



**Universidade de Brasília**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular**

**Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro**

**PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS SALIVARES DE TRIATOMÍNEO  
UTILIZANDO SISTEMAS DE EXPRESSÃO PROCARIOTO E  
EUCARIOTO**

**KAIO LUÍS DA SILVA BENTES**

Brasília - DF, 2020.

KAIO LUÍS DA SILVA BENTES

**PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS SALIVARES DE TRIATOMÍNEO  
UTILIZANDO SISTEMAS DE EXPRESSÃO PROCARIOTO E  
EUCARIOTO**

KAIO LUÍS DA SILVA BENTES

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília – Faculdade de Medicina como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Patologia Molecular.

Orientadora: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Izabela Marques Dourado Bastos Charneau**

Coorientadora: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Nunes de Araújo**

Brasília - DF, 2020.

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

*Apoio financeiro:* Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF, Processos 193.001.053/2015 e 193.001.802/2017).

Projeto de Mestrado realizado com bolsa da CAPES e CNPq

*“Qualquer pergunta que possa ser respondida deve ser respondida ou ao menos considerada. Processos ilógicos de pensamento devem ser desafiados assim que surgem. Respostas erradas devem ser corrigidas. Respostas corretas devem ser confirmadas.”*

*(Veronica Roth)*

*Dedico este trabalho à minha mãe  
Lúcia, meu vô Antônio e à minha irmã  
Beatriz.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, Lucia Maria da Silva Bentes, pelo seu amor, apoio, suporte, paciência e não me deixar desistir nos momentos difíceis. Por me incentivar a continuar os estudos e seguir a carreira científica;

À minha irmã, Beatriz Akati da Silva Bentes, pela cumplicidade, amor e apoio;

À minha orientadora, Dra. Izabela Marques Dourado Bastos, por ter me dado a oportunidade em ingressar no Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular;

À minha coorientadora, Profa. Dra. Carla Nunes de Araújo, por ter me acolhido e acreditado em mim, me orientando desde 2016. Nessa trajetória, atuou como uma segunda mãe, como professora e orientadora, e servindo de modelo como profissional dentro da academia;

Aos meus amigos, colegas de trabalho e professores do LIPH pela amizade, apoio e conselhos;

Ao grupo da saliva, composto por membros atuais e egressos, pela companhia e compartilhar das mesmas dificuldades e anseios em relação ao nosso campo de trabalho;

À minha amiga Yanna Reis Praça, que também faz parte do grupo da saliva, por ser sempre companheira, conselheira, compartilhar os mesmos medos e infortúnios. Por sempre estar presente e apoiar nos momentos difíceis. Sua presença deixa o ambiente mais leve e tranquilo. Por ajudar durante a minha trajetória acadêmica, e quem me ensinou a dissecar o primeiro triatomíneo;

Aos meus amigos do Fab 4, Allan Mascarenhas, Alessandro Zanard e Arthur Soares, pela companhia, amizade, cumplicidade, conselhos e apoio;

Ao Laboratório de Virologia, em especial ao Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro por ter confiado e acreditado no projeto de expressão em células de inseto; e ao Bruno Milhomem por ter me ensinado as técnicas de cultura e infecção de células de inseto;

Ao LBQP, em especial ao Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau e ao Nuno, pela parceria e tentativa em identificar as proteínas recombinantes por MS;

Ao National Institutes of Health, especificamente ao LMVR, especialmente ao Dr. Eric Calvo, pela parceria, por ter me recebido em seu laboratório, pela

paciência e orientação; e também à Dra. Inés Martín-Martín, Olivia Kern e Andrew “Andy” Paige, pelo carinho, recepção e por terem me ensinado novas técnicas de expressão e testes de inibição enzimática;

Ao Brian Martin, do NIH/NIMH, por ter realizado a degradação de Edman em período de tempo curto;

Às minhas amigas do Rabbit, Kamila Guimarães, Nathânia Dábilla, Nathália Pufal e Stefany Lopes, que foram minha família durante minha estadia no EUA. Pela amizade, carinho, suporte e apoio;

Ao meu amigo Eduardo “Du” Vieira, pela amizade, carinho, conselhos e apoio.

À banca examinadora, por ter aceitado o convite e participarem da defesa da dissertação;

Ao Weverton e Juliana, pelo cuidado com os barbeiros no biotério;

À CAPES PrInt, pela bolsa de internacionalização, permitindo que a parte experimental do trabalho fosse concluída no exterior;

À CAPES e CNPq pela concessão da bolsa de estudo;

À FAPDF, CAPES e CNPq pelo financiamento da pesquisa.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT .....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Doença de Chagas .....	16
1.2 Tratamento da doença de Chagas.....	17
1.3 Triatomíneos.....	18
1.4 <i>Rhodnius neglectus</i> .....	19
1.5 O repasto sanguíneo.....	20
1.6 Hemostasia.....	21
1.7 Proteínas salivares de artrópodes hematófagos .....	23
1.8 Inibidores de serino proteases do tipo Kazal.....	25
1.9 <i>Pheromone Binding Protein (PBP)/General Odorant Binding Protein (GOBP)</i> .....	27
1.10 Serino protease do tipo tripsina.....	28
1.11 Triabina.....	29
2 JUSTIFICATIVA.....	31
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos .....	32
4 METODOLOGIA .....	33
4.1 Seleção das sequências de proteínas salivares de <i>R. neglectus</i> .....	33
4.2 Análise <i>in silico</i> .....	33
4.3 Clonagem molecular .....	34
4.4 Transformação bacteriana com os vetores pET100/D-TOPO recombinantes 36	
4.4.1 Expressão das proteínas salivares recombinantes em sistema procarioto.....	37
4.4.2 Preparação dos corpos de inclusão .....	37
4.4.3 Enovelamento <i>in vitro</i> de proteína.....	38
4.4.4 Concentração de fluxo tangencial da proteína enovelada <i>in vitro</i> ....	38
4.5 Transformação bacteriana com os vetores pFastBac1 recombinantes ....	39

4.5.1	Verificação do fenótipo das bactérias transformadas .....	39
4.5.2	Geração e purificação do bacmídeo recombinante .....	41
4.5.3	Transfecção das células de inseto .....	41
4.5.4	Expressão das proteínas salivares recombinantes em sistema eucarioto.....	42
4.6	Análise em SDS-PAGE.....	42
4.7	Análise por <i>Western Blot</i> .....	43
4.8	Purificação das proteínas recombinantes .....	44
4.9	Degradação de Edman das proteínas recombinantes .....	45
4.10	Ensaio de tempo de protrombina .....	46
4.11	Ensaio de inibição do fator Xa .....	46
5	RESULTADOS .....	47
5.1	Análise <i>in silico</i> .....	47
5.2	Proteínas obtidas em sistema procaríoto .....	48
5.2.1	RnKazalSPI.....	48
5.2.2	RnOBP.....	51
5.2.3	RnTriabin.....	53
5.3	As proteínas recombinantes RnKazalSPI e RnTriabin não alteraram o tempo de protrombina, nem inibiram o fator Xa da cascata de coagulação .....	55
5.4	Proteínas obtidas em sistema eucarioto .....	57
5.4.1	RnKazalSPI.....	57
5.4.2	RnTrypsin.....	60
6	DISCUSSÃO.....	64
7	CONCLUSÃO .....	69
8	PERSPECTIVAS .....	70
9	MINI-CURRÍCULO.....	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS

**DTT** – Ditioneitol

**EK** – Enterocinase

**GOBP** – *General Odorant Binding Protein*

**hpi** – Horas pós-infecção

**II** – Índice de instabilidade

**IPTG** – Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

**OPAS** – Organização Pan-Americana da Saúde (*Organización Pañamericana de la Salud*)

**pI** – Ponto isoelétrico

**SDS-PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*)

**SFB** – Soro fetal bovino

**TFA** – Ácido trifluoroacético

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição geográfica de *Rhodnius neglectus*. Os estados coloridos em rosa são aqueles em que foi descrita a presença do triatomíneo. Fonte: acervo pessoal baseado nas referências Jurberg *et al.*, 2014 e Ramos *et al.*, 2018. .... 20
- Figura 2.** Representação esquemática da cascata de coagulação. As setas azuis representam a via intrínseca, as setas laranjas representam a via extrínseca e as setas verdes representam a sobreposição de ambas as vias. Adaptado de Hall, 2011. .... 23
- Figura 3.** Representação esquemática da estrutura secundária de um inibidor de serino protease do tipo Kazal clássico. A  $\alpha$ -hélice em vermelho e as fitas  $\beta$  em preto. Adaptado de Papamokos *et al.*, 1982. .... 26
- Figura 4.** Representação esquemática da metodologia utilizada. .... 33
- Figura 5.** Mapa do vetor recombinante pET100/D-TOPO contendo as sequências de DNA do inibidor de protease do tipo Kazal putativo. A sequência do inibidor foi substituída pelas outras sequências, OBP e Triabina. Fonte: ThermoFisher Scientific. .... 35
- Figura 6.** Mapa do vetor recombinante pFastBac™ 1 contendo a sequência de DNA do inibidor de protease do tipo Kazal putativo. A sequência do inibidor foi substituída pela sequência da tripsina. Fonte: Thermo Fisher Scientific. .... 36
- Figura 7.** Mapa do bacmídeo recombinante ilustrando o local de anelamento dos *primers* pUC/M13 *Forward* e pUC/M13 *Reverse* no sítio mini-*att*Tn7 dentro da região de complementação *lacZ* $\alpha$ . Tn7R – Terminal direito do transposon Tn7; Gent – Gene de resistência à gentamicina; Pph – Promotor poliedrina; Insert – Gene de interesse; SV40 PA – Sequência terminadora SV40 poli(A); Tn7L – Terminal esquerdo do transposon Tn7. Adaptado de Invitrogen. .... 40
- Figura 8.** *Western blot* da expressão da RnKazalSPI utilizando o anticorpo anti-His na diluição 1:2.000. **(A)** RnKazalSPI induzida com IPTG 1 mM, 37°C por 3h em *E. coli* BL21(DE3). FS – Fração solúvel; FI – Fração insolúvel; 1 – Antes da indução; 2 – Depois da indução; 3 – Antes da indução; 4 – Depois da indução; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen™ (kDa). **(B)** RnKazalSPI induzida com IPTG 1mM a 37°C, por 3h em *E. coli* BL21(DE3). FS – Fração solúvel; FI – Fração insolúvel; 1 – Amostra preparada sem agente redutor e sem ferver; 2 – Antes da indução; 3 – Amostra preparada com agente redutor e submetida a 70°C por 5 min; 4 – Amostra preparada com agente redutor e fervida a 100°C; 5 – Antes da indução; 6 – Depois da indução; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen™ (kDa). **(C)** RnKazalSPI induzida com IPTG 1mM a 37°C, por 3h em *E. coli* BL21(DE3). 1 – Amostra preparada sem ureia e fervida a 100°C por 5 min; 2 – Amostra preparada com ureia 6 M e submetida a 40°C O.N.; 3 – Amostra preparada com ureia 6 M e fervida a 100°C por 5 min; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen™ (kDa). .... 49
- Figura 9.** Purificação da RnKazalSPI expressa na fração solúvel por cromatografia de afinidade em níquel. Gel NuPAGE™ Bis-Tris 4-12% da RnKazalSPI. 1 – Extrato total; 2 – Não ligado; 3 – Eluição: imidazol 20 mM; 4 – Eluição: imidazol 100 mM; 5 – Eluição: imidazol 250 mM; 6 – Eluição: imidazol 500 mM; MW – Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen™ (kDa). .... 50
- Figura 10.** Purificação da RnKazalSPI, imidazol 100 mM, por cromatografia de troca iônica. **(A)** Cromatografia de troca iônica da RnKazal, imidazol 100 mM, em coluna Mono Q 5/50 GL revelou dois picos, o primeiro com o volume de eluição próximo a 25 mL e o segundo próximo a 40 mL. **(B)** Gel NuPAGE™ Bis-Tris 4-12% da RnKazalSPI. 1 – Fração D7; 2 – Fração D8; 3 – Fração D9; 4 – Fração D10; 5 – Fração D11; 6 – Fração D12; 7 – Fração E1; 8 – Fração E2;

9 – Fração G1; MW – Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen™ (kDa)..... 50

**Figura 11.** Purificação da RnKazalSPI, imidazol 250 mM, por cromatografia de troca iônica. **(A)** Cromatografia de troca iônica da RnKazal, imidazol 250 mM, em coluna Mono Q 5/50 GL revelou um pico com o volume de eluição próximo a 20 mL. **(B)** Gel NuPAGE™ Bis-Tris 4-12% da RnKazalSPI. 1 – Fração C6; 2 – Fração C7; 3 – Fração C8; 4 – Fração C9; MW – Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen™ (kDa). 51

**Figura 12.** Western blot da expressão da RnOBP utilizando o anticorpo anti-His na diluição 1:2000. **(A)** RnOBP induzida com IPTG 1 mM, 37°C por 3 h em *E. coli* BL21(DE3) ou **(B)** com IPTG 0,5 mM, 25°C por 3 h em *E. coli* BL21(DE3). FS – Fração solúvel; FI – Fração insolúvel; 1 – Antes da indução; 2 – Depois da indução; 3 – Antes da indução; 4 – Depois da indução; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen (kDa). ..... 52

**Figura 13.** Purificação da RnOBP expressa na fração solúvel por cromatografia de afinidade em níquel. Gel de poliácridamida 15% da RnOBP. 1 – Lavagem sem imidazol; 2 – Não ligado; 3 – Eluição: imidazol 20 mM; 4 – Eluição: imidazol 40 mM; 5 – Eluição: imidazol 80 mM; 6 – Eluição: imidazol 150 mM; 7 – Eluição: imidazol 300 mM; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen™ (kDa)..... 52

**Figura 14.** Expressão da RnTriabin. Indução realizada usando IPTG 0,4 mM a 37°C a 3h. **(A)** Gel NuPAGE™ Bis-Tris 4-12% da RnTriabin. 1 – Antes da indução; 2 – Depois da indução; MW – Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen™ (kDa). **(B)** Western blot da expressão da RnTriabin utilizando o anticorpo anti-His na diluição 1:2.000. 1 – Fração solúvel; 2 – Fração insolúvel; MW – Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen™ (kDa). ..... 53

**Figura 15.** Purificação da RnTriabin por cromatografia por exclusão de tamanho. **(A)** Cromatografia por exclusão de tamanho da RnTriabin em coluna HiPrep™ 16/60 Sephacryl™ S-100 HR revelou três picos a 280 nm e um com 220 nm com o volume de eluição próximo a 60 mL. **(B)** Gel NuPAGE™ Bis-Tris 4-12% da RnKazalSPI. 1 – Fração C6; 2 – Fração C7; 3 – Fração C8; 4 – Fração C9; MW – Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen™ (kDa). ..... 54

**Figura 16.** Purificação e concentração da RnTriabin. **(A)** Gel NuPAGE™ Bis-Tris 4-12% da RnTriabin purificada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados. 1 – Extrato total; 2 – Não ligado; 3 – Eluição: imidazol 20 mM; 4 – Eluição: imidazol 100 mM; 5 – Eluição: imidazol 250 mM; MW – Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen™ (kDa). **(B)** Gel NuPAGE™ Bis-Tris 4-12% da RnTriabin concentrada utilizando filtro Amicon® 10K. 1 – Fração 100 mM; 2 – Fração 250 mM; MW – Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen™ (kDa). ..... 54

**Figura 17.** Representação em gráfico do tempo de protrombina da RnKazal **(A)** e RnTriabin **(B)**. Foi realizado o teste utilizando 10 µL da RnKazalSPI (2,38 mg/mL) e da fração 100 da RnTriabin (0,178 mg/mL) não apresentando diferença estatística entre o controle e as amostras testadas. Desta forma, realizou-se o teste com o dobro do volume para cada uma das proteínas, e novamente, o resultado obtido não teve diferença significativa se comparado ao controle. Como obteve-se duas frações da RnTriabin, foi realizado um novo experimento com a fração mais concentrada (6,15 mg/mL), usando 10 µL da amostra, porém, o resultado não diferiu do resultado utilizando a RnTriabin menos concentrada. Controle +: Alboserpina. .... 55

**Figura 18.** Representação em gráfico da inibição do fator Xa da RnKazalSPI e RnTriabin. Não houve diferença estatística entre o controle e as amostras testadas. Controle +: Alboserpina.

..... 56

**Figura 19.** Clivagem das proteínas recombinantes e degradação de Edman. **(A)** Gel NuPAGE™ Bis-Tris 4-12% da RnKazalSPI e RnTriabin após a clivagem utilizando enterocinase. 1 – RnKazalSPI fração 100 mM; 2 – RnKazalSPI fração 250 mM; 3 – RnTriabin fração 100 mM; 4 – RnTriabin fração 250 mM MW – Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen™ (kDa). Aminoácidos identificados das proteínas recombinantes **(B)** RnKazalSPI e **(C)** RnTriabin clivada com enterocinase, sem purificação prévia, indicando a presença da cauda N-terminal e da proteína de interesse. Sequências aminoacídicas das proteínas recombinantes **(D)** RnKazalSPI e **(E)** RnTriabin. Resíduos de aminoácidos em rosa representam aqueles que foram identificados pela degradação de Edman; e em verde, aqueles que foram identificados após a clivagem com enterocinase. A seta preta indica a fração N-terminal após a clivagem com enterocinase. .... 57

**Figura 20.** Confirmação do fenótipo de colônias transformadas com o plasmídeo RnKazalSPinhibitor\_pFastBac1. **(A)** PCR de confirmação da transposição do plasmídeo RnKazalSPinhibitor\_pFastBac1. 1 – Clone 1; 2 – Clone 2; 3 – Clone 3; 4 – Clone 4; 5 – Clone 5; MW – Marcador de pares de base 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™. O quadrado preto indica transposição positiva para o clone 2. **(B)** PCR da midiprep do clone 2. 1 – Clone 2; M – Marcador de pares de base 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™ ..... 58

**Figura 21.** Western blot da expressão da RnKazalSPI 72 hpi. RnKazalSPI expressa em células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). 1 – Meio de cultura; 2 – Extrato celular; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen (kDa). ..... 59

**Figura 22.** Expressão do RnKazalSPI em sistema eucarioto utilizando células Tn5B. **(A)** Células Tn5B (*Trichoplusia ni*) infectadas com baculovírus recombinante carregando RnKazalSPI 72 hpi. É possível visualizar poliedros livres no meio, indicativo de lise celular. **(B)** Western blot da expressão da RnKazalSPI 72 hpi utilizando o anticorpo anti-His na diluição 1:2.000. RnKazalSPI expressa em células Tn5B (*Trichoplusia ni*). 1 – Meio de cultura; 2 – Extrato celular; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen (kDa). O círculo rosa indica poliedros livres no meio. .... 60

**Figura 23.** Confirmação do fenótipo das colônias selecionada transformadas com o plasmídeo RnTrypsin\_pFastBac1. **(A)** PCR de colônia dos clones selecionados. 1 – Clone 1; 2 – Clone 2; 3 – Clone 3; 4 – Clone 4; 5 – Clone 5; MW – Marcador de pares de base 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™. **(B)** PCR da midiprep do clone 4. 1 – Primeira eluição da midiprep; 2 – Segunda eluição da midiprep; M – Marcador de pares de base 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™ ..... 61

**Figura 24.** Western blot da expressão da RnTrypsin 72 hpi. RnTrypsin expressa em células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). 1 – Meio de cultura; 2 – Extrato celular; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen (kDa). ..... 62

**Figura 25.** Expressão da RnTrypsin em sistema eucarioto utilizando células Tn5B. **(A)** Células Tn5B (*Trichoplusia ni*) infectadas com baculovírus recombinante carregando RnTrypsin 48 hpi. É possível observar vacúolos, sinais não característicos da infecção causada por baculovírus. **(B)** Western blot da expressão da RnTrypsin 72 hpi. RnTrypsin expressa em células Tn5B (*Trichoplusia ni*). 1 – Meio de cultura; 2 – Extrato celular; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen (kDa). As setas rosas indicam os vacúolos..... 63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Peso molecular calculado das proteínas putativas contendo ou não peptídeo sinal e após expressão em bactéria ou célula de inseto.....	36
<b>Tabela 2.</b> Sequências dos primers utilizados para PCR. ....	40
<b>Tabela 3.</b> Tamanho dos produtos de PCR esperados para a visualização em gel de agarose. ....	41
<b>Tabela 4.</b> Resultado da análise <i>in silico</i> das sequências aminoacídicas do inibidor de protease do tipo Kazal, PBP/GOBP, triabina e tripsina salivares de <i>R. neglectus</i> .....	47

## RESUMO

O *Rhodnius neglectus* é um inseto hematófago, sendo vetor da doença de Chagas tendo a sua ampla distribuição no cerrado. Para garantir o sucesso do repasto sanguíneo, esses insetos possuem algumas estratégias para contrapor o sistema hemostático do hospedeiro. Desta forma, na saliva desses animais podem ser encontradas moléculas farmacologicamente ativas, como anticoagulantes, antiplaquetárias e vasodilatadoras. O objetivo desse trabalho foi produzir proteínas salivares de *R. neglectus* em sistemas heterólogos procarioto e eucarioto e avaliar sua capacidade para inibir a coagulação sanguínea. Desta forma, foram selecionados 4 transcritos do transcrito de *R. neglectus*, os quais foram clonados no vetor pET100/D-TOPO® ou pFastBac1™. O inibidor de serino protease do tipo Kazal (RnKazalSPI) foi expresso tanto em sistema procarioto, sendo identificado apenas na fração solúvel, quanto em eucarioto, porém neste último foi possível detectar sua expressão, por *western blot*, na linhagem Tn5B. Uma serino protease do tipo tripsina (RnTrypsin) também foi expressa em sistema eucarioto. A proteína de ligação a odorantes (RnOBP) foi expressa em ambas as frações bacterianas, porém ainda não foi possível purificar a proteína da fração solúvel. A triabina (RnTriabin), embora também tenha sido detectada em ambas as frações bacterianas, foi purificada a partir de corpos de inclusão. Das quatro proteínas, duas (RnKazalSPI e RnTriabin) foram efetivamente expressas em bactérias, purificadas e testadas quanto à sua capacidade para inibir a coagulação sanguínea. Entretanto, não apresentaram atividade anticoagulante nos ensaios realizados.

**Palavras-chave:** *Rhodnius neglectus*; inibidor de protease; triabina; serino protease; *odorant binding protein*; anticoagulante.

## ABSTRACT

*Rhodnius neglectus* is a hematophagous insect and Chagas disease vector and it is widely distributed in the Brazilian savannah. To ensure the success of the blood meal, these insects have some strategies to counter host homeostasis. Thus, its saliva may have pharmacologically active molecules as anticoagulants, antiplatelets, and vasodilators. This study aimed to express *R. neglectus* salivary proteins in prokaryote and eukaryote systems and to evaluate the capacity to inhibit blood clotting. Thus, four transcripts were selected from *R. neglectus* transcriptome, and they were cloned into pET100/D-TOPO® or pFastBac1™. A Kazal-type serine protease inhibitor (RnKazalSPI) was expressed in both the prokaryotic system, being identified only in the soluble fraction, and in the eukaryotic, however, in the latter, it was not detected by western blot in the Tn5B cell line. A trypsin-like serine protease (RnTrypsin) was also expressed in the eukaryotic system. An odorant-binding protein (RnOBP) was detected in both bacterial fractions, but it has not been possible to purify the protein from the soluble fraction yet. A triabin (RnTriabin), although also detected in both bacterial fractions, was purified from inclusion bodies. Out of the four proteins, two (RnKazalSPI and RnTriabin) were effectively expressed in bacteria, purified and tested for their ability to inhibit blood clotting. However, they did not show anticoagulant activity in this study.

**Keywords:** *Rhodnius neglectus*, protease inhibitor, triabin, serine protease, odorant binding protein; anticoagulant.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, foi descoberta em 1909 pelo médico e cientista brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, durante uma campanha para combater a malária no interior de Minas Gerais (KROPF; MASSARANI, 2009; MALAFAIA; RODRIGUES, 2010). Este descobrimento foi considerado um marco na história da medicina, pois trata-se de uma tripla descoberta, onde Carlos Chagas descreveu o agente etiológico da doença, seu vetor e a patologia (MALAFAIA; RODRIGUES, 2010).

O mecanismo de transmissão clássico é o vetorial, que acontece quando o triatomíneo infectado pelo *Trypanosoma cruzi* deposita suas fezes contaminadas na pele entrando em contato com a pele lesionada ou com mucosas do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. Outras formas de transmissão são transfusional, congênita, transplantes de órgãos, oral ou ainda por acidentes laboratoriais (OPAS, 2019).

No Brasil, a forma transfusional de transmissão não ocorre, pois, desde 2004, o sangue total e seus componentes não podem ser transfundidos anteriormente à obtenção de resultados negativos para a doença de Chagas, assim como a transmissão por transplante de órgãos (BRASIL, 2004).

A transmissão congênita depende de diferentes fatores epidemiológicos, como por exemplo: região geográfica, cepa do parasito, parasitemia da mãe e existência de lesões na placenta (CARLIER; TORRICO, 2003; WHO, 2020). No Brasil, o risco estimado da transmissão vertical é de aproximadamente 1% (WHO, 2020), enquanto em outros países da América Latina, esse risco pode chegar a mais de 10% (CARLIER; TORRICO, 2003). A transmissão congênita depende diretamente da prevalência da infecção de mulheres férteis, as quais são normalmente infectadas de forma vetorial (WHO, 2020).

A transmissão oral da doença ocorre pelo consumo de alimentos contaminados como carne de caça, caldo de cana ou açaí, levando a microepidemias da forma aguda da doença, o que vem ocorrendo principalmente na região amazônica (PRATA, 2001; SANGENIS; NIELEBOCK; SANTOS; SILVA *et al.*, 2016; VARGAS; MALTA; COSTA; CLÁUDIO *et al.*, 2018).

A doença de Chagas pode ser dividida em duas fases, a aguda e a crônica. A fase aguda da doença, quando sintomática, tem sintomas característicos de uma infecção comum, havendo febre, falta de apetite, mal-estar e inflamação leve no local da picada. Mas essa doença possui sinais patognomônicos nesse período inicial, são eles o sinal de Romaña (edema bipalpebral unilateral) ou o chagoma de inoculação (lesão a furúnculo que não supura). Passada a fase aguda, caso não tenha sido realizado o tratamento específico, a doença evolui para a fase crônica, a qual pode ser dividida em duas formas, a indeterminada e a sintomática. A forma indeterminada é a forma crônica mais frequente. O indivíduo apresenta sorologia positiva sem nenhuma outra alteração identificável por outros tipos de exames. Esta forma pode durar toda a vida, ou cerca de 10-20 anos após à infecção, e pode evoluir para a forma sintomática. A forma sintomática pode apresentar problemas cardíacos, com aumento do volume do coração e arritmias, podendo levar, em alguns casos à insuficiência cardíaca e à morte súbita (forma cardíaca); dilatação do esôfago e do intestino, apresentando disfagia e constipação (forma digestiva); ou pode apresentar sintomas de ambas as formas cardíaca e digestiva (forma mista ou cardiodigestiva) (BRASIL 2010; KROPF; MASSARANI, 2009).

Cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo todo são estimadas estarem infectadas pelo *T. cruzi*. A doença de Chagas é encontrada principalmente nas áreas endêmicas de 21 países continentais da América Latina. Inicialmente, essa doença estava restrita a áreas rurais desses países. Por conta da alta migração nas últimas décadas, muitas pessoas infectadas vivem em áreas urbanas e a doença foi detectada em países não endêmicos como os Estados Unidos, Canadá, alguns países europeus, africanos, do Mediterrâneo Oriental e do Pacífico Ocidental (WHO, 2019).

## 1.2 Tratamento da doença de Chagas

A doença de Chagas pode ser tratada com benznidazol ou nifurtimox. Ambos os medicamentos são quase 100% efetivos, caso administrados o no início da infecção, durante a fase aguda. A eficácia de ambos os medicamentos diminui, no entanto, com a evolução do tempo de infecção da pessoa (WHO, 2019).

O tratamento também é indicado àqueles os quais a infecção teve recidiva, devido à imunossupressão, por exemplo, e para pacientes durante a fase crônica inicial. Em outros casos, os benefícios potenciais da medicação na prevenção ou no retardamento do desenvolvimento da doença de Chagas deve ser pesado contra a

duração do tratamento, de duração de até 2 meses, e possíveis reações adversas, ocorrendo em até 40% dos pacientes tratados (WHO, 2019).

Benznidazol e nifurtimox não devem ser administrados em mulheres grávidas ou em pessoas com insuficiência renal ou hepática. Nifurtimox também é contraindicado para pessoas com transtornos neurológicos ou psiquiátricos, e foi descontinuado no Brasil. Adicionalmente, o tratamento específico para manifestações cardíacas, ou digestivas, ou neurológicas pode ser requerido (WHO, 2019). Por conta da eficácia restrita das duas drogas à fase aguda, dos efeitos colaterais e do acesso limitado dos pacientes aos medicamentos, o tratamento da doença de Chagas durante a fase crônica é um contratempo (DUMONTEIL; HERRERA, 2017). Sendo assim, na ausência de um tratamento altamente eficaz ou de uma vacina para a doença de Chagas, o controle vetorial é o método mais efetivo de prevenção na América Latina. (WHO, 2019).

### 1.3 Triatomíneos

Os triatomíneos, os quais são conhecidos popularmente como barbeiros, são artrópodes pertencentes à classe Insecta, ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (JURBERG; RODRIGUES; MOREIRA; DALE *et al.*, 2014; LENT; WYGODZINSKY, 1979). São classificados como hemimetábolos e têm cinco estágios de ninfa e um estágio adulto. A ecdise, crescimento, reprodução e oviposição são regulados pelo repasto sanguíneo. Os triatomíneos, em sua maioria, possuem pico de atividade no período noturno (TEIXEIRA, 2007).

Atualmente, a subfamília Triatominae possui 153 espécies, sendo destas 2 fósseis, (LIMA-CORDÓN; MONROY; STEVENS; RODAS *et al.*, 2019; VIEIRA; PRAÇA; BENTES; SANTIAGO *et al.*, 2018) agrupadas em 17 gêneros e organizadas em 5 tribos: Aberproseniini, Bolboderini, Cavercolini, Rhodniini, Triatomini (VIEIRA; PRAÇA; BENTES; SANTIAGO *et al.*, 2018), que estão amplamente distribuídas pelas Américas (GUARNERI; PEREIRA; DIOTAIUTI, 2000; OTÁLORA-LUNA; PÉREZ-SÁNCHEZ; SANDOVAL; ALDANA, 2015). Espécies do gênero *Linshcosteus* já foram relatadas na Índia, e alguns *Triatoma* spp. foram identificados na África, Oriente Médio, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental (VIEIRA; PRAÇA; BENTES; SANTIAGO *et al.*, 2018).

Normalmente, esses insetos são encontrados em ambientes silvestres associados frequentemente com diversos hospedeiros vertebrados, assim como em seus ninhos ou tocas (LAZZARI; PEREIRA; LORENZO, 2013). O contato com o ambiente urbano, animais domésticos e humanos tem ocorrido devido ao aumento do desmatamento do ambiente e queimadas (ALMEIDA; FOLLY-RAMOS; PETERSON; LIMA-NEIVA *et al.*, 2009), que por consequência, leva à perda de hospedeiros primários (SCHOFIELD, 1988), ou quando o triatomíneo alcança áreas urbanas através do voo e colonizam as habitações humanas (LAZZARI; PEREIRA; LORENZO, 2013).

Todas as espécies são consideradas capazes a transmitir o *T. cruzi*, agente etiológico da doença. No entanto, aqueles que pertencem aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* têm importância epidemiológica maior na América Latina, devido ao fato de terem se adaptado a colonizar ambientes peridomésticos e domésticos, entrando em contato com animais domésticos e humanos (CAVASSIN; KUEHN; KOPP; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2014), além da sua competência vetorial (VIEIRA; PRAÇA; BENTES; SANTIAGO *et al.*, 2018).

#### 1.4 *Rhodnius neglectus*

O *Rhodnius neglectus* é uma espécie de triatomíneos, pertencente à tribo Rhodniini, que possui comprimento entre 17,5 mm a 20,5 mm, sendo o macho menor que a fêmea (LENT; WYGODZINSKY, 1979). Possui a coloração marrom claro, com marcações marrons escuras na cabeça, e áreas amareladas no abdômen ventral, e nas coxas (LENT; WYGODZINSKY, 1979). Devido à sua semelhança morfológica com alguns outros *Rhodnius* spp., ele foi classificado como membro do “complexo *Rhodnius prolixus*”, juntamente com *Rhodnius domesticus*, *Rhodnius montenegrensis* (DA ROSA; MENDONÇA; GARDIM; DE CARVALHO *et al.*, 2014), *Rhodnius nasutus* e *Rhodnius robustus*, além do próprio *R. prolixus* (BARRETT, 1988).

*R. neglectus* é um vetor secundário envolvido na transmissão da doença de Chagas tendo sua ampla distribuição no Cerrado, sendo encontrado infestando palmeiras (GURGEL-GONÇALVES; CURA; SCHIJMAN; CUBA, 2012) e ocasionalmente em galinheiros e habitações humanas, configurando seu ciclo/habitat como peridomiciliar e domiciliar. Já foi descrita a sua presença nas seguintes unidades federativas: Acre (RAMOS; CASTRO; SOUZA; OLIVEIRA *et al.*, 2018), Bahia, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba,

Pernambuco, Piauí, Paraná, São Paulo e Tocantins (Figura 1) (JURBERG; RODRIGUES; MOREIRA; DALE *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Distribuição geográfica de *Rhodnius neglectus*. Os estados coloridos em rosa são aqueles em que foi descrita a presença do triatomíneo. Fonte: acervo pessoal baseado nas referências Jurberg *et al.*, 2014 e Ramos *et al.*, 2018.

Este triatomíneo, assim como os outros *Rhodnius* spp., tem as glândulas salivares avermelhadas. Essa característica não ocorre nas glândulas de outros gêneros de triatomíneos. A cor vermelha é devida à presença de hemoproteínas conhecidas como nitroforinas, as quais são responsáveis por muitas atividades anti-hemostáticas da saliva de *Rhodnius*, como vasodilatadora pela liberação de óxido nítrico, anticoagulante e anti-histamínica (SOARES; SANT'ANNA; GONTIJO; ROMANHA *et al.*, 2000).

### 1.5 O repasto sanguíneo

Para garantir o sucesso do repasto sanguíneo, os triatomíneos desenvolveram estratégias morfológicas e moleculares. Dentre as morfológicas, o aparelho bucal tornou-se altamente especializado, contendo: lábio ou probóscide, um par de mandíbulas serrilhadas e um par de maxilas longas e flexíveis. Estas estruturas formam o canal salivar, o qual leva a saliva para o sítio de alimentação e o canal

alimentar, onde o sangue sugado pelo inseto passa durante o processo de alimentação (LAVOPIERRE; DICKERSON; GORDON, 1959).

Durante o repasto sanguíneo, o inseto perfura a pele do hospedeiro utilizando essas estruturas e injeta saliva no tecido do hospedeiro e no vaso sanguíneo local. Os triatomíneos são classificados como insetos solenófagos, ou seja, retiram o sangue diretamente dos vasos sanguíneos, utilizando sua probóscide longa e flexível, não provocando micro-hemorragias (SILVA, 2009). A picada do inseto causa uma lesão tecidual e vascular que desencadeia a resposta fisiológica do hospedeiro para evitar a perda de sangue, chamada hemostasia; o processo inflamatório e a resposta imunológica. Estas respostas fisiológicas são extremamente rápidas, e faz-se necessário a produção de moléculas ativas farmacologicamente capazes de contornar estes obstáculos para que esses insetos obtenham sucesso ao realizar o repasto (CHAMPAGNE, 2004; CHAMPAGNE, 2005; RIBEIRO, 1995).

## 1.6 Hemostasia

A hemostasia é um conjunto de eventos fisiológicos e tem como objetivo evitar a perda sanguínea ocorrida por alguma lesão. Ela pode ser dividida didaticamente em três fenômenos diferentes, a vasoconstrição, a formação do tampão plaquetário e a formação do coágulo sanguíneo (HALL, 2011).

A vasoconstrição acontece como uma resposta imediata após o corte ou ruptura do vaso sanguíneo, onde o trauma da própria parede vascular leva à contração da sua musculatura lisa. O fluxo sanguíneo, então, é instantaneamente reduzido pelo vaso lesado (HALL, 2011).

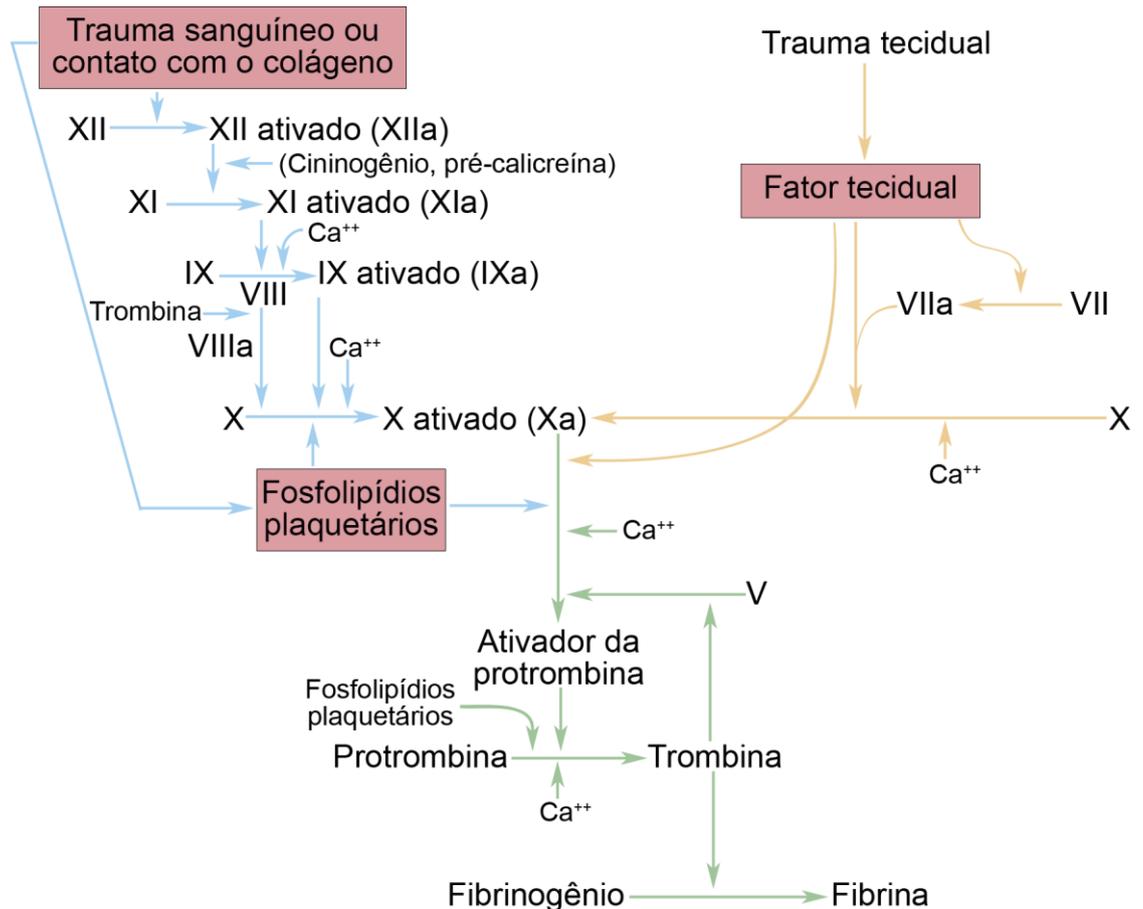
Caso a lesão no vaso sanguíneo seja muito pequena, ela é selada com sucesso pelo tampão plaquetário. No momento em que as plaquetas entram em contato com a superfície vascular lesada, estas começam a se dilatar, assumindo formas irregulares e liberam grânulos contendo diversos fatores ativos. Estes fatores aderem ao colágeno dos tecidos e ao fator de von Willebrand. As plaquetas, então, secretam ADP e as suas enzimas formam o tromboxano  $A_2$ . Estas duas moléculas atuam ativando as plaquetas vizinhas e, assim, as recém-ativadas aderem às originalmente ativadas, atraindo novas plaquetas até que o tampão plaquetário seja formado (ANDREWS; BERNDT, 2008; HALL, 2011).

O coágulo sanguíneo começa a se desenvolver, em média, 15 segundos após um trauma grave, e até 2 minutos, caso o trauma seja pequeno. Ele pode ser formado

por duas vias, que interagem constantemente entre si, a via extrínseca e a via intrínseca (HALL, 2011).

A coagulação pela via extrínseca começa a partir da liberação do fator tecidual, pelo tecido traumatizado. O complexo lipoproteico do fator tecidual em conjunto com o fator VII da coagulação sanguínea e, em presença de íons cálcio, atuam enzimaticamente sobre o fator X ativando-o (Xa). O fator Xa, os fosfolipídios teciduais e o fator V formam o complexo chamado de ativador da protrombina. Na presença de íons cálcio, esse complexo cliva a protrombina para formar a trombina. Então, a trombina causa a polimerização das moléculas de fibrinogênio em fibras de fibrina, as quais se aderem às superfícies lesadas dos vasos sanguíneos, impedindo a perda de sangue. O coágulo sanguíneo é, desta forma, composto por malhas de fibras de fibrinas que retêm células sanguíneas, plaquetas e plasma (Figura 2) (CRAWLEY; LANE, 2008; HALL, 2011).

A coagulação pela via intrínseca começa com o trauma ao próprio sangue ou pela exposição do sangue ao colágeno, fazendo com que o fator XII seja ativado (XIIa) e com que as plaquetas sejam afetadas liberando fosfolipídios plaquetários que contém a lipoproteína chamada fator plaquetário 3. O fator XIIa ativa enzimaticamente o fator XI, o qual é dependente do cininogênio de alto peso molecular e é catalisado pela pré-caliceína. O fator XIa atua enzimaticamente sobre o fator IX ativando-o. O fator IX em conjunto com o fator VIIIa, os fosfolipídios plaquetários e com o fator plaquetário 3 ativam o fator X. O fator Xa combinado ao fator V e com as plaquetas ou fosfolipídios teciduais formam o complexo ativador da protrombina, que desencadeia a clivagem da protrombina em trombina, e esta é responsável pela polimerização do fibrinogênio em fibras de fibrina (Figura 2) (GAILANI; RENNÉ, 2007; HALL, 2011; SCHMAIER, 2008).



**Figura 2.** Representação esquemática da cascata de coagulação. As setas azuis representam a via intrínseca, as setas laranjas representam a via extrínseca e as setas verdes representam a sobreposição de ambas as vias. Adaptado de Hall, 2011.

### 1.7 Proteínas salivares de artrópodes hematófagos

A saliva dos artrópodes hematófagos é um fluido rico em proteínas ativas farmacologicamente com atividades anti-hemostáticas, por exemplo: antiplaquetária, anticoagulante, anti-histamínica e vasodilatadora necessárias para a hematofagia, além de facilitarem a transmissão de patógenos (CHAMPAGNE, 1994; CHAMPAGNE, 2004; RIBEIRO, 1995; STARK; JAMES, 1996).

Entre as famílias de proteínas salivares de triatomíneos com funções anti-hemostáticas descritas até o momento, é possível mencionar as lipocalinas, triabinas, apirases, hemolisinas, antígenos 5, inibidores de proteases, proteases, entre outras, além de proteínas com função desconhecida (DE ARAÚJO; BUSSACOS; SOUSA; HECHT *et al.*, 2012; SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; PRAÇA *et al.*, 2020).

Os artrópodes hematófagos desenvolveram diversas estratégias para inibir a ativação e agregação plaquetária, uma função mediada por receptores a sinais

associados ao trauma, incluindo ADP, colágeno e trombina (CHAMPAGNE, 2005). As proteínas que têm função de inibir a agregação plaquetária podem ter como mecanismo de ação a inibição da liberação de ATP pelas plaquetas, como é o caso da palidipina de *Triatoma pallidipennis* (NOESKE-JUNGBLUT; KRÄTZSCHMAR; HAENDLER; ALAGON *et al.*, 1994); a depleção do ADP e/ou ATP da lesão, como é o caso das apirases, descrita na saliva de vários triatomíneos, como *Dipetalogaster maxima* (ASSUMPÇÃO; CHARNEAU; SANTIAGO; FRANCISCHETTI *et al.*, 2011), *Panstrongylus megistus* (RIBEIRO, J. M.; SCHWARZ, A.; FRANCISCHETTI, I. M., 2015), *R. neglectus* (SANTIAGO; ASSUMPÇÃO; DE ARAÚJO; BASTOS *et al.*, 2016), *R. prolixus* (SARKIS; GUIMARÃES; RIBEIRO, 1986) e *Triatoma infestans* (FAUDRY; LOZZI; SANTANA; D'SOUZA-AULT *et al.*, 2004); a ligação ao ADP, como é o caso da RPAI (*Rhodnius Platelet Aggregation Inhibitor*) de *R. prolixus* (FRANCISCHETTI; RIBEIRO; CHAMPAGNE; ANDERSEN, 2000); ligação ao colágeno, como é o caso das proteínas da família do antígeno 5 salivar, descrito em *D. maxima* (ASSUMPÇÃO; CHARNEAU; SANTIAGO; FRANCISCHETTI *et al.*, 2011) e *T. infestans* (ASSUMPÇÃO; FRANCISCHETTI; ANDERSEN; SCHWARZ *et al.*, 2008; ASSUMPÇÃO; MA; SCHWARZ; REITER *et al.*, 2013; MORITA; ISAWA; ORITO; IWANAGA *et al.*, 2006); e pela ligação à trombina, como é o caso da triabina do *T. pallidipennis* (FUENTES-PRIOR; NOESKE-JUNGBLUT; DONNER; SCHLEUNING *et al.*, 1997).

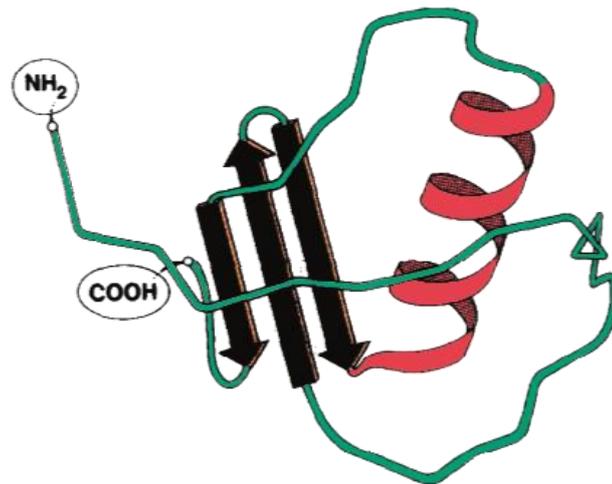
Outra estratégia desenvolvida por esses insetos foi para inibir a coagulação do sangue e evitar a obstrução do aparelho sugador e do intestino, tendo como alvo um dos fatores da cascata de coagulação. A prolixina-S de *R. prolixus* impede a conversão do fator X em Xa (HELLMANN; HAWKINS, 1965); e a triabina de *T. pallidipennis* se liga à trombina (fator IIa) impedindo a conversão de fibrinogênio em fibrina (NOESKE-JUNGBLUT; HAENDLER; DONNER; ALAGON *et al.*, 1995).

Além disso, para evitar a ação da histamina, uma molécula de sinalização liberada por mastócitos, a qual induz prurido, podendo arruinar a alimentação do inseto, os triatomíneos possuem em sua saliva moléculas capazes de se ligarem à histamina e assim neutralizar sua ação (RIBEIRO; WALKER, 1994). Em *Rhodnius* spp., a proteína salivar ligante à aminas biogênicas (BABP – *Biogenic Amine-Binding Protein*) (BUSSACOS; NAKAYASU; HECHT; PARENTE *et al.*, 2011) e as nitroforinas cumprem esta função se ligando à histamina, evitando assim a resposta inflamatória (RIBEIRO; WALKER, 1994). Estas moléculas também têm a função vasodilatadora,

que no caso das BABPs, se ligam bem como à serotonina, epinefrina e norepinefrina, inibindo a vasoconstrição (ANDERSEN; FRANCISCHETTI; VALENZUELA; SCHUCK *et al.*, 2003). No caso das nitroforinas, estas estão ligadas ao óxido nítrico (NO) dentro da glândula do inseto, e durante o repasto, devido a alteração de pH, de um ambiente levemente ácido (saliva: pH ~6,0) para um ambiente neutro/levemente básico (sangue: pH ~7,4), o NO é liberado, e este se difunde no sangue promovendo a vasodilatação (ANDERSEN; CHAMPAGNE; WEICHSEL; RIBEIRO *et al.*, 1997; BUSSACOS; NAKAYASU; HECHT; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2011; DE ARAÚJO; BUSSACOS; SOUSA; HECHT *et al.*, 2012; MONTFORT; WEICHSEL; ANDERSEN, 2000; PAIM; NASCIMENTO; NASCIMENTO; PACHECO *et al.*, 2017).

### 1.8 Inibidores de serino proteases do tipo Kazal

Os inibidores de serino proteases são distribuídos em diversos organismos de todos os reinos e têm um papel crucial em vários mecanismos fisiológicos (LASKOWSKI; KATO, 1980). Eles são proteínas pequenas, onde o domínio Kazal apresenta, em média 40-60 aminoácidos contendo 6 resíduos de cisteína, que formam pontes dissulfeto entre elas, organizadas na ordem I-V, II-IV e III-VI, apresentando o loop do sítio reativo entre as cisteínas II e III. Esses inibidores apresentam uma alta potência inibitória, e uma pronunciada especificidade contra distintas enzimas-alvo (FRIEDRICH; KRÖGER; BIALOJAN; LEMAIRE *et al.*, 1993; KAZAL; SPICER; BRAHINSKY, 1948; VAN DE LOCHT; LAMBA; BAUER; HUBER *et al.*, 1995). A estrutura clássica dos domínios Kazal consistem de uma  $\alpha$ -hélice central, a qual está inserida entre duas fitas  $\beta$  anti-paralelas e uma terceira voltada para o porção C terminal (Figura 3) (PAPAMOKOS; WEBER; BODE; HUBER *et al.*, 1982). Os inibidores de proteases proteicos podem ter um ou múltiplos domínios compartilhando um motivo conservado (FRIEDRICH; KRÖGER; BIALOJAN; LEMAIRE *et al.*, 1993; KAZAL; SPICER; BRAHINSKY, 1948; SCHLOTT; WÖHNERT; ICKE; HARTMANN *et al.*, 2002; VAN DE LOCHT; LAMBA; BAUER; HUBER *et al.*, 1995).



**Figura 3.** Representação esquemática da estrutura secundária de um inibidor de serino protease do tipo Kazal clássico. A  $\alpha$ -hélice em vermelho e as fitas  $\beta$  em preto. Adaptado de Papamokos et al., 1982.

Esses inibidores proteicos desempenham funções importantes em invertebrados, tendo ação antibacteriana (DONPUDSA; TASSANAKAJON; RIMPHANITCHAYAKIT, 2009; KIM; LEE; ZOU; WAN *et al.*, 2013; SOARES; BUARQUE; QUEIROZ; GOMES *et al.*, 2015), anticoagulante (ARAUJO; CAMPOS; TANAKA; SANTOS *et al.*, 2007; CAMPOS; AMINO; SAMPAIO; AUERSWALD *et al.*, 2002; FRIEDRICH; KRÖGER; BIALOJAN; LEMAIRE *et al.*, 1993; KATO; JOCHIM; GOMEZ; TSUNEKAWA *et al.*, 2017), antitripanossoma (LOVATO; AMINO; GONZÁLEZ; MIRANDA *et al.*, 2011), e vasodilatadora (SANTOS; RIBEIRO; LEHANE; GONTIJO *et al.*, 2007; TAKÁC; NUNN; MÉSZÁROS; PECHÁNOVÁ *et al.*, 2006).

Nos triatomíneos, alguns inibidores Kazal foram descritos e caracterizados, como por exemplo a rhodniina de *R. prolixus*, a qual tem dois domínios Kazal, possui afinidade pela trombina, desta forma atuando como um anticoagulante (FRIEDRICH; KRÖGER; BIALOJAN; LEMAIRE *et al.*, 1993). O cDNA da infestina de *T. infestans* apresenta quatro domínios Kazal, porém enquanto proteína, sua forma nativa tem apenas dois domínios, possuindo afinidade para trombina e tripsina, principalmente, e também para os fatores XIIa e Xa, e para plasmina, atuando também como anticoagulante (CAMPOS; AMINO; SAMPAIO; AUERSWALD *et al.*, 2002; LOVATO; NICOLAU DE CAMPOS; AMINO; TANAKA, 2006). O gene da dipetalogastina de *D. maxima* codifica seis domínios Kazal, porém ao ser traduzida, acontece mudanças pós-traducionais, clivando-a em três inibidores distintos, cada qual com dois domínios Kazal, e ela possui alta afinidade com trombina, e baixa afinidade com tripsina e

plasmina, assim como os dois anteriores, atua como anticoagulante (MENDE; LANGE; NOWAK, 2004).

### 1.9 *Pheromone Binding Protein (PBP)/General Odorant Binding Protein (GOBP)*

Proteínas de ligação a feromônios (PBP) e proteínas de ligação a odorantes (OBP) são proteínas solúveis de baixo peso molecular (10-20 kDa), de 120-150 aminoácidos, todas possuindo 6 resíduos de cisteína que formam 3 pontes dissulfeto, que têm capacidade de se ligarem a moléculas de feromônios e odorantes, respectivamente (TEGONI; CAMPANACCI; CAMBILLAU, 2004). Elas foram identificadas em altas concentrações (~10 mM) na linfa sensillar da antena da mariposa *Antheraea polyphemus* (KLEIN, 1987). A habilidade de ligante junto com a localização destas proteínas sugerem uma função de transporte a elas (PELOSI; MAIDA, 1995; STEINBRECHT; LAUE; ZIEGELBERGER, 1995; STEINBRECHT; OZAKI; ZIEGELBERGER, 1992; VOGT; RIDDIFORD, 1981; ZHANG; MAIDA; STEINBRECHT, 2001).

Apesar das OBPs terem um papel fundamental na olfação e esta função ser sustentada por diversos estudos que demonstram que a maioria das proteínas são expressas especificamente em antenas (PELOSI; ZHOU; BAN; CALVELLO, 2006; SHANBHAG; HEKMAT-SCAFE; KIM; PARK *et al.*, 2001), e com a lista de membros identificados dentro da família OBP crescendo, tem ficado claro que nem todas estão associadas com órgãos sensoriais, indicando que estas proteínas podem apresentar funções diferentes (BRITO; MOREIRA; MELO, 2016).

Foram observadas OBPs em glândulas produtoras de feromônio e órgãos reprodutores, como no caso da OBP10 de *Helicoverpa armigera* (SUN; HUANG; PELOSI; WANG, 2012) e da OBP22 de *Aedes aegypti* (LI; PICIMBON; JI; KAN *et al.*, 2008), os quais podem participar da liberação controlada de semioquímicos no ambiente. Em *Phormia regina*, uma OBP é responsável pela solubilização de ácidos graxos da dieta (ISHIDA; ISHIBASHI; LEAL, 2013). Em artrópodes hematófagos, encontraram-se OBPs no transcrito do intestino de *Culex nigripalpus* (SMARTT; ERICKSON, 2009) e *R. prolixus* (RIBEIRO; GENTA; SORGINE; LOGULLO *et al.*, 2014), no sialotranscritoma de *T. infestans* (ASSUMPÇÃO; FRANCISCHETTI; ANDERSEN; SCHWARZ *et al.*, 2008; SCHWARZ; MEDRANO-MERCADO; SCHAUB; STRUCHINER *et al.*, 2014), *P. megistus* (RIBEIRO, J. M. C.; SCHWARZ, A.; FRANCISCHETTI, I. M. B., 2015), *R. neglectus* (SANTIAGO; ASSUMPÇÃO; DE

ARAÚJO; BASTOS *et al.*, 2016), *T. dimidiata* (SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; BASTOS *et al.*, 2018) e *P. lignarius* (NEVOA; MENDES; DA SILVA; SOARES *et al.*, 2018), e no sialoproteoma de *T. dimidiata* (SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; BASTOS *et al.*, 2018), sugerindo que elas podem estar envolvidas com o transporte de nutrientes e outras moléculas na função digestiva.

Proteínas olfativas e não olfativas da família OBP gênica apresentam propriedades estruturais semelhantes. Suas estruturas ricas em hélices sugerem que essas proteínas encapsulam odorantes e outros ligantes hidrofóbicos, com a habilidade de transportá-los através de ambientes aquosos. Consequentemente, presume-se que estas proteínas podem ser usadas em uma variedade de tecidos onde há a necessidade de transportar moléculas hidrofóbicas em meio aquoso ou proteger moléculas da degradação, assim como assegurar uma liberação gradual de semioquímicos no ambiente (BRITO; MOREIRA; MELO, 2016). Por conta disso, Leal (2006) sugere que essas proteínas deveriam ser nomeadas “encapsulinas”, por conta de seu papel comum de encapsular pequenos ligantes e o rótulo “proteína de ligação a odorantes” deveria ser restrito a proteínas olfativas desta família. Ademais, é possível que um extenso número de genes anotados de genomas de inseto como OBPs putativas sejam apenas encapsulinas.

#### 1.10 Serino protease do tipo tripsina

As proteases são enzimas responsáveis por hidrolisar ligações peptídicas em sequências de resíduos de aminoácidos, uma reação importante para processos fisiológicos assim como para patológicos (MOTWANI; DE ROSA; ODELL; HALLBERG *et al.*, 2015). Elas podem atuar em uma diversa variedades de funções complexas, exercendo papel-chave em processos como ativação de zimogênios, catabolismo de proteínas, liberação de peptídeos farmacologicamente ativos de proteínas precursoras, dentre outras funções (RAO; TANKSALE; GHATGE; DESHPANDE, 1998). A classificação das proteases é feita de acordo com o agrupamento de sequências relacionadas em famílias (RAWLINGS; BARRETT; FINN, 2015).

As proteases são um subgrupo das hidrolases e sua nomenclatura é feita de acordo com o tipo de reação catalisada, a natureza química do sítio catalítico e de acordo com a estrutura, sendo subdivididas em exopeptidases ou endopeptidases (TREMACOLDI, 2009). Atualmente, existem sete principais famílias de proteases:

asparagino liase, aspártico, cisteíno, glutâmico, metalo, serino e treonino protease (RAWLINGS; BARRETT; FINN, 2015).

As serino proteases são classificadas desta forma por apresentarem um resíduo de serina reativo no centro ativo (sítio ativo: DSH), e o mecanismo catalítico destas proteases envolve a ligação covalente de substratos a este aminoácido (BOND; BUTLER, 1987). As serino proteases são ramificadas em numerosos tipos, as mais importantes sendo do tipo tripsina, quimotripsina, subtilisina, elastase, calicreína e catepsina (PATEL, 2017).

A tripsina cliva o lado carboxi (C) terminal dos aminoácidos básicos de lisina e arginina, resultando em peptídeos com carga positiva no resíduo mais carboxílico (PATEL, 2017). Em triatomíneos, uma serino protease do tipo tripsina foi purificada e caracterizada da saliva de *T. infestans*, nomeada triapsina, a qual é sintetizada e estocada como zimogênio no lúmen do par D2 de glândulas salivares deste triatomíneo e é ativada e liberada durante a picada e ejeção da saliva (AMINO; TANAKA; SCHENKMAN, 2001). Apesar de parte da saliva ser ingerida juntamente com o sangue, o papel digestivo da triapsina é duvidoso devido ao fato que a digestão do sangue, em triatomíneos, acontece no intestino médio via cisteíno e aspártico proteases (SANTIAGO; DE ARAÚJO; MOTTA; PRAÇA *et al.*, 2017). O papel hipotético proposto para a triapsina é a hidrólise de receptores acoplados à proteína G ativados por proteinase, que regulam o crescimento, desenvolvimento, inflamação e respostas ao dano tecidual (AMINO; TANAKA; SCHENKMAN, 2001). Tripsinas também já foram descritas no proteoma de *P. megistus* (BUSSACOS; NAKAYASU; HECHT; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2011), *R. neglectus* (SANTIAGO; ASSUMPÇÃO; DE ARAÚJO; BASTOS *et al.*, 2016) e *T. dimidiata* (SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; BASTOS *et al.*, 2018).

### 1.11 Triabina

A família das triabinas é formada por proteínas salivares de insetos hematófagos que contrapõe os eventos hemostáticos do hospedeiro vertebrado, como a coagulação, vasoconstrição e a agregação plaquetária (SANT'ANNA; ARAÚJO; PEREIRA; PESQUERO *et al.*, 2002). A proteína triabina, por sua vez, é um tipo de inibidor de serino protease que forma um complexo não-covalente com a trombina, inibindo a agregação plaquetária (FUENTES-PRIOR; NOESKE-JUNGBLUT; DONNER; SCHLEUNING *et al.*, 1997).

Inicialmente, ela foi classificada na família das lipocalinas devido à semelhança da estrutura tridimensional entre os membros das duas famílias (FUENTES-PRIOR; NOESKE-JUNGBLUT; DONNER; SCHLEUNING *et al.*, 1997). Posteriormente, observou-se que as triabinas apresentam um enovelamento diferente das lipocalinas, especialmente em relação à direção das folhas- $\beta$  na conformação geral do barril- $\beta$  (FLOWER; NORTH; SANSOM, 2000; HERNÁNDEZ-VARGAS; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; CORZO, 2016).

A triabina de *T. pallidipennis*, identificada em sua saliva, inibe a trombina em uma razão molar de 1:1 prevenindo a agregação plaquetária e formação de trombos em concentrações de 22 nM (HERNÁNDEZ-VARGAS; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; CORZO, 2016; NOESKE-JUNGBLUT; KRÄTZSCHMAR; HAENDLER; ALAGON *et al.*, 1994). Outras triabinas já foram reportadas no transcrito de *T. brasiliensis* (SANT'ANNA; ARAÚJO; PEREIRA; PESQUERO *et al.*, 2002), *R. prolixus* (RIBEIRO; ANDERSEN; SILVA-NETO; PHAM *et al.*, 2004), *P. megistus* (BUSSACOS; NAKAYASU; HECHT; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2011), *Triatoma rubida* (RIBEIRO; ASSUMPÇÃO; PHAM; FRANCISCHETTI *et al.*, 2012), *R. neglectus* (SANTIAGO; ASSUMPÇÃO; DE ARAÚJO; BASTOS *et al.*, 2016), além do próprio *T. pallidipennis* (HERNÁNDEZ-VARGAS; GIL; LOZANO; PEDRAZA-ESCALONA *et al.*, 2017), e no proteoma de *R. prolixus* (RIBEIRO; ANDERSEN; SILVA-NETO; PHAM *et al.*, 2004), *T. infestans* (CHARNEAU; JUNQUEIRA; COSTA; PIRES *et al.*, 2007), *R. brethesi* (COSTA; SOUSA; RICART; SANTANA *et al.*, 2011), *P. megistus* (BUSSACOS; NAKAYASU; HECHT; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2011), *R. neglectus* (SANTIAGO; ASSUMPÇÃO; DE ARAÚJO; BASTOS *et al.*, 2016) e, novamente, do próprio *T. pallidipennis* (HERNÁNDEZ-VARGAS; GIL; LOZANO; PEDRAZA-ESCALONA *et al.*, 2017).

## 2 JUSTIFICATIVA

Sabendo que a saliva de triatomíneos contém moléculas farmacologicamente ativas que permitem que o repasto seja satisfatório e que podem estar relacionadas com uma maior taxa de infecção do hospedeiro vertebrado pelo *T. cruzi*, faz-se necessário o estudo da saliva destes animais. Além disso, ainda são escassos trabalhos produzindo e caracterizando proteínas salivares de triatomíneos, fazendo que essa área de estudo seja relevante. Desta forma, a expressão das proteínas salivares utilizando sistemas de expressão heterólogos trará conhecimento e entendimento maior acerca destas moléculas, assim como as interações vetor-parasito-hospedeiro. Além disso, o conhecimento adquirido sobre essas proteínas salivares poderá confirmar o potencial biotecnológico destas como moléculas de interesse clínico/comercial, no desenvolvimento de medicamentos para tratamento de doenças ou em uso laboratorial, ou mesmo para rastreamento de outras doenças, ou pré-exposição ao triatomíneo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

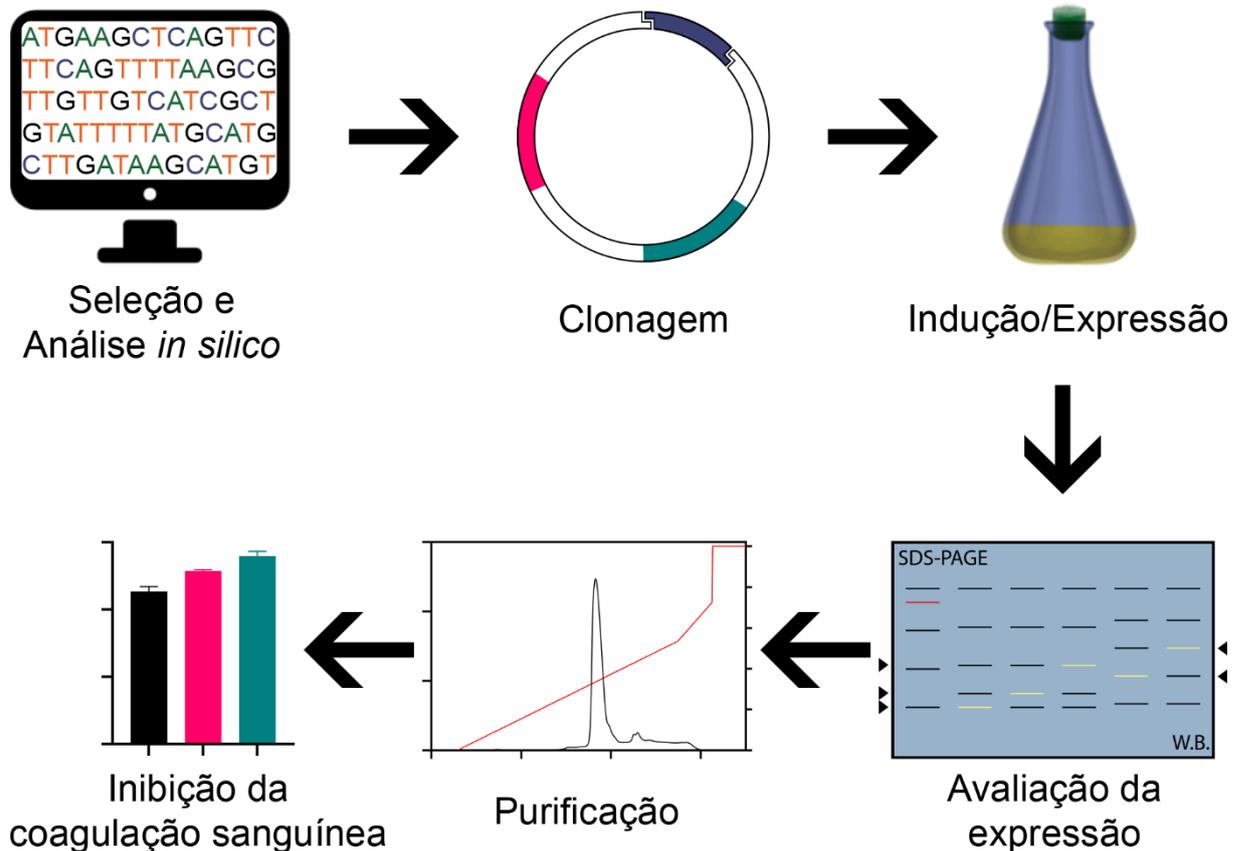
Produzir proteínas salivares de *Rhodnius neglectus*, vetor da doença de Chagas, em sistemas heterólogos procarioto e eucarioto e avaliar sua capacidade para inibir a coagulação sanguínea.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a expressão de proteínas salivares de *R. neglectus* em sistema de expressão bacteriano;
2. Avaliar a expressão de proteínas salivares de *R. neglectus* em sistema de expressão eucarioto;
3. Purificar as proteínas salivares recombinantes de *R. neglectus*;
4. Realizar ensaio de inibição da coagulação sanguínea com as proteínas recombinantes.

## 4 METODOLOGIA

Para alcançar o objetivo proposto, foi delineado o desenho experimental de acordo com a Figura 4 abaixo:



**Figura 4.** Representação esquemática da metodologia utilizada.

### 4.1 Seleção das sequências de proteínas salivares de *R. neglectus*

A partir dos dados do sialoma de *R. neglectus* obtidos por Santiago *et al.* (2016), os seguintes transcritos foram selecionados: Inibidor de protease do tipo Kazal putativo, número de acesso GenBank – GDKW01000509.1; PBP/GOBP putativa, número de acesso GenBank – GDKW01001763.1; Triabina putativa, número de acesso GenBank – GDKW01000502.1; Tripsina salivar putativa, número de acesso GenBank – GDKW01002070.1.

### 4.2 Análise *in silico*

As sequências de aminoácidos das proteínas selecionadas foram caracterizadas inicialmente, realizando uma análise *in silico*, utilizando os seguintes

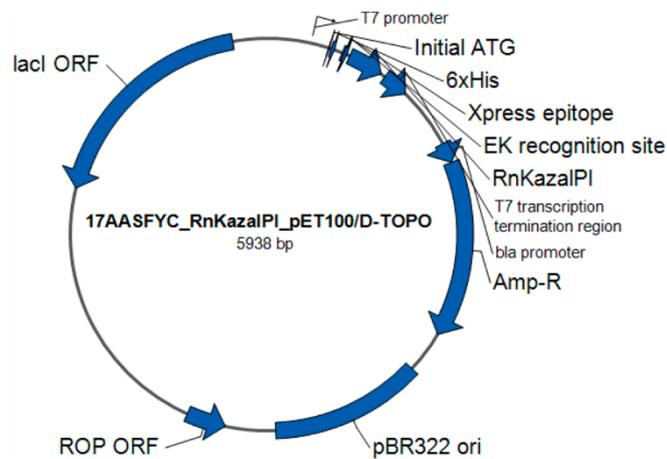
programas: **ProtParam** (GASTEIGER; HOOGLAND; GATTIKER; WILKINS *et al.*, 2005), o qual calcula parâmetros físicos e químicos para uma determinada proteína, tais quais, peso molecular, ponto isoelétrico teórico, composição de aminoácidos, índice de instabilidade, entre outros; **SignalP 5.0** (ALMAGRO ARMENTEROS; TSIRIGOS; SØNDERBY; PETERSEN *et al.*, 2019), que prediz a presença de peptídeos sinais e a localização dos sítios de clivagem em proteínas de Archaea, Bacteria Gram-positiva, Bacteria Gram-negativa e Eukarya; **NetPhos 3.1** (BLOM; GAMMELTOFT; BRUNAK, 1999), o qual prediz sítios de fosforilação de serina, treonina ou tirosina em proteínas eucarióticas; **NetNGlyc 1.0** (GUPTA; JUNG; BRUNAK, 2004) e **NetOGlyc 4.0** (STEENTOFT; VAKHRUSHEV; JOSHI; KONG *et al.*, 2013) os quais predizem sítios de N-glicosilação e O-glicosilação, respectivamente, nas sequências das proteínas.

#### 4.3 Clonagem molecular

As sequências de DNA do inibidor de protease do tipo Kazal putativo, PBP/GOBP putativa e triabina putativa foram códon-otimizadas para expressão em sistema bacteriano e clonadas no vetor pET100/D-TOPO® sem a presença do peptídeo sinal (Figura 5 e Tabela 1) pela empresa Thermo Fisher Scientific, para expressão em *Escherichia coli* regulada pelo promotor T7, o qual permite a expressão de alto nível de proteínas recombinantes induzidas por isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) em linhagens de *E. coli* que expressam a T7 RNA polimerase.

Este vetor possui também o operador *lac* (*lacO*), que tem a função de reduzir a expressão basal da proteína recombinante; um sítio de ligação ao ribossomo (RBS), o qual é responsável pelo recrutamento de ribossomos durante o início da tradução de proteínas; o códon ATG, códon de iniciação da transcrição; uma sequência que codifica um cauda contendo seis resíduos de histidina na porção N-terminal, permitindo a purificação da proteína recombinante e também a sua detecção em *western blot* utilizando anticorpos anti-His; um epítipo Xpress™, que também possibilita a detecção da proteína em *western blot* utilizando anticorpos anti-Xpress™; um sítio de reconhecimento para enterocinase (EK), que permite a remoção da porção N-terminal da proteína recombinante utilizando uma enterocinase, após a purificação da proteína; um sítio de clonagem TOPO®, o qual viabiliza a clonagem rápida do produto de PCR para expressão em *E. coli*; um promotor *bla* e o gene de resistência

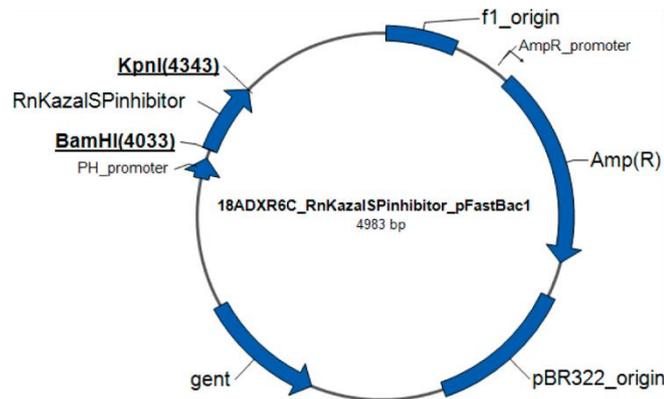
à ampicilina ( $\beta$ -lactamase), sendo o promotor necessário para a expressão do gene de resistência à ampicilina, que permite a seleção de *E. coli* contendo o plasmídeo; uma origem de replicação pBR322 (*ori*), permitindo a replicação e manutenção do plasmídeo em *E. coli*; *ROP* ORF, o qual interage com a origem pBR322 para facilitar a replicação de baixa cópia do plasmídeo em *E. coli*; e *lacI* ORF, que codifica para um repressor lac que se liga ao promotor T7/*lac* bloqueando a transcrição basal do gene de interesse e ao promotor *lacUV5* no cromossomo hospedeiro para reprimir a transcrição da T7 RNA polimerase (Figura 5).



**Figura 5.** Mapa do vetor recombinante pET100/D-TOPO contendo as seqüências de DNA do inibidor de protease do tipo Kazal putativo. A seqüência do inibidor foi substituída pelas outras seqüências, OBP e Triabina. Fonte: ThermoFisher Scientific.

As seqüências de DNA do inibidor de protease do tipo Kazal putativo e da tripsina salivar putativa também foram clonadas no vetor pFastBac™1 pela empresa Thermo Fisher Scientific, no entanto contendo a seqüência do peptídeo sinal, para transformação inicial de *E. coli* e geração de bacmídeos recombinantes (Figura 6 e Tabela 1). O pFastBac™1 é um vetor sem fusão, ou seja, nenhuma cauda de fusão está presente neste vetor. Desta forma, adicionaram-se uma cauda de histidina e um FLAG (DYKDDDDK) na posição C-terminal de cada seqüência. Esse vetor possui o promotor de poliedrina ( $P_{PH}$ ), para a indução da expressão da proteína recombinante em células de inseto; sítios de clonagem múltiplos, que viabilizam a clonagem mediada por sítios de restrição do gene de interesse; sinal de poliadenilação SV40, o qual permite a finalização eficiente da transcrição e poliadenilação do mRNA; Tn7L e Tn7R, estes elementos mini Tn7 possibilitam a transposição sítio-específica do gene de interesse dentro do genoma do baculovírus; origem f1, a qual facilita o resgate de

DNA de fita simples; gene de resistência à ampicilina, que permite a seleção de *E. coli* contendo o plasmídeo; origem pUC, a qual viabiliza a replicação de alta cópia e manutenção do plasmídeo em *E. coli*; e gene de resistência a gentamicina, o qual permite a seleção do bacmídeo recombinante em *E. coli* DH10Bac™ (Figura 6).



**Figura 6.** Mapa do vetor recombinante pFastBac™ 1 contendo a sequência de DNA do inibidor de protease do tipo Kazal putativo. A sequência do inibidor foi substituída pela sequência da tripsina. Fonte: Thermo Fisher Scientific.

**Tabela 1.** Peso molecular calculado das proteínas putativas contendo ou não peptídeo sinal e após expressão em bactéria ou célula de inseto.

Proteína	PM (kDa) com PS	PM (kDa) sem PS	PM (kDa) em pET100/D-TOPO	PM (kDa) em pFastBac1
Kazal	9,38	6,57	10,70	11,47
OBP	14,91	12,58	16,70	N/A
Triabina	19,82	18,02	22,15	N/A
Tripsina	27,19	25,14	N/A	29,28

PM – Peso molecular; PS – Peptídeo sinal; N/A – Não se aplica.

#### 4.4 Transformação bacteriana com os vetores pET100/D-TOPO recombinantes

As bactérias competentes *E. coli* das linhagens BL21(DE3) ou BL21-AI foram incubadas com 20 ng/μL do vetor RnKazalPI\_pET100/D-TOPO ou RnGOBP\_pET100/D-TOPO ou RnTriabin\_pET100/D-TOPO por 30 min, no gelo. Em seguida, foram submetidas a um choque térmico a 42°C, por 90 s e imediatamente incubadas no gelo por 2 min. Em sequência, as bactérias cresceram em 250 μL de meio SOC a 37°C por 1h sob agitação constante de 250 rpm. As culturas foram

plaqueadas em meio LB ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, por 16 h.

#### 4.4.1 Expressão das proteínas salivares recombinantes em sistema procarioto

Selecionaram-se algumas colônias resultantes da transformação e foram inoculadas em 100 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL). As culturas foram mantidas sob agitação constante de 250 rpm, a 37°C, por 16 h. Após esse período, os 20 mL de cada cultura foram transferidos para 1 L de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL). As culturas foram incubadas a 37°C e sob agitação constante de 250 rpm até atingirem densidade óptica (OD<sub>600</sub>) entre 0,4 e 0,6, medidas na leitora de microplacas SpectraMax M5 (Molecular Devices).

A expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de IPTG, para bactérias da linhagem BL21(DE3); ou pela adição de IPTG e L-arabinose (0,2%), para bactérias da linhagem BL21-AI. A concentração de IPTG, temperatura e tempo de indução utilizados variaram de acordo com o vetor, porém agitação constante de 250 rpm: RnKazalPI\_pET100/D-TOPO – 1 mM, 37°C e 3h; RnGOBP\_pET100/D-TOPO – 0,5 mM, 20°C e 5 h; e RnTriabin\_pET100/D-TOPO – 0,4 mM, 37°C e 3 h.

Após o período de indução, as culturas foram centrifugadas a 2000 × g, por 20 min, a 4°C, em centrífuga CF16RXII (Hitachi). Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos bacterianos foram lisados utilizando solução de lise BugBuster™ (Novagen) acrescida de coquetel de inibidor de protease cOMplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) 1X e 25 unidades/µL de Benzonase® (Sigma), seguindo as instruções do fabricante. As frações solúvel e insolúvel foram separadas. As frações insolúveis foram reconstituídas no mesmo volume de água ultrapura. As frações foram separadas por SDS-PAGE 15%, conforme descrito no item 4.6, e analisadas por *western blot*, conforme descrito no item 4.7.

#### 4.4.2 Preparação dos corpos de inclusão

Para as proteínas que foram visualizadas na fração insolúvel, as bactérias transformadas foram induzidas em 4 L de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL) e após o tempo de indução, as culturas foram centrifugadas, em centrífuga Avanti® J-E (Beckman Coulter), a 6000 rpm, por 15 min, a 4°C, rotor JLA 9.1000. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos bacterianos foram lavados e ressuspensos em 200 mL de Tris 25 mM pH 8 com auxílio de raspador de células, e

centrifugados novamente a 12.000 rpm, por 15 min, a 4°C. Descartaram-se os sobrenadantes e o sedimento foi lavado e ressuspensão novamente com 200 mL de Tris 25 mM pH 8 e, então, a amostra foi sonicada por 30 s, amplitude máxima, e colocada em gelo por 30 s entre as sonicações. A amostra sonicada foi centrifugada novamente a 12.000 rpm, por 15 min, a 4°C, rotor JA-14. O sedimento foi lavado e ressuspensão com 100 mL de Tris 25 mM pH 8, sonicado novamente e adicionou-se 1 mL de Triton X-100, e deixou-se a amostra agitando, com auxílio de agitador magnético, por 2 h, a 4°C. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm, por 15 min, a 4°C. O sedimento foi lavado e ressuspensão com 150 mL de Tris 25 mM pH 8, e sonicado novamente. Centrifugou-se a 12.000 rpm, por 10 min, a 4°C, este procedimento final foi repetido três vezes.

#### 4.4.3 Enovelamento *in vitro* de proteína

À amostra contendo a proteína recombinante estocada nos corpos de inclusão foram adicionados 20 mL da solução Tris 25 mM pH8, guanidina 6 M e EDTA 1 mM. Agitou-se a amostra, em agitador magnético, por 1 h a 4°C. Em seguida, adicionou-se ditioneitol (DTT) (concentração final: 10 mM), seguida de agitação por mais 1 h a 4°C. Após, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 min a 4°C. Separou-se o sobrenadante do sedimento, e o primeiro foi adicionado gota a gota em 4 L de tampão de enovelamento (Tris 50 mM pH 8, EDTA 1 mM, glutatona dissulfeto 0,2 mM, glutatona 1 mM e arginina 200 mM), enquanto este estava sob agitação, em agitador magnético, velocidade máxima. Logo após, deixou-se a solução agitando, por 16 h, em agitador magnético, velocidade baixa-média a 4°C.

#### 4.4.4 Concentração de fluxo tangencial da proteína enovelada *in vitro*

Para concentração das proteínas, a bomba Pellicon® (Millipore – n. catálogo XX80EL005) e a coluna Prep/Scale TFF 2 ft<sup>2</sup> (Millipore – n. catálogo SK1P026W3) foram previamente lavadas com 4 L de NaOH 100 mM, seguidos de 4 L de água mili-Q para remover qualquer resíduo de NaOH. Então, a amostra foi passada na coluna de acordo com as especificações do fabricante, para um volume final de 300 mL. Manteve-se a pressão da bomba a 0,5 kg/cm<sup>2</sup>. Em seguida, passaram-se os 300 mL na célula de ultrafiltração agitada (Millipore – modelo 8400), no modo concentração, de acordo com as especificações do fabricante, para um volume final de 80 mL. Esse volume foi dividido em filtros Amicon® 10K (Millipore) e centrifugados, em centrífuga

Allegra X-14R (Beckman Coulter), a 4.000 rpm, 4°C, rotor SX4750, até redução do volume para 10 mL.

#### 4.5 Transformação bacteriana com os vetores pFastBac1 recombinantes

As bactérias *E. coli* competentes DH10Bac (100 µL) foram descongeladas em gelo, homogeneizadas gentilmente e transferidas para um microtubo pré-resfriado. Adicionou-se 1 µL (10 ng/µL) do vetor RnKazalSPinhibitor\_pFastBac1 ou RnTrypsin\_pFastBac1 às células, agitou-se gentilmente e foram incubadas no gelo por 1 min. Em seguida, as células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação pré-resfriada, fez-se a suspensão alcançar o fundo da cubeta com leves batidas. Na câmara de eletroporação, realizou-se um pulso para bactéria (Bio-Rad). Removeu-se a cubeta da câmara de eletroporação e adicionou-se meio SOC, ressuspendeu-se, gentilmente, as células e foram transferidas para um microtubo. Incubou-se o tubo a 37 °C por 4 h a rotação constante de 225 rpm. Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar contendo canamicina (50 µg/mL), gentamicina (7 µg/mL), tetraciclina (10 µg/mL), X-gal (100 µg/mL) e IPTG (40 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 48 h.

##### 4.5.1 Verificação do fenótipo das bactérias transformadas

Cinco colônias brancas foram selecionadas e plaqueadas em meio LB ágar contendo os antibióticos, em suas devidas concentrações, descritos no item anterior. Cada alça de inoculação utilizada para recolher as colônias foi agitada vigorosamente em 50 µL de água ultrapura estéril em um microtubo. As amostras foram incubadas a 100°C por 10 min e centrifugadas a 16.000 × g por 5 min para lisar as bactérias e desnaturar as DNAses.

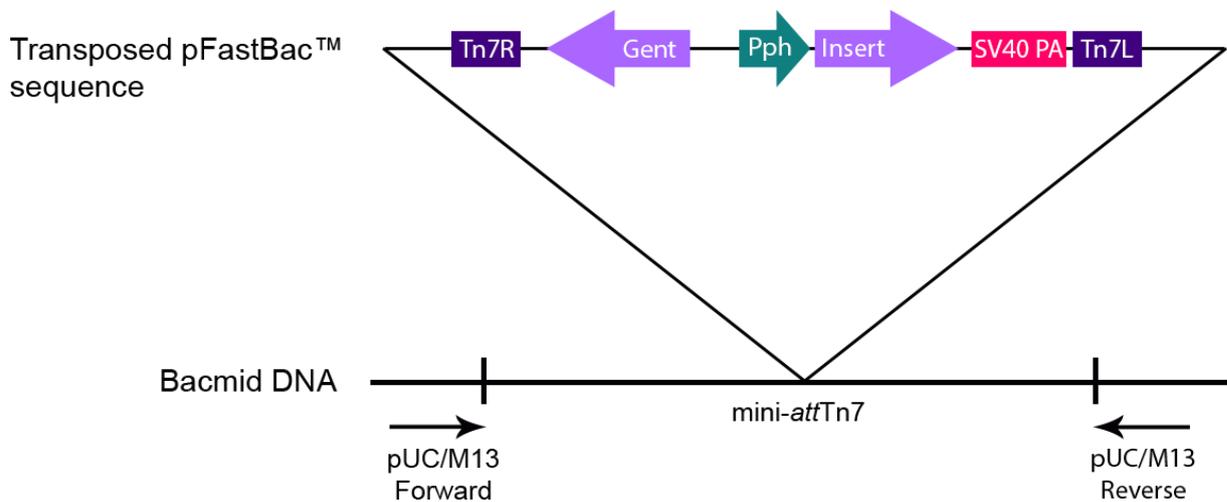
Para confirmar a transposição do bacmídeo recombinante, foi necessário realizar PCR, em razão dele ser maior que 135 kb e a análise de restrição é difícil de ser realizada em DNA deste tamanho.

Foram utilizados 5 µL do sobrenadante do lisado bacteriano de cada clone selecionado como molde para a amplificação por PCR. A PCR foi realizada utilizando os *primers* senso e antisenso pUC/M13 (Tabela 2). Estes primers hibridizam para locais que flanqueiam o sítio mini-*attTn7* dentro da região de complementação *lacZα* para facilitar a análise de PCR (Figura 7). Um total de 35 ciclos foi executado sob as seguintes condições: etapa de desnaturação inicial a 93°C por 3 min, etapa de

desnaturação a 94°C por 45 s, etapa de anelamento a 55°C por 45 s, etapa de extensão a 72°C por 3,5 min, e etapa de extensão final a 72°C por 10 min. Todas as reações foram realizadas utilizando PCR Master Mix (Promega) para volume final de 25 µL.

**Tabela 2.** Sequências dos primers utilizados para PCR.

Primer	Sequência
pUC/M13 <i>Forward</i>	5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'
pUC/M13 <i>Reverse</i>	5'-AGCGGATAACAATTCACACAGG-3'



**Figura 7.** Mapa do bacmídeo recombinante ilustrando o local de anelamento dos *primers* pUC/M13 *Forward* e pUC/M13 *Reverse* no sítio mini-attTn7 dentro da região de complementação *lacZα*. Tn7R – Terminal direito do transposon Tn7; Gent – Gene de resistência à gentamicina; Pph – Promotor poliedrina; Insert – Gene de interesse; SV40 PA – Sequência terminadora SV40 poli(A); Tn7L – Terminal esquerdo do transposon Tn7. Adaptado de Invitrogen.

Ao término da PCR, os produtos de DNA gerados foram analisados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (500 mg/mL). A eletroforese foi realizada a temperatura ambiente com voltagem constante de 90 V e o gel visualizado em foto documentador.

Para verificar se houve a transposição, os oligos pUC/M13 *Forward* e *Reverse* foram utilizados para a amplificação de um produto de PCR com o tamanho esperado de ~2300 bp acrescido do tamanho do inserto. Na ausência da transposição, o produto esperado era de ~300 bp (Tabela 3).

**Tabela 3.** Tamanho dos produtos de PCR esperados para a visualização em gel de agarose.

<b>Amostra</b>	<b>Tamanho do produto de PCR</b>
Bacmídeo não-transposto	~300 bp
Bacmídeo transposto com RnKazalSPinhibitor_pFastBac1	~2612 bp
Bacmídeo transposto com RnTrypsin_pFastBac1	~3095 bp

#### 4.5.2 Geração e purificação do bacmídeo recombinante

Após a confirmação genotípica do fenótipo anteriormente observado, inoculou-se uma colônia em 5 mL de meio LB com os antibióticos, e suas devidas concentrações, descritos no item 4.5. Incubou-se a cultura a 37°C por 16 h a rotação constante de 250 rpm. Após esse período, os 5 mL de cada cultura foram transferidos para 100 mL de meio LB contendo os antibióticos e suas devidas concentrações. As culturas foram incubadas a 37°C e sob agitação constante de 250 rpm por 16 h.

Em seguida, colheram-se as células bacterianas por centrifugação a 2.000 × g por 40 min e descartou-se o sobrenadante. Para isolar o bacmídeo recombinante, utilizou-se o PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

#### 4.5.3 Transfecção das células de inseto

Para a transfecção, foram utilizadas células de inseto Sf9 durante a fase log (1,5-2,5 × 10<sup>6</sup> células/mL). Adicionaram-se 500 µL de meio de cultura TC-100 sem soro fetal bovino (SFB) e adicionaram-se 8 × 10<sup>5</sup> das células Sf9 do passo anterior em uma placa de 35 mm (TPP). Incubou-se as células por 15 min, em temperatura ambiente, para que elas aderissem ao fundo da placa. Para cada transfecção, diluiu-se 8 µL do lipossomo Cellfectin® II em 100 µL do meio TC-100 não suplementado e agitou-se essa mistura para deixá-la homogênea; diluiu-se 1 µL do bacmídeo em 100 µL do meio TC-100 não suplementado e agitou-se gentilmente. Combinou-se o bacmídeo diluído com o lipossomo diluído (mistura de transfecção). Misturou-se gentilmente e incubou-se por 15 min a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se a mistura de transfecção gotejando nas células Sf9. Estas foram incubadas a 27°C por 3 h. Removeu-se a mistura de transfecção e adicionou-se 1,5 mL do meio TC-100

suplementado com 10% de SFB. Incubaram-se as células a 27°C por 72h ou até visualização da infecção viral.

#### 4.5.4 Expressão das proteínas salivares recombinantes em sistema eucarioto

Após as 72 h da transfecção, coletou-se o meio contendo o vírus de cada placa e transferiu-se para um tubo estéril, o qual foi centrifugado a 6.000 rpm por 5 min. Em seguida, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo estéril (estoque viral P1), armazenado a 4°C, protegido da luz.

As células Tn5B foram utilizadas para a amplificação viral e expressão das proteínas recombinantes. Foram plaqueadas  $5 \times 10^6$  células e incubadas a temperatura ambiente por 1 h para que aderissem ao fundo da placa. Após esse tempo, adicionou-se 500  $\mu$ L do estoque viral P1 na placa, e estas foram incubadas por 48 h a 27°C. Após o tempo de infecção, coletou-se o meio contendo vírus de cada placa e transferiu-se para tubo estéril. Centrifugou-se o tubo a 6.000 rpm, por 5 min. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo estéril (estoque viral P2), e armazenou-se a -80°C, protegido da luz. O sedimentado foi coletado e lavado 3 vezes com tampão fosfato-salino (PBS – NaCl 0,137 M, KCl 0,0027 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0018 M pH 7,4) nas mesmas condições da centrifugação anterior. Em seguida, ressuspendeu-se o precipitado de células em 300  $\mu$ L de PBS 1X contendo inibidor de protease e armazenado a -20°C. Para lisar as células, utilizou-se tampão de lise (Tris 62,5 mM pH 6,8, 2% de SDS), centrifugou-se a 16.000  $\times$  g, por 10 min, para obter as frações solúvel e insolúvel.

#### 4.6 Análise em SDS-PAGE

A fim de avaliar o perfil de expressão das proteínas salivares recombinantes pelos sistemas utilizados, os extratos proteicos dos lisados celulares bacterianos ou de inseto foram separados em frações solúvel e insolúvel, as quais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (LAEMMLI, 1970). Adicionou-se às amostras tampão de amostra (Tris 50 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 1% e azul de bromofenol 0,1%). As amostras foram incubadas a 100°C por 5 min e aplicadas em gel SDS-PAGE 15% ou NuPAGE™ Bis-Tris 4-12%. Foram aplicados 12  $\mu$ L de cada fração (solúvel ou insolúvel) de seus respectivos tipos celulares por poço do gel, um gel espelho foi produzido para análise por *Western Blot*. A eletroforese foi realizada a temperatura ambiente. Após a eletroforese, um dos géis

foi corado com solução contendo Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2%, metanol 40% e ácido acético 10% por 1h e descorado com solução contendo metanol 30% e ácido acético 10% até a visualização das bandas. As massas moleculares das proteínas foram estimadas por comparação com o padrão de massas moleculares *BenchMark™ Protein Ladder*, Invitrogen™ ou *SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard*, Invitrogen™.

#### 4.7 Análise por *Western Blot*

Para confirmar a expressão das proteínas recombinantes, foi realizada análise por *western blot* após separação das amostras por SDS-PAGE e transferência para membrana de nitrocelulose (Amersham™ Protran® Supported 0,45 µm, GE Healthcare). A membrana foi submersa em tampão de transferência Towbin (Tris 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM; SDS 0,1% (w/v); e metanol 20% (v/v)) gelado, por 10 min antes do início da transferência. Para a transferência, utilizou-se o sistema MiniProtean®3 Cell (BioRad), corrente constante de 350 mA por 1 h. Após a transferência, a membrana foi corada com solução Ponceau (Ponceau S 0,2% w/v; ácido acético 1%) por 5 min e lavada com água ultrapura, permitindo assim visualizar as bandas transferidas.

A membrana foi bloqueada utilizando solução Tris Buffered Saline (TBS – Tris 50 mM pH 7.5; e NaCl 150 mM) contendo 5% de leite desnatado (w/v) por 16 h a 4°C. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-His (Sigma Aldrich) diluído 1:2.000 em TBS contendo 0,1% de Tween 20 (v/v) (TBS-T) e 1% de leite desnatado (w/v) por 1h sob agitação leve. Logo após, a membrana foi lavada quatro vezes por 5 min a temperatura ambiente, sob agitação leve, com TBS contendo 0,1% de Tween 20 e incubada com o anticorpo secundário (Goat Anti-Mouse IgG horseradish peroxidase conjugated – GAM) diluído 1:30.000 em TBS-T e leite desnatado 1% (w/v) por 1 h, sob agitação leve. Seguidamente, a membrana foi lavada sete vezes com TBS-T. Após as lavagens, as bandas de proteínas imunorreativas foram visualizadas utilizando o substrato quimioluminescente de peroxidase (ECL™ Prime Western Blotting System, GE Healthcare) no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). As massas moleculares das proteínas foram estimadas por comparação com o padrão de massas moleculares *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, Invitrogen ou *SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard*, Invitrogen™.

#### 4.8 Purificação das proteínas recombinantes

Confirmada a expressão das proteínas recombinantes por *western blot*, as frações do lisado celular que continham a proteína recombinante foram usadas para purificação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados utilizando a resina Ni Sepharose™ High Performance (GE Healthcare Life Sciences) ou a coluna de purificação HiTrap™ Chelating HP 5 mL (GE Healthcare Life Sciences) e cromatografia de troca iônica; ou por cromatografia por exclusão de tamanho e cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados utilizando a coluna de purificação HiTrap™ Chelating HP 5 mL (GE Healthcare Life Sciences).

A proteína recombinante presente em corpos de inclusão foi purificada utilizando a coluna HiPrep™ 16/60 Sephacryl™ S-100 HR (GE Healthcare Life Sciences) acoplada ao ÄKTA purifier (GE Healthcare Life Sciences). Basicamente, injetaram-se os 10 mL da amostra obtidos de acordo com o item 4.4.4 e a eluição foi realizada a um fluxo de 0,05 mL/min e as frações de 2 mL foram coletadas em uma placa de coleta de 96 poços. A absorbância das frações foi monitorada em ambos os comprimentos de onda 220 nm e 280 nm, de forma que as proteínas mostram absorbância nessas duas regiões de comprimento de onda. Sendo no primeiro devido às ligações peptídicas e no segundo, aos aminoácidos com anéis aromáticos nas cadeias laterais (fenilalanina, tirosina, triptofano e histidina) (SCHMID, 2001). As frações que poderiam conter a proteína recombinante foram misturadas e purificadas novamente utilizando a coluna de purificação HiTrap™ Chelating HP 5 mL (GE Healthcare Life Sciences).

As amostras contendo proteína recombinante foram adicionadas à coluna contendo resina Ni Sepharose™ High Performance (GE Healthcare Life Sciences) ou à coluna HiTrap™ Chelating HP 5 mL (GE Healthcare Life Sciences) carregada com níquel, previamente equilibrada e com taxa de fluxo de 0,4 mL/min. A coluna foi lavada com tampão de ligação (Tris 20 mM pH 8, NaCl 500 mM) contendo concentrações crescentes de imidazol (20 mM, 100 mM, 250 mM e 500 mM). As frações obtidas da purificação foram analisadas por SDS-PAGE 15% sob condições desnaturantes e redutoras, e *western blot* utilizando anticorpo anti-His. As frações contendo a proteína recombinante foram concentradas e lavadas com Tris 25 mM pH 8 em filtro Amicon® 3K ou 10K (Milipore) por centrifugação em centrífuga Allegra X-14R (Beckman Coulter) a 4000 rpm, 4°C, rotor SX4750, até redução do volume para 500 µL.

A proteína recombinante presente na fração solúvel foi purificada utilizando a coluna Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare Life Sciences) acoplada ao ÄKTA purifier (GE Healthcare Life Sciences). Basicamente, injetaram-se 10 mL da amostra em tampão sem sal (Tris 25 mM pH 8), para garantir a ligação da proteína na coluna e foram utilizados os tampões A (Tris 25 mM pH 8) e B (Tris 25 mM pH 8, NaCl 1 M) para lavagem e eluição. A eluição foi realizada a um fluxo de 0.05 mL/min e as frações de 0,5 mL foram coletadas em uma placa de coleta de 96 poços. A absorbância das frações foi monitorada com o comprimento de onda 280 nm, assim como a condutividade. As frações que poderiam conter a proteína recombinante foram misturadas, concentradas e lavadas com Tris 25 mM para troca de tampão utilizando filtro Amicon® 3K (Millipore). Ao final da purificação e concentração, a quantificação foi realizada no espectrofotômetro/fluorômetro DS-11 FX (DeNovix, DE). As proteínas recombinantes foram estocadas a -30°C para uso posterior. A RnKazalSPI foi purificada utilizando as colunas HiTrap™ Chelating HP 5 mL (GE Healthcare Life Sciences) e Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare Life Sciences); a RnOBP foi purificada utilizando a resina Ni Sepharose™ High Performance (GE Healthcare Life Sciences); e a RnTriabin foi purificada utilizando as colunas HiPrep™ 16/60 Sephacryl™ S-100 HR (GE Healthcare Life Sciences) e HiTrap™ Chelating HP 5 mL (GE Healthcare Life Sciences).

#### 4.9 Degradação de Edman das proteínas recombinantes

A proteína recombinante (5 µL a 0,1 mg/ml) foi diluída em 100 µL de TFA 0,1% e a amostra foi homogeneizada em vórtex. Passou-se a amostra no cartucho ProSorb (Thermo Fisher Scientific), lavado anteriormente com metanol 100% graduação para HPLC. Após carregar a amostra, o cartucho foi lavado com 600 µL de TFA 0,1% e deixado para secar. Quando seco, a membrana PVDF do cartucho foi removida e colocada diretamente no sequenciado Procise 494 (Thermo Fisher Scientific). O sequenciador foi operado de acordo com as instruções do fabricante para a operação pulso-líquido. A análise e relatórios para os dados da sequência das proteínas foram processados usando o programa SequencePro. Foram utilizadas as proteínas RnKazalSPI e RnTriabin.

#### 4.10 Ensaio de tempo de protrombina

Colocaram-se as tiras de cuvetas na área de incubação para pré-aquecimento a 37°C por no mínimo 3 min. Dispensou-se uma bola magnética em cada cuveta, e adicionaram-se nas cuvetas pré-aquecidas 50 µL de plasma de controle normal (BIOPHEN™), 10 µL ou 20 µL da amostra ou tampão, e incubaram-se as colunas por 60s. Logo após, a reação foi ativada pela adição de 1,25 mL do reagente Neoplastine® Cl 5 pré-aquecido a 37°C. O experimento foi realizado em triplicata no aparelho Diagnostica Stago STart 4 Hemostasis Analyzer. O tempo foi cronometrado pelo próprio aparelho. As proteínas RnKazalSPI e RnTriabin purificadas foram utilizadas neste teste.

#### 4.11 Ensaio de inibição do fator Xa

Para avaliar a inibição da coagulação do plasma, foi utilizado o substrato cromogênico S-2222 (Chromogenix). Os ensaios foram realizados em triplicata. As reações foram iniciadas adicionando 25 µL da amostra ou do tampão do ensaio (HEPES 25 mM pH 7,3; NaCl 150 mM; CaCl<sub>2</sub> 5 mM; BSA 0,05% (w/v)) e 75 µL do fator Xa 1 nM diluído no tampão do ensaio. Incubou-se a placa a 37°C por 20 min e em seguida, adicionaram-se 5 µL do substrato S-2222. A leitura da placa foi medida a cada 10 s durante 45 min pela leitora de placas VersaMax (Molecular Devices, CA), no comprimento de onda de 405 nm, a 37°C. As proteínas RnKazalSPI e RnTriabin purificadas foram utilizadas neste teste.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise *in silico*

O transcrito GDKW01000509.1 (GenBank) codifica para um inibidor de protease do tipo Kazal putativo (RnKazalSPI; Uniprot: A0A0P4W3X1) de 83 resíduos de aminoácidos, 9,38 kDa de peso molecular calculado, ponto isoelétrico (pI) teórico de 4,39 e índice de instabilidade (II) de 39,43, classificando-o como estável. Esta proteína foi predita como contendo peptídeo sinal, indicativo de secreção, e seu sítio de clivagem entre os aminoácidos nas posições 26 e 27 (VFG-DE). Ela possui 9 potenciais sítios de fosforilação, sendo 5 resíduos de serina, 3 de treonina e 1 de tirosina; e nenhum sítio predito de N-glicosilação ou O-glicosilação (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resultado da análise *in silico* das sequências aminoacídicas do inibidor de protease do tipo Kazal, PBP/GOBP, triabina e tripsina salivares de *R. neglectus*.

Software	Kazal (A0A0P4W3X1)*	OBP (A0A0N7Z921)*	Triabina (A0A0P4VLV1)*	Tripsina (A0A0P4VQ38)*
<b>ProtParam</b>				
Resíduos de aa	83 aa	131 aa	180 aa	244 aa
PM	9,38 kDa	14,9 kDa	19,82 kDa	27.19 kDa
pI	4,93	5,11	6,40	9,06
II	39,43	39,55	28,91	28,19
<b>SignalP</b>	1-26 aa	1-20 aa	1-17 aa	1-20 aa
<b>NetPhos</b>				
Serina	5	9	11	8
Treonina	3	5	7	10
Tirosina	1	1	2	5
<b>NetNGlyc</b>	-	N55 e N80	N171	N46 e N138
<b>NetOGlyc</b>				
Serina	-	-	1	-
Treonina	-	-	4	-

\* ID de cada transcrito no UniProt; PM – Peso molecular; pI – Ponto isoelétrico; II – Índice de instabilidade; N – Asparagina; aa – aminoácido.

O transcrito GDKW01001763.1 (GenBank) codifica para uma PBP/GOBP putativa (RnOBP; Uniprot: A0A0N7Z921) de 131 resíduos de aminoácidos, 14,91 kDa de peso molecular, pI teórico de 5,11 e II de 39,55, classificando-a como estável. Esta proteína foi predita como contendo peptídeo sinal, indicativo de secreção, e seu sítio de clivagem entre os aminoácidos nas posições 20 e 21 (ISA-QE). Ela possui 15

potenciais sítios de fosforilação, sendo 9 resíduos de serina, 5 de treonina e 1 de tirosina; 2 resíduos de asparagina, nas posições 55 e 80, potenciais de N-glicosilação, porém não apresentou nenhum sítio predito de O-glicosilação (Tabela 4).

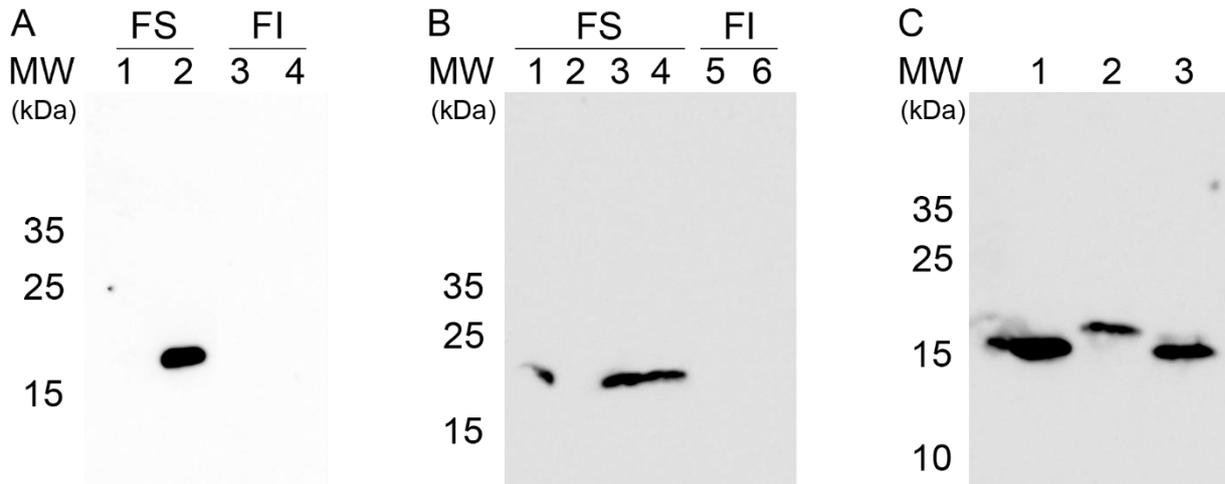
O transcrito GDKW01000502.1 (GenBank) codifica para uma triabina putativa (RnTriabin; Uniprot: A0A0P4VLV1) de 180 resíduos de aminoácidos, 19,82 kDa de peso molecular, pI teórico de 6,40 e pI de 28,91, classificando-a como estável. Esta proteína foi predita como contendo peptídeo sinal, indicativo de secreção, e seu sítio de clivagem entre os aminoácidos nas posições 17 e 18 (TFA-AA). Ela possui 20 potenciais sítios de fosforilação, sendo 11 resíduos de serina, 7 de treonina e 2 de tirosina; 1 resíduos de asparagina, na posição 171, potencial de N-glicosilação; e 5 sítios potenciais para O-glicosilação, sendo 4 resíduos de treonina e 1 de serina (Tabela 4).

O transcrito GDKW01002070.1 (GenBank) codifica para uma tripsina salivar putativa (RnTrypsin; Uniprot: A0A0P4VQ38) de 244 resíduos de aminoácido, 27,19 kDa de peso molecular, pI teórico de 9,06 e pI de 28,19, classificando-a como estável. Esta proteína foi predita como contendo peptídeo sinal, indicativo de secreção, e seu sítio de clivagem entre os aminoácidos nas posições 20 e 21 (VNP-QS). Ela possui 23 potenciais sítios de fosforilação, sendo 8 resíduos de serina, 10 de treonina e 5 de tirosina; 2 resíduos de asparagina, nas posições 46 e 138, potenciais de N-glicosilação, porém não apresentou nenhum sítio predito de O-glicosilação (Tabela 4).

## 5.2 Proteínas obtidas em sistema procarioto

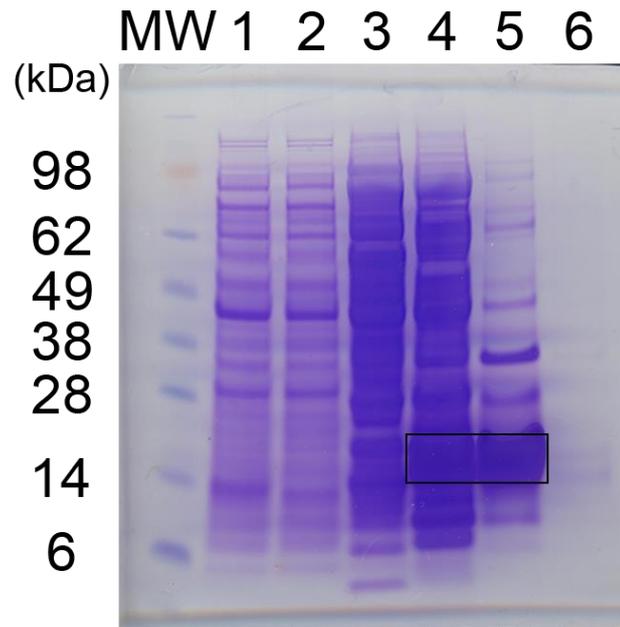
### 5.2.1 RnKazalSPI

A proteína recombinante foi expressa na fração solúvel da linhagem de bactéria *E. coli* BL21(DE3) (Figura 8A). Porém a proteína recombinante foi detectada com o peso molecular maior (~20 kDa) que o esperado (~10 kDa), podendo estar em forma de dímero. Com o objetivo de ter a RnKazalSPI em forma de monômero, a amostra foi preparada de formas diferentes, na ausência ou presença de agente redutor; submetida ou não a aquecimento de 70°C ou 100°C (Figura 8B), na ausência ou presença de ureia 6 M, submetida a aquecimento de 40°C ou 100°C (Figura 8C), porém a proteína recombinante continuou apresentando o dobro do tamanho esperado.

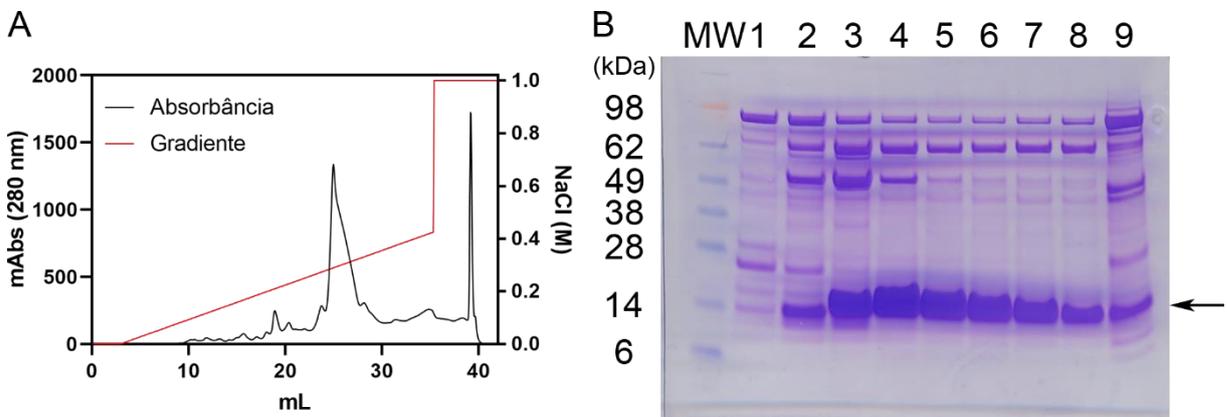


**Figura 8.** *Western blot* da expressão da RnKazalSPI utilizando o anticorpo anti-His na diluição 1:2.000. **(A)** RnKazalSPI induzida com IPTG 1 mM, 37°C por 3h em *E. coli* BL21(DE3). FS – Fração solúvel; FI – Fração insolúvel; 1 – Antes da indução; 2 – Depois da indução; 3 – Antes da indução; 4 – Depois da indução; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen™ (kDa). **(B)** RnKazalSPI induzida com IPTG 1mM a 37°C, por 3h em *E. coli* BL21(DE3). FS – Fração solúvel; FI – Fração insolúvel; 1 – Amostra preparada sem agente redutor e sem ferver; 2 – Antes da indução; 3 – Amostra preparada com agente redutor e submetida a 70°C por 5 min; 4 – Amostra preparada com agente redutor e fervida a 100°C; 5 – Antes da indução; 6 – Depois da indução; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen™ (kDa). **(C)** RnKazalSPI induzida com IPTG 1mM a 37°C, por 3h em *E. coli* BL21(DE3). 1 – Amostra preparada sem ureia e fervida a 100°C por 5 min; 2 – Amostra preparada com ureia 6 M e submetida a 40°C O.N.; 3 – Amostra preparada com ureia 6 M e fervida a 100°C por 5 min; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen™ (kDa).

Após a purificação da RnKazalSPI em coluna de afinidade, a proteína apresentou maior concentração nas eluições contendo imidazol 100 mM e imidazol 250 mM (Figura 9). As eluições contendo a proteína recombinante estavam impuras e foram submetidas a purificação por cromatografia de troca iônica. Para a fração contendo 100 mM de imidazol, dois picos de absorbância foram observados no cromatograma (Figura 10A), o primeiro próximo a 25 mL, correspondendo aos poços D7-E2 na placa de coleta; e o segundo pico próximo a 40 mL de eluição, correspondente ao poço G1 (Figura 10B).



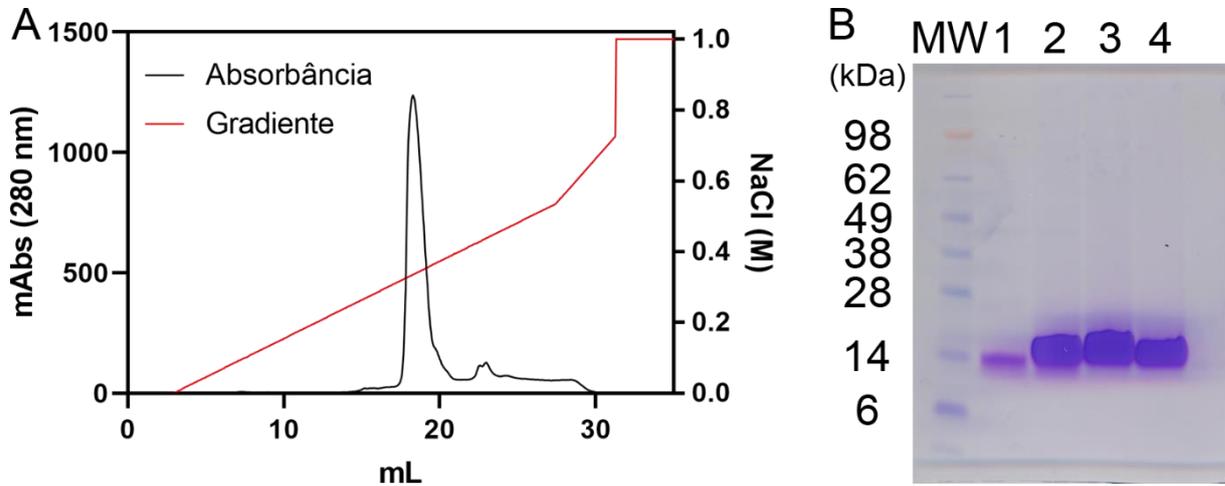
**Figura 9.** Purificação da RnKazalSPI expressa na fração solúvel por cromatografia de afinidade em níquel. Gel NuPAGE™ Bis-Tris 4-12% da RnKazalSPI. 1 – Extrato total; 2 – Não ligado; 3 – Eluição: imidazol 20 mM; 4 – Eluição: imidazol 100 mM; 5 – Eluição: imidazol 250 mM; 6 – Eluição: imidazol 500 mM; MW – Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen™ (kDa).



**Figura 10.** Purificação da RnKazalSPI, imidazol 100 mM, por cromatografia de troca iônica. **(A)** Cromatografia de troca iônica da RnKazal, imidazol 100 mM, em coluna Mono Q 5/50 GL revelou dois picos, o primeiro com o volume de eluição próximo a 25 mL e o segundo próximo a 40 mL. **(B)** Gel NuPAGE™ Bis-Tris 4-12% da RnKazalSPI. 1 – Fração D7; 2 – Fração D8; 3 – Fração D9; 4 – Fração D10; 5 – Fração D11; 6 – Fração D12; 7 – Fração E1; 8 – Fração E2; 9 – Fração G1; MW – Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen™ (kDa).

Para a fração contendo 250 mM de imidazol, observou-se apenas um pico próximo a 20 mL de eluição (Figura 11), correspondendo aos poços C6-C9 na placa de coleta. Por ter observado que ao fim das purificações, o purificado desta fração estava mais puro que o da fração contendo 100 mM de imidazol, as frações C6-C9

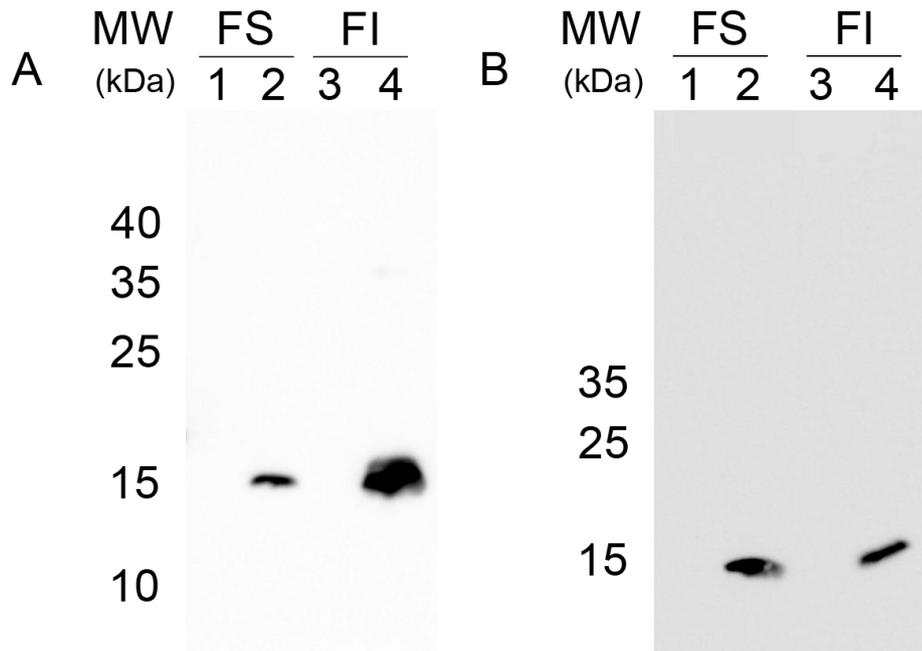
foram reunidas e concentradas, apresentando uma concentração final de 2,38 mg/mL. Os experimentos a seguir foram realizados utilizando este concentrado.



**Figura 11.** Purificação da RnKazalSPI, imidazol 250 mM, por cromatografia de troca iônica. **(A)** Cromatografia de troca iônica da RnKazal, imidazol 250 mM, em coluna Mono Q 5/50 GL revelou um pico com o volume de eluição próximo a 20 mL. **(B)** Gel NuPAGE™ Bis-Tris 4-12% da RnKazalSPI. 1 – Fração C6; 2 – Fração C7; 3 – Fração C8; 4 – Fração C9; MW – Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen™ (kDa).

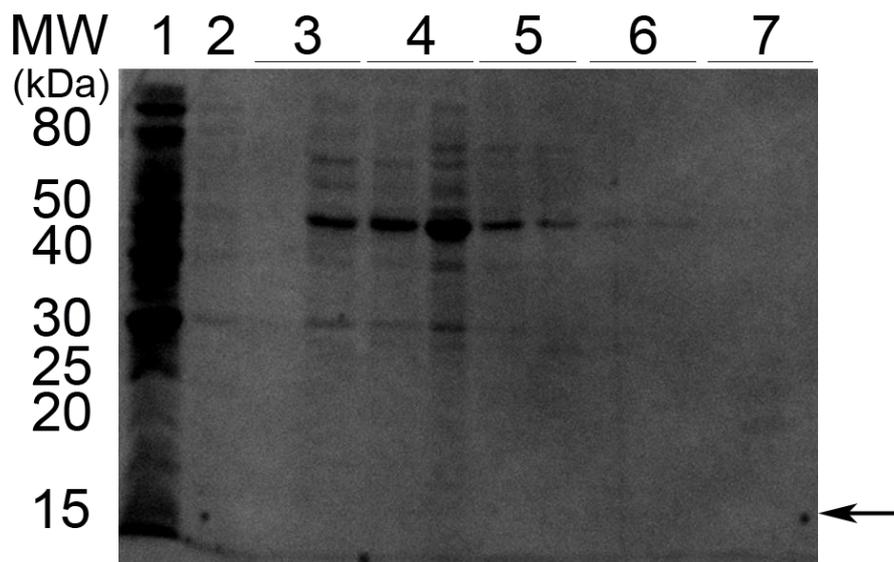
### 5.2.2 RnOBP

A RnOBP foi expressa na primeira condição testada (IPTG 1 mM, 37°C por 3 h) em ambas as frações bacterianas, solúvel e insolúvel (Figura 12A). A proteína recombinante foi expressa pelas duas linhagens de bactérias testadas, *E. coli* BL21(DE3) e BL21-AI e apresentou o peso molecular esperado (~15 kDa). Com o objetivo de obter a proteína na fração solúvel, ajustou-se a condição (IPTG 0,5 mM, 25 °C por 5 h), e a proteína continuou sendo expressa em ambas as frações (Figura 12B).



**Figura 12.** Western blot da expressão da RnOBP utilizando o anticorpo anti-His na diluição 1:2000. **(A)** RnOBP induzida com IPTG 1 mM, 37°C por 3 h em *E. coli* BL21(DE3) ou **(B)** com IPTG 0,5 mM, 25°C por 3 h em *E. coli* BL21(DE3). FS – Fração solúvel; FI – Fração insolúvel; 1 – Antes da indução; 2 – Depois da indução; 3 – Antes da indução; 4 – Depois da indução; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen (kDa).

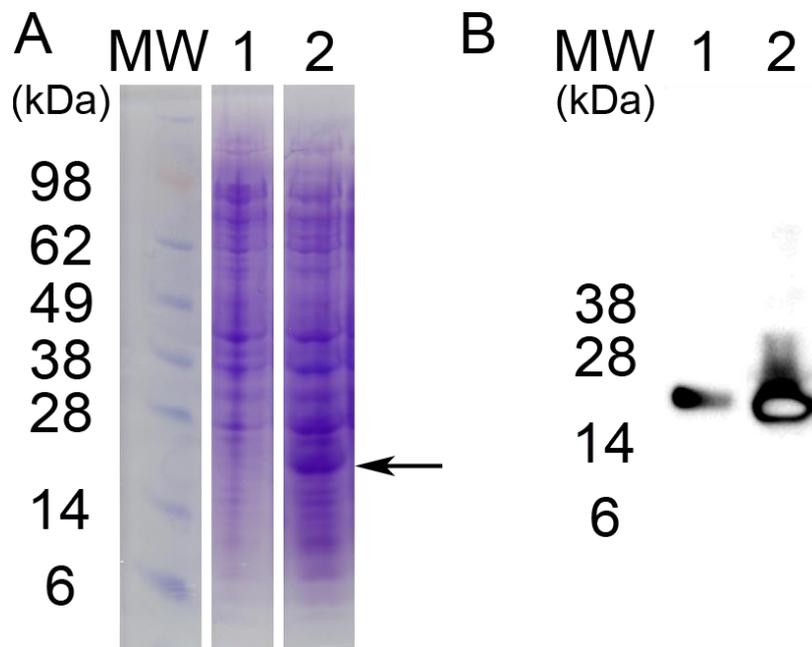
Após a purificação da fração solúvel por cromatografia de afinidade não foi possível observar a RnOBP purificada (Figura 13).



**Figura 13.** Purificação da RnOBP expressa na fração solúvel por cromatografia de afinidade em níquel. Gel de poliacrilamida 15% da RnOBP. 1 – Lavagem sem imidazol; 2 – Não ligado; 3 – Eluição: imidazol 20 mM; 4 – Eluição: imidazol 40 mM; 5 – Eluição: imidazol 80 mM; 6 – Eluição: imidazol 150 mM; 7 – Eluição: imidazol 300 mM; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen™ (kDa).

### 5.2.3 RnTriabin

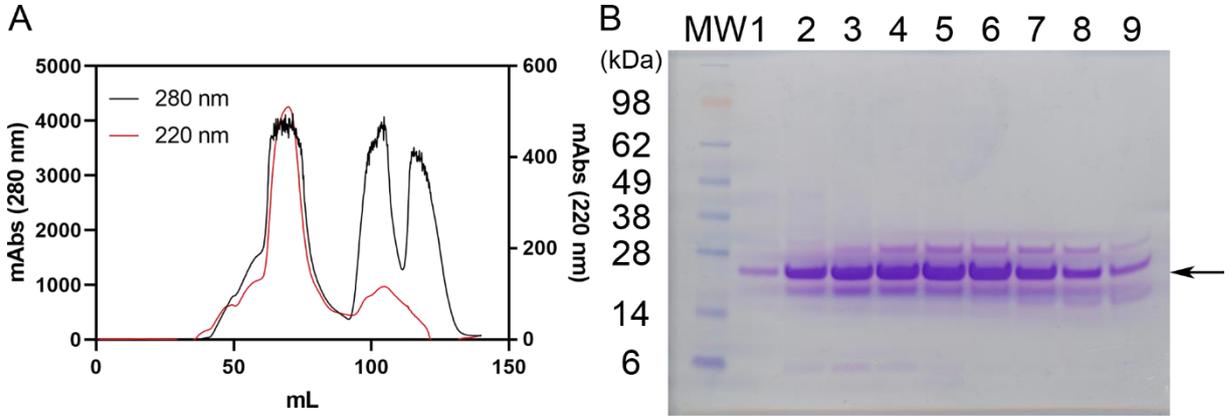
A RnTriabin foi expressa com o peso molecular esperado (~22 kDa, Figura 14A), e detectou-se a presença da proteína em ambas as frações solúvel e insolúvel (Figura 14B), utilizando as condições clássicas de expressão (37°C por 3h), porém com quantidade superior de proteína na fração insolúvel. Por conta disso, decidiu-se utilizar a fração insolúvel para obter a proteína dos corpos de inclusão.



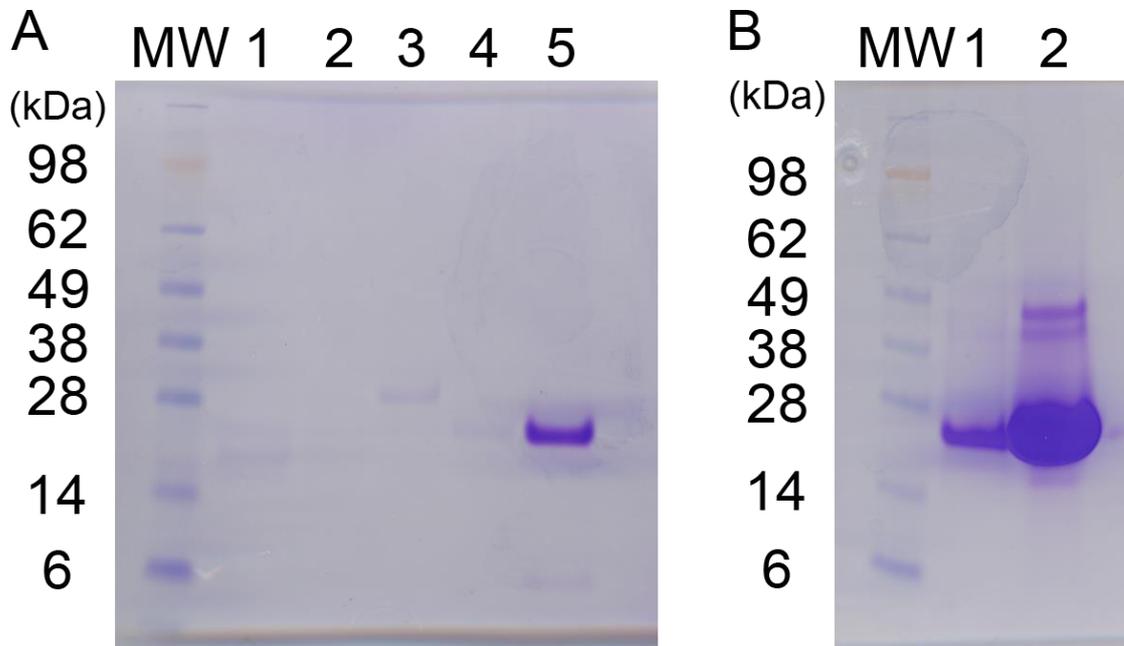
**Figura 14.** Expressão da RnTriabin. Indução realizada usando IPTG 0,4 mM a 37°C a 3h. **(A)** Gel NuPAGE™ Bis-Tris 4-12% da RnTriabin. 1 – Antes da indução; 2 – Depois da indução; MW – Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen™ (kDa). **(B)** Western blot da expressão da RnTriabin utilizando o anticorpo anti-His na diluição 1:2.000. 1 – Fração solúvel; 2 – Fração insolúvel; MW – Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen™ (kDa).

Ao realizar a purificação por cromatografia por exclusão de tamanho, observaram-se três picos de absorvância a 280 nm e um a 220 nm, este coincidindo com o primeiro pico de 280 nm, o que confirmou que as frações coletadas nos seus respectivos poços, na placa de coleta, tinham a proteína com o tamanho esperado, como observado no gel de poliacrilamida (Figura 15). Assim, as frações foram reunidas e submetidas a uma nova purificação, onde a proteína foi obtida em maior rendimento na eluição contendo imidazol 250 mM em relação à eluição contendo imidazol 100 mM (Figura 16). Por fim, as duas frações foram concentradas e

quantificadas, sendo que a fração obtida com imidazol 100 mM apresentou concentração de 0,178 mg/mL, e a de imidazol 250 mM teve concentração igual a 6,15 mg/mL.



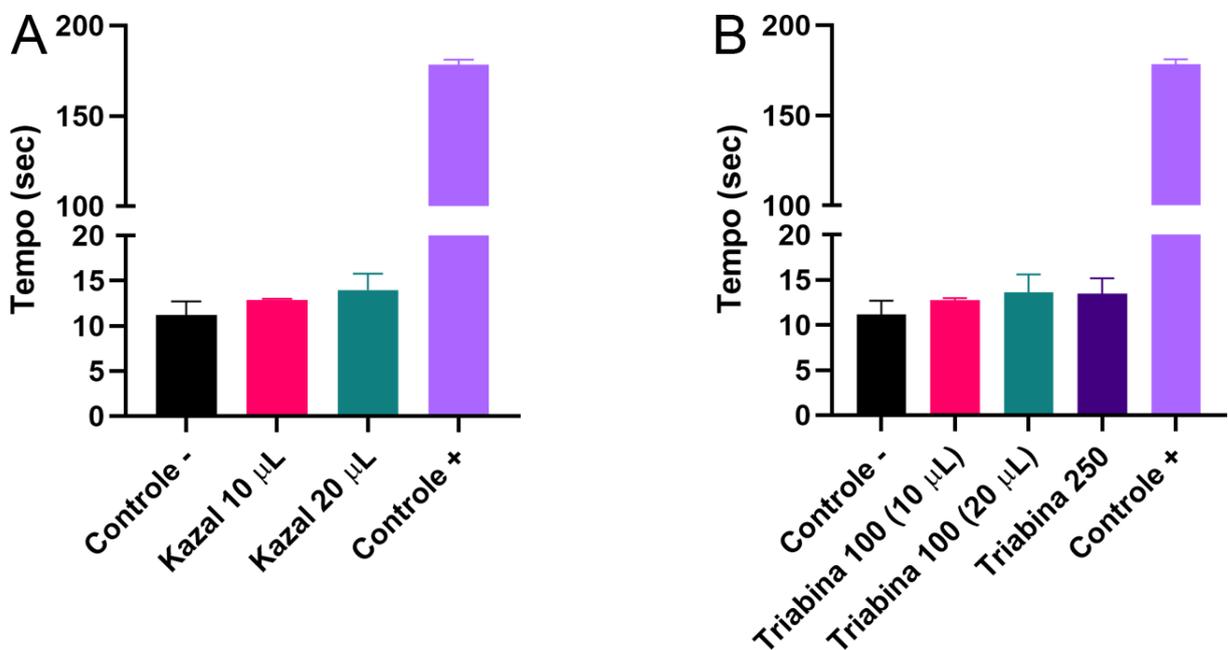
**Figura 15.** Purificação da RnTriabin por cromatografia por exclusão de tamanho. **(A)** Cromatografia por exclusão de tamanho da RnTriabin em coluna HiPrep™ 16/60 Sephacryl™ S-100 HR revelou três picos a 280 nm e um com 220 nm com o volume de eluição próximo a 60 mL. **(B)** Gel NuPAGE™ Bis-Tris 4-12% da RnKazalSPI. 1 – Fração C6; 2 – Fração C7; 3 – Fração C8; 4 – Fração C9; MW – Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen™ (kDa).



**Figura 16.** Purificação e concentração da RnTriabin. **(A)** Gel NuPAGE™ Bis-Tris 4-12% da RnTriabin purificada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados. 1 – Extrato total; 2 – Não ligado; 3 – Eluição: imidazol 20 mM; 4 – Eluição: imidazol 100 mM; 5 – Eluição: imidazol 250 mM; MW – Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen™ (kDa). **(B)** Gel NuPAGE™ Bis-Tris 4-12% da RnTriabin concentrada utilizando filtro Amicon® 10K. 1 – Fração 100 mM; 2 – Fração 250 mM; MW – Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen™ (kDa).

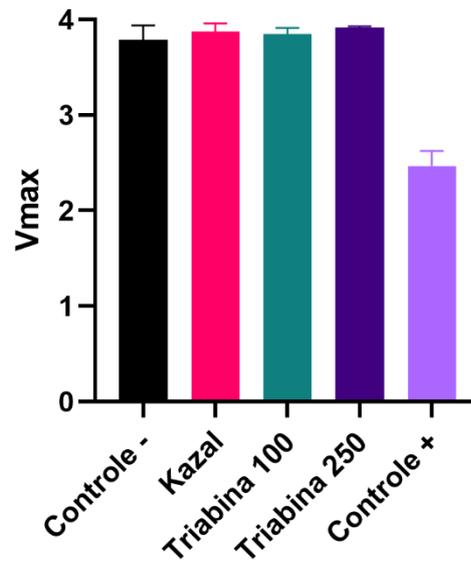
### 5.3 As proteínas recombinantes RnKazalSPI e RnTriabin não alteraram o tempo de protrombina, nem inibiram o fator Xa da cascata de coagulação

As proteínas recombinantes RnKazalSPI e RnTriabin foram avaliadas quanto à sua capacidade de retardar ou inibir por completo a conversão da protrombina em trombina. Embora, o tempo de conversão tenha sido levemente maior, não houve diferença significativa em relação ao controle (Figura 17A). No entanto, como obteve-se duas frações da RnTriabin, foi realizado um novo experimento com a fração mais concentrada (6,15 mg/mL), usando 10  $\mu$ L da amostra. O resultado não diferiu do resultado utilizando a RnTriabin menos concentrada (Figura 17B).



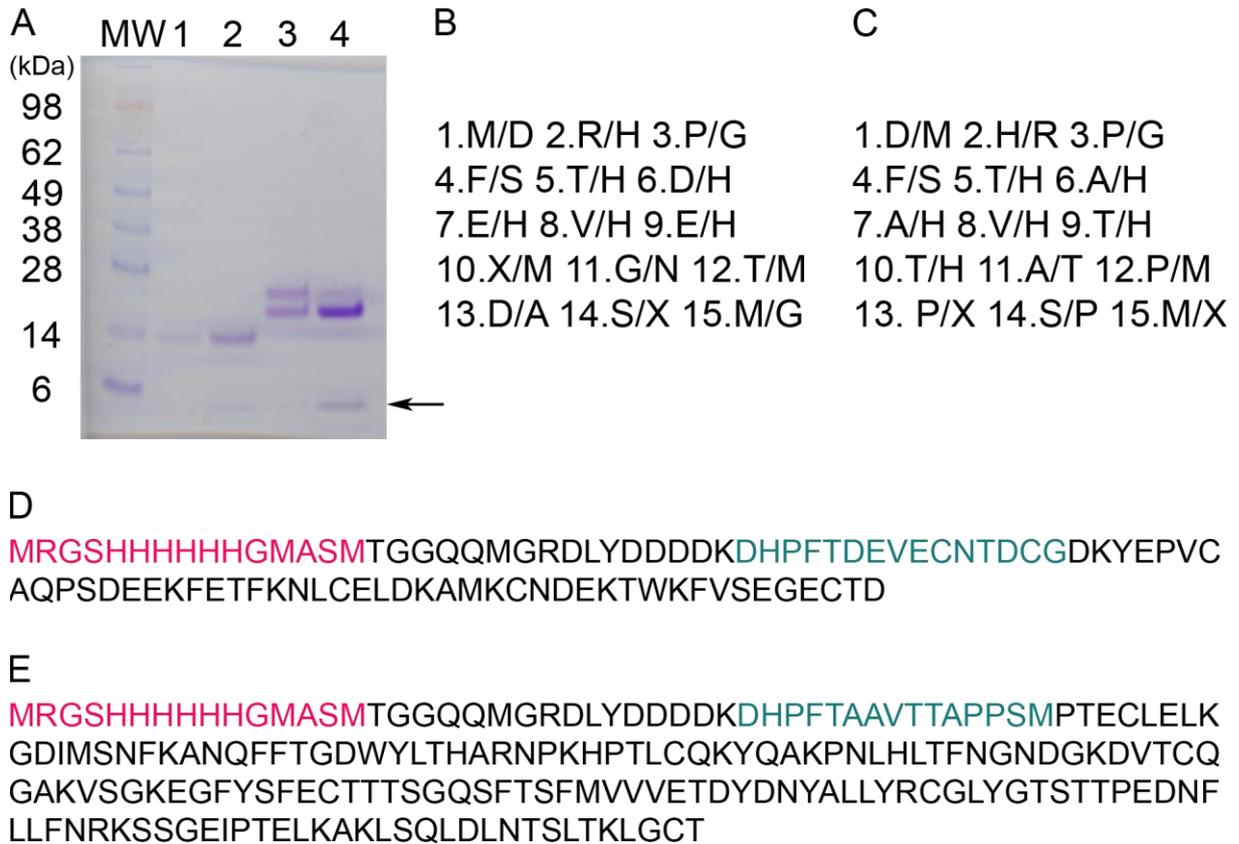
**Figura 17.** Representação em gráfico do tempo de protrombina da RnKazal (A) e RnTriabin (B). Foi realizado o teste utilizando 10  $\mu$ L da RnKazalSPI (2,38 mg/mL) e da fração 100 da RnTriabin (0,178 mg/mL) não apresentando diferença estatística entre o controle e as amostras testadas. Desta forma, realizou-se o teste com o dobro do volume para cada uma das proteínas, e novamente, o resultado obtido não teve diferença significativa se comparado ao controle. Como obteve-se duas frações da RnTriabin, foi realizado um novo experimento com a fração mais concentrada (6,15 mg/mL), usando 10  $\mu$ L da amostra, porém, o resultado não diferiu do resultado utilizando a RnTriabin menos concentrada. Controle +: Alboserpina.

As proteínas também não foram capazes de inibir o fator Xa da cascata de coagulação (Figura 18).



**Figura 18.** Representação em gráfico da inibição do fator Xa da RnKazalSPI e RnTriabin. Não houve diferença estatística entre o controle e as amostras testadas. Controle +: Alboserpina.

Para confirmar que as proteínas utilizadas eram as de interesse, foi realizada a clivagem da porção N-terminal utilizando EK e a identificação por degradação de Edman, o que levou à confirmação de que os primeiros 15 resíduos de aminoácidos eram das proteínas de interesse (Figura 19), possibilitando identificar tanto a cauda N-terminal quanto a proteína após a clivagem.

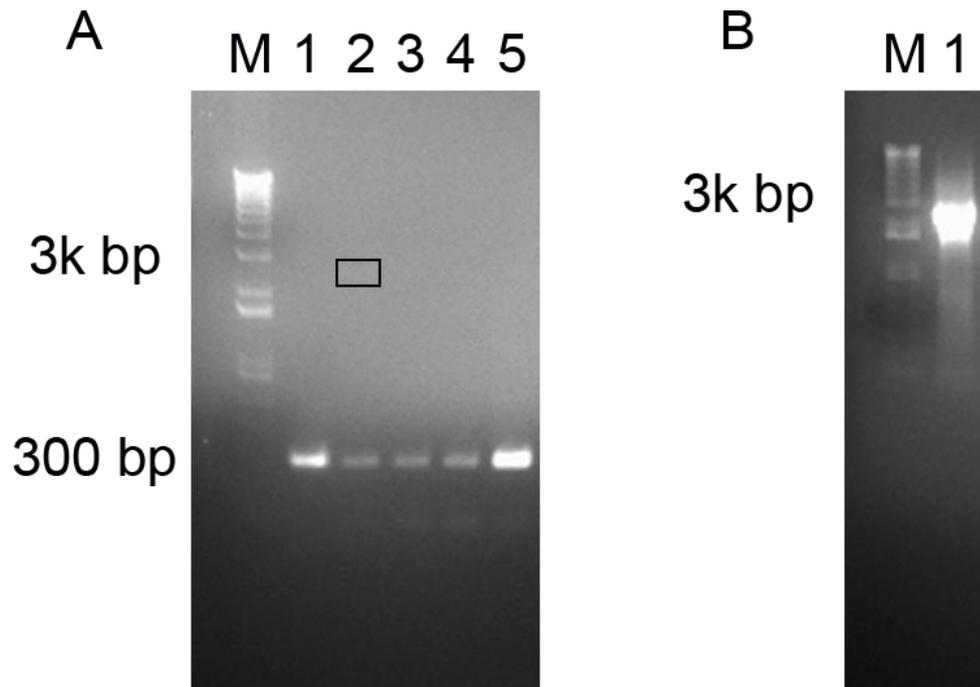


**Figura 19.** Clivagem das proteínas recombinantes e degradação de Edman. **(A)** Gel NuPAGE™ Bis-Tris 4-12% da RnKazalSPI e RnTriabin após a clivagem utilizando enterocinase. 1 – RnKazalSPI fração 100 mM; 2 – RnKazalSPI fração 250 mM; 3 – RnTriabin fração 100 mM; 4 – RnTriabin fração 250 mM. MW – Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen™ (kDa). Aminoácidos identificados das proteínas recombinantes **(B)** RnKazalSPI e **(C)** RnTriabin clivada com enterocinase, sem purificação prévia, indicando a presença da cauda N-terminal e da proteína de interesse. Sequências aminoacídicas das proteínas recombinantes **(D)** RnKazalSPI e **(E)** RnTriabin. Resíduos de aminoácidos em rosa representam aqueles que foram identificados pela degradação de Edman; e em verde, aqueles que foram identificados após a clivagem com enterocinase. A seta preta indica a fração N-terminal após a clivagem com enterocinase.

## 5.4 Proteínas obtidas em sistema eucarioto

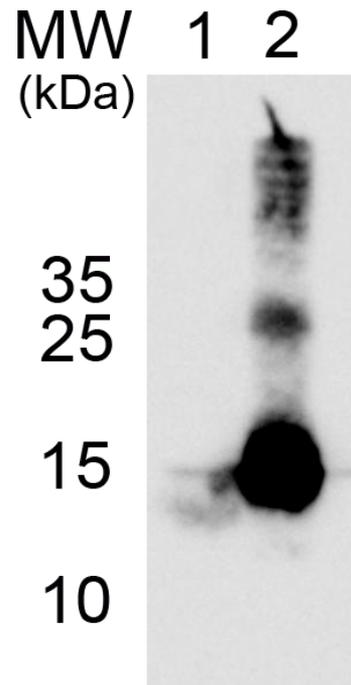
### 5.4.1 RnKazalSPI

Para confirmar o fenótipo das colônias, realizou-se a PCR de colônia de 5 clones transformados, e foi possível observar que apenas o clone 2 (Figura 20A) apresentou produto de PCR que caracteriza como positivo para transposição (~2612 bp), apesar de também apresentar produto negativo para transposição (~300 bp). Desta forma, foi realizada uma midiprep e uma nova PCR, confirmando o que foi visualizado no primeiro gel (Figura 20B).



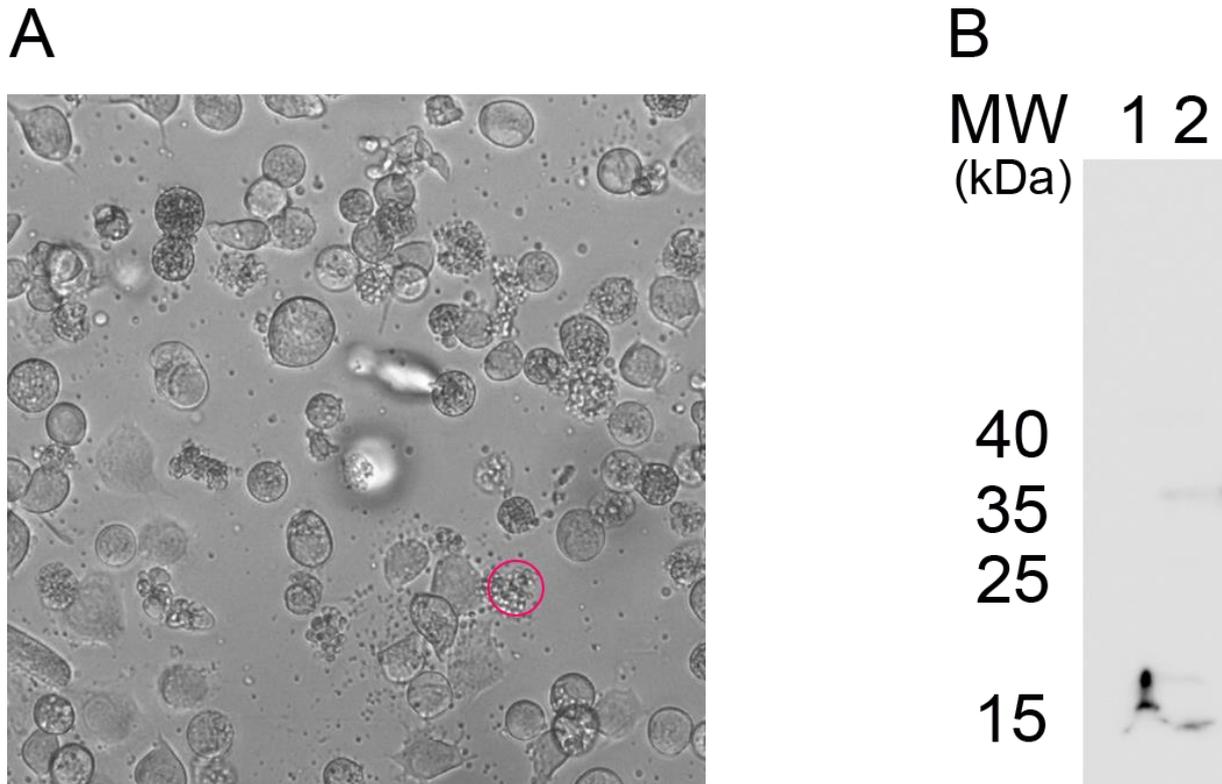
**Figura 20.** Confirmação do fenótipo de colônias transformadas com o plasmídeo RnKazalSPinhibitor\_pFastBac1. **(A)** PCR de confirmação da transposição do plasmídeo RnKazalSPinhibitor\_pFastBac1. 1 – Clone 1; 2 – Clone 2; 3 – Clone 3; 4 – Clone 4; 5 – Clone 5; MW – Marcador de pares de base 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™. O quadrado preto indica transposição positiva para o clone 2. **(B)** PCR da midiprep do clone 2. 1 – Clone 2; M – Marcador de pares de base 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™.

Sendo assim, prosseguiu-se para a transfecção das células Sf9 para geração do vírus recombinante. Foi observada a expressão da RnKazalSPI recombinante 72 hpi no extrato celular, entretanto com peso molecular maior (~15 kDa) que o esperado (~11 kDa) (Figura 21). Nesse período pós-infecção foram observadas células mortas na placa de cultura, por apresentarem poliedros livres no meio. Porém, não foi possível observar a presença da proteína recombinante no meio de cultura.



**Figura 21.** *Western blot* da expressão da RnKazalSPI 72 hpi. RnKazalSPI expressa em células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). 1 – Meio de cultura; 2 – Extrato celular; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen (kDa).

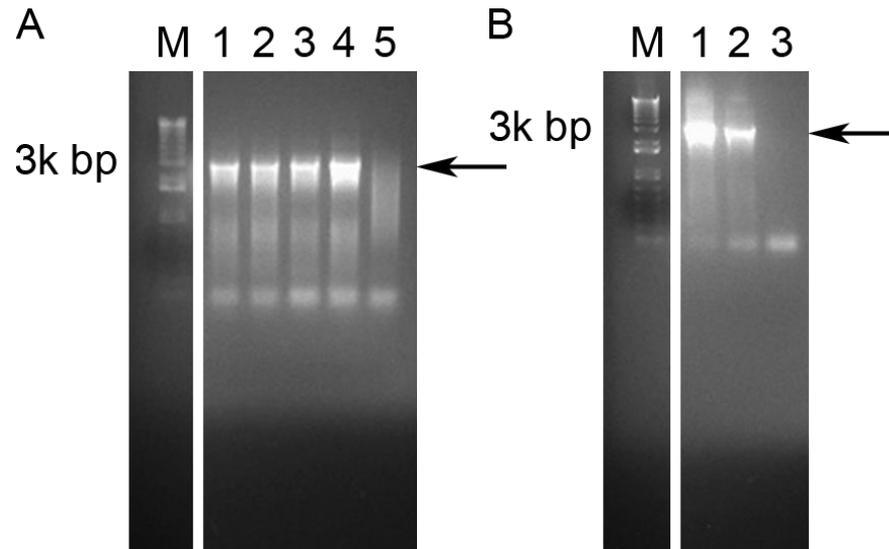
Em uma tentativa de se obter a proteína recombinante no sobrenadante da cultura, células Tn5B foram infectadas com os vírus obtidos a partir da transfecção das células Sf9. Poliedros livres no meio, sinal característico de lise celular, foram observados na cultura de Tn5B 72 hpi (Figura 22A). Após a realização de *western blot*, não foi possível observar nenhuma proteína recombinante reativa ao anticorpo utilizado (Figura 22B).



**Figura 22.** Expressão do RnKazalSPI em sistema eucarioto utilizando células Tn5B. **(A)** Células Tn5B (*Trichoplusia ni*) infectadas com baculovírus recombinante carregando RnKazalSPI 72 hpi. É possível visualizar poliedros livres no meio, indicativo de lise celular. **(B)** *Western blot* da expressão da RnKazalSPI 72 hpi utilizando o anticorpo anti-His na diluição 1:2.000. RnKazalSPI expressa em células Tn5B (*Trichoplusia ni*). 1 – Meio de cultura; 2 – Extrato celular; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen (kDa). O círculo rosa indica poliedros livres no meio.

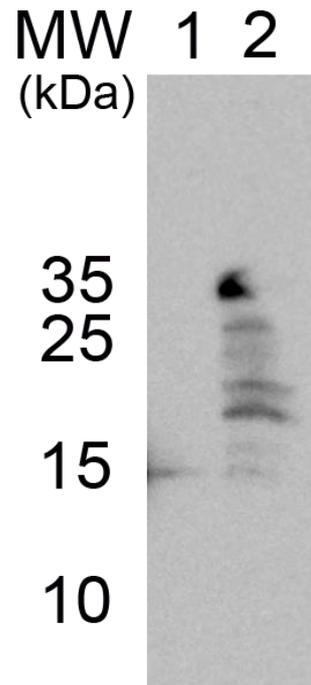
#### 5.4.2 RnTrypsin

Para confirmar o fenótipo das colônias, realizou-se a PCR de colônia de 5 clones transformados e todos os clones mostraram positivos para a transposição (Figura 23A). Assim, escolheu-se o clone 4 para realizar a midiprep do bacmídeo recombinante (Figura 23B).



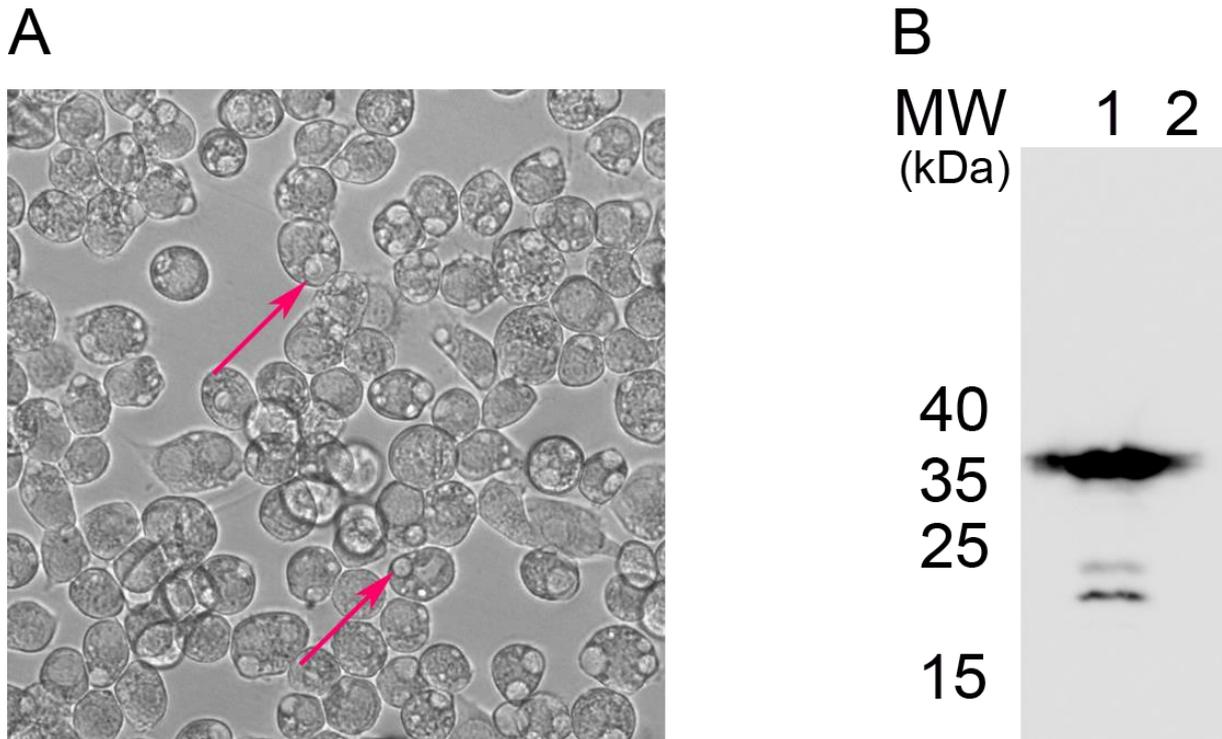
**Figura 23.** Confirmação do fenótipo das colônias selecionada transformadas com o plasmídeo RnTrypsin\_pFastBac1. **(A)** PCR de colônia dos clones selecionados. 1 – Clone 1; 2 – Clone 2; 3 – Clone 3; 4 – Clone 4; 5 – Clone 5; MW – Marcador de pares de base 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™. **(B)** PCR da midiprep do clone 4. 1 – Primeira eluição da midiprep; 2 – Segunda eluição da midiprep; M – Marcador de pares de base 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™.

Desta forma, prosseguiu-se com para a transfecção das células Sf9 para geração do vírus recombinante. Às 48 hpi, observou-se que algumas células apresentavam vacúolos, sinais não característicos de uma infecção por baculovírus. No entanto, às 72 hpi, esses sinais não estavam mais presentes. Para confirmar que havia produção do vírus recombinante e, conseqüentemente, da proteína recombinante, foi realizado *western blot*, o que confirmou sua expressão (~30 kDa). Porém, não foi possível observar a presença da proteína recombinante no meio de cultura, apenas no extrato celular (Figura 24).



**Figura 24.** *Western blot* da expressão da RnTrypsin 72 hpi. RnTrypsin expressa em células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). 1 – Meio de cultura; 2 – Extrato celular; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen (kDa).

Confirmada a expressão, as células Tn5B foram infectadas, e assim como as células Sf9, elas também apresentaram vacúolos 48 hpi (Figura 25A), o que não foi visualizado 72 hpi. Assim como nas células Sf9, a expressão da proteína foi confirmada apenas no extrato celular (Figura 25B).



**Figura 25.** Expressão da RnTrypsin em sistema eucarioto utilizando células Tn5B. **(A)** Células Tn5B (*Trichoplusia ni*) infectadas com baculovírus recombinante carregando RnTrypsin 48 hpi. É possível observar vacúolos, sinais não característicos da infecção causada por baculovírus. **(B)** *Western blot* da expressão da RnTrypsin 72 hpi. RnTrypsin expressa em células Tn5B (*Trichoplusia ni*). 1 – Meio de cultura; 2 – Extrato celular; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen (kDa). As setas rosas indicam os vacúolos.

## 6 DISCUSSÃO

Os sialomas, estudos transcritômicos e proteômicos das glândulas salivares, de triatomíneos têm permitido a identificação de famílias de proteínas com atividades anti-hemostáticas, anti-inflamatórias, imunomoduladoras, entre outras, que desempenham papel importante na hematofagia (SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; PRAÇA *et al.*, 2020; SANTIAGO; DE ARAÚJO; MOTTA; PRAÇA *et al.*, 2017), influenciam a competência desses vetores para transmissão do *T. cruzi* aos seus hospedeiros vertebrados (MENDES; CARVALHO-COSTA; DA SILVA; ANHÊ *et al.*, 2016), e apresentam potencial biotecnológico. Entretanto, a presença de mRNAs que codificam para famílias de proteínas salivares não é garantia de que essas proteínas sejam realmente expressas (SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; PRAÇA *et al.*, 2020; SANTIAGO; DE ARAÚJO; MOTTA; PRAÇA *et al.*, 2017). E mesmo quando identificadas nas análises proteômicas, é necessária a obtenção de evidências experimentais para suas atividades.

Neste trabalho, as proteínas salivares RnKazalSPI, RnOBP, RnTriabin e RnTrypsin codificadas por sequências nucleotídicas obtidas do sialotranscritoma de *R. neglectus* (SANTIAGO; ASSUMPÇÃO; DE ARAÚJO; BASTOS *et al.*, 2016) foram produzidas em sistemas procarioto (RnKazalSPI, RnOBP e RnTriabin) e eucarioto (RnKazalSPI e RnTrypsin), e avaliadas quanto à sua capacidade para inibir a cascata de coagulação sanguínea. O sistema de coagulação sanguínea, em mamíferos, consiste em uma cascata enzimática cujos principais fatores são geralmente serino proteases. Quatro grupos de inibidores de proteases têm sido descritos na saliva de artrópodes hematófagos: inibidores do tipo Kunitz, serpinas, inibidor com domínio rico em cisteína semelhante a inibidor de tripsina, e inibidores do tipo Kazal. A maioria tem sido caracterizada como anticoagulantes que inibem várias proteases na cascata de coagulação (CHMELAR; CALVO; PEDRA; FRANCISCHETTI *et al.*, 2012; CHMELAR; KOTÁL; LANGHANSOVÁ; KOTSYFAKIS, 2017; CORRAL-RODRÍGUEZ; MACEDO-RIBEIRO; BARBOSA PEREIRA; FUENTES-PRIOR, 2009).

Aqui, o RnKazalSPI foi expresso na fração solúvel em sistema procarioto, porém com o dobro do peso molecular esperado, podendo indicar dimerização. Mesmo quando expresso em células eucariotas, o inibidor apresentou peso molecular maior que o esperado. Quando se realiza a comparação com inibidores de serino protease do tipo Kazal de outros triatomíneos, é possível notar que a proteína madura

apresenta dois domínios Kazal, mesmo que o cDNA apresente mais domínios (CAMPOS; AMINO; SAMPAIO; AUERSWALD *et al.*, 2002; FRIEDRICH; KRÖGER; BIALOJAN; LEMAIRE *et al.*, 1993; MENDE; LANGE; NOWAK, 2004). No caso do RnKazalSPI, o mRNA possui apenas um domínio Kazal, desta forma, pode ser que a proteína forme dímeros como uma forma de melhorar sua atividade durante a hematofagia, mantendo o sangue fluido, para o sucesso do repasto deste inseto. O RnKazalSPI não apresentou atividade inibitória para as serino proteases testadas neste estudo. Sua falta de atividade pode estar relacionada ao sistema de expressão utilizado, devido ao fato de que a bactéria não possui a maquinaria necessária para realizar as mudanças pós-traducionais em proteínas eucariotas (JIA; JEON, 2016; KHOW; SUNTRARACHUN, 2012). Mesmo que poucas modificações tenham sido preditas na análise *in silico*, estas podem ser essenciais para sua atividade enquanto inibidor. Na predição de modificações pós-traducionais, o inibidor do tipo Kazal não apresentou glicosilações, apenas fosforilações. Além disso, essas mudanças pós-traducionais podem ser necessárias para enovelamento correto da proteína. Na forma expressa pela bactéria, um enovelamento incorreto poderia resultar no sítio de ligação escondido (GILEADI, 2017; YIN; LI; REN; HERRLER, 2007), fazendo com que não ocorra ligação do inibidor com a serino protease à qual possui afinidade. Além disso, outros membros da família de inibidores de serino proteases do tipo Kazal podem apresentar outras propriedades anti-hemostáticas, como é o caso do vasotab, um inibidor de serino protease do tipo Kazal de *Hybomitra bimaculata* com atividade vasodilatadora (TAKÁC; NUNN; MÉSZÁROS; PECHÁNOVÁ *et al.*, 2006).

Numa tentativa de expressar o RnKazalSPI contendo modificações pós-traducionais, um sistema de expressão eucarioto foi utilizado. Entretanto, não foi possível obter a proteína expressa pelas células de inseto, especialmente em células Tn5B. Esse resultado é curioso, tendo em vista que a proteína é de inseto, porém se mostrou tóxica para as células de expressão eucariotas. A explicação para esse achado pode estar na própria função da proteína alvo. As células de expressão de inseto são advindas de lepidópteras, e essas células produzem serino proteases, chamadas de hemolina e profenoloxidase, que são responsáveis pela defesa contra a infecção viral causada pelo baculovírus, tendo como alvo miRNAs produzidos por ele (SINGH; SINGH; BHAVANI; NAGARAJU, 2010; TANG; QIU; LI, 2019). Assim, o RnKazalSPI pode estar inibindo essas serino proteases, e a infecção viral ser intensa para a célula levando à lise da célula mais rapidamente. Mesmo que tenha sido

possível ver presença de proteína em células Sf9, a explicação pode estar na função utilizada de cada uma dessas duas células. Enquanto as células Tn5B são mais usadas para a expressão em larga escala de proteínas recombinantes, as células Sf9 são utilizadas para a replicação viral, mas também pode ser utilizada para expressar proteínas, porém com a escala menor (DAVIS; WICKHAM; MCKENNA; GRANADOS *et al.*, 1993; WILDE; KLAUSBERGER; PALMBERGER; ERNST *et al.*, 2014). Desta forma, por conta de as Tn5B serem utilizadas para esse propósito, uma quantidade maior de RnKazalSPI estava disponível para inibir a hemolina e a profenoloxidase, podendo ter feito com que a infecção fosse mais tóxica nesta linhagem do que para as Sf9, e conseqüentemente ter menos proteína detectável por *western blot*.

Assim como não foi possível avaliar a capacidade inibitória da RnKazalSPI, esse episódio foi observado da mesma forma com a RnTriabin. Martins (2016) expressou essa proteína na fração solúvel usando temperatura de indução de 15°C, porém o rendimento foi baixo nesta fração. Por esse motivo, a RnTriabin utilizada foi obtida a partir de corpos de inclusão, e dois eventos característicos são observados aqui podendo estar relacionado a isto. O primeiro é o sistema de expressão utilizado podendo ser incompatível para que a proteína esteja ativa, e o segundo é o local em que ela foi expressa, em corpos de inclusão, necessitando que se realize o enovelamento *in vitro* da proteína. Ao realizar este passo, não está garantido que a proteína será enovelada na forma que ela é encontrada em sua forma nativa, ela será enovelada, porém, de uma forma que fique estável no tampão utilizado (JIA; JEON, 2016; KHOW; SUNTRARACHUN, 2012), e assim, o barril- $\beta$ , característico das triabinas e essencial para se ligar à trombina (FLOWER; NORTH; SANSOM, 2000; HERNÁNDEZ-VARGAS; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; CORZO, 2016), pode não ter sido formado. Desta maneira, esses dois eventos podem estar contribuindo para que a proteína não tenha apresentado atividade inibitória para as serino proteases avaliadas neste estudo.

Outras proteínas estudadas nesse trabalho foram uma OBP, que apesar de apresentar glicosilações em dois resíduos de asparagina, por ser uma proteína de baixo peso molecular calculado (14,9 kDa), sob as condições adequadas, foi expressa em ambas as frações bacterianas, evitando o passo de reenovelamento da proteína. Optou-se por clonar a tripsina em vetor de expressão eucarioto, por se tratar de uma proteína maior em comparação com as anteriores e possuir também glicosilações preditas em dois resíduos de asparagina. Apesar dos softwares utilizados para

predizer N- ou O-glicosilações serem utilizados especificamente para proteínas humanas (GUPTA; JUNG; BRUNAK, 2004) ou de mamíferos (STEENTOFT; VAKHRUSHEV; JOSHI; KONG *et al.*, 2013), respectivamente, optou-se o uso destes devido ao fato de não possuir um software geral para eucariotos ou específico para insetos. Além disso, os alvos dos programas e as sequências avaliadas no trabalho são de grupos diferentes de seres vivos, porém pertencentes ao mesmo reino, Animalia, sendo considerados próximos na escala evolutiva, principalmente se comparando-os com plantas ou fungos, por exemplo.

Apesar de não ter sido possível purificar a RnOBP e prosseguir com a caracterização funcional desta proteína até o momento, já foram caracterizadas proteínas de mosquitos similares à OBP de insetos, as quais pertencem à família chamada *D7-related* (*D7r*) (VALENZUELA; CHARLAB; GONZALEZ; DE MIRANDA-SANTOS *et al.*, 2002). Essas proteínas contêm dois domínios OBP, que são notavelmente diferentes na sequência aminoacídica, e são conectados por um pequeno segmento contendo alguns poucos aminoácidos (PELOSI; IOVINELLA; ZHU; WANG *et al.*, 2018). Estudos mostraram que esses dois domínios atuam independentemente, o primeiro se liga a cisteinil-leucotrienos, enquanto que o segundo exibia uma forte afinidade com aminas biogênicas, como norepinefrina e serotonina. Ambas as classes desses componentes são liberados durante a picada do vetor hematófago, causando ou podendo causar eritema, inchaço, dor e coceira, e desta forma, é importante haver na saliva desses insetos, moléculas que reduzam estes sintomas, o que causaria a interrupção do repasto (PELOSI; IOVINELLA; ZHU; WANG *et al.*, 2018). As proteínas *D7* reduzem a inflamação através da ligação das aminas biogênicas e cisteinil-leucotrienos (CALVO; MANS; ANDERSEN; RIBEIRO, 2006; CALVO; MANS; RIBEIRO; ANDERSEN, 2009; MANS; CALVO; RIBEIRO; ANDERSEN, 2007). Uma proteína *D7-related* de *Anopheles stephensi* foi identificada como um inibidor da coagulação sanguínea, afetando a ativação do plasma (ISAWA; YUDA; ORITO; CHINZEI, 2002). Proteínas *D7-related* foram sugeridas a serem usadas como marcadores epidemiológicos de exposição a mosquitos (DOUCOURE; CORNELIE; PATRAMOOL; MOUCHET *et al.*, 2013; MARIE; HOLZMULLER; TCHIOFFO; ROSSIGNOL *et al.*, 2014; OKTARIANTI; SENJARINI; HAYANO; FATCHIYAH *et al.*, 2015) e flebotomíneos (MARTÍN-MARTÍN; MOLINA; JIMÉNEZ, 2013), por serem imunogênicas. Uma outra proteína, de família desconhecida, de triatomíneo que também é imunogênica e foi sugerida ser utilizada como marcador de

exposição é a TiSP14.6 (SCHWARZ; MEDRANO-MERCADO; BILLINGSLEY; SCHAUB *et al.*, 2010). Outro papel que a OBP de insetos pode ter é na nutrição, onde ela se liga a ácidos graxos e outros nutrientes (PELOSI; IOVINELLA; ZHU; WANG *et al.*, 2018), corroborando com a sugestão de Leal (2006) que algumas OBP são “encapsulinas”, de forma que as OBPs se ligam a esses nutrientes, e no intestino anterior, devido ao pH ser mais baixo, essas proteínas perdem afinidade com os nutrientes, liberando-os no lúmen intestinal (ISHIDA; ISHIBASHI; LEAL, 2013). Sendo assim, as OBPs salivares podem vir a servir como marcadores de exposição a triatomíneos, mas são necessários mais estudos para chegar a essa conclusão.

Por fim, a RnTrypsin foi expressa em células de inseto, porém foi observado a presença de vacúolos nas células, um sinal incomum de infecção por baculovírus, apesar de já ter sido relatado na literatura algumas vezes (BOUAMR; GARNIER; RAYNE; VERNA *et al.*, 2000). A hipótese é que podem estar sendo expressas altas quantidades de partículas virais e assim elas são estocadas em vacúolos como um mecanismo de defesa da célula (BOUAMR; GARNIER; RAYNE; VERNA *et al.*, 2000).

## 7 CONCLUSÃO

As proteínas recombinantes foram expressas em ambos os sistemas de expressão utilizados, de forma que foi possível obter proteínas tanto na fração solúvel ou por corpos de inclusão, utilizando o sistema de expressão procarioto. E utilizando o sistema eucarioto, apenas a RnTrypsin foi detectada por *western blot* ao fim da expressão. Apesar de ser uma proteína de inseto, a RnKazalSPI se mostrou tóxica para expressão em sistema eucarioto. As proteínas obtidas na expressão em sistema procarioto, RnKazalSPI e RnTriabin, não apresentaram atividade anticoagulante nos ensaios realizados, no entanto, mais testes são necessários para completa caracterização destas proteínas.

## 8 PERSPECTIVAS

1. Realizar ensaio de inibição de outras serino proteases, como tripsina e elastase, utilizando RnKazaISPI;
2. Purificar a RnTrypsin e realizar sua caracterização;
3. Purificar a RnOBP obtida na fração insolúvel;
4. Realizar ensaio para avaliar a inibição da ativação plaquetária;
5. Realizar a identificação completa das proteínas recombinantes por espectrometria de massas
6. Produzir anticorpos contra as proteínas recombinantes obtidas.

## 9 MINI-CURRÍCULO

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Católica de Brasília (2014) e graduação em Farmácia pela Universidade de Brasília (UnB, 2017). Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da UnB (PPGPM, conceito CAPES 6), onde foi bolsista CAPES e CNPq. Ainda no PPGPM, foi contemplado com uma bolsa Capacitação de 3 meses no Programa CAPES-PrInt/UnB, que foi realizada no *National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), National Institutes of Health (NIH)*, Bethesda, Maryland, EUA, sob a supervisão do Dr. Eric Calvo, chefe da Unidade de Entomologia Molecular. A equipe do Dr. Calvo tem desenvolvido pesquisas sobre o papel da saliva de artrópodes vetores de doenças na transmissão de patógenos, as moléculas salivares como alvos para vacinação, os mecanismos de ação de moléculas salivares anti-hemostáticas, a expressão de moléculas salivares recombinantes, o desenvolvimento de ferramentas para anotação transcritômica, entre outras áreas de pesquisa, que foram ao encontro das atividades propostas durante o mestrado.

### **Publicação (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2196-1153>)**

VIEIRA, C. B.; PRAÇA, Y. R.; BENTES, K. L. S.; SANTIAGO, P. B.; SILVA, S. M. M.; SILVA, G. S.; MOTTA, F. N.; BASTOS, I. M. D.; de SANTANA, J. M.; de ARAÚJO, C. N. Triatomines: Trypanosomatids, Bacteria, and Viruses Potential Vectors? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 8, p. 405, 2018. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00405.

### **Manuscrito submetido para publicação**

SANTIAGO, P. B.; CHARNEAU, S. O.; MANDACARU, S.; BENTES, K. L. S.; BASTOS, I. M. D.; SOUSA, M. V.; RICART, C. A. O.; de ARAÚJO, C. N.; de SANTANA, J. M. Proteomic Mapping of Multifunctional Complexes Within Triatomine Saliva. Submetido para *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.

### Resumos publicados em anais de congressos

SILVA, S. M. M.; MARTINS, D. B. S.; BENTES, K. L. S.; PRAÇA, Y. R.; SANTIAGO, P. B.; de SANTANA, J. M.; MOTTA, F. N.; BASTOS, I. M. D.; de ARAÚJO, C. N. Recombinant *Rhodnius neglectus* salivary triabin produced by bacterial expression system is immunogenic in mice. In: I Congresso Internacional de Farmacologia Molecular Aplicada, 2019, Brasília. Anais do I Congresso Internacional de Farmacologia Molecular Aplicada, 2019.

PRAÇA, Y. R.; SILVA, S. M. M.; BENTES, K. L. S.; CHARNEAU, S. O.; MANDACARU, S.; SANTIAGO, P. B.; BASTOS, I. M. D.; de SANTANA, J. M.; de ARAÚJO, C. N. The *Triatoma sordida* salivary proteome: a cocktail of pharmacologic reagents. In: I Congresso Internacional de Farmacologia Molecular Aplicada, 2019, Brasília. Anais do I Congresso Internacional de Farmacologia Molecular Aplicada, 2019.

BENTES, K. L. S.; de ARAÚJO, C. N.; de SANTANA, J. M.; BASTOS, I. M. D. Expression of *Rhodnius neglectus* salivary proteins in prokaryote and eukaryote systems. In: IV Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, 2019, Brasília. IV Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, 2019.

BENTES, K. L. S.; de ARAUJO, C. N.; de SANTANA, J. M.; BASTOS, I. M. D. Identification of salivary miRNAs of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) after the blood meal and analysis of its biological functions. In: III Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, 2018, Brasília. III Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, 2018.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMAGRO ARMENTEROS, J. J.; TSIRIGOS, K. D.; SØNDERBY, C. K.; PETERSEN, T. N. *et al.* SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nat Biotechnol**, 37, n. 4, p. 420-423, 04 2019.

ALMEIDA, C. E.; FOLLY-RAMOS, E.; PETERSON, A. T.; LIMA-NEIVA, V. *et al.* Could the bug *Triatoma sherlocki* be vectoring Chagas disease in small mining communities in Bahia, Brazil? **Med Vet Entomol**, 23, n. 4, p. 410-417, Dec 2009.

AMINO, R.; TANAKA, A. S.; SCHENKMAN, S. Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Biochem Mol Biol**, 31, n. 4-5, p. 465-472, Mar 2001.

ANDERSEN, J. F.; CHAMPAGNE, D. E.; WEICHSEL, A.; RIBEIRO, J. M. *et al.* Nitric oxide binding and crystallization of recombinant nitrophorin I, a nitric oxide transport protein from the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Biochemistry**, 36, n. 15, p. 4423-4428, Apr 1997.

ANDERSEN, J. F.; FRANCISCHETTI, I. M.; VALENZUELA, J. G.; SCHUCK, P. *et al.* Inhibition of hemostasis by a high affinity biogenic amine-binding protein from the saliva of a blood-feeding insect. **J Biol Chem**, 278, n. 7, p. 4611-4617, Feb 2003.

ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Platelet adhesion: a game of catch and release. **J Clin Invest**, 118, n. 9, p. 3009-3011, Sep 2008.

ARAUJO, R. N.; CAMPOS, I. T.; TANAKA, A. S.; SANTOS, A. *et al.* Brasiliensin: A novel intestinal thrombin inhibitor from *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) with an important role in blood intake. **Int J Parasitol**, 37, n. 12, p. 1351-1358, Oct 2007.

ASSUMPÇÃO, T. C.; CHARNEAU, S.; SANTIAGO, P. B.; FRANCISCHETTI, I. M. *et al.* Insight into the salivary transcriptome and proteome of *Dipetalogaster maxima*. **J Proteome Res**, 10, n. 2, p. 669-679, Feb 2011.

ASSUMPÇÃO, T. C.; FRANCISCHETTI, I. M.; ANDERSEN, J. F.; SCHWARZ, A. *et al.* An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. **Insect biochemistry and molecular biology**, 38, n. 2, p. 213-232, 2008.

ASSUMPÇÃO, T. C.; MA, D.; SCHWARZ, A.; REITER, K. *et al.* Salivary antigen-5/CAP family members are Cu<sup>2+</sup>-dependent antioxidant enzymes that scavenge O<sub>2</sub><sup>-</sup> and

inhibit collagen-induced platelet aggregation and neutrophil oxidative burst. **J Biol Chem**, 288, n. 20, p. 14341-14361, May 2013.

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

BLOM, N.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. **J Mol Biol**, 294, n. 5, p. 1351-1362, Dec 1999.

BOND, J. S.; BUTLER, P. E. Intracellular proteases. **Annu Rev Biochem**, 56, p. 333-364, 1987.

BOUAMR, F.; GARNIER, L.; RAYNE, F.; VERNA, A. *et al.* Differential budding efficiencies of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) Gag and Gag-Pro polyproteins from insect and mammalian cells. **Virology**, 278, n. 2, p. 597-609, Dec 2000.

BRASIL. ANVISA. Resolução da diretoria colegiada – **RDC nº 153**, de 14 de junho de 2004. ANVISA. 2004. Disponível em: [http://www.sbpc.org.br/upload/noticias\\_gerais/320100416113458.pdf](http://www.sbpc.org.br/upload/noticias_gerais/320100416113458.pdf). Acesso em: 20 ago 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Ministério da Saúde. – 8. ed. rev. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010. p. 143-149.

BRITO, N. F.; MOREIRA, M. F.; MELO, A. C. A. A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception. **Journal of Insect Physiology**, 95, p. 51-65, 2016.

BUSSACOS, A. C.; NAKAYASU, E. S.; HECHT, M. M.; ASSUMPÇÃO, T. C. *et al.* Redundancy of proteins in the salivary glands of *Panstrongylus megistus* secures prolonged procurement for blood meals. **J Proteomics**, 74, n. 9, p. 1693-1700, Aug 2011.

BUSSACOS, A. C.; NAKAYASU, E. S.; HECHT, M. M.; PARENTE, J. A. *et al.* Diversity of anti-haemostatic proteins in the salivary glands of *Rhodnius* species transmitters of Chagas disease in the greater Amazon. **J Proteomics**, 74, n. 9, p. 1664-1672, Aug 2011.

CALVO, E.; MANS, B. J.; ANDERSEN, J. F.; RIBEIRO, J. M. Function and evolution of a mosquito salivary protein family. **J Biol Chem**, 281, n. 4, p. 1935-1942, Jan 2006.

CALVO, E.; MANS, B. J.; RIBEIRO, J. M.; ANDERSEN, J. F. Multifunctionality and mechanism of ligand binding in a mosquito antiinflammatory protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, n. 10, p. 3728-3733, Mar 2009.

CAMPOS, I. T.; AMINO, R.; SAMPAIO, C. A.; AUERSWALD, E. A. *et al.* Infestin, a thrombin inhibitor presents in *Triatoma infestans* midgut, a Chagas' disease vector: gene cloning, expression and characterization of the inhibitor. **Insect Biochem Mol Biol**, 32, n. 9, p. 991-997, Sep 2002.

CARLIER, Y.; TORRICO, F. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36, p. 767-771, 2003.

CAVASSIN, F. B.; KUEHN, C. C.; KOPP, R. L.; THOMAZ-SOCCOL, V. *et al.* Genetic variability and geographical diversity of the main Chagas' disease vector *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Triatominae) in Brazil based on ribosomal DNA intergenic sequences. **J Med Entomol**, 51, n. 3, p. 616-628, May 2014.

CHAMPAGNE, D. The role of salivary vasodilators in bloodfeeding and parasite transmission. **Parasitology Today**, 10, n. 11, p. 430-433, 1994.

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

CHAMPAGNE, D. E. Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods. **Pathophysiol Haemost Thromb**, 34, n. 4-5, p. 221-227, 2005.

CHARNEAU, S.; JUNQUEIRA, M.; COSTA, C. M.; PIRES, D. L. *et al.* The saliva proteome of the blood-feeding insect *Triatoma infestans* is rich in platelet-aggregation inhibitors. 268, n. 2-3, p. 265-276, 2007.

CHMELAR, J.; CALVO, E.; PEDRA, J. H.; FRANCISCHETTI, I. M. *et al.* Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. **J Proteomics**, 75, n. 13, p. 3842-3854, Jul 2012.

CHMELAR, J.; KOTÁL, J.; LANGHANSOVÁ, H.; KOTSYFAKIS, M. Protease Inhibitors in Tick Saliva: The Role of Serpins and Cystatins in Tick-host-Pathogen Interaction. **Front Cell Infect Microbiol**, 7, p. 216, 2017.

CORRAL-RODRÍGUEZ, M. A.; MACEDO-RIBEIRO, S.; BARBOSA PEREIRA, P. J.; FUENTES-PRIOR, P. Tick-derived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors. **Insect Biochem Mol Biol**, 39, n. 9, p. 579-595, Sep 2009.

COSTA, C. M.; SOUSA, M. V.; RICART, C. A.; SANTANA, J. M. *et al.* 2-DE-based proteomic investigation of the saliva of the Amazonian triatomine vectors of Chagas disease: *Rhodnius brethesi* and *Rhodnius robustus*. **J Proteomics**, 74, n. 9, p. 1652-1663, Aug 2011.

CRAWLEY, J. T.; LANE, D. A. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 28, n. 2, p. 233-242, Feb 2008.

DA ROSA, J. A.; MENDONÇA, V. J.; GARDIM, S.; DE CARVALHO, D. B. *et al.* Study of the external female genitalia of 14 *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) using scanning electron microscopy. **Parasit Vectors**, 7, p. 17, Jan 2014.

DAVIS, T. R.; WICKHAM, T. J.; MCKENNA, K. A.; GRANADOS, R. R. *et al.* Comparative recombinant protein production of eight insect cell lines. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, 29A, n. 5, p. 388-390, May 1993.

DE ARAÚJO, C. N.; BUSSACOS, A. C.; SOUSA, A. O.; HECHT, M. M. *et al.* Interactome: Smart hematophagous triatomine salivary gland molecules counteract human hemostasis during meal acquisition. **Journal of proteomics**, 75, n. 13, p. 3829-3841, 2012.

DONPUDSA, S.; TASSANAKAJON, A.; RIMPHANITCHAYAKIT, V. Domain inhibitory and bacteriostatic activities of the five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Dev Comp Immunol**, 33, n. 4, p. 481-488, Apr 2009.

DOUCOURE, S.; CORNELIE, S.; PATRAMOOL, S.; MOUCHET, F. *et al.* First screening of *Aedes albopictus* immunogenic salivary proteins. **Insect Mol Biol**, 22, n. 4, p. 411-423, Aug 2013.

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

FAUDRY, E.; LOZZI, S. P.; SANTANA, J. M.; D'SOUZA-AULT, M. *et al.* *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. **Journal of Biological Chemistry**, 279, n. 19, p. 19607-19613, 2004.

FLOWER, D. R.; NORTH, A. C.; SANSOM, C. E. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. **Biochim Biophys Acta**, 1482, n. 1-2, p. 9-24, Oct 2000.

FRANCISCHETTI, I. M.; RIBEIRO, J. M.; CHAMPAGNE, D.; ANDERSEN, J. Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. **J Biol Chem**, 275, n. 17, p. 12639-12650, Apr 2000.

FRIEDRICH, T.; KRÖGER, B.; BIALOJAN, S.; LEMAIRE, H. G. *et al.* A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. **J Biol Chem**, 268, n. 22, p. 16216-16222, Aug 1993.

FUENTES-PRIOR, P.; NOESKE-JUNGBLUT, C.; DONNER, P.; SCHLEUNING, W. D. *et al.* Structure of the thrombin complex with triabin, a lipocalin-like exosite-binding inhibitor derived from a triatomine bug. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94, n. 22, p. 11845-11850, Oct 1997.

GAILANI, D.; RENNÉ, T. Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 27, n. 12, p. 2507-2513, Dec 2007.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; WILKINS, M. R. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *In: The proteomics protocols handbook*: Springer, 2005. p. 571-607.

GILEADI, O. Recombinant Protein Expression in *E. coli* : A Historical Perspective. **Methods Mol Biol**, 1586, p. 3-10, 2017.

GUARNERI, A. A.; PEREIRA, M. H.; DIOTAIUTI, L. Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). **Journal of medical entomology**, 37, n. 3, p. 373-379, 2000.

GUPTA, R.; JUNG, E.; BRUNAK, S. **Prediction of N-glycosylation sites in human proteins.** p. 203-206, 2004. Disponível em: <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>.

GURGEL-GONÇALVES, R.; CURA, C.; SCHIJMAN, A. G.; CUBA, C. A. C. Infestation of *Mauritia flexuosa* palms by triatomines (Hemiptera: Reduviidae), vectors of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian savanna. **Acta tropica**, 121, n. 2, p. 105-111, 2012.

HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 475-486.

HELLMANN, K.; HAWKINS, R. I. Prolixins-S and prolixin-G; two anticoagulants from *Rhodnius prolixus* Stål. **Nature**, 207, n. 994, p. 265-267, Jul 1965.

HERNÁNDEZ-VARGAS, M. J.; GIL, J.; LOZANO, L.; PEDRAZA-ESCALONA, M. *et al.* Proteomic and transcriptomic analysis of saliva components from the hematophagous reduviid *Triatoma pallidipennis*. **J Proteomics**, 162, p. 30-39, 06 2017.

HERNÁNDEZ-VARGAS, M. J.; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ, C. E.; CORZO, G. An Insight into the Triabin Protein Family of American Hematophagous Reduviids: Functional, Structural and Phylogenetic Analysis. **Toxins (Basel)**, 8, n. 2, p. 44, Feb 2016.

ISAWA, H.; YUDA, M.; ORITO, Y.; CHINZEI, Y. A mosquito salivary protein inhibits activation of the plasma contact system by binding to factor XII and high molecular weight kininogen. **J Biol Chem**, 277, n. 31, p. 27651-27658, Aug 2002.

ISHIDA, Y.; ISHIBASHI, J.; LEAL, W. S. Fatty acid solubilizer from the oral disk of the blowfly. **PLoS One**, 8, n. 1, p. e51779, 2013.

JIA, B.; JEON, C. O. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. **Open Biol**, 6, n. 8, 08 2016.

JURBERG, J.; RODRIGUES, J. M.; MOREIRA, F. F.; DALE, C. *et al.* Atlas Iconográfico dos triatomíneos do Brasil (Vetores da doença de Chagas). Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz 2014. . p. 22.

KATO, H.; JOCHIM, R. C.; GOMEZ, E. A.; TSUNEKAWA, S. *et al.* Salivary gland transcripts of the kissing bug, *Panstrongylus chinai*, a vector of Chagas disease. **Acta Trop**, 174, p. 122-129, Oct 2017.

KAZAL, L. A.; SPICER, D. S.; BRAHINSKY, R. A. Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from pancreas. **J Am Chem Soc**, 70, n. 9, p. 3034-3040, Sep 1948.

KHOW, O.; SUNTRARACHUN, S. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. **Asian Pac J Trop Biomed**, 2, n. 2, p. 159-162, Feb 2012.

KIM, B. Y.; LEE, K. S.; ZOU, F. M.; WAN, H. *et al.* Antimicrobial activity of a honeybee (*Apis cerana*) venom Kazal-type serine protease inhibitor. **Toxicon**, 76, p. 110-117, Dec 2013.

KLEIN, U. Sensillum-lymph proteins from antennal olfactory hairs of the moth *Antheraea polyphemus* (Saturniidae). **Insect Biochemistry**, 17, n. 8, p. 1193-1204, 1987.

KROPF, S. P.; MASSARANI, L. **Carlos Chagas, a ciência para combater doenças tropicais**. Rio de Janeiro: Museu da Vida COC Fiocruz, 2009. 16 p. 978-85-85239-49-7.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, n. 5259, p. 680-685, Aug 1970.

LASKOWSKI, M.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annu Rev Biochem**, 49, p. 593-626, 1980.

LAVOPIERRE, M.; DICKERSON, G.; GORDON, R. Studies on the Methods of Feeding of Blood-sucking Arthropods: I—The Manner in Which Triatomine Bugs Obtain Their Blood-Meal, as Observed in the Tissues of the Living Rodent, with Some Remarks on the Effects of the Bite on Human Volunteers. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, 53, n. 2, p. 235-250, 1959.

LAZZARI, C. R.; PEREIRA, M. H.; LORENZO, M. G. Behavioural biology of Chagas disease vectors. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 108 Suppl 1, p. 34-47, 2013.

LEAL, W. S. Molecular-based chemical prospecting of mosquito attractants and repellents. *In*: DEBBOUN, M.;FRANCES, S. P., *et al* (Ed.). **Insect Repellents: Principles, Methods, and Uses**, 2006. cap. 11, p. 229-243.

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

LI, S.; PICIMBON, J.-F.; JI, S.; KAN, Y. *et al*. Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 372, n. 3, p. 464-468, 2008.

LIMA-CORDÓN, R. A.; MONROY, M. C.; STEVENS, L.; RODAS, A. *et al*. Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **ZooKeys**, 820, 2019.

LOVATO, D. V.; AMINO, R.; GONZÁLEZ, Y.; MIRANDA, A. *et al*. Infestin 1R, an intestinal subtilisin inhibitor from *Triatoma infestans* able to impair mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol**, 129, n. 4, p. 362-367, 2011.

LOVATO, D. V.; NICOLAU DE CAMPOS, I. T.; AMINO, R.; TANAKA, A. S. The full-length cDNA of anticoagulant protein infestin revealed a novel releasable Kazal domain, a neutrophil elastase inhibitor lacking anticoagulant activity. **Biochimie**, 88, n. 6, p. 673-681, Jun 2006.

MALAFAIA, G.; RODRIGUES, A. S. D. L. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 43, n. 5, p. 483-485, 2010.

MANS, B. J.; CALVO, E.; RIBEIRO, J. M.; ANDERSEN, J. F. The crystal structure of D7r4, a salivary biogenic amine-binding protein from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **J Biol Chem**, 282, n. 50, p. 36626-36633, Dec 2007.

MARIE, A.; HOLZMULLER, P.; TCHIOFFO, M. T.; ROSSIGNOL, M. *et al.* *Anopheles gambiae* salivary protein expression modulated by wild *Plasmodium falciparum* infection: highlighting of new antigenic peptides as candidates of *An. gambiae* bites. **Parasit Vectors**, 7, p. 599, Dec 2014.

MARTÍN-MARTÍN, I.; MOLINA, R.; JIMÉNEZ, M. Identifying salivary antigens of *Phlebotomus argentipes* by a 2DE approach. **Acta Trop**, 126, n. 3, p. 229-239, Jun 2013.

MARTINS, D. B. S. **Expressão de antígenos salivares e avaliação da atividade apirásica salivar do triatomíneo *Rhodnius neglectus*, vetor da doença de Chagas.** 2018. 112 f., il. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) — Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

MENDE, K.; LANGE, U.; NOWAK, G. Three recombinant serine proteinase inhibitors expressed from the coding region of the thrombin inhibitor dipetalogastin. **Insect Biochem Mol Biol**, 34, n. 9, p. 971-979, 2004.

MENDES, M. T.; CARVALHO-COSTA, T. M.; DA SILVA, M. V.; ANHÊ, A. C. *et al.* Effect of the saliva from different triatomine species on the biology and immunity of TLR-4 ligand and *Trypanosoma cruzi*-stimulated dendritic cells. **Parasit Vectors**, 9, n. 1, p. 634, 12 2016.

MONTFORT, W. R.; WEICHSEL, A.; ANDERSEN, J. F. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. **Biochim Biophys Acta**, 1482, n. 1-2, p. 110-118, 2000.

MORITA, A.; ISAWA, H.; ORITO, Y.; IWANAGA, S. *et al.* Identification and characterization of a collagen-induced platelet aggregation inhibitor, triplatin, from

salivary glands of the assassin bug, *Triatoma infestans*. **FEBS J**, 273, n. 13, p. 2955-2962, 2006.

MOTWANI, H. V.; DE ROSA, M.; ODELL, L. R.; HALLBERG, A. *et al.* Aspartic protease inhibitors containing tertiary alcohol transition-state mimics. **European journal of medicinal chemistry**, 90, p. 462-490, 2015.

NEVOA, J. C.; MENDES, M. T.; DA SILVA, M. V.; SOARES, S. C. *et al.* An insight into the salivary gland and fat body transcriptome of *Panstrongylus lignarius* (Hemiptera: Heteroptera), the main vector of Chagas disease in Peru. **PLoS Negl Trop Dis**, 12, n. 2, p. e0006243, 2018.

NOESKE-JUNGBLUT, C.; HAENDLER, B.; DONNER, P.; ALAGON, A. *et al.* Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. **J Biol Chem**, 270, n. 48, p. 28629-28634, 1995.

NOESKE-JUNGBLUT, C.; KRÄTZSCHMAR, J.; HAENDLER, B.; ALAGON, A. *et al.* An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. **J Biol Chem**, 269, n. 7, p. 5050-5053, 1994.

OKTARIANTI, R.; SENJARINI, K.; HAYANO, T.; FATCHIYAH, F. *et al.* Proteomic analysis of immunogenic proteins from salivary glands of *Aedes aegypti*. **J Infect Public Health**, 8, n. 6, p. 575-582, 2015 Nov-Dec 2015.

OPAS. **PAHO | Enfermedad de Chagas**. 2019. Disponível em: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743)<=es. Acesso em: 04 mar 2019.

OTÁLORA-LUNA, F.; PÉREZ-SÁNCHEZ, A. J.; SANDOVAL, C.; ALDANA, E. Evolution of hematophagous habit in Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). **Revista chilena de historia natural**, 88, n. 1, p. 4, 2015.

PAIM, R. M. M.; NASCIMENTO, B. W. L.; NASCIMENTO, A. M. D.; PACHECO, D. E. *et al.* Functional aspects of salivary nitric oxide synthase of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) and nitric oxide trafficking at the vector-host interface. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 16036, 2017.

PAPAMOKOS, E.; WEBER, E.; BODE, W.; HUBER, R. *et al.* Crystallographic refinement of Japanese quail ovomucoid, a Kazal-type inhibitor, and model building studies of complexes with serine proteases. **J Mol Biol**, 158, n. 3, p. 515-537, 1982.

PATEL, S. A critical review on serine protease: Key immune manipulator and pathology mediator. **Allergol Immunopathol (Madr)**, 45, n. 6, p. 579-591, 2017 Nov - Dec 2017.

PELOSI, P.; IOVINELLA, I.; ZHU, J.; WANG, G. *et al.* Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects. **Biol Rev Camb Philos Soc**, 93, n. 1, p. 184-200, 02 2018.

PELOSI, P.; MAIDA, R. Odorant-binding proteins in insects. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 111, n. 3, p. 503-514, 1995.

PELOSI, P.; ZHOU, J. J.; BAN, L. P.; CALVELLO, M. Soluble proteins in insect chemical communication. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, 63, n. 14, p. 1658-1676, 2006.

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

RAMOS, L. J.; CASTRO, G. V. D. S.; SOUZA, J. L. D.; OLIVEIRA, J. D. *et al.* First report of *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from the State of Acre, Brazil, and the Brazilian Western Amazon Region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 51, n. 2, p. 212-214, 2018.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol Mol Biol Rev**, 62, n. 3, p. 597-635, Sep 1998.

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

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

RIBEIRO, J. M.; ASSUMPÇÃO, T. C.; PHAM, V. M.; FRANCISCHETTI, I. M. *et al.* An insight into the sialotranscriptome of *Triatoma rubida* (Hemiptera: Heteroptera). **J Med Entomol**, 49, n. 3, p. 563-572, May 2012.

RIBEIRO, J. M.; GENTA, F. A.; SORGINE, M. H.; LOGULLO, R. *et al.* An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. **PLoS Negl Trop Dis**, 8, n. 1, p. e2594, 2014.

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

RIBEIRO, J. M.; WALKER, F. A. High affinity histamine-binding and antihistaminic activity of the salivary nitric oxide-carrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*. **J Exp Med**, 180, n. 6, p. 2251-2257, 1994.

RIBEIRO, J. M. C.; ANDERSEN, J.; SILVA-NETO, M. A. C.; PHAM, V. M. *et al.* Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 34, n. 1, p. 61-79, 2004.

RIBEIRO, J. M. C.; SCHWARZ, A.; FRANCISCHETTI, I. M. B. A Deep Insight Into the Sialotranscriptome of the Chagas Disease Vector, *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Heteroptera). **Journal of Medical Entomology**, 52, n. 3, p. 351-358, 2015.

SANGENIS, L. H. C.; NIELEBOCK, M. A. P.; SANTOS, C. D. S.; SILVA, M. C. C. D. *et al.* Transmissão da doença de Chagas por consumo de carne de caça: revisão sistemática. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 19, p. 803-811, 2016.

SANT'ANNA, M. R.; ARAÚJO, J. G.; PEREIRA, M. H.; PESQUERO, J. L. *et al.* Molecular cloning and sequencing of salivary gland-specific cDNAs of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Mol Biol**, 11, n. 6, p. 585-593, Dec 2002.

SANTIAGO, P. B.; ASSUMPCÃO, T. C.; DE ARAÚJO, C. N.; BASTOS, I. M. D. *et al.* A Deep Insight into the Sialome of *Rhodnius neglectus*, a Vector of Chagas Disease. **PLoS Negl Trop Dis**, 10, n. 4, p. e0004581, 2016.

SANTIAGO, P. B.; DE ARAÚJO, C. N.; CHARNEAU, S.; BASTOS, I. M. D. *et al.* Exploring the molecular complexity of *Triatoma dimidiata* sialome. **Journal of Proteomics**, 174, p. 47-60, 2018.

SANTIAGO, P. B.; DE ARAÚJO, C. N.; CHARNEAU, S.; PRAÇA, Y. R. *et al.* The Pharmacopea within Triatomine Salivary Glands. **Trends Parasitol**, 36, n. 3, p. 250-265, Mar 2020.

SANTIAGO, P. B.; DE ARAÚJO, C. N.; MOTTA, F. N.; PRAÇA, Y. R. *et al.* Proteases of haematophagous arthropod vectors are involved in blood-feeding, yolk formation and immunity - a review. **Parasit Vectors**, 10, n. 1, p. 79, Feb 2017.

SANTOS, A.; RIBEIRO, J. M. C.; LEHANE, M. J.; GONTIJO, N. F. *et al.* The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). **Insect biochemistry and molecular biology**, 37, n. 7, p. 702-712, 2007.

SARKIS, J. J.; GUIMARÃES, J. A.; RIBEIRO, J. M. Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*. Kinetics and purification. **Biochem J**, 233, n. 3, p. 885-891, 1986.

SCHLOTT, B.; WÖHNERT, J.; ICKE, C.; HARTMANN, M. *et al.* Interaction of Kazal-type inhibitor domains with serine proteinases: biochemical and structural studies. **J Mol Biol**, 318, n. 2, p. 533-546, 2002.

SCHMAIER, A. H. The elusive physiologic role of Factor XII. **J Clin Invest**, 118, n. 9, p. 3006-3009, Sep 2008.

SCHMID, F.-X. Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry. *In: eLS*, 2001.

SCHOFIELD, C. Biosystematics of the Triatominae. 1988.

SCHWARZ, A.; MEDRANO-MERCADO, N.; BILLINGSLEY, P. F.; SCHAUB, G. A. *et al.* IgM-antibody responses of chickens to salivary antigens of *Triatoma infestans* as early biomarkers for low-level infestation of triatomines. **Int J Parasitol**, 40, n. 11, p. 1295-1302, Sep 2010.

SCHWARZ, A.; MEDRANO-MERCADO, N.; SCHAUB, G. A.; STRUCHINER, C. J. *et al.* An updated insight into the Sialotranscriptome of *Triatoma infestans*: developmental stage and geographic variations. **PLoS Negl Trop Dis**, 8, n. 12, p. e3372, 2014.

SHANBHAG, S. R.; HEKMAT-SCAFE, D.; KIM, M. S.; PARK, S. K. *et al.* Expression mosaic of odorant-binding proteins in *Drosophila* olfactory organs. **Microsc Res Tech**, 55, n. 5, p. 297-306, 2001.

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

SINGH, J.; SINGH, C. P.; BHAVANI, A.; NAGARAJU, J. Discovering microRNAs from *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus. **Virology**, 407, n. 1, p. 120-128, Nov 2010.

SMARTT, C. T.; ERICKSON, J. S. Expression of a novel member of the odorant-binding protein gene family in *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol**, 46, n. 6, p. 1376-1381, 2009.

SOARES, R.; SANT'ANNA, M.; GONTIJO, N.; ROMANHA, A. *et al.* Identification of morphologically similar *Rhodnius* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by electrophoresis of salivary heme proteins. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 62, n. 1, p. 157-161, 2000.

SOARES, T. S.; BUARQUE, D. S.; QUEIROZ, B. R.; GOMES, C. M. *et al.* A Kazal-type inhibitor is modulated by *Trypanosoma cruzi* to control microbiota inside the anterior midgut of *Rhodnius prolixus*. **Biochimie**, 112, p. 41-48, 2015.

STARK, K.; JAMES, A. Anticoagulants in vector arthropods. **Parasitology Today**, 12, n. 11, p. 430-437, 1996.

STEENTOFT, C.; VAKHRUSHEV, S. Y.; JOSHI, H. J.; KONG, Y. *et al.* Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. **EMBO J**, 32, n. 10, p. 1478-1488, May 2013.

STEINBRECHT, R. A.; LAUE, M.; ZIEGELBERGER, G. Immunolocalization of pheromone-binding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moths *Antheraea* and *Bombyx*. **Cell and Tissue Research**, 282, n. 2, p. 203-217, 1995.

STEINBRECHT, R. A.; OZAKI, M.; ZIEGELBERGER, G. Immunocytochemical localization of pheromone-binding protein in moth antennae. **Cell and Tissue Research**, 270, n. 2, p. 287-302, 1992.

SUN, Y. L.; HUANG, L. Q.; PELOSI, P.; WANG, C. Z. Expression in antennae and reproductive organs suggests a dual role of an odorant-binding protein in two sibling *Helicoverpa* species. **PLoS One**, 7, n. 1, p. e30040, 2012.

TAKÁC, P.; NUNN, M. A.; MÉSZÁROS, J.; PECHÁNOVÁ, O. *et al.* Vasotab, a vasoactive peptide from horse fly *Hybomitra bimaculata* (Diptera, Tabanidae) salivary glands. **J Exp Biol**, 209, n. Pt 2, p. 343-352, Jan 2006.

TANG, Q.; QIU, L.; LI, G. Baculovirus-Encoded MicroRNAs: A Brief Overview and Future Prospects. **Curr Microbiol**, 76, n. 6, p. 738-743, Jun 2019.

TEGONI, M.; CAMPANACCI, V.; CABBILLAU, C. Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. **Trends Biochem Sci**, 29, n. 5, p. 257-264, 2004.

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

TREMACOLDI, C. **Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2009. 1983-0513. 44 p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/662441/1/Doc353.pdf>.

VALENZUELA, J. G.; CHARLAB, R.; GONZALEZ, E. C.; DE MIRANDA-SANTOS, I. K. *et al.* The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera. **Insect Mol Biol**, 11, n. 2, p. 149-155, Apr 2002.

VAN DE LOCHT, A.; LAMBA, D.; BAUER, M.; HUBER, R. *et al.* Two heads are better than one: crystal structure of the insect derived double domain Kazal inhibitor rhodniin in complex with thrombin. **EMBO J**, 14, n. 21, p. 5149-5157, 1995.

VARGAS, A.; MALTA, J. M. A. S.; COSTA, V. M. D.; CLÁUDIO, L. D. G. *et al.* Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. **Cadernos de Saúde Pública**, 34, 2018.

VIEIRA, C. B.; PRAÇA, Y. R.; BENTES, K. L. D. S.; SANTIAGO, P. B. *et al.* Triatomines: Trypanosomatids, Bacteria, and Viruses Potential Vectors? **Front Cell Infect Microbiol**, 8, p. 405, 2018.

VOGT, R. G.; RIDDIFORD, L. M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. **Nature**, 293, n. 5828, p. 161-163, 1981.

WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2019. Disponível em: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 20 ago. 2019.

WHO. **Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee**. Brasília, Brasil: World Health Organization, 2020. 92 4 120905 4. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42443/WHO\\_%20TRS\\_905.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42443/WHO_%20TRS_905.pdf).

WILDE, M.; KLAUSBERGER, M.; PALMBERGER, D.; ERNST, W. *et al.* Tnao38, high five and Sf9--evaluation of host-virus interactions in three different insect cell lines: baculovirus production and recombinant protein expression. **Biotechnol Lett**, 36, n. 4, p. 743-749, Apr 2014.

YIN, J.; LI, G.; REN, X.; HERRLER, G. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **J Biotechnol**, 127, n. 3, p. 335-347, Jan 2007.

ZHANG, S.; MAIDA, R.; STEINBRECHT, R. A. Immunolocalization of odorant-binding proteins in noctuid moths (Insecta, Lepidoptera). **Chem Senses**, 26, n. 7, p. 885-896, 2001.