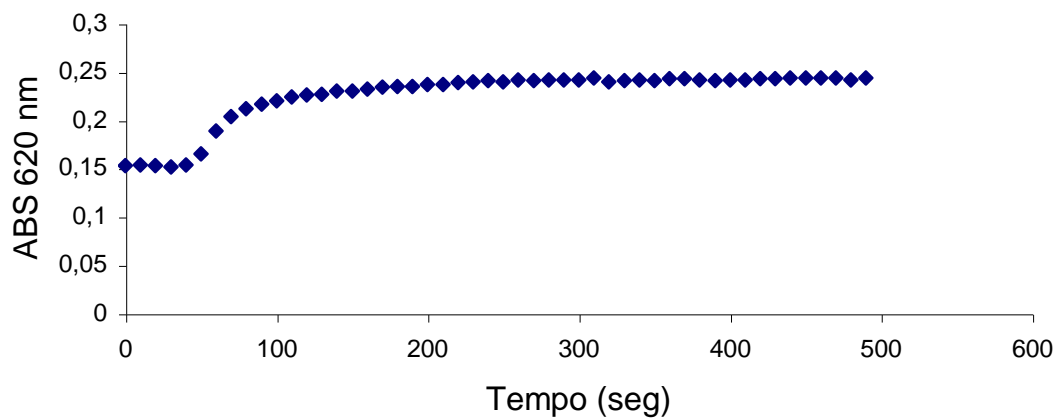


Figura 35 - Tempo de Tromboplastina parcial ativada (aPTT) em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (0,156 par) de *T. guianense*.

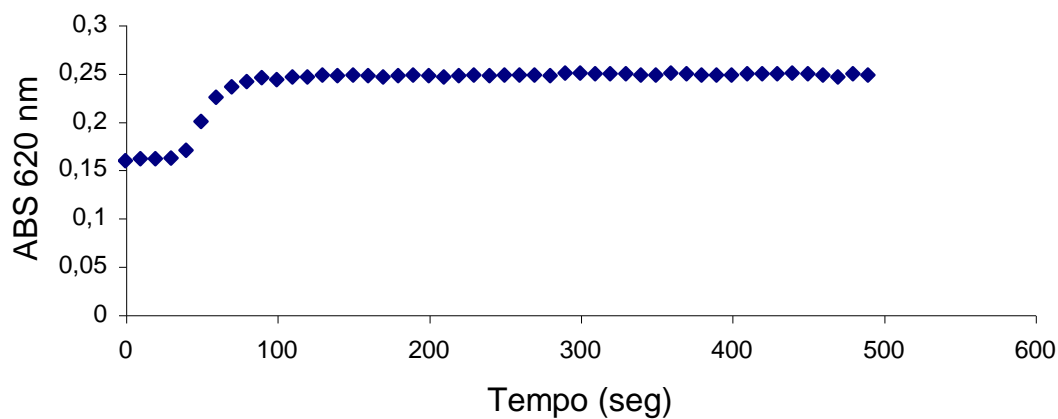


Figura 36 - Tempo de Tromboplastina parcial ativada (aPTT) em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (0,078 par) de *T. guianense*.

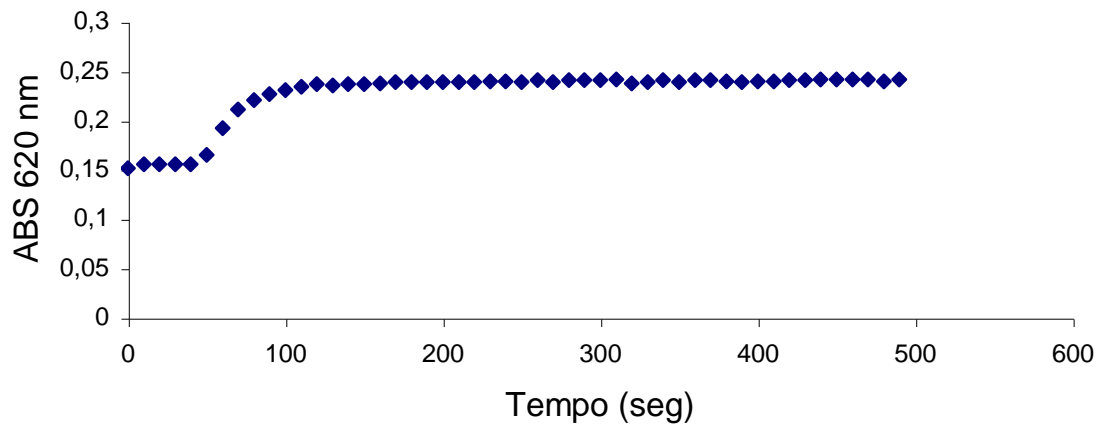


Figura 37 - Tempo de Tromboplastina parcial ativada (aPTT) em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (0,039 par) de *T. guianense*.

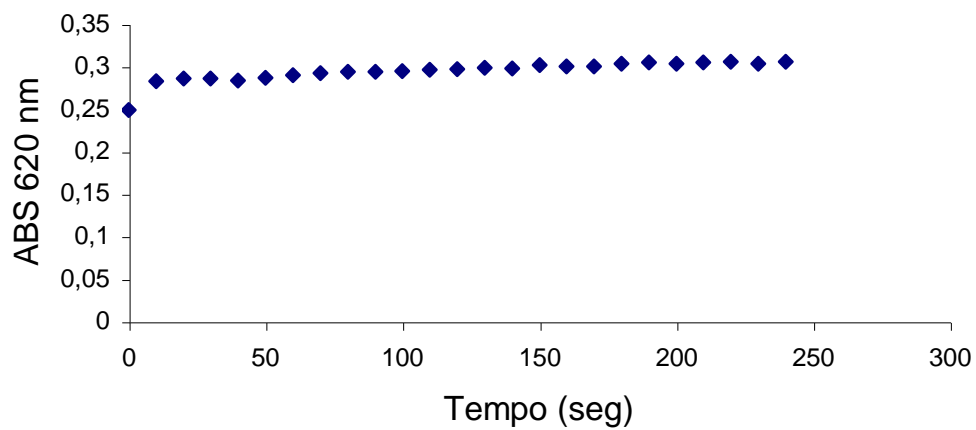


Figura 38 - Tempo de Protrombina em plasma comercial humano – controle

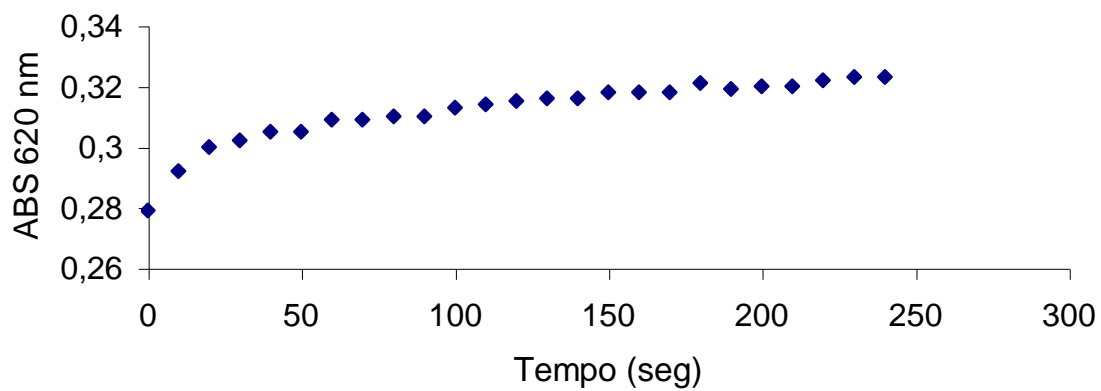


Figura 39 - Tempo de Protrombina em plasma comercial humano na presença de extratos de glândulas salivares (5 pares) de *T. guianense*.

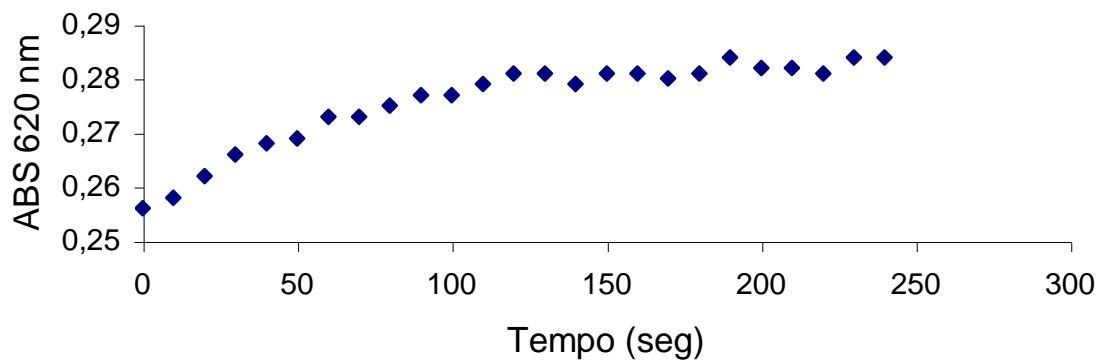


Figura 40 - Tempo de Protrombina em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (2,5 pares) de *T. guianense*.

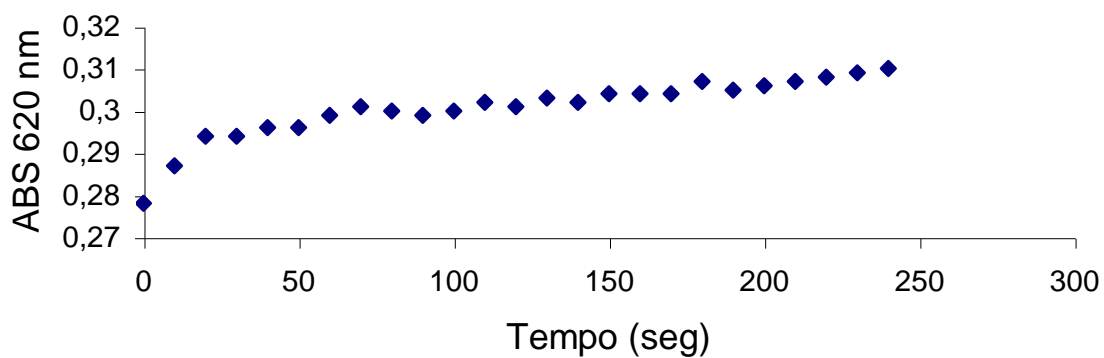


Figura 41 - Tempo de Protrombina em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (0,125 pares) de *T. guianense*.

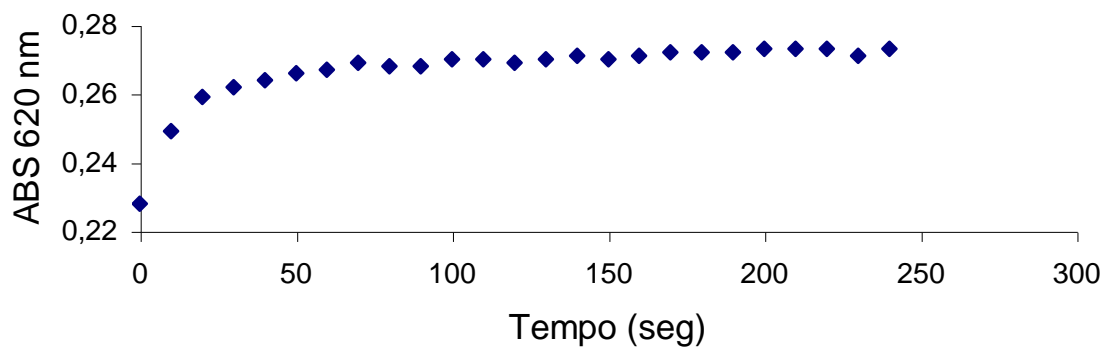


Figura 42 - Tempo de Protrombina em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (0,625 par) de *T. guianense*.

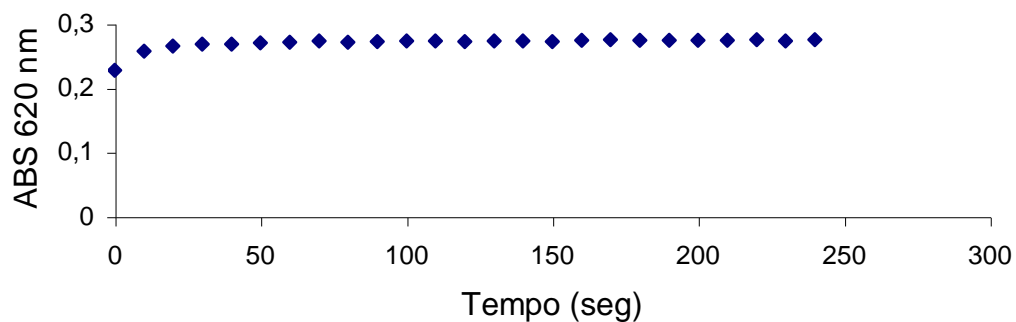


Figura 43 - Tempo de Protrombina em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (0,3125 par) de *T. guianense*.

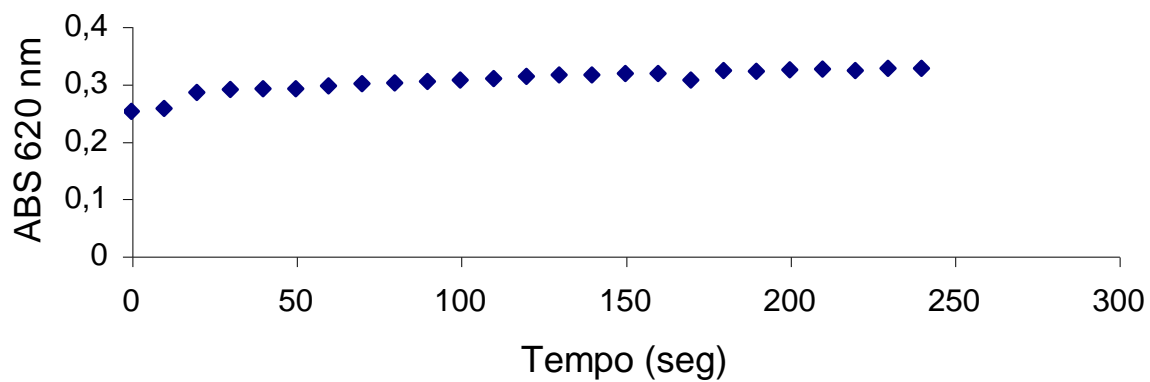


Figura 44 - Tempo de Protrombina em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (0,156 par) de *T. guianense*.

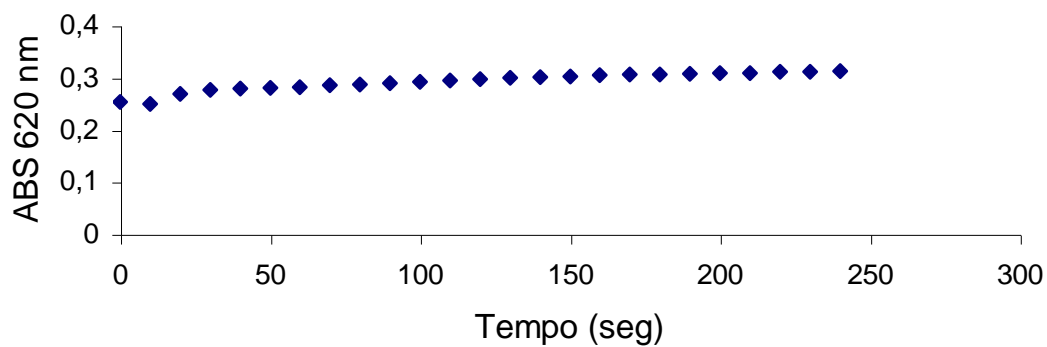


Figura 45 - Tempo de Protrombina em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (0,078 par) de *T. guianense*.

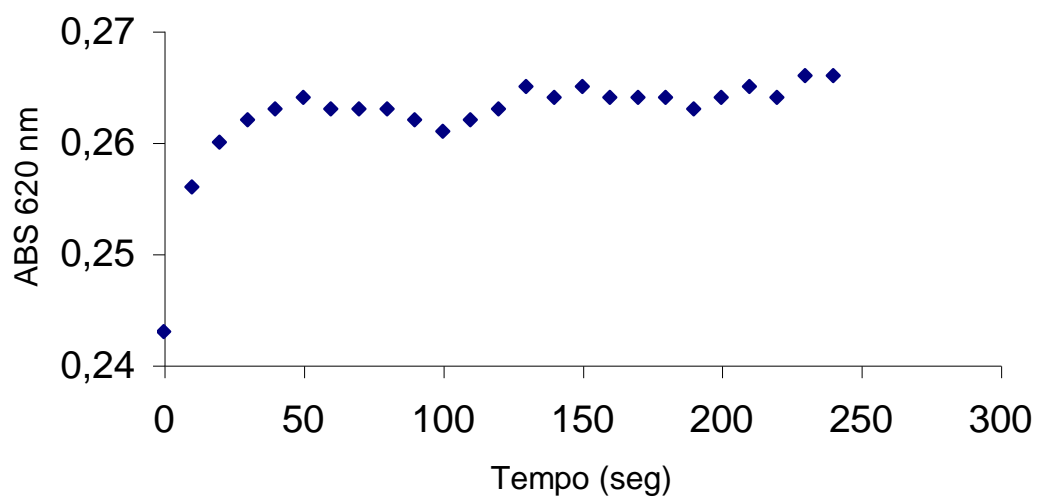


Figura 46 - Tempo de Protrombina em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (0,039 par) de *T. guianense*.



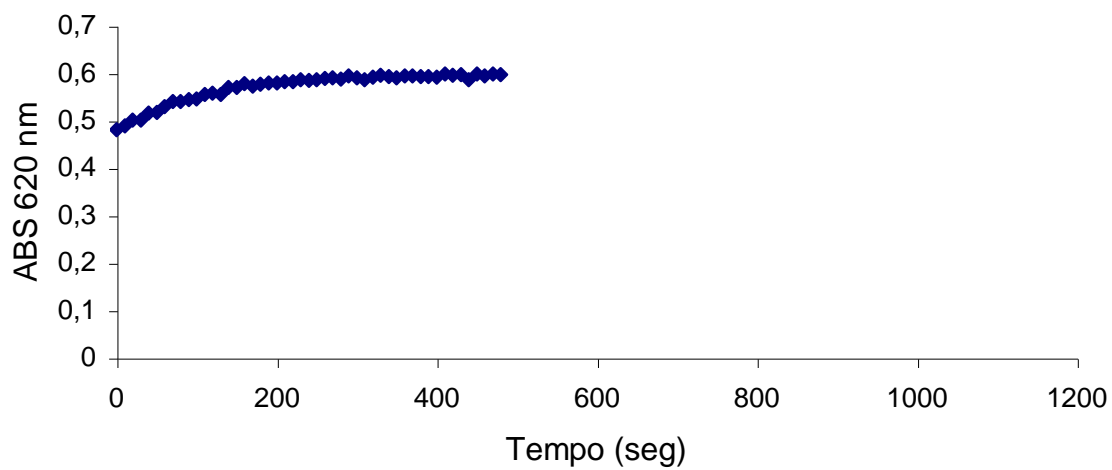


Figura 47 - Tempo de Trombina em plasma comercial humano – controle

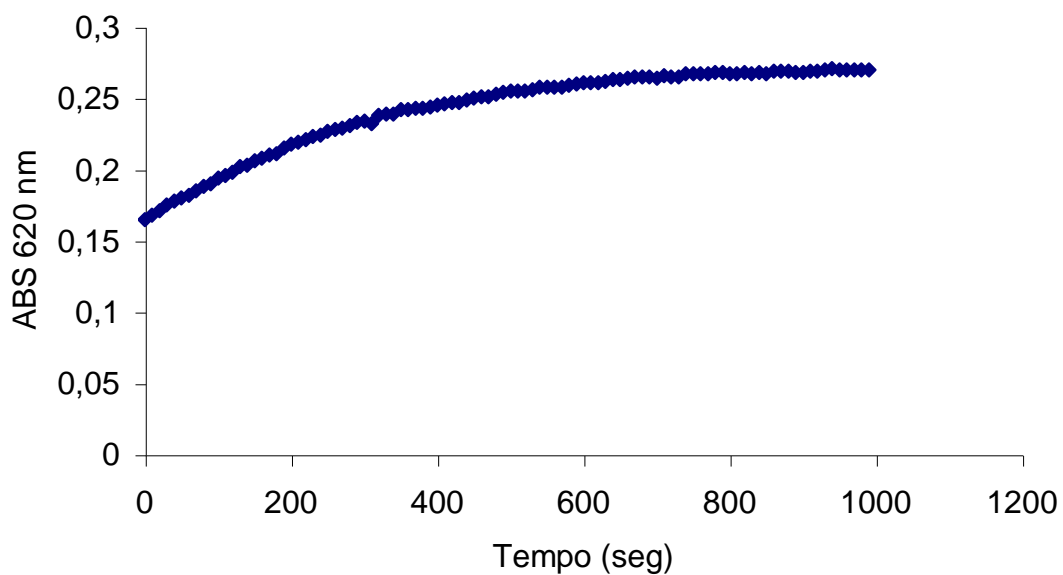


Figura 48 - Tempo de Trombina em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (5 pares) de *T. guianense*.

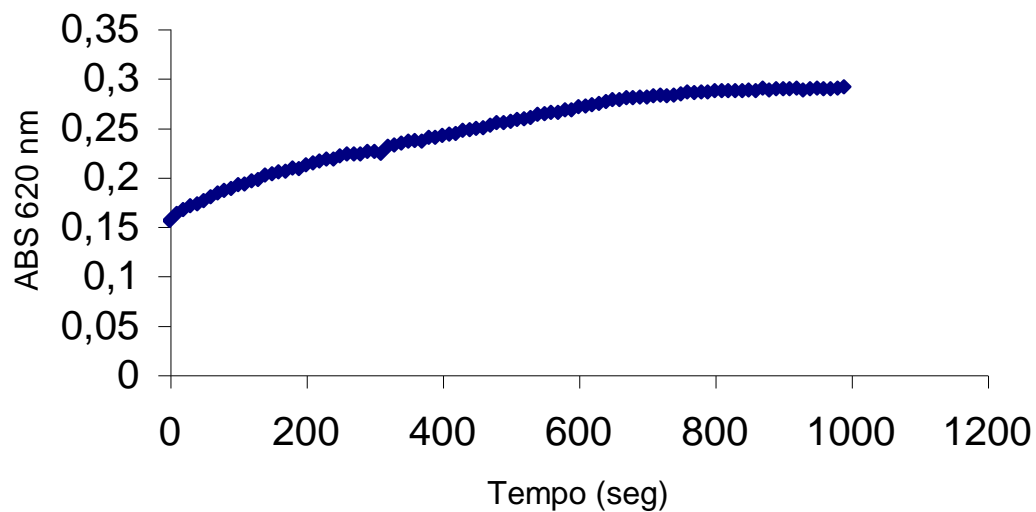


Figura 49 - Tempo de Trombina em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (2,5 pares) de *T. guianense*.

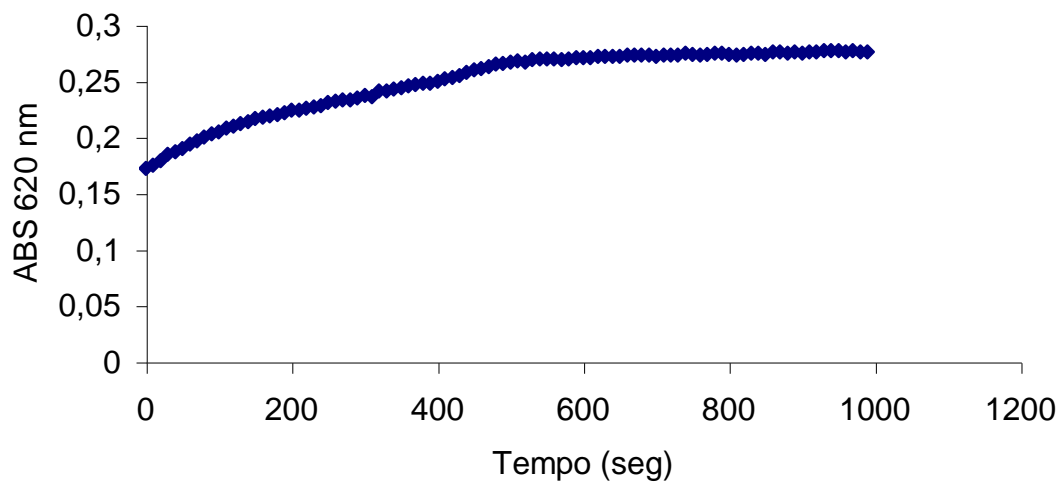


Figura 50 - Tempo de Trombina em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (1,25 pares) de *T. guianense*.

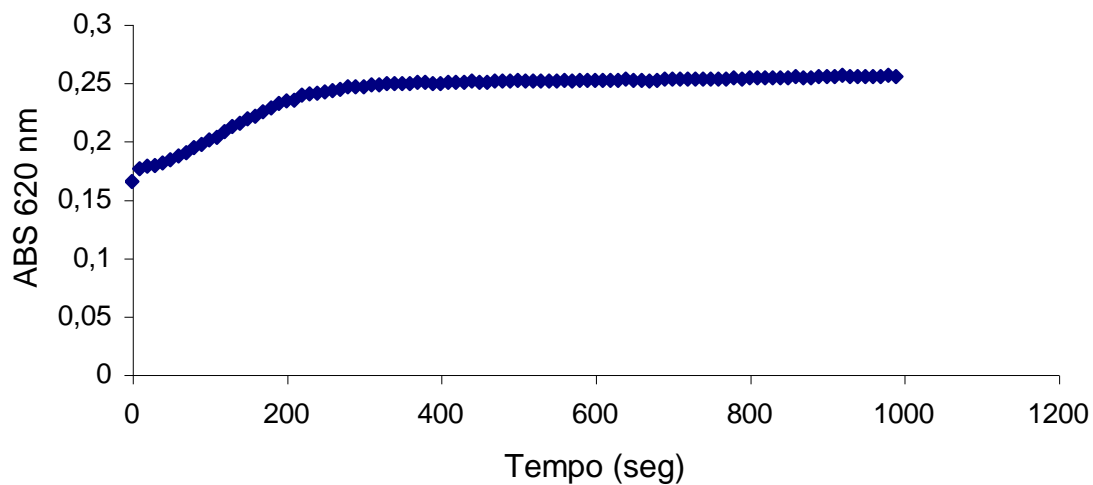


Figura 51 - Tempo de Trombina em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (0,625 par) de *T. guianense*.

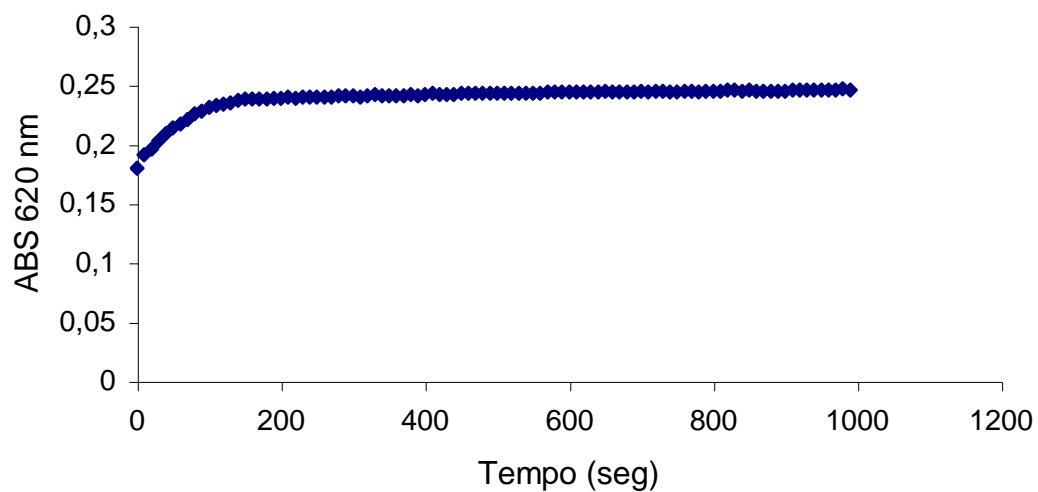


Figura 52 - Tempo de Trombina em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (0,3125 par) de *T. guianense*.

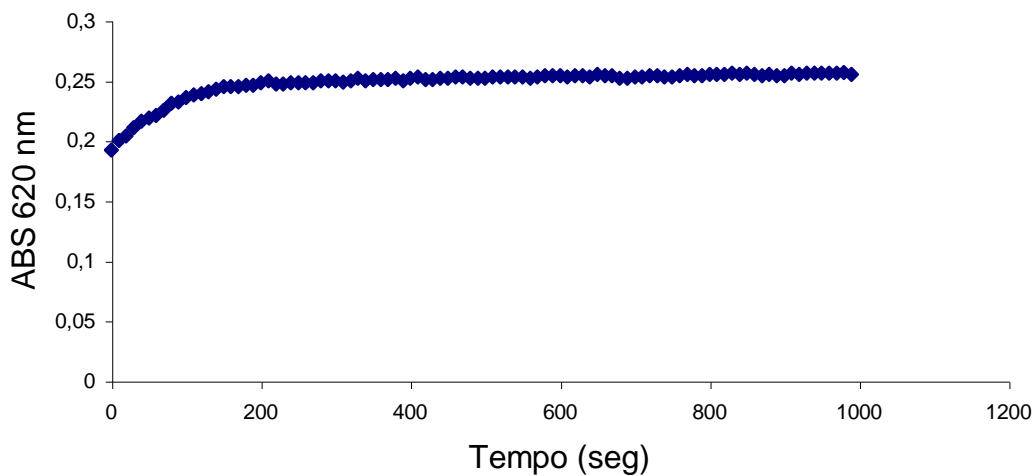


Figura 53 - Tempo de Trombina em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (0,156 par) de *T. guianense*.

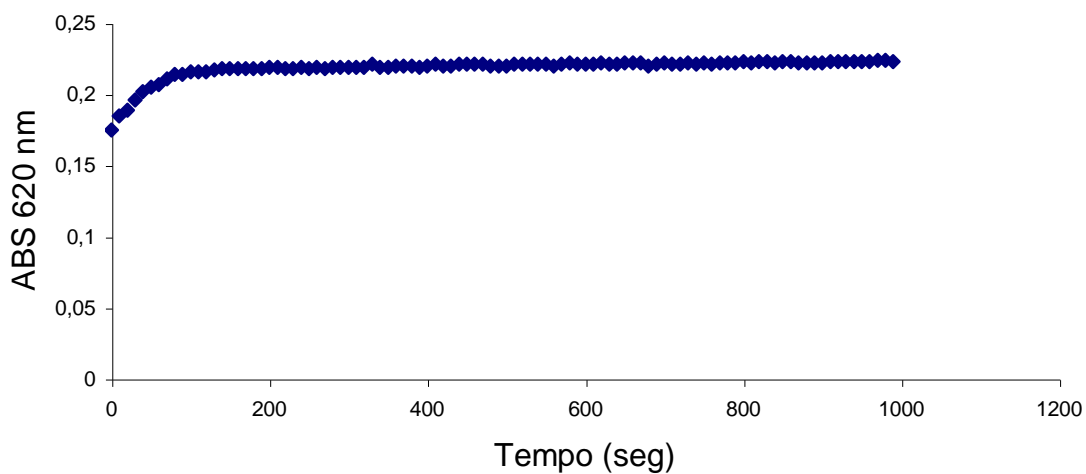


Figura 54 - Tempo de Trombina em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (0,078 par) de *T. guianense*.

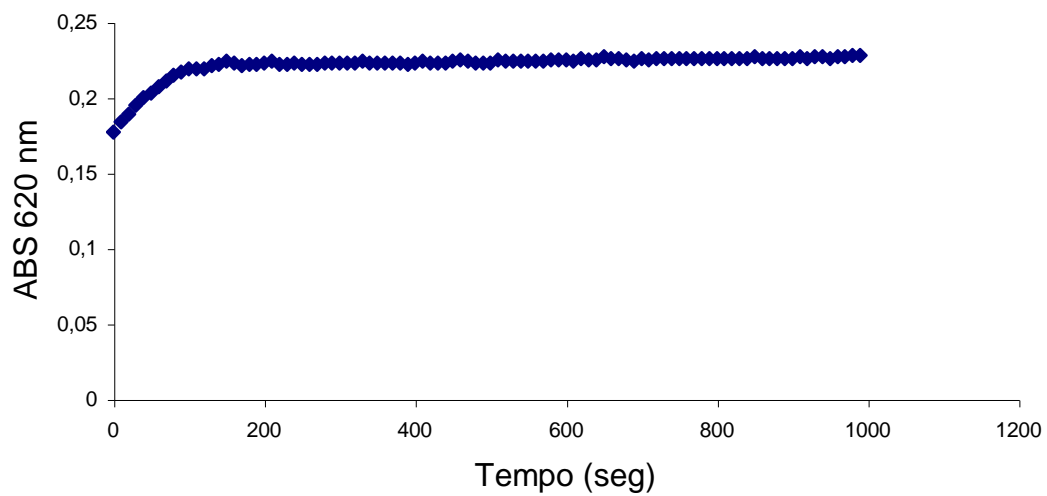


Figura 55 - Tempo de Trombina em plasma comercial humano na presença de de extratos de glândulas salivares (0,039 par) de *T. guianense*.