



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ANÁLISE *IN SÍLICO* E PRODUÇÃO DA APIRASE RECOMBINANTE DE  
*RHODNIUS PROLIXUS***

**Renan Pereira Moura**

**BRASÍLIA-DF**  
**2024**  
**RENAN PEREIRA MOURA**

**ANÁLISE *IN SÍLICO* E PRODUÇÃO DA APIRASE RECOMBINANTE DE  
*RHODNIUS PROLIXUS***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde

Orientador (a): Prof. Dr. Jaime Martins de Santana

**BRASÍLIA-DF**

**2024**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ma Moura, Renan Pereira  
ANÁLISE IN SÍLICO E EXPRESSÃO DA APIRASE RECOMBINANTE DE  
RHODNIUS PROLIXUS / Renan Pereira Moura; orientador Jaime  
Martis de Santana . -- Brasília, 2024.  
78 p.

Dissertação(Mestrado em Ciências Médicas) -- Universidade  
de Brasília, 2024.

1. Triatomíneos. 2. Saliva . 3. Apirase. 4. Metabolismo  
de nucleotídeos. 5. Doença de Chagas. I. Santana , Jaime  
Martis de , orient. II. Título.

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro (LIPH) do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas (UnB) sob a orientação do prof. Dr. Jaime Martins de Santana. A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), CNPq/INCT, Finep e Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) apoiaram a execução deste projeto de mestrado com suporte financeiro.

## AGRADECIMENTOS

Minha mais sincera gratidão,

Ao meu orientador Jaime Martins de Santana que foi uma pessoa que sempre me ajudou e me guiou nesse processo, meu muito obrigado.

Aos professores do Laboratório de Interação Patógeno Hospedeiro pela receptividade, pois mesmo sem nenhuma experiência me acolheram e me permitiram chegar até aqui.

À professora Carla Nunes, uma pessoa dona de um coração imenso. Gratidão por toda a ajuda, por todos os ensinamentos e por todas as trocas que a nossa vivência nos permitiu ter. A senhora é maravilhosa!

À professora Flávia Nunes obrigado por tudo, você foi luz!

À professora e pós doutoranda Paula Santiago que sempre esteve por perto me auxiliando e ajudando.

À professora Izabela Bastos agradeço por toda a ajuda, por todo o suporte e principalmente por ter me ajudado em vários momentos de desespero. “Vai dar certo”, dizia você!

À minha professora querida Alice Melo Ribeiro que foi uma pessoa que sempre esteve presente na minha trajetória acadêmica. Gratidão por tudo!

À minha psicóloga Lucélia Castro pelo seu trabalho maravilhoso.

A Deus e a espiritualidade amiga pelo amparo, pela minha vida, pela vida da minha família e dos meus amigos. A Ele que sempre me deu providências, abriu portas, me guiou e foi maravilhoso em sua infinita misericórdia.

Aos meus amados pais Roberto e Reginalda que foram os meus pilares durante es-

se processo, sempre me incentivando e me acalutando nos momentos mais difíceis. Vocês são as minhas raízes e as minhas asas, obrigado por me concederem a vida e por serem os meus exemplos. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos Rafaela, Reyla e Ryan por estarem juntos comigo nos momentos felizes, tristes e nos desafios da vida. A jornada sem vocês não seria a mesma coisa. A vida sempre se torna mais leve com vocês. Estamos juntos nos melhores e piores momentos. Gratidão pelo amparo, apoio e incentivo. Amo demais!

Aos meus amados e queridos cunhados Maria Cristina e Eli, que foram pessoas muito presentes em todos os momentos da minha vida.

Aos meus amados sobrinhos Lauren e Lorenzo. Vocês são tudo pra mim!

Aos meus amados amigos do LIPH que amo demais, Alexandra um presente que o laboratório me deu, obrigado por sua amizade e por todo o caminhar lado a lado. Andrey o meu amigo prodígio. Beatriz Argolo a ruiva mais linda, simpática e maravilhosa. Daniela minha amiga de graduação que tive o privilégio de reencontrar e conviver novamente. Gabriel o bioinformata pisciano *good vibes* e sommelier de café. Giulia Causin a jovem mística, obrigado pelos momentos legais falando sobre biologia ou espiritualidade. Gil um ser humano maravilhoso. Kaio um amigo incrível, que sempre foi paciente e me auxiliou em todas as demandas, desculpa por encher o saco e gratidão por toda a ajuda. Karen por ser uma amiga a quem confidenciei muitas vivências. Nath Araújo a gótica trevosa mais amorzinho que existe, a gente se entende falando de gatos ou das dificuldades da vida. Verônica, minha querida vizinha de bancada, obrigado pelos papos falando dos experimentos ou de coisas aleatórias. Me lembrarei com carinho e levarei para a vida a memória afetiva dos nossos cafés vespertinos. Momentos felizes. Memoráveis. Aos meus demais colegas do laboratório Amanda, Tarci, Guilherme (IC) e Juliana agradeço pelas vivências, pelas trocas, vocês são incríveis.

Aos meus amigos de vida Carlos Fehnirak, Edson Freitas, Gleyse Lorhen, Luana Bianchi, Mariane Lino, Myllena de Paula, Pedro Henrique, Peterson Leal, Sabrina Gomes.

## RESUMO

A Doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* que é transmitido entre hospedeiros por triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae). A DC é uma doença negligenciada e endêmica nas Américas. Na saliva de triatomíneos são encontradas moléculas que contrapõem a hemostasia e modulam o sistema imune do hospedeiro. As apirases são moléculas que catabolizam nucleotídeos e nucleosídeos e interferem na agregação plaquetária mediada por ADP. *Rhodnius prolixus* é um importante vetor/transmissor da DC. Os objetivos deste estudo foram realizar uma análise *in silico* das apirases de *R. prolixus* e produzir as proteínas recombinantes em sistema heterólogo de expressão procarioto. Duas sequências de apirases de *R. prolixus* (T1H8D6 e T1H852) foram caracterizadas *in silico*, clonadas no vetor de expressão Pet17b (Novagen) e fusionadas com cauda 6xHis para expressão em sistema bacteriano utilizando a linhagem de bactérias *Escherichia coli* BL21(DE3). Após a transformação, seleção e cultivo dos clones bacterianos, SDS-PAGE e *Western blotting* foram realizados para confirmar a expressão das apirases recombinantes de *R. prolixus*. A atividade apirásica foi avaliada em solução e por zimografia. Das duas apirases de *R. prolixus*, apenas a proteína T1H8D6 de aproximadamente 40 kDa foi expressa. A proteína recombinante foi observada somente na fração insolúvel sob a forma de agregados celulares, formando corpos de inclusão. Os corpos de inclusão foram preparados e purificados por cromatografia de afinidade. As sequências de aminoácidos das apirases de *R. prolixus* possuem sítios para N-glicosilação, O-glicosilação, acetilação, fosforilação e presença de um peptídeo sinal. Além disso, a análise comparativa entre os modelos das apirases de *R. prolixus* com membros das famílias CD39, 5' nucleotidase e Cimex mostrou que elas possuem similaridade com a família Cimex, as quais são dependentes de  $Ca^{2+}$  para a sua atividade no catabolismo de nucleotídeos. As apirases facilitam a hematofagia através da inibição da agregação plaquetária mediada por ADP no hospedeiro vertebrado e seu estudo pode auxiliar no desenvolvimento de abordagens para prevenir a transmissão da DC.

**Palavras-chave:** Triatomíneos; Saliva; Apirase; Metabolismo de nucleotídeos; Análise bioinformática; Proteína recombinante; Doença de Chagas.

## ABSTRACT

Chagas Disease (CD) is caused by the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted among hosts by triatomines (Hemiptera: Reduviidae). CD is a neglected and endemic disease in the Americas. In the saliva of triatomines, molecules are found that counteract hemostasis and modulate the host's immune system. Apyrases are molecules that catabolize nucleotides and nucleosides and interfere with ADP-mediated platelet aggregation. *Rhodnius prolixus* is an important vector/transmitter of CD. The objectives of this study were to perform an *in-silico* analysis of *R. prolixus* apyrases and to produce recombinant proteins in a heterologous prokaryotic expression system. Two sequences of *R. prolixus* apyrases (T1H8D6 and T1H852) were characterized *in silico*, cloned into the expression vector pET17b (Novagen), and fused with a 6xHis tag for expression in a bacterial system using the *Escherichia coli* BL21(DE3) strain. After transformation, selection, and cultivation of bacterial clones, SDS-PAGE and Western blotting were performed to confirm the expression of recombinant *R. prolixus* apyrases. Apyrase activity was evaluated in solution and by zymography. Of the two *R. prolixus* apyrases, only the T1H8D6 protein of approximately 40 kDa was expressed. The recombinant protein was observed in the insoluble fraction as cellular aggregates, forming inclusion bodies that were prepared and purified by affinity chromatography. The amino acid sequences of *R. prolixus* apyrases have sites for N-glycosylation, O-glycosylation, acetylation, phosphorylation, and the presence of a signal peptide. Furthermore, comparative analysis between the models of *R. prolixus* apyrases and members of the CD39, 5' nucleotidase, and Cimex families showed that they are similar to the Cimex family, which are dependent on  $Ca^{2+}$  their activity on nucleotides. Apyrases facilitate hematophagy by inhibiting ADP-mediated platelet aggregation in the vertebrate host, and their study may help in the development of approaches to prevent the transmission of CD.

**Keywords:** Triatomines; Saliva; Apyrase; Nucleotide metabolism; Bioinformatics analysis; Recombinant protein; Chagas Disease.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Vista lateral e dorsal dos insetos da ordem Hemiptera de acordo com os hábitos alimentares. ....	18
<b>Figura 2.</b> Corte transversal esquematizando a estrutura da peça bucal de uma ninfa de quinto estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	19
<b>Figura 3.</b> Desenho esquemático dos estágios de inserção do fascículo na pele do hospedeiro e o processo de sucção dos triatomíneos.. ....	20
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática da inibição da agregação plaquetária induzida por Apirase de <i>Triatoma infestans</i> .. ....	25
<b>Figura 5.</b> Representação das estruturas tridimensionais cristalizadas gerada pelo AlphaFold das três famílias de apirases.....	29
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática da metodologia empregada para as análises in sílico e in vitro das apirases T1H8D6 e T1H852 de <i>R. prolixus</i> .....	32
<b>Figura 7.</b> Representação do plasmídeo pET17b, usado neste estudo, com aproximadamente 3,3 kb.....	34
<b>Figura 8.</b> Alinhamento das sequências de apirases pela plataforma Esript 2.0. A sequência de aminoácidos cristalizada de <i>H. sapiens</i> (Uniprot - Q8WVQ1) foi alinhada com membro da família 5' nucleotidase <i>T. infestans</i> (Uniprot - Q70GK8), família Cimex <i>C. lectularius</i> (Uniprot - O96559) e famílias de apirases aparentadas à família Cimex, <i>M. musculus</i> (Uniprot - Q8VCF1), <i>R. prolixus</i> (Uniprot - T1H8D6) e (Uniprot – T1H852).....	41
<b>Figura 9.</b> Predição da estrutura secundária da apirase T1H8D6 de <i>R. prolixus</i> a partir da sequência primária utilizando a plataforma NetSurfP 2.0.....	43
<b>Figura 10.</b> Predição das estruturas secundárias de apirases de <i>H. sapiens</i> (Q8WVQ1) e <i>R. prolixus</i> (T1H8D6).....	44
<b>Figura 11.</b> Predição de domínio transmembrana para a apirase T1H8D6 de <i>R. prolixus</i> realizada na plataforma Deep TMHMM. ....	45
<b>Figura 12.</b> Predição de domínio transmembrana e peptídeo sinal pela plataforma Phobius. ....	46
<b>Figura 13.</b> Predição dos motivos de N-glicosilação na apirase T1H8D6 <i>R. prolixus</i> na plataforma NetNGlyc 1.0. ....	47
<b>Figura 14.</b> Predição de motivos de O-glicosilação da apirase T1H8D6 de <i>R. prolixus</i> na plataforma NetOGlyc 4.0.....	48
<b>Figura 15.</b> Predição de peptídeo sinal da apirase T1H8D6 de <i>R. prolixus</i> pela plataforma SignalP 6.0.....	49
<b>Figura 16.</b> Análise da predição de secreção pela via não clássica utilizando o SecretomeP 2.0.....	49

<b>Figura 17.</b> Predição dos sítios de fosforilação da apirase T1H8D6 de <i>R. prolixus</i> . ..	50
<b>Figura 18.</b> Predição dos sítios de acetilação da sequência da apirase T1H8D6 de <i>R. prolixus</i> . A plataforma GPS-Pail 2.0 previu a existência de quatro resíduos de aminoácidos acetilados nas posições 249, 255, 258 e 259. ....	50
<b>Figura 19.</b> Predição da estrutura tridimensional da apirase de <i>R. prolixus</i> (T1H8D6)..	52
<b>Figura 20.</b> Gráfico de cobertura de sequências que compartilham graus de identidade com a sequência de <i>R. prolixus</i> .....	53
<b>Figura 21.</b> Comparação entre as estruturas tridimensionais da apirase cristalizada de <i>H. sapiens</i> codificado pelo gene CANT1 e de <i>R. prolixus</i> pela plataforma Pymol..	54
<b>Figura 22.</b> Motivos de ligação ao sítio catalítico da proteína e de ligação ao Cálcio da apirase humana.....	55
<b>Figura 23.</b> Relações evolutivas entre as famílias de apirases de diferentes espécies.....	56
<b>Figura 24.</b> Análise da expressão por western blotting de extrato total das Apirases T1H8D6 e T1H852 de <i>R. prolixus</i> marcados com anticorpo Anti-His na proporção 1:2000.....	57
<b>Figura 25.</b> Análise da expressão por Western Blotting da fração insolúvel das Apirases (TH18D6 e T1H852) de <i>R. prolixus</i> marcadas com anticorpo Anti-His na proporção 1:2000..	58
<b>Figura 26.</b> Análise da expressão por Western Blotting da fração solúvel das Apirases T1H8D6 e T1H852 de <i>R. prolixus</i> marcados com anticorpo Anti-His na proporção 1:2000..	58
<b>Figura 27.</b> Análise da expressão por Western Blotting da fração insolúvel em diferentes concentrações de IPTG (0.1, 0.25, 0.5, 1 mM) de T1H8D6 de <i>R. prolixus</i> clones 1, 4 e 7, marcados com anticorpo Anti-His na proporção 1:2000.....	59
<b>Figura 28.</b> Análise da expressão por Western Blotting da fração solúvel e insolúvel de T1H8D6 em diferentes concentrações de IPTG (0.1, 0.25, 0.5, 1 mM) da Apirase de <i>R. prolixus</i> clones 1 e 8, marcadas com anticorpo Anti-His na proporção 1:2000..	59
<b>Figura 29.</b> Análise da purificação dos Corpos de Inclusão de TH18D6 e verificação por Western Blotting marcados com anticorpo Anti-His na proporção 1:2000.....	60
<b>Figura 30.</b> Atividade de zimograma em gel 12% para detecção da atividade apirásica de T1H8D6 de <i>R. prolixus</i> .....	61

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1.</b> Características das sequências T1H8D6 e T1H852 de apirases de <i>R. prolixus</i> .....	39
---	----

## LISTA DE ABREVIações

ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
BB	BugBuster®
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclica
CI	Corpos de inclusão
DC	Doença de Chagas
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
E-NTPDases	Difosfohidrolases de ecto-nucleosídeo trifosfato
GS	Glândulas Salivares
IP	Inibidor de Protease
IPTG	Isopropil-β-D-Tiogalactosídeo
LB	Luria Bertani
NTPDase	Difosfohidrolases de nucleotídeos trifosfato
OD	Densidade óptica
ON	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC	Ponto de corte
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Pi	Fosfato inorgânico
pLDDT	<i>Prediction of Local Difference Distance Test</i>
RPM	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poli-Acrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1. TRIATOMÍNEOS	17
1.2. <i>RHODNIUS PROLIXUS</i>	21
1.3. SIALOMA	21
1.4. APIRASES	23
1.5. CIMEX	26
1.6. 5' NUCLEOTIDASES	26
1.7. CD39	27
1.8. ESTRUTURAS CRISTALIZADAS DAS TRÊS FAMÍLIAS DE APIRASES	28
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>30</b>
<b>3. OBJETIVO</b>	<b>31</b>
3.1. OBJETIVO GERAL	31
3.2. ETAPAS	31
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>32</b>
4.1. ANÁLISES <i>IN SILICO</i> DAS SEQUÊNCIAS DAS APIRASES DE <i>RHODNIUS PROLIXUS</i>	32
4.2. CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS DE APIRASES DE <i>RHODNIUS</i> <i>PROLIXUS</i> NO VETOR DE EXPRESSÃO	33
4.3. EXPRESSÃO DAS APIRASES DE <i>RHODNIUS PROLIXUS</i> EM <i>ESCHERICHIA COLI</i>	34
4.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS APIRASES DE <i>RHODNIUS</i> <i>PROLIXUS</i> EM <i>ESCHERICHIA COLI</i>	36
4.5. PURIFICAÇÃO DA APIRASE RECOMBINANTE DE <i>RHODNIUS</i> <i>PROLIXUS</i>	37
4.6. TESTE DE ATIVIDADE APIRÁSICA POR ZIMOGRAMA	38
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>39</b>
5.1. TESTES <i>IN SILICO</i>	39
5.1.1. Alinhamento das sequências das apirases de <i>Rhodnius prolixus</i> com apirases de outros organismos	39
5.1.2. A apirase T1H8D6 de <i>R. prolixus</i>	39
5.1.3. Predição de estrutura secundária da apirase de <i>R. prolixus</i>	42
5.1.4. Predição de domínios transmembrana da apirase T1H8D6 de <i>Rhodnius prolixus</i>	44
5.1.5. Predição de motivos de N-glicosilação na sequência da apirase T1H8D6 de <i>Rhodnius prolixus</i>	46
5.1.6. Predição de motivos de O-glicosilação na sequência da apirase T1H8D6 de <i>Rhodnius prolixus</i>	47
5.1.7. Predição de peptídeo sinal na sequência da apirase de T1H8D6 de <i>Rhodnius prolixus</i>	48
5.1.8. Predição de sítios de fosforilação na sequência da apirase T1H8D6 de <i>Rhodnius prolixus</i>	49
5.1.9. Predição de sítios de acetilação na sequência da apirase T1H8D6 de <i>Rhodnius prolixus</i>	50
5.1.10. Predição do modelo tridimensional da apirase T1H8D6 de	

<i>Rhodnius prolixus</i> .....	51
5.1.11. Comparação entre as estruturas das apirases T1H8D6 de <i>Rhodnius prolixus</i> e a apirase Q8WVQ1 de <i>Homo sapiens</i> .....	53
5.1.12. Comparação filogenética da apirase T1H8D6 de <i>Rhodnius prolixus</i> com outras apirases.....	55
5.2. EXPRESSÃO DAS APIRASES RECOMBINANTES DE <i>RHODNIUS PROLIXUS</i> 56	
5.1.13. A apirase T1H8D6 recombinante de <i>R. prolixus</i> não apresentou atividade apirásica por zimograma .....	60
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>8. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>67</b>
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Em 1909, em Lassance, uma cidade de Minas Gerais, o médico sanitário Brasileiro e pesquisador Carlos Chagas na cidade de Minas Gerais, descreveu uma nova doença humana causada por um protozoário flagelado (Chagas, 1909). O pesquisador nomeou o parasita como *Trypanossoma cruzi* em homenagem ao cientista Oswaldo Cruz. Chagas foi o primeiro na história da medicina a descrever completamente o ciclo da doença identificando o vetor da doença, o agente etiológico, o reservatório, os sintomas e as complicações clínicas (Kropf, 2009; Paiz Reyes, 2008). O *T. cruzi* pertence à Família Trypanosomatidae, e caracteriza-se pelo seu ciclo heteroxeno tendo uma parte associada a um vetor e a outra a um hospedeiro mamífero.

A Doença de Chagas é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma Doença Tropical Negligenciada (DTN). As DTNs afetam em maior parte, mas não somente, as camadas mais pobres da sociedade, estando presente em regiões de grande vulnerabilidade socioeconômica. Os países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento sofrem sérias limitações, que são impostas às sociedades atingidas pelas DTNs, tais dificuldades incluem à falta de acesso aos centros de saúde, dificuldades no diagnóstico e tratamento (Dias et al., 2013).

O ciclo de transmissão da DC inicia-se quando os vetores (Triatominae) ao realizarem o repasto sanguíneo nos seus hospedeiros vertebrados ingerem sangue contaminado com as formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*. Em seu intestino médio, os protozoários ingeridos sofrem diferenciações em suas formas epimastigotas onde migram para o intestino posterior do barbeiro. Em função do alto estresse nutricional no intestino posterior, estes diferenciam-se nas formas infectantes tripomastigotas metacíclicas que serão excretados pelas fezes e urina. Os triatomíneos ao terminarem sua refeição desancoram o aparato bucal da pele do hospedeiro deixando de secretar as proteínas presentes em sua saliva, o que pode desencadear o prurido no local da picada. As coceiras podem levar a escoriações e lesões superficiais, que junto a outras lesões já existentes poderão tornar-se uma porta de entrada para o parasita alcançar a corrente sanguínea e infectar as células nucleadas do seu hospedeiro. (Ferreira, et al., 2023; Garcia et al., 2007; Santos, 2021).

A DC possui duas fases principais a fase aguda ou inicial da doença, que é

caracterizada pela presença de sintomas inespecíficos como febre persistente, dor de cabeça, fraqueza, manchas avermelhadas na pele e inchaço das pálpebras e a fase crônica que pode surgir muitos anos após a infecção, que é caracterizada pela síndrome dos megas: cardiomegalia, esplenomegalia, megaesôfago e megacólon. Os tratamentos disponíveis consistem na administração de antiparasitários como o Benzonidazol e Nirfutimox, que são eficazes apenas na fase aguda da doença. Além de não serem efetivos na fase crônica, a alta toxicidade dos medicamentos dificultam a adesão ao tratamento (Brener; Gazzinelli, 1997; Rassi et al., 2010).

Atualmente, existem pelo ou menos 6 milhões de pessoas infectadas em 21 países da América Latina, sendo a América do Sul o continente mais afetado. No Brasil, a estimativa é de que haja cerca de um milhão de pessoas infectadas pela DC, sendo a doença parasitária que mais mata com 14.000 mortes anuais. Neste sentido, torna-se imprescindível que medidas governamentais objetivem a diminuição da transmissão da DC no Brasil e no mundo. Hodiernamente, o controle vetorial é um dos métodos mais efetivos na interrupção do ciclo de transmissão do protozoário. Tais medidas levaram à uma diminuição nas taxas de infecção pela DC, que passou de 18 milhões de pessoas infectadas para cerca de 6 a 7 milhões nos dias atuais. (Hughes, 2013; WHO, 2018).

Ao longo do Século XVIII no ciclo da mineração do Brasil, as matas eram bem preservadas e com baixa incidência de desmatamentos, não havendo registros de adaptação dos triatomíneos ao ambiente domiciliar. A domiciliação dos inicia-se nos ciclos da agricultura e pecuária, onde se tinha períodos de desmatamento intenso (Coura, 2003). Naturalmente, os animais silvestres constituem a fonte natural de alimentação dos triatomíneos. Por causa do desmatamento várias espécies silvestres perdem os recursos necessários para a sua sobrevivência, sofrendo processos de extinção em massa. Por este motivo, os triatomíneos passam a se alimentar do sangue de animais domésticos e do homem, adaptando-se ao ambiente domiciliar e peridomiciliar (Coura, 2003; Forratini, 2006).

Os movimentos migratórios de indivíduos infectados de áreas rurais para urbanas e imigratórios para outros países do globo alteraram a dinâmica de transmissão da doença, que vem se espalhando para áreas, que antes eram consideradas não endêmicas como a Europa e a América do Norte. Neste sentido, é necessária uma maior atenção epidemiológica para que os indivíduos infectados nessas áreas



sejam monitorados, a fim de controlar novos ciclos de transmissão da doença (Dias, 2007).

Além da transmissão vetorial que é a mais disseminada, outras formas de contaminação são relatadas na literatura, como a transmissão oral por alimentos contaminados mais comumente o açaí e a cana-de-açúcar, por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, transmissão vertical – da mãe para o bebê -, e mais raramente por acidentes em laboratório (Carvalho et al., 2018; Leal; De Oliveira, 2009).

Os vetores da DC são insetos da Ordem Hemiptera e Subfamília Triatominae, popularmente conhecidos como barbeiros. São hematófagos e se alimentam do sangue de animais endotérmicos, mais comumente aves e mamíferos. Segundo Hwang; Weirauch (2012), a hematofagia na família Reduviidae pode ter surgido como um evento evolutivo único ou advindo de transições evolutivas independentes.

Os insetos hematófagos no decorrer do repasto sanguíneo injetam a sua saliva nos tecidos do hospedeiro. O conteúdo salivar possui uma biblioteca de moléculas que auxiliam na superação dos processos hemostáticos do hospedeiro. A hemostasia é um processo natural do corpo humano em que os tecidos lesionados agem para interromper a perda de sangue. Tal resposta fisiológica pode bloquear o elo entre o vetor e o hospedeiro vertebrado, impedindo o sucesso alimentar do inseto hematófago. A fim de contornar as barreiras naturais, a saliva dos triatomíneos evoluiu para neutralizar os mecanismos fisiológicos naturais dos seus hospedeiros, atuando na contraposição dos processos hemostáticos (Silva, 2009).

No ambiente silvestre os triatomíneos se domicíliam próximo a árvores como palmeiras, que se caracterizam como seu ecótopo natural. As aves e mamíferos constituem a preferência alimentar de triatomíneos e usam estes espaços para armar suas tocas e ninhos. Os triatomíneos em seu ambiente silvestre usam estes locais como ecótopos naturais, uma vez que se aproximam de animais que são fonte alimentar. As ações antrópicas exercem uma forte pressão sobre a fauna. Com a devastação do ambiente natural e a perda do hábitat silvestre, as espécies tendem a migrar para ambientes urbanos e rurais, próximos a regiões domiciliares e peridomiciliares em busca de alimento, resultando no aumento da frequência do contato vetor-humano (Diotaiuti et al., 1998; Forattini et al., 1971; Galvão, 2014; Schofield, 1988).

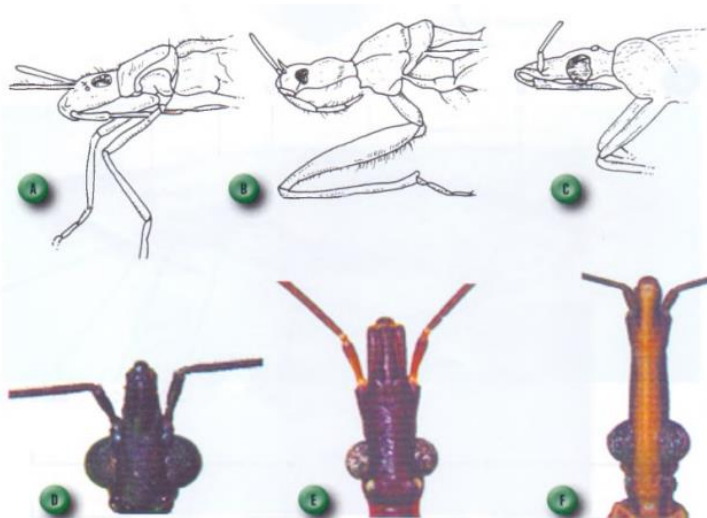
Algumas espécies de triatomíneos se adaptaram a conviver em espaços que também são ocupados pelo homem. A domiciliação em triatomíneos é descrita na literatura principalmente para os gêneros *Rhodnius* e *Triatoma*, sendo as espécies *Triatoma brasiliensis* (Gurgel-Gonçalves, 2008), *Triatoma infestans* (Gurgel-Gonçalves, 2008; MacCord; Jurberg; Raymundo, 1983), *Triatoma sordida* (Da Silva et al., 2010; Forratini et al., 1983) e *Rhodnius neglectus* (Diotaiuti; Dias, 1984; Rodrigues, 2009) sinantrópicas, ou seja, que colonizam habitações humanas e os seus arredores (Schofield; Diotaiuti; Dujardin, 1999).

Tendo em vista que o controle vetorial no ambiente domiciliar e peridomiciliar constituem-se como estratégias efetivas para o controle da DC, é imprescindível que estudos extensivos acerca da distribuição, dispersão e mecanismos de transmissão na interação vetor hospedeiro, ajudem na compreensão de novas estratégias para o controle da infecção pela DC (Vinhaes; Dias, 2000).

### 1.1. TRIATOMÍNEOS

Os triatomíneos são popularmente conhecidos como barbeiros e caracterizam-se como ectoparasitas solenofágicos; retiram o sangue diretamente das vênulas ou arteríolas da pele de vertebrados. Comumente possuem o hábito de defecar durante ou após a alimentação de sangue, e quando infectados pelo *T. cruzi* liberam os parasitos em suas fezes ou urina (Alevi et al., 2021).

A subfamília Triatominae se difere dos outros membros da família Reduviidae por serem estritamente hematófagos. Diferentemente dos hemípteros predadores que possuem a probóscida curvilínea, os triatomíneos possuem a probóscida praticamente retilínea e dividida em três segmentos (Figura 1) (Neves et al., 2016).



**Figura 1.** Vista lateral (a-c) e dorsal (d-f) dos insetos da ordem Hemiptera de acordo com os hábitos alimentares. Vista lateral **(a)** Fitófago, probóscida longa que ultrapassa ventralmente o primeiro par de patas **(b)** Predadores, probóscida curvilínea. **(c)** Hematófagos, probóscida retilínea dividida em três segmentos **(d)** *Panstrongylus* **(e)** *Triatoma* **(f)** *Rhodnius*. Fonte: Neves et al., 2016.

No Brasil atualmente três gêneros apresentam importância epidemiológica: *Panstrongylus*, *Triatoma* e *Rhodnius*, em virtude de sua distribuição geográfica nos estados brasileiros, podem ser encontrados no ambiente silvestre, domicílio e peridomicílio e são eficientes no processo de transmissão do *T. cruzi*. Esses, por sua vez podem ser distinguidos quanto às suas características anatômicas (Neves et al., 2016; Santiago et al., 2020):

- ✓ *Panstrongylus*: possui cabeça mais curta e estreita, com formato triangular e as antenas são implantadas bem próximas aos olhos.

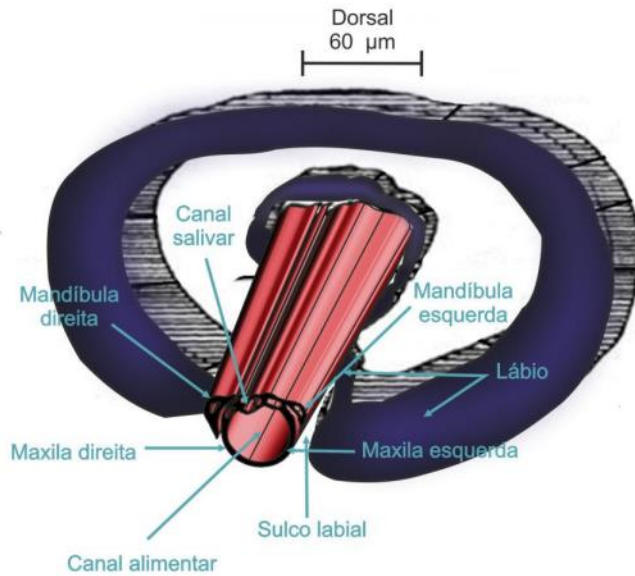
- ✓ *Triatoma*: cabeça alongada e delgada e as antenas estão inseridas em um ponto médio entre os olhos e o clipeo – extremidade anterior da cabeça -

- ✓ *Rhodnius*: cabeça mais alongada e estreita e as antenas são implantadas próximas ao clipeo.

Os insetos adultos chegam a medir cerca de 1 a 4 cm de comprimento, e em sua fase adulta desenvolvem dois pares de asas, as quais, a superior constitui-se de uma asa mais endurecida, enquanto a inferior é mais fina e membranosa. O termo Hemíptero, refere-se comumente às asas desses insetos, que são metade membranosas (mais finas) e metade coriáceas (mais espessas). Estima-se existir mais de 140 espécies de triatomíneos com hábitos e comportamentos heterogêneos, alguns vivendo exclusivamente no ambiente silvestre, enquanto outros se adaptaram bem ao convívio rural e urbano (Schofield; Galvão, 2009).

Evolutivamente os Triatominae formam grupos polifiléticos, ou seja, um táxon que inclui alguns, mas não todos os descendentes de um mesmo ancestral em comum. Essas evidências ganharam força principalmente devido à observação de acentuadas diferenças morfológicas e na fisiologia das glândulas salivares de *Rhodnius* e *Triatomini* (Schofield, 1988; Schofield; Galvão, 2009).

A cabeça dos triatomíneos geralmente é alongada e provida de um aparato bucal do tipo picador-sugador constituído de um par de mandíbulas serrilhadas e um par de maxilas escavadas na face interna em que ambas apresentam forma pontiaguda (Figura 2).



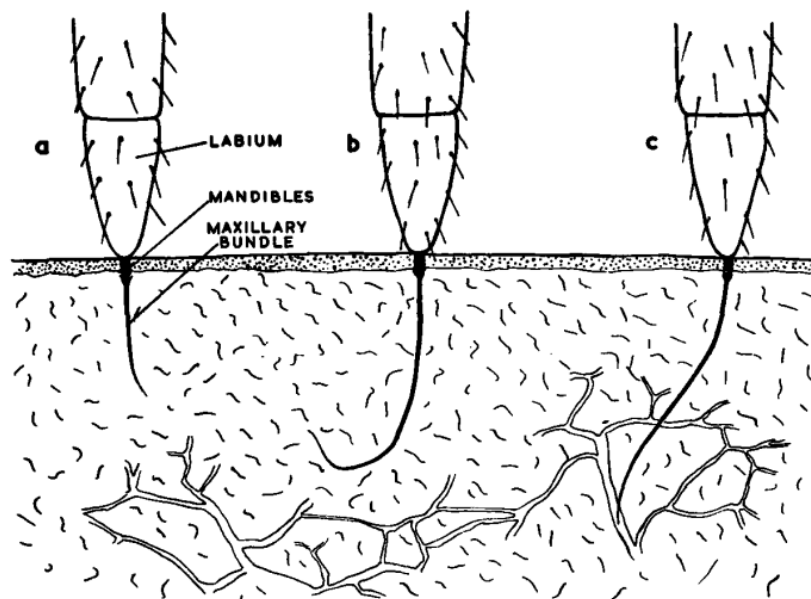
**Figura 2.** Corte transversal esquematizando a estrutura da peça bucal de uma ninfa de quinto estágio de *Rhodnius prolixus*. Fonte: Araujo et al., 2012.

Os triatomíneos são insetos hemimetábolos, assim sendo, se desenvolvem do ovo aos estágios de ninfa - 1º ao 5º estágio -, antes de chegarem à fase adulta. Uma característica que os distingue, é que diferentemente de outros insetos hematófagos tais como mosquitos e flebotomíneos onde apenas as fêmeas se alimentam de sangue, neles tanto os machos como as fêmeas possuem hábitos hematófagos. As ninfas além de se alimentarem de sangue desde os seus primeiros estágios de vida, também transmite o *T. cruzi* (Galvão, 2014; Lima, 2017).

Ao realizarem o repasto sanguíneo, os triatomíneos ancoram o fascículo na superfície da pele do hospedeiro, enquanto músculos que controlam as maxilas atravessam a derme. Cada estilete das maxilas formam dois canais independentes, um alimentar central e um alimentar estreito. Após penetrarem a derme, inicia-se a fase de sondagem, onde o par de maxilas ficam juntas e realizam movimentos oscilatórios parecidos com um chicoteado, a fim de encontrar um vaso sanguíneo (De Araujo et al., 2012).

Segundo Lavoipierre et al., 1959, durante a fase de sondagem o triatomíneo poderá retrair a maxila, porém mantendo a mandíbula presa à pele e as bombas de sucção inativas. Ao detectar um vaso sanguíneo as maxilas atuam como uma cânula, perfurando a parede deste vaso e iniciando o processo de sucção do sangue, também conhecida como fase de ingurgitamento (Figura 3). Na saliva uma mistura

de diversas moléculas é injetada, incluindo proteínas, com o objetivo de contrapor o aparato biológico do hospedeiro (Santiago et al., 2020).



**Figura 3. Desenho esquemático dos estágios de inserção do fascículo na pele do hospedeiro e o processo de sucção dos triatomíneos. (a)** Ancoramento do fascículo na pele do hospedeiro e inserção das maxilas na derme do hospedeiro. **(b)** Fase de Sondagem: movimentos oscilatórios (chicoteado) em busca de vasos sanguíneos **(c)** Fase de ingurgitamento: as maxilas perfuram o vaso sanguíneo e a sucção do sangue ocorre por meio das bombas faríngeas e cibárias **Fonte:** Lavoipierre et al., 1959.

De acordo com Dias & Coura (1997) todos os triatomíneos são capazes de transmitir a Doença de Chagas, desde que sejam contaminados com o *T. cruzi*. Quando esses animais ingerem o sangue contaminado de mamíferos ou aves, os barbeiros são infectados e podem transmitir o parasita para outros animais e para os seres humanos. Os barbeiros são assim conhecidos porque picam principalmente a face dos animais os quais se alimentam. Entretanto, o nome pode estar associado a prática de sangria, uma vez que se alimentam exclusivamente de sangue (de Rezende; Rassi, 2008).

As glândulas salivares (GS) dos triatomíneos desempenham um papel fundamental para o sucesso alimentar e a obtenção de sangue. Essas, possuem uma grande diversidade quanto ao número de glândulas, tamanho e forma nas diferentes espécies de triatomíneos. Normalmente, as glândulas estão situadas na região torácica, porém as vezes se deslocam para a região abdominal em resultado dos movimentos peristálticos de órgãos vizinhos (Lacombe, 1999). As GS produzem uma

grande diversidade de moléculas como proteínas e transcritos de mRNA capazes de modular as respostas do hospedeiro (Santiago et al., 2020).

## 1.2. *RHODNIUS PROLIXUS*

É um dos principais vetores da doença de Chagas, uma vez que são insetos que convivem nos mesmos espaços ocupados pelo ser humano. *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) é uma espécie que possui preferência quase exclusivamente pelo ambiente domiciliar e peri-domiciliar. E está distribuído na região norte da América do Sul – Venezuela, Colômbia e América central – onde atuam como os principais vetores da DC. Em outros países como o México, Nicarágua, Guatemala, Honduras, El Salvador, Costa Rica, norte do Brasil e Panamá, são um dos mais importantes, porém não os únicos transmissores da DC (Anhê et al., 2011; Hashimoto; Schofield, 2012).

Gurgel-Gonçalves e colaboradores (2010), descreveram que até 1950 todos os espécimes coletados no centro do Brasil que pertenciam ao gênero *Rhodnius* foram identificados como *R. prolixus*. Após 1954, novas aparições do gênero foram observadas, como a espécie *Rhodnius neglectus*, principalmente na região Sudeste – Minas Gerais e São Paulo – e Centro-Oeste no estado de Goiás. Ademais, *R. prolixus* também é uma espécie encontrada nas zonas de transição Amazônia-Cerrado.

O gênero *Rhodnius*, incluindo as espécies *R. prolixus*, *R. neglectus*, *R. robustus* e *R. nasutus* são vetores diligentes na transmissão do *T. cruzi* dado que estão frequentemente associados às infestações domiciliares. No entanto, apesar da sua grande tendência a domiciliação, a maioria das espécies do gênero vivem em habitat arbóreo, na copa das árvores. Ademais, apresentam um rápido ciclo de desenvolvimento, e, possuem, o hábito de defecarem logo após a alimentação o que os tornam competentes na transmissão da DC (Anhê, 2011; Gurgel-Gonçalves et al., 2008).

## 1.3. SIALOMA

No extrato salivar dos triatomíneos são encontrados, um conjunto de moléculas secretadas durante o repasto sanguíneo para superar o processo de hemostasia do hospedeiro. O sialoma constitui-se como um conjunto de proteínas e transcri-

tos de mRNA (RNA mensageiro) presentes no extrato salivar de alguns animais. A adequação à alimentação sanguínea envolve a evolução de bibliotecas salivares que ajudaram insetos hematófagos a superarem as respostas naturais do hospedeiro frente às lesões teciduais. Deste modo, este conjunto de proteínas e transcritos salivares podem atuar em diferentes alvos hemostáticos, como a agregação plaquetária, coagulação sanguínea, vasodilatação, anti-inflamatórios e imunomoduladores (Andersen et al., 2009).

As moléculas do conteúdo salivar articulam-se de maneira sinérgica e coordenada, atuando muitas vezes, em um mesmo alvo hemostático, a fim de promover uma maior eficiência no processo de obtenção do alimento. Por essa razão, esse conjunto de proteínas e transcritos são fundamentais para que os triatomíneos se tornem invisíveis ao seu hospedeiro, resultando em um repasto sanguíneo sem interrupções e garantindo a sobrevivência do inseto (Costa, 2021; Francischetti, 2010; Rosa 2014). Os compostos salivares são fundamentais para que insetos hematófagos obtenham elevadas taxas de sucesso alimentar. Sendo assim, ao menos três tipos de moléculas são encontrados na saliva desses animais: àquelas que terão como função promover a vasodilatação aumentando o calibre dos vasos sanguíneos e uma maior circulação de sangue, àquelas que inibem a formação de coágulos interferindo nas etapas da cascata de coagulação, àquelas que inibem a agregação de plaquetas e em alguns casos àquelas que promovem a anestesia no local da picada (Andersen et al., 2005; Ribeiro et al., 2004).

Ao explorar o sialoma de *R. prolixus* encontrou-se uma ampla diversidade de famílias de proteínas com funções relacionadas sobre os mecanismos moleculares hemostáticos do hospedeiro. Das proteínas diferencialmente expressas, Ribeiro e colaboradores (2004) descrevem que as lipocalinas e nitroforinas constituem maior parte do grupo de transcritos associados a produtos de secreção. Outras famílias de proteínas também são encontradas como apirases, palidipinas e triabinas.

As lipocalinas são proteínas extracelulares de baixa massa molecular, cerca de ~20 kDa e estrutura tridimensional bem conservada entre as espécies. Entretanto, apesar da similaridade entre as estruturas secundárias e terciárias da proteína, essa possui uma baixa identidade na sequência de aminoácidos sendo uma família bastante heterogênea (Andersen et al., 2005; Santos, 2021).

As nitroforinas (NPs) são hemeproteínas capazes de armazenar e se ligar às moléculas de óxido nítrico (NO). Pesquisadores demonstram que a coloração avermelhada encontrada nas glândulas salivares do gênero *Rhodnius*, está relacionada à alta concentração de NPs. Este grupo de lipocalinas representam cerca de 50% das proteínas salivares totais em *R. prolixus*. De modo oposto, os pares de glândulas salivares em Triatominae são incolores, em função da ausência dessas proteínas. Durante o repasto sanguíneo, as NPs são liberadas diretamente no tecido do hospedeiro onde se difundirão a fim de promover vasodilatação (Andersen et al., 2005; Ribeiro et al., 1995). Outras famílias de proteínas também são encontradas na saliva como apirases, palidipinas e triabinas.

#### 1.4. APIRASES

As apirases pertencem à uma família de enzimas que está presente em uma variedade de organismos como artrópodes hematófagos, plantas, protozoários, mamíferos e vermes nematoides. Molnar; Lorand (1961) enfatizam que “apirase” é um termo coletivo, pois ao invés de designar uma única enzima, referem-se às famílias de enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos. O termo apirase foi cunhado primeiramente por Meyerhoff (1945) para caracterizar enzimas capazes de catabolizar nucleotídeos e seus derivados.

Essas enzimas podem desempenhar diferentes papéis nos organismos, entretanto sua principal função é de uma NTPDase - nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (EC 3.6.1.5) -, ou seja, uma enzima que catalisa a hidrólise de ligações fosfodiéster de nucleosídeos trifosfatos como a adenina e guanina – ATP, GTP – convertendo-os em seus respectivos nucleosídeos difosfatos – ADP, GDP - e monofosfatos – AMP, cAMP, GMP, cGMP – na presença de cátions bivalentes -  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  - promovendo a liberação de fósforo inorgânico. (Charneau et al., 2007; Hughes, 2013; Ribeiro; Garcia, 1980; Sarkis et al., 1986; Valenzuela et al., 2001).

O sistema purinérgico está intimamente relacionado ao papel das apirases uma vez que essas enzimas ao atuarem no metabolismo extracelular de nucleotídeos – moléculas sinalizatórias – e ao se ligarem aos seus receptores de membrana, podem modular alguns mecanismos celulares, fisiológicos e imunes (Cardoso; Manfredi; Maciel, 2021).

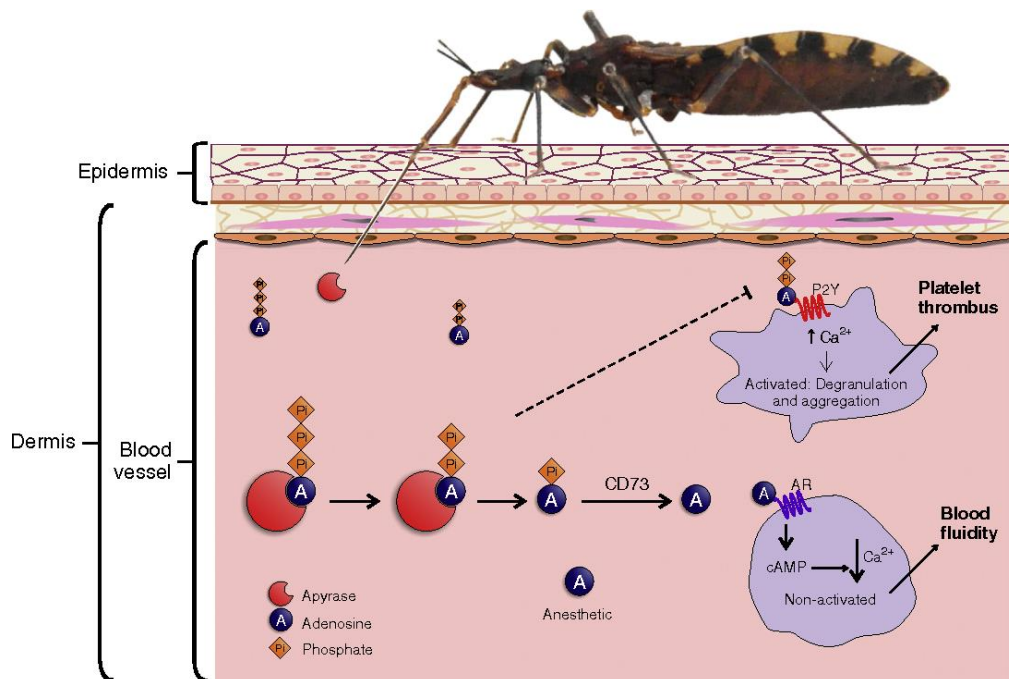


É de conhecimento que os artrópodes vetores de organismos causadores de doenças infecciosas em humanos e vertebrados possuem atividade apirásica salivar: Anopheles vetor da malária (Ribeiro; Rossignol; Spielman, 1985), Aedes vetor da dengue (Ribeiro et al., 1984), Glossina vetor da doença do sono africana (Mant; Parker, 1981), Triatoma (Faudry et al., 2004), Rhodnius (Sarkis; Guimarães; Ribeiro, 1986; Ribeiro; Garcia, 1980) e Panstrogylus (Nevoa et al., 2018) vetores da doença de Chagas, *Lutzomyia* vetor da Leishmaniose (Valenzuela et al., 2001) e Ornithodoros (Mans et al., 1998) vetor da doença de Lyme.

Nas glândulas salivares são encontradas diversas proteínas e transcritos com variadas funções. A apirase, uma dessas, possui um papel fundamental para que os triatomíneos garantam sucesso em sua alimentação durante o repasto sanguíneo, pois a secreção dessa proteína, inibe o processo de agregação plaquetária mediada pela hidrólise do ADP, um importante indutor do processo da agregação plaquetária (Pires, 2006; Ribeiro; Garcia, 1980; Ribeiro et al., 1984; Rosa, 2013; Santiago, 2016).

Acredita-se que alimentação de sangue evoluiu pelo processo de evolução convergente, ou seja, de forma independente entre os diferentes grupos de insetos hematófagos. A atividade da apirase salivar está intrinsecamente ligada ao processo de sucção de sangue e repasto sanguíneo, que também ocorreu de forma distinta durante o processo evolutivo. Deste modo, organismos aparentados podem ter evoluído a partir de diferentes famílias de apirases salivares (Valenzuela et al., 1998).

Quando artrópodes hematófagos realizam o repasto sanguíneo, inserem o aparato bucal na pele do hospedeiro perfurando pequenas vênulas e arteríolas a fim de obter acesso livre ao sangue. Concomitante, com a injúria tecidual de células endoteliais lesionadas, nucleotídeos são liberados no espaço extracelular. Os nucleotídeos tri e difosfatados como o ATP e ADP atuam na sinalização e modulação da homeostasia e do sistema imune do hospedeiro. A saliva injetada possui uma infinidade de proteínas que já foram elucidadas e outras que ainda precisam ser investigadas por meio de análises de transcriptoma. As apirases, são uma família de enzimas que hidrolisam ligações fosfato de nucleotídeos, clivando substratos como o ADP transformando-os em AMP + pi, e resultando na inibição da agregação plaquetária mediada pelo ADP (Figura 4) (Araujo et al., 2012; Dai et al., 2014).



**Figura 4. Representação esquemática da inibição da agregação plaquetária induzida por Apirase de *Triatoma infestans*.** O triatomíneo ao ancorar o aparato bucal na pele do hospedeiro injeta um conjunto de proteínas presentes na saliva, entre elas a apirase. Após o dano tecidual causado pela picada, o mecanismo de agregação plaquetária é alcançado quando o ADP se liga aos receptores de membrana P2Y e P2Y12, promovendo um aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular e a redução dos níveis de cAMP. Conforme esquema representado na imagem (parte inferior) a apirase desfosforila as moléculas de ATP > ADP > AMP, posteriormente cliva o fosfato do AMP deixando a molécula de adenosina livre, que resulta em uma atividade anestésica no local da picada. Fonte: Araujo et al., 2012.

Alguns estudos reforçam a potente ação das enzimas apirases como potentes antiagregadores plaquetários. Moeckel e colaboradores, (2014) estão desenvolvendo uma nova terapia utilizando a apirase humana (CD39L3) a fim de atenuar o desenvolvimento de infarto agudo do miocárdio em cães e camundongos. A pesquisa tem demonstrado um grande potencial biotecnológico da enzima, que pode ser capaz de eliminar a formação de coágulos sanguíneos (Crunkhorn et al., 2014).

Em bactérias do gênero *Shigella flexneri* a atividade apirásica está relacionada ao aumento da patogenicidade bacteriana, que modula a resposta imune do hospedeiro infectado através da hidrólise de nucleotídeos extracelulares durante o seu crescimento exponencial (Babu et al, 2002; Perruzza et al., 2023). Em plantas, a apirase foi atribuída como responsável pelo processo de crescimento, desenvolvimento, resistência a toxinas e resposta a estímulos externos como por exemplo quando uma planta é estimulada pelo toque. (Shibata et al., 1999; Gosh, 1998). Em mamíferos as apirases estão associadas à participação nos processos de sinalização celular, modulação da resposta imune, processo de agregação plaquetária e no catabo-

lismo de nucleotídeos intracelulares (Zimmerman; Zebisch; Sträter, 2012; Silva, 2018).

Segundo Hughes (2013), as apirases animais são divididas em três famílias principais, sendo elas a Cimex, 5' nucleotidases e CD39.

### 1.5. CIMEX

As apirases desta família recebem este nome, pois foram identificadas inicialmente em *C. lectularius*. Essas enzimas estão envolvidas no processo de contração da hemostasia do hospedeiro durante o repasto sanguíneo ao removerem o fosfato inorgânico do ATP e ADP e inibirem o processo de ativação e agregação plaquetária. As apirases desta família são exclusivamente dependentes do  $\text{Ca}^{2+}$  e, ao contrário de outras apirases, não podem ser ativadas por  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$ . Os organismos que produzem essa família de proteínas apirases inclui os Cimidae, conhecido popularmente como percevejos e os flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomia* (Valenzuela et al., 1998). Outrossim, proteínas homólogas à família *Cimex* também foram relatadas em humanos e camundongos (Dai et al., 2014; Valenzuela et al., 1998)

### 1.6. 5' NUCLEOTIDASES

A família 5' nucleotidase (5'ND) está relacionada à regulação da reposta sinalizadora em nível intracelular. São enzimas dependentes dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ . Podem ser encontradas em uma variedade de organismos, tanto em vertebrados como em invertebrados, como por exemplo triatomíneos *Triatoma infestans* (Faudry et al., 2004), dípteros *Anopheles gambiae* (Lombardo et al., 2000), *A. aegypti* (Champagne et al., 1995), Culicidae (Champagne et al., 1995), carrapatos *Rhipicephalus microplus* (Liyu et al., 1999) e *Ornithodoros savignyi* (Stutzer et al., 2009) são organismos que pertencem a esta família de apirases (Champagne et al., 1995; Hughes, 2013).

O aumento da concentração de ATP extracelular pode indicar alguns problemas, por este motivo a ação das ectonucleotidases (E-DNTPs) podem controlar o aumento local dessas moléculas. De modo geral, a adenosina é um metabólito pro-

duzido a partir da hidrólise do ATP que funciona como uma molécula regulatória limitando os processos inflamatórios.

As 5'ND atuam como fosfo-monoesterases, ou seja, enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres fosfóricos da ligação ribose-5'-fosfato dos nucleotídeos. Em mamíferos essa enzima é encontrada principalmente no tecido hepático, mas também abundantes no tecido renal e seminal. Sua principal função é a hidrólise do AMP extracelular. Alguns trabalhos indicam que essa enzima é um sensível marcador de membrana. Elevadas taxas dessa enzima podem estar relacionadas ao crescimento de tumores, dado que a desregulação e o mau funcionamento do sistema purinérgico contribuem para o desenvolvimento de diversas patologias. Além disso, as ecto-5'-NT participam das interações célula-célula e célula-matriz extracelular. (Campeato, 2010; Huang et al., 2021; Wang, 2008).

Champagne e colaboradores (1995) destacam que as apirases descritas em vertebrados carregam uma assinatura de um domínio C-terminal hidrofóbico, e encontram-se na membrana de vertebrados ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI). Em artrópodes nota-se a ausência dessa região C-terminal, assim como múltiplas substituições em resíduos de aminoácidos como a mudança de isoleucina (ILE) por leucina (LEU) e valina (VAL). A perda do domínio C-terminal em artrópodes hematófagos que pertencem a família 5'ND corroboram para o fato de que após a perda do domínio passaram a ser secretadas nas glândulas salivares, sendo encontradas em sua forma solúvel.

### 1.7. CD39

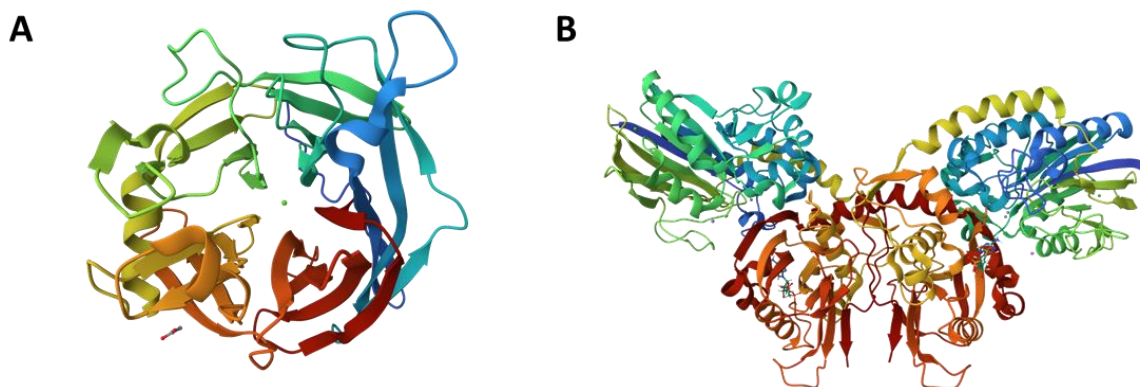
As CD39/NTPDase 1 são proteínas homólogas do antígeno de células B humanas. Necessitam de  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  para serem ativadas. São encontradas na superfície celular e ancoradas à membrana plasmática. Estão presentes no tecido vascular e em células do sistema imune: NK, células B, células dendríticas, monócitos, macrófagos e células T reguladoras. Além disso, o CD39 foi primeiramente identificado como um marcador de superfície em células B linfoblásticas após sensibilização com o vírus Epstein-Barr (EBV) (Wang; Guidotti, 1996). Estão relacionadas com o controle da sinalização celular mediados por nucleotídeos tri e difosfatados, incluindo a agregação plaquetária e a transmissão sináptica. Vários organismos como

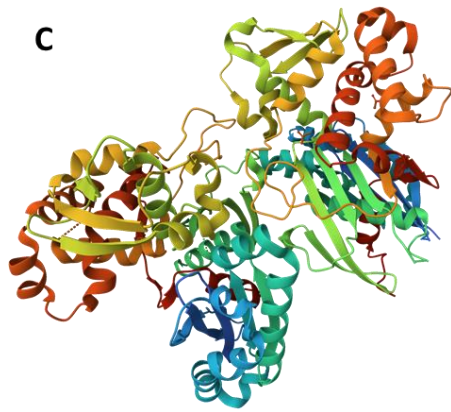
bactérias, plantas, protozoários, fungos e invertebrados expressam o CD39 (Failer; Braun; Zimmerman, 2002; Hughes; 2013, Pires, 2006; Silva, 2018).

O CD39 endotelial metaboliza o ADP que é liberado durante a ativação plaquetária. Em 2019, Li e colaboradores demonstraram que elevados níveis de CD39 em células estromais e endoteliais correlacionam-se com o desenvolvimento de um microambiente tumoral, devido à sua atividade celular imunossupressora. O grupo estudou o impacto do CD39 no crescimento tumoral, demonstrando que camundongos deficientes em CD39 apresentavam uma maior resistência ao desenvolvimento de metástases. Sendo assim, o metabolismo de nucleotídeos promove alterações na sinalização das purinas que exerce um papel na disseminação do câncer colorretal. No estudo, baixos níveis de mRNA de CD39 estavam relacionados a uma maior sobrevivência dos camundongos assim como uma formação tardia de metástases. (Künzli et al., 2011).

#### 1.8. ESTRUTURAS CRISTALIZADAS DAS TRÊS FAMÍLIAS DE APIRASES

Além da afinidade por diferentes substratos de nucleotídeos e nucleosídeos e íons divalentes, os modelos tridimensionais das famílias de apirases podem divergir quanto às suas sequências de resíduos de aminoácidos (Jumper et al., 2021). A apirase de *C. lectularius* assume uma conformação de estrutura toroidal com um núcleo central enquanto a apirase 5' nucleotidase de *H. sapiens* é um homodímero ancorado em GPI à membrana extracelular. A apirase de *Rattus norvegicus* é composta por dois domínios estruturais e quatro cadeias polipeptídicas (Figura 5) (Dai et al., 2014; Battarai et al., 2020; Zebisch et al., 2012).





**Figura 5. Representação das estruturas tridimensionais cristalizadas gerada pelo Alphafold das três famílias de apirases. (A)** Apirase de *H. sapiens* código PDB (1S18) cristalizada mais aparentada à família Cimex, Dai et al., (2014); **(B)** Apirase de *H. sapiens* código PDB (6TVG) cristalizada pertencente à família 5' nucleotidase (CD73), Battarai et al., (2020); **(C)** Apirase de *R. novergicus* código PDB (3ZX3) pertencente à família NTPDase1/CD39, Zebisch et al., (2012).

## 2. JUSTIFICATIVA

Os triatomíneos são fundamentais para o desenvolvimento das formas infecciosas do protozoário flagelado *T. cruzi*, logo, esses tornam-se importantes alvos de estudos para o desenvolvimento de estratégias que minimizem o contato vetor-humano. A espécie *R. prolixus* merece bastante atenção, pois já foram relatadas na literatura a ocorrência da espécie próximo às habitações humanas (Silva et al., 1991).

Quando se trata de doenças que possuem ciclos heteroxênicos, o sucesso do ciclo de transmissão depende da competência do vetor na transmissão de agentes patogênicos. Ademais, as proteínas e transcritos salivares do vetor assumem um papel importante na contraposição da hemostasia do hospedeiro. A elucidação destas moléculas são fundamentais para criar mecanismos capazes de minimizar o sucesso dos triatomíneos em realizarem o repasto sanguíneo, e assim, reduzir as taxas de transmissão da DC em zonas endêmicas. Araujo e colaboradores (2012) sugerem que diferentes abordagens podem ser utilizadas como barreiras ao sucesso alimentar de insetos hematófagos, como por exemplo, o desenvolvimento de proteínas sintéticas ou moléculas associadas a peptídeos que possam inibir os componentes salivares de triatomíneos.

As moléculas salivares constituem-se como promissores alvos biotecnológicos. Alguns fármacos foram produzidos ou estão em fases de testes como o potente anticoagulante Bivalirudina produzido a partir de moléculas salivares de *Hirudinea* (Blaya et al., 1988), *Maxadilan* um peptídeo vasodilatador com propriedades imunomodulatórias isolado do componente salivar de *Lutzomia longipalpis* (Aires et al., 2005; Tatsuno et al., 2001), outros como Votucalis uma molécula analgésica encontrada na saliva de *Rhipicephalus appendiculatus* (Alrashdi, 2022).

Neste sentido, torna-se de suma importância o estudo da biologia e fisiologia dos triatomíneos para um efetivo controle vetorial. As proteínas farmacologicamente ativas na saliva dos vetores além de alvos biotecnológicos, também podem por outro lado, servir de modelo para a produção de moléculas antigênicas, a fim de neutralizar a interação proteína-proteína do vetor com os substratos do hospedeiro (Araujo, 2012).

### 3. OBJETIVO

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é realizar a análise *in silico* e *in vitro* das apirases T1H8D6 e T1H852 de *R. prolixus*, vetor da doença de Chagas.

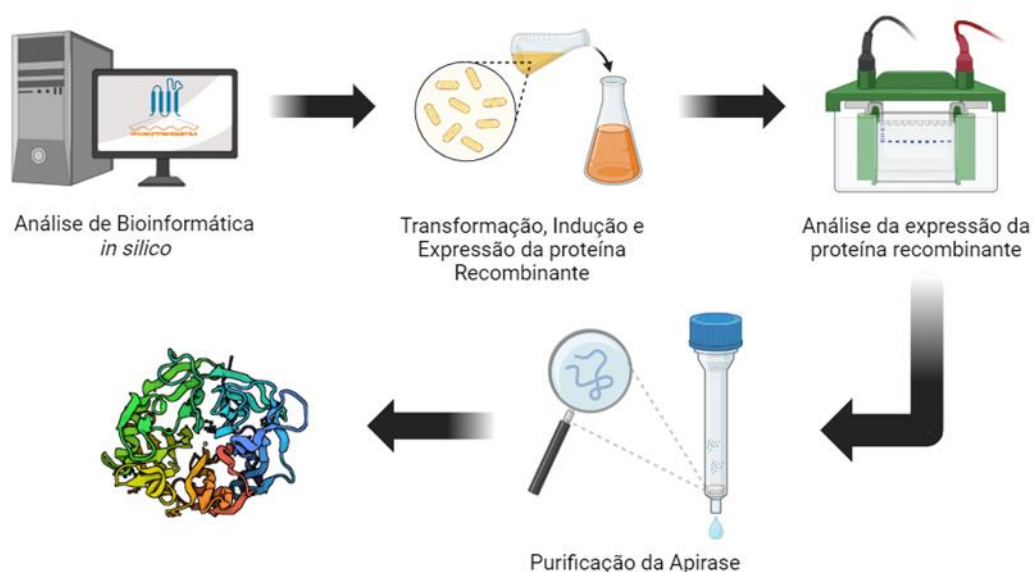
#### 3.2. ETAPAS

- ⇒ Realizar a análise *in silico* das apirases de *R. prolixus* (Uniprot T1H8D6 e Uniprot T1H852);
- ⇒ Comparar os modelos das estruturas tridimensionais das apirases de *R. prolixus* (Uniprot T1H8D6 e Uniprot T1H852) com apirases mais bem caracterizadas na literatura por meio de abordagens computacionais;
- ⇒ Produzir as apirases de *R. prolixus* em um sistema de expressão em *Escherichia coli*;
- ⇒ Purificar as apirases recombinantes por cromatografia de afinidade;
- ⇒ Testar a atividade das apirases em ensaios de hidrólise de nucleotídeos.



#### 4. METODOLOGIA

A Figura 6 representa o fluxo esquemático da metodologia empregada para alcançar os objetivos propostos neste trabalho. Deste modo, foram delineadas duas etapas principais, uma *in silico* por meio de abordagens computacionais e outra *in vitro* na produção e purificação das apirases recombinantes T1H8D6 e T1H852 de *R. prolixus*.



F

**Figura 6. Representação esquemática da metodologia empregada para as análises *in silico* e *in vitro* das apirases T1H8D6 e T1H852 de *R. prolixus*.** A metodologia empregada envolve o uso de abordagens *in vitro* e *in silico* para o estudo da apirase T1H8D6 de *R. prolixus*.

#### 4.1. ANÁLISES *IN SILICO* DAS SEQUÊNCIAS DAS APIRASES DE *RHODNIUS PROLIXUS*

As sequências putativas das apirases de *R. prolixus* (T1H852 e T1H8D6) foram obtidas por meio da plataforma Uniprot<sup>1</sup> (<https://www.uniprot.org>). A sequência da apirase de *H. sapiens* foi obtida pelas plataformas Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/structure/1S18>) e Uniprot (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8WVQ1/entry>). O alinhamento foi realizado pela plataforma MUSCLE (ClustalW) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) um programa que produz sequências de alinhamentos biologicamente significativos de sequências de DNA e proteínas divergentes entre si. As estruturas tridimensionais da apirase de *H. sapiens* e *R.*

*prolixus* foram feitas pelo software Pymol (<https://pymol.org/>). Além disso, para a predição de características físico-químicas da apirase, foram realizados testes *in silico* com o objetivo de conhecer tais propriedades. O servidor Signal P 5.0 foi utilizado para prever a existência de peptídeo sinal a partir da sequência de aminoácidos da proteína de interesse (Almagro Armenteros et al., 2019); Secretome P 2.0 indica a presença do peptídeo sinal a partir da via não clássica de secreção (Bendtsen et al., 2005); A predição dos motivos de N-glicosilação foi feita pela plataforma NetNGlyc (GUPTA; JUNG; BRUNAK, 2004) e NetOGlyc 4.0 usado pra prever sítios de O-glicosilação (Steentoft et al., 2013); TMHMM 2.0 (Möller, Croning, Apweiler, 2001) localiza a presença de domínios transmembrana; NetSurf 2.0 que prediz a estrutura secundária a partir da estrutura primária de uma proteína (Klausen et al., 2018); Esript 2.0 indica níveis de semelhança entre sequências de estruturas primárias e secundária (Robert; Gouet, 2014); NetPhos 3.1 faz a predição de resíduos de serina, tirosina e treonina fosforilados (Blom et al., 2004); GPS-Pail 2.0 para a predição de sítios de acetilação em lisinas (Deng et al., 2016); Alphafold2 para a modelagem da proteína e construção do modelo tridimensional da proteína (Mirdita et al., 2022); MEGA11 para a predição das relações filogenéticas das famílias de apirases (Tamura; Stecher; Kumar, 2021).

#### 4.2. CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS DE APIRASES DE RHODNIUS PROLIXUS NO VETOR DE EXPRESSÃO

As sequências das apirases de *R. prolixus* (Uniprot T1H8D6 e Uniprot T1H852) foram clonadas no vetor de expressão pET17b e disponibilizadas pelo Dr. José Marcos Ribeiro do *National Institutes of Health* (NIH), EUA. O plasmídeo foi códon otimizado para o sistema de expressão em *E. coli* de modo a melhorar a expressão da proteína recombinante. Para a clonagem do vetor de interesse pET17b (Figura 7), foram utilizadas as enzimas de restrição NdeI e XhoI para a inserção das sequências de DNA que codificam para as apirases de *R. prolixus*, com a adição de uma cauda 6XHis fusionada na porção C-terminal anterior ao códon de parada.

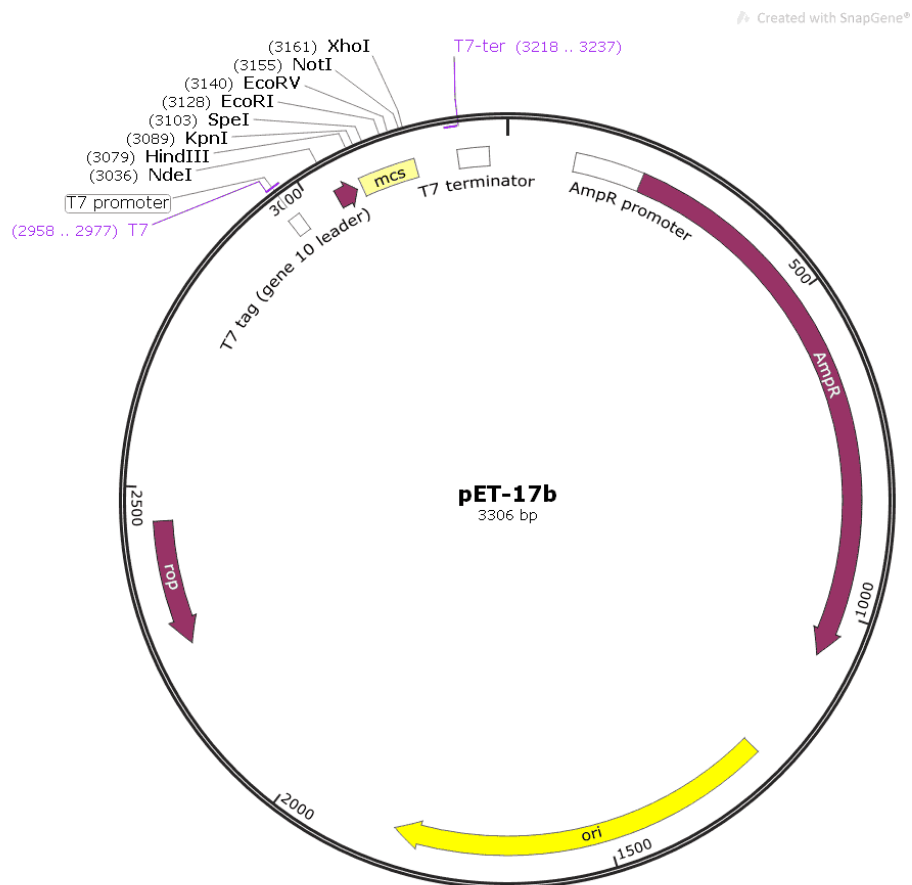


Figura 7. Representação do plasmídeo pET17b, usado neste estudo, com aproximadamente 3,3 kb.

#### 4.3. EXPRESSÃO DAS APIRASES DE *RHODNIUS PROLIXUS* EM *ESCHERICHIA COLI*

Após a clonagem das sequências no vetor, bactérias competentes de *E. coli* da cepa BL21 (DE3), foram utilizadas para a transformação. O método empregado foi o do choque térmico, que consiste em submeter as células competentes à mudança brusca de temperatura resultando na criação de poros na membrana, de modo a facilitar a entrada do DNA plasmidial no interior da célula (Froger; Hall, 2007). Resumidamente, as células competentes foram descongeladas em gelo por 15 min, em seguida foram incubadas com 10 ng de cada plasmídeo de interesse (contendo as sequências das apirases de *R. prolixus* Uniprot T1H8D6 ou Uniprot T1H852) e foram homogeneizadas com movimentos leves e incubadas por 30 min em gelo. Em seguida foram aquecidas em banho-maria a 42 °C, por 45 s. Depois

retornaram ao gelo por 2 min. Após esse tempo, foi adicionado às células competentes 1mL de Meio Luria Bertani (LB) ou *Super Optimal broth with Catabolite repression* (SOC), e as culturas foram incubadas sob agitação a 220 rpm (rotações por min), 37 °C por 1 h. Ao final, foram centrifugadas por 5 min a 500 x g e plaqueadas em meio LB Ágar contendo Ampicilina (100µg/mL) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C *overnight* (ON) por 16h.

Oito clones bacterianos transformados com o plasmídeo contendo a apirase T1H8D6 e três clones bacterianos transformados com o plasmídeo contendo a apirase T1H852 foram selecionados e cultivados em 5 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL), sob agitação constante a 220 rpm, 37° C até atingirem densidade óptica (OD) entre 0,4 e 0,6 mensuradas por meio de leitura da absorbância a 600 nm em espectrofotômetro (Pharmacia, England). Ao atingir a OD, adicionou-se 1mM de Isopropil-β-D-Tiogalactosídeo (IPTG) e as culturas foram mantidas sob agitação constante a 250 rpm, 37°C, por 3 h. O IPTG (N° 22331, Eppendorf), molécula análoga à β-galactosidase é um indutor da expressão bacteriana, que promove a dissociação do repressor *operon lac*, induzindo a expressão de T7-RNA polimerase que se ligará a região promotora e iniciará a transcrição gênica (Dekel; Alon, 2005). Ao término da incubação, as culturas foram centrifugadas a 14000 x g, 20 min, 4° C. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram mantidos a - 20°C antes da lise celular.

Para a lise bacteriana, o reagente BugBuster® Protein Extraction Reagent (TB245, Novagen) foi utilizado seguindo as recomendações do fabricante. À solução de Bugbuster (BB), foram adicionados um coquetel de inibidores de proteases 1x (Complete Mini EDTA free, Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) e benzonase 25U/µL. O inibidor de protease tem como finalidade inibir a degradação das proteínas presentes na amostra e a benzonase é uma endonuclease que degrada moléculas de DNA e RNA, conservando apenas as proteínas de interesse. A cada 50mL de cultura, recomenda-se o uso de 2,5 mL de BB. Em função do pequeno volume de cultura induzido para os testes iniciais, foi utilizada a proporção de 250 µL de BB para cada 5 mL. Resumidamente, os sedimentos foram ressuspensos em BB e mantidos em plataforma de agitação sob velocidade lenta por 10 min. Decorrido este tempo, estas foram submetidas a centrifugação 16000 x g, 20 min, 4°C. Em seguida, foram separadas em fração solúvel (sobrenadante) e fração insolúvel (se-

dimento). Os sedimentos foram ressuspensos na mesma quantidade de coquetel de lise que as amostras iniciais e mantidos a -20 °C.

O reagente BugBuster® (Novagen) também foi utilizado para a obtenção dos corpos de inclusão (CI) a partir das frações insolúveis, seguindo o manual do fabricante. Os CI caracterizam-se como agregados proteicos de proteínas insolúveis que se formam durante a expressão heteróloga de proteínas recombinantes. Ao expressar uma proteína recombinante em uma célula hospedeira, poderá haver problemas de dobramento (proteínas mal dobradas ou parcialmente dobradas) e solubilidade da proteína, resultando na formação dos CI. A preparação dos CI teve como objetivo a remoção de impurezas solúveis, eliminação de contaminantes e melhoria da pureza da proteína de interesse.

#### 4.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS APIRASES DE *RHODNIUS PROLIXUS* EM *ESCHERICHIA COLI*

A fim de verificar a expressão das apirases de *R. prolixus* (T1H852 e T1H8D6), as frações bacterianas solúvel e insolúvel foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e os géis corados por Coomassie Blue ou analisados por *western blotting*. As amostras foram diluídas em tampão de amostra 1X (Tris HCl 50mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%,  $\beta$ -Mercaptoetanol ( $\beta$ ME) 15 mM) e em seguida aquecidas em banho-seco a 95°C por 5 min, para a desnaturação das proteínas e para que adquiram cargas carregadas negativamente a fim de migrarem pelo complexo SDS-proteína. O gel de poliacrilamida foi preparado na concentração de 12%. As amostras foram aplicadas no gel e submetidas à voltagem inicial de 80V até passarem do gel concentrador e posteriormente correram a 120V no gel separador em tampão de corrida Tris Glicina (Tris HCl 25 mM pH 8.8, Glicina 250 mM e SDS 0,1%). Como padrão de massa molecular, foi utilizado o marcador *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific™).

Para a visualização das bandas das proteínas, o gel foi submerso em solução corante azul de Coomassie (Metanol 45%, ácido acético 10%, *Coomassie Brilliant Blue R-250*) por 40 min em plataforma sob agitação leve. Em seguida, a solução corante foi descartada em descarte apropriado e o gel foi descorado com solução descoran-

te (Metanol 10% e Ácido acético 10%) mantido em agitação lenta à temperatura ambiente até que fosse possível a visualização dos padrões de bandas proteicas no gel.

Para a análise por *western blotting*, após o término da corrida dos géis de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham™ Protran® Supported 0.45 NC, GE Healthcare) pelo sistema de transferência semi-seco (Biorad, TransBlot Turbo). Para confirmação da transferência das bandas de proteínas do gel para a membrana, esta foi corada com *Ponceau* (Ponceau S 2,62 mM, Ácido tricloroacético 183 mM, Ácido sulfossalicílico 118 mM) por 2 min e lavada com água destilada para retirar o excesso de corante. Após a completa descoloração do Ponceau, a membrana de NC foi bloqueada com solução de bloqueio contendo 5% de leite desnatado em tampão *Tris-Buffered Saline* (TBS) para impedir as ligações não específicas entre as proteínas e os anticorpos e posteriormente lavada com solução tampão *Tris-Buffered Saline* (T-TBS) contendo 0.1% (v/v) de Tween-20 (T-TBS). Após o bloqueio, a membrana foi sensibilizada com o anticorpo primário. O anticorpo primário utilizado foi o anti-His (Monoclonal anti-His Tag SAB1305538, Sigma) diluído em T-TBS na proporção 1:2000. A incubação com anti-His foi mantida sob agitação leve por 1 h, e então, membrana foi lavada com solução T-TBS por 4 vezes, cada uma delas por 5 min para remover ligações inespecíficas e anticorpos que não se ligaram a proteína. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-GAM diluído em T-TBS na proporção 1:5000, por 1h em agitação. Ao término da incubação a membrana foi lavada 7 vezes com tampão T-TBS e em seguida o western blotting foi revelado o reagente de detecção de quimioluminescência (Cytiva, RPN2232) no fotodocumentador (Fusion Solo X, Vilber).

#### 4.5. PURIFICAÇÃO DA APIRASE RECOMBINANTE DE *RHODNIUS PROLIXUS*

Após a confirmação da expressão das apirases recombinantes por western blotting, as frações dos lisados bacterianos foram usadas para purificação por cromatografia de afinidade ao níquel. A escolha do método de purificação por afinidade a íons metálicos mobilizados (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*) se deu pelo motivo de que o gene da proteína recombinante clonada no plasmídeo pET17b está fusionada com uma cauda de histidina (6xHis). A resina *HIS-Select Nickel Af-*

*finity Gel* (P6611, Sigma) é indicada para purificação de proteínas com cauda de histidina (His-tag), constituindo-se como um método mais eficiente para a purificação do extrato proteico de interesse.

A coluna foi preparada com resina HIS-Select Nickel Affnity Gel (P6611, Sigma) e lavada com água MiliQ para a eluição do etanol 20% em que a resina estava estocada. Posteriormente, foi equilibrada em Tampão de Equilíbrio (Tris HCl 50mM pH 8.0, 500 mM NaCl). Para iniciar o processo de purificação, foi adicionada à fração solúvel de um dos clones selecionados e coletou-se a fração não ligada (NL) à coluna. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com 15 volumes de coluna (VC) cada uma delas: Lavagem 1 (Tris HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM) e Lavagem 2 (Tris HCl 50mM pH 8.0, NaCl 500 mM, Imidazol 20mM) com o precipitado coletado. Após as lavagens, foram realizadas duas eluições, a primeira eluição com 5 VC (Tris HCl 50mM, NaCl 500 mM, Imidazol 200 mM) e a eluição final com 5 VC (Tris HCl 50mM, NaCl 500 mM, Imidazol 1,0 M).

Para a purificação da apirase recombinante (T1H8D6) dos corpos de inclusão, a amostra foi solubilizada com tampão contendo uréia (Tris 50mM, NaCl 500 mM e ureia 8 M), um agente desnaturante, e incubada em gelo durante 30 min. Inicialmente a coluna foi lavada com água deionizada 5VC para a retirada do etanol. Em seguida, equilibrada com tampão de equilíbrio 5VC (Tris 50 mM, NaCl 200 mM e uréia 8 M). A amostra foi aplicada e o não ligado foi coletado. A coluna foi lavada com 30 VC contendo tampão de lavagem (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, ureia 8 M e Imizadol 5 mM) e o lavado foi coletado. A eluição foi realizada com tampão de eluição (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, ureia 8 M e Imidazol 200 mM) em quatro frações de 500 µL.

#### 4.6. TESTE DE ATIVIDADE APIRÁSICA POR ZIMOGRAMA

O zimograma foi realizado em SDS-PAGE. As amostras foram diluídas em tampão de amostra de proteínas sem o agente redutor e não foram submetidas à fervura. Após a corrida de eletroforese a 4° C, o gel foi lavado duas vezes com uma solução contendo 2,5% Triton X-100 durante 20 min cada, seguidas por outras duas lavagens de 20 min em água ultrapura sob agitação leve e incubado em tampão de atividade (Tris HCl, 50 mM, pH 8.3, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM e ATP 5 mM) a temperatura ambiente por 16h, a fim de verificar a presença de um precipitado de

fosfato de cálcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) que confere coloração esbranquiçada às bandas reativas do gel. A saliva total de *R. prolixus* foi usada como controle positivo da reação.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. TESTES *IN SILICO*

#### 5.1.1. Alinhamento das sequências das apirases de *Rhodnius prolixus* com apirases de outros organismos

As sequências T1H8D6 e T1H852 de apirases de *R. prolixus* codificam para proteínas de 344 e 409 resíduos de aminoácidos de comprimento, com massas moleculares putativos de 39,700 e 46,895 kDa, e os pontos isoelétricos das proteínas (Pis) de 6,94 e 8,73 respectivamente (Tabela 1). As apirases T1H8D6 e T1H852 carregam um percentual de identidade de 61.05% entre si.

**Tabela 1. Características das sequências T1H8D6 e T1H852 de apirases de *R. prolixus*.**

Nome da proteína*	UniProt ID*	Tamanho (AA)	Massa molecular (kDa)	PI
<i>Uncharacterized protein</i>	T1H8D6	344	39,700	6,94
<i>Soluble calcium-activated nucleotidase 1</i>	T1H852	409	46,895	8,73

\*Dados Uniprot; AA = aminoácidos, PI = ponto isoelétrico

#### 5.1.2. A apirase T1H8D6 de *R. prolixus*

Embora o objetivo inicial fosse obter as duas apirases recombinantes T1H8D6 e T1H852 de *R. prolixus*, por razões ainda desconhecidas, a segunda apirase não foi expressa em sistema heterólogo. Deste modo, as análises *in silico* e *in vitro* se concentraram na apirase T1H8D6, já que foi possível expressá-la em sistema bacteriano.

Inicialmente, a apirase humana (Q8WVQ1) foi selecionada por ser melhor caracterizada na literatura com predições *in silico* e testes *in vitro* do seu modelo tridimensional. A human Soluble Calcium Nucleotidase (hSCAN) descrita por Dai e colaboradores (2014) não pertence as famílias de apirases 5' nucleotidase e CD39 sen-



do mais próxima estruturalmente à família Cimex. Outrossim, a apirase de *H. sapiens* cuja estrutura é conhecida revelou por meio das sobreposições das sequências, que os resíduos de aminoácidos mais importantes relacionados ao sítio catalítico da proteína e os motivos de ligação ao cálcio são conservados em *R. prolixus* e *C. lectularius*, enquanto um membro da família 5' nucleotidase *T. infestans* não possui o mesmo grau de identidade (Figura 8).

Quando submetidas a análise de BLAST a apirase T1H8D6 de *R. prolixus* com 344 resíduos de aminoácidos exibiu um grau de identidade de 51,06% com a sequência de *C. lectularius* (O96559.1) com 364 resíduos de aminoácidos.

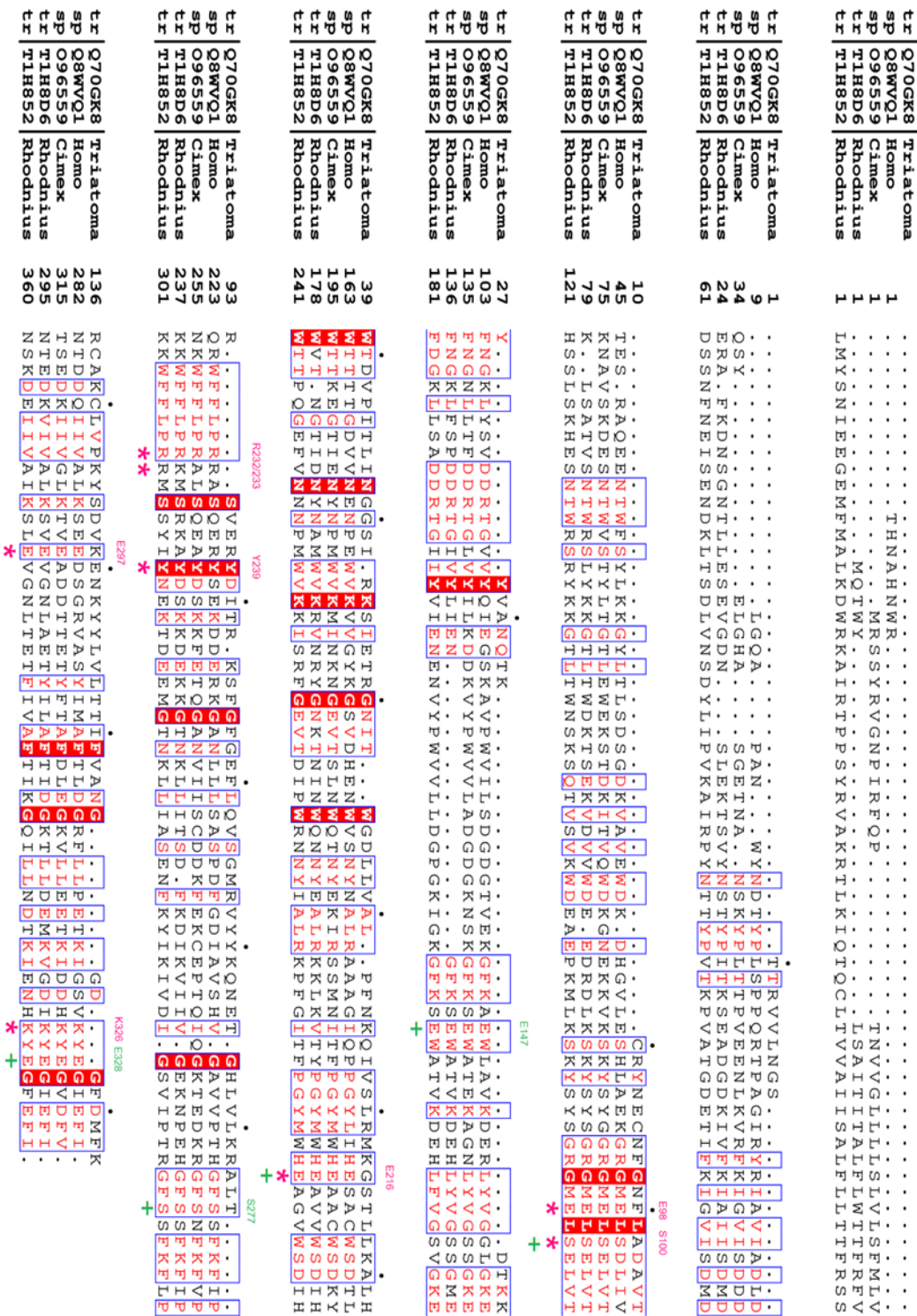


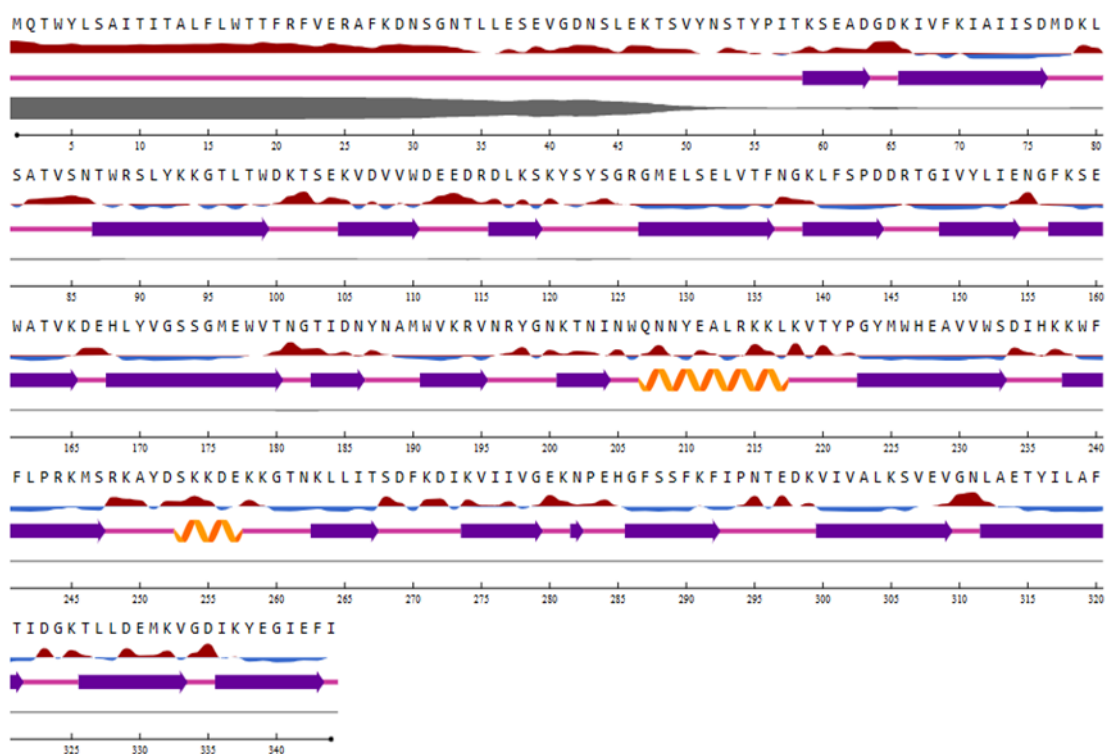
Figura 8. Alinhamento das sequências de apirases pela plataforma Esript 2.0. A sequência de aminoácidos cristalizada de *H. sapiens* (Uniprot - Q8WVQ1) foi alinhada com membro da família 5' nucleotidase *T. infestans* (Uniprot - Q70GK8), família Cimex *C. lectularius* (Uniprot - O96559) e famílias de apirases aparentadas à família Cimex, *M. musculus* (Uniprot - Q8VCF1), *R. prolixus* (Uniprot - T1H8D6) e (Uniprot - T1H852). Sequências alinhadas com realce em vermelho indicam aminoácidos conservados entre todas as espécies analisadas. Resíduos de aminoácidos em vermelho inseridos no box azul indicam aminoácidos bioquimicamente semelhantes entre si (>70%). Asteriscos rosas indicam motivos do centro de ligação a nucleotídeos e do sítio catalítico da apirase de *H. sapiens*. Sinal de adição verde revelam resíduos de aminoácidos que centralizam o íon

divalente  $\text{Ca}^{2+}$  formando uma alça de conexão no túnel central da  $\beta$ -propeller.

O alinhamento das sequências T1H8D6 e T1H852 das apirases de *R. prolixus* com as sequências de Cimex (O96559) e de *Homo sapiens* (Q8WVQ1) sugere um maior grau de identidade entre as sequências, enquanto *T. infestans* (Q70GK8) possui menor correspondência entre os resíduos de aminoácidos para os locais de ligação à nucleotídeos e ao íon divalente apresentando (Figura 8). Embora *R. prolixus* (T1H8D6, T1H852) e *T. infestans* (Q70GK8) sejam organismos que pertençam a uma mesma subfamília biológica, não pertencem à mesma família de proteínas apirases demonstrando que diferentes genes responsáveis por codificarem as apirases em triatomíneos evoluíram de forma independente entre os gêneros. (Hughes, 2013; Faudry, 2004).

### **5.1.3. Predição de estrutura secundária da apirase de *R. prolixus***

A predição da estrutura secundária da proteína foi realizada utilizando a plataforma NetSurfP 2.0. O servidor detalha a acessibilidade da superfície, a estrutura secundária e os graus de desordem dos ângulos phi/psi de uma sequência de resíduos de aminoácidos de uma proteína. O servidor gerou uma previsão com base nos 344 resíduos de aminoácidos, que resultaram na representação gráfica do modelo estrutural da conformação secundária da proteína contendo 2  $\alpha$ -hélices e 22 folhas- $\beta$  (Figura 9).



**Figura 9. Predição da estrutura secundária da apirase T1H8D6 de *R. prolixus* a partir da sequência primária utilizando a plataforma NetSurfP 2.0. As duas  $\alpha$ -hélices estão representadas em alaranjado, enquanto as vinte e três folhas- $\beta$  estão em roxo. As linhas vermelhas e azuis indicam a acessibilidade relativa da superfície, sendo que os picos (vermelhas) são as regiões de exposição, enquanto os vales (azuis) indicam regiões não expostas. A espessura das linhas cinzas indicam o grau de desordem de resíduos de aminoácidos que não adotam uma estrutura tridimensional fixa.**

A plataforma Esript 2.0 foi utilizada para comparar as estruturas secundárias das apirases de *R. prolixus* e *H. sapiens*. As duas sequências foram alinhadas pela plataforma Muscle Alignment e posteriormente, inseridas no Esript 2.0 para comparação das estruturas secundárias. A estrutura secundária da sequência de *H. sapiens* (330 resíduos a.a) possui 26 folhas  $\beta$  e duas  $\alpha$ -hélices apresentando domínio transmembrana entre os resíduos 71-401. O modelo tridimensional é constituído de folhas- $\beta$  antiparalelas, que formam uma estrutura de pás e um túnel central conhecida como  $\beta$ eta-propeller. A estrutura de *R. prolixus* (344 aa) possui 22 folhas- $\beta$  e duas  $\alpha$ -hélices, e apresenta regiões de sobreposição com a estrutura secundária da apirase de *H. sapiens*. As duas estruturas possuem em comum a sobreposição de 16 folhas  $\beta$  e duas alfa-hélices (Figura 10).

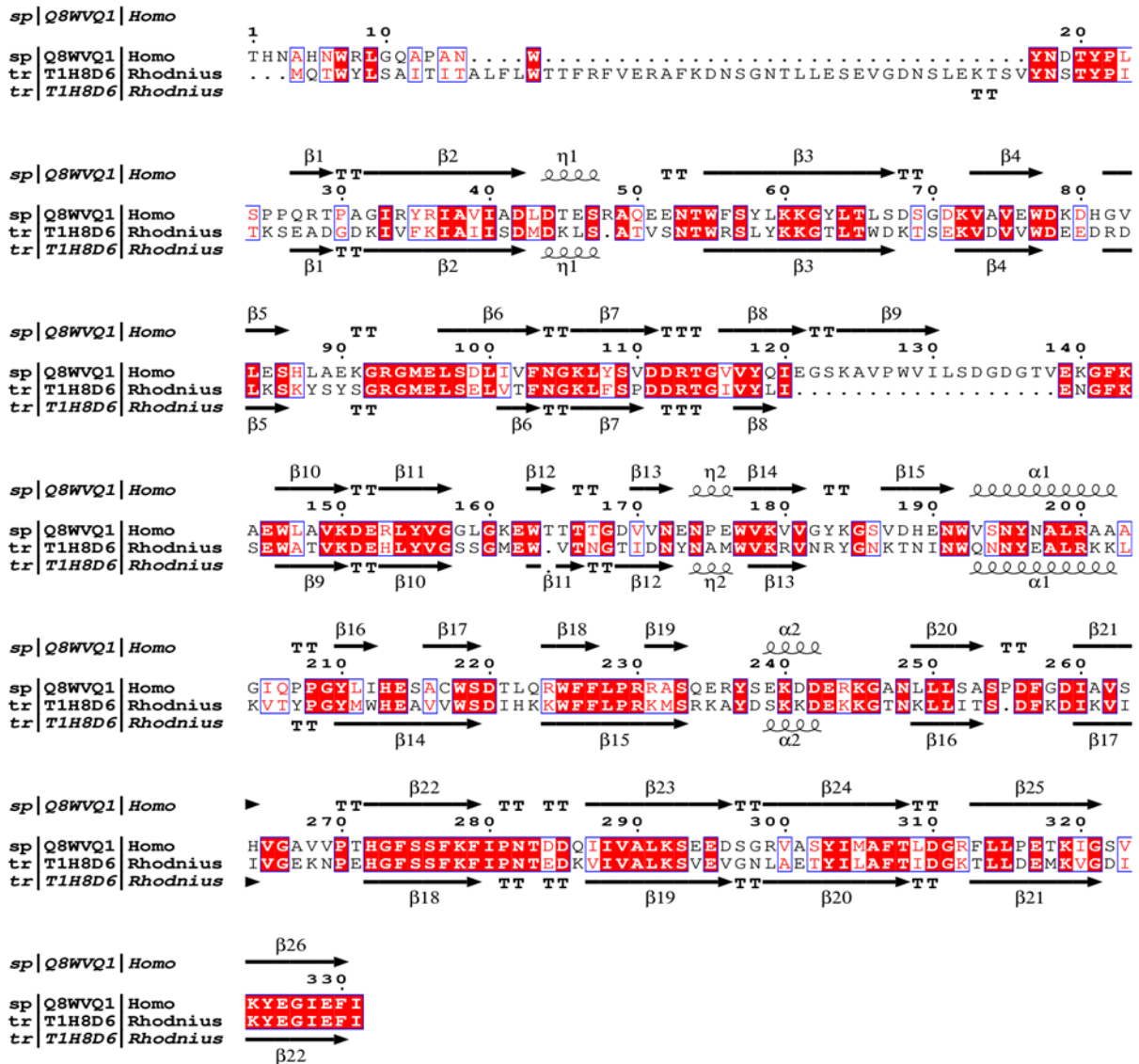
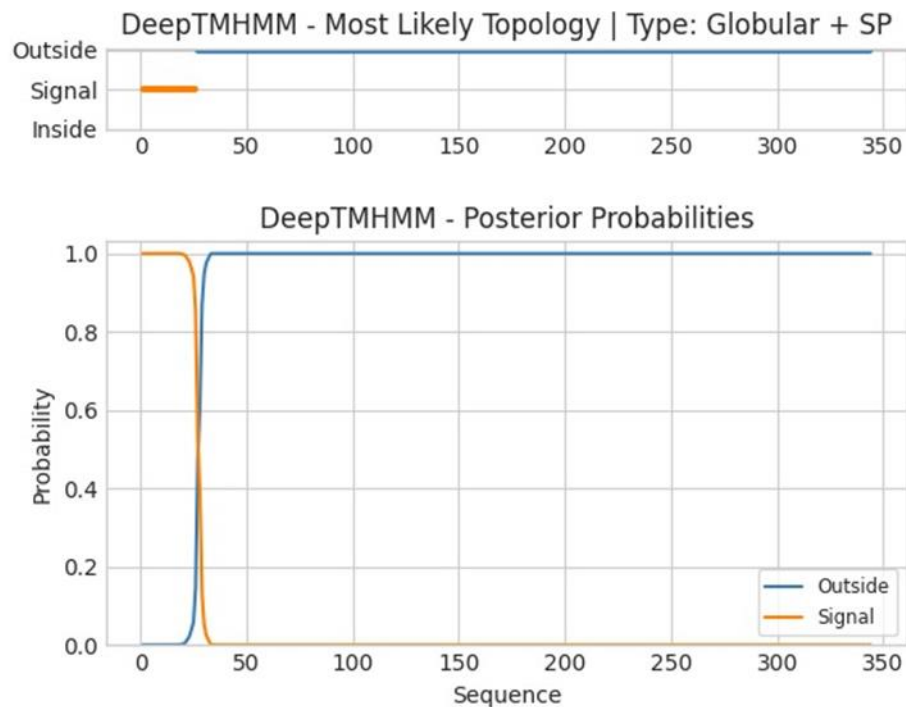


Figura 10. Predição das estruturas secundárias de apirases de *H. sapiens* (Q8WVQ1) e *R. prolixus* (T1H8D6). Estrutura secundária de *H. sapiens* no topo e *R. prolixus* na porção inferior. As setas indicam as folhas- $\beta$  e formas helicoidais indicam as  $\alpha$ -hélices das estruturas secundárias.

#### 5.1.4. Predição de domínios transmembrana da apirase T1H8D6 de *Rhodnius prolixus*

A plataforma Deep TMHMM foi utilizada para a predição de domínios transmembrana da apirase T1H8D6 de *R. prolixus*. Entretanto, não foram preditos domínios transmembrana para a sequência analisada. O gráfico gerado pela plataforma sugere a existência de peptídeo sinal entre os aminoácidos 1-26, e da proteína ma-

dura encontrar-se na porção externa da membrana considerando os resíduos de aminoácidos de 27 a 344. (Figura 11).



```
##gff-version 3
# tr|T1H8D6|T1H8D6_RHOPR Length: 344
# tr|T1H8D6|T1H8D6_RHOPR Number of predicted TMRs: 0
tr|T1H8D6|T1H8D6_RHOPR signal 1 26
tr|T1H8D6|T1H8D6_RHOPR outside 27 344
```

**Figura 11. Predição de domínio transmembrana para a apirase T1H8D6 de *R. prolixus* realizada na plataforma Deep TMHMM.** A sequência de aminoácidos 1-26 foi predita como sendo um peptídeo sinal (linha amarela), seguido da proteína madura 27-344 (linha azul). Não foram preditos domínios transmembrana para a sequência apirásica de *R. prolixus* analisada.

A plataforma Phobius (*Protein Functional Analysis - PFA*) também foi utilizada para a predição de domínios transmembrana e a presença de peptídeo sinal. Essa plataforma previu a existência de peptídeo sinal entre os aminoácidos 1-21 na porção N-terminal da proteína. A proteína madura compreende os aminoácidos 22-344 (Figura 12).

```

ID   tr|T1H8D6|T1H8D6_RHOPR
FT   SIGNAL          1    21
FT   DOMAIN          1     5      N-REGION.
FT   DOMAIN          6    16      H-REGION.
FT   DOMAIN         17    21      C-REGION.
FT   DOMAIN         22   344      NON CYTOPLASMIC.
//

```

Figura 12. Predição de domínio transmembrana e peptídeo sinal pela plataforma Phobius.

### 5.1.5. Predição de motivos de N-glicosilação na sequência da apirase T1H8D6 de *Rhodnius prolixus*

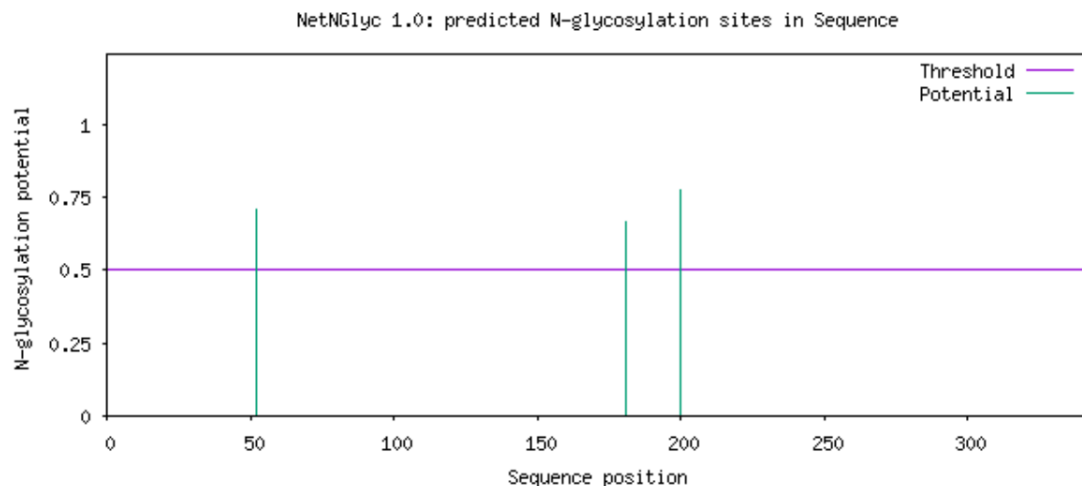
Para determinar o grau de N-glicosilação, foi realizada uma análise *in silico* da sequência da apirase T1H8D6 de *R. prolixus*. Esta revelou que a T1H8D6 contém pelo menos 3 motivos de N-glicosilação nas seguintes posições: 52 (NSTY), 181 (NGTI) e 200 (NKTN). É importante notar que a rede de nove servidores que apoiam a previsão dos motivos (coluna *Jury agreement*) apoiou igualmente (9/9) a previsão dos três motivos retornados para a proteína analisada. O potencial de N-glicosilação (0.5) foi considerado como ponto de corte (PC). Para uma alta especificidade de sítios de N-glicosilação, é necessário considerar motivos com resultados iguais ou maiores que (++) . As asparaginas previstas como N-glicosiladas são mostradas em vermelho e os aminoácidos potenciais em azul (Figura 13).

```

#####
Name: Sequence          Length: 344
MQTWYLSAITITALFLWTTFRFVERAFKDNSGNTLLESEVGDNSLEKTSVYNSYIPITKSEADGDKIVFKIAIISDMDKL      80
SATVSNWRSLYKKGTLTWDKTSEKVDVVWDEEDRDLSKYSYSGRMELSELVTFNGKLFSPDDRTGIVYLIENGFKSE      160
WATVKDEHLYVSSGMEWVTNGTIDNYNAMWVKRVNRYGNKTNINWQNNYEALRKKLKVTYPGYMWEAVVWSDIHKKWF      240
FLPRKMSRKAYDSKKDEKKGTKNLLITSDFKDIKVIIVGEKNPEHGFSSFKFIPNTEDKVIIVALKSVEVGNLAETIYILAF      320
TIDGKTLLEDKMGVDIKYEGIEFI
.....N.....      80
.....      160
.....N.....N.....      240
.....      320
.....      400

(Threshold=0.5)
-----
SeqName      Position  Potential  Jury      N-Glyc
              agreement result
-----
Sequence     52 NSTY    0.7051    (9/9)    ++
Sequence     181 NGTI    0.6637    (9/9)    ++
Sequence     200 NKTN    0.7746    (9/9)    +++
-----

```



**Figura 13. Predição dos motivos de N-glicosilação na apirase T1H8D6 *R. prolixus* na plataforma NetNGlyc 1.0.** O gráfico ilustra os locais de N-glicosilação previstos na proteína analisada. O eixo x representa o comprimento da proteína do N-terminal ao C-terminal enquanto o eixo y o potencial de N-glicosilação. Quando o ponto de corte (linha roxa) é cruzado por uma linha perpendicular (linha verde) o sítio é previsto como glicosilado.

#### 5.1.6. Predição de motivos de O-glicosilação na sequência da apirase T1H8D6 de *Rhodnius prolixus*

Para a predição dos motivos de O-glicosilação, que se refere principalmente à adição de glicanos aos resíduos de aminoácidos, principalmente à serina (S), treonina (T) e tirosina (Y), foi realizada uma análise *in silico* da apirase de T1H8D6 contém dois possíveis sítios de O-glicosilação nas posições 49 (Ser) e 53 (Ser) (Figura 13). A O-glicosilação se refere principalmente a adição de glicanos aos resíduos de aminoácidos, principalmente a serina (S), treonina (T) e tirosina (Y). Os parâmetros do servidor consideram o PC como 0.5, portanto, apenas os locais que obtiveram pontuações superiores ao PC foram previstos como glicosilados (Figura 14).



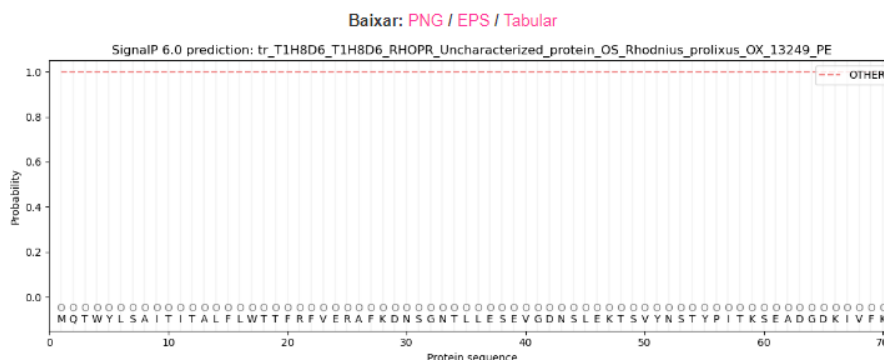
#Type Protein									
#seqname	source	feature	start	end	score	strand	frame	comment	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	3	3	0.0719708		3		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	7	7	0.043488		7		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	10	10	0.0370371		10		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	12	12	0.0210747		12		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	18	18	0.10522		18		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	19	19	0.112666		19		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	31	31	0.288933		31		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	34	34	0.0716724		34		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	38	38	0.257577		38		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	44	44	0.224011		44		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	48	48	0.313369		48		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	49	49	0.619734		49		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	53	53	0.863574		53		#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	54	54	0.279919		54		#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	58	58	0.187809		58		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	60	60	0.073263		60		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	75	75	0.0867195		75		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	81	81	0.0121072		81		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	83	83	0.0408106		83		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	85	85	0.0266571		85		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	87	87	0.0526245		87		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	90	90	0.127886		90		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	96	96	0.0201604		96		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	98	98	0.0192653		98		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	102	102	0.0055187		102		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	103	103	0.0138127		103		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	119	119	0.00936163		119		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	122	122	0.0172874		122		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	124	124	0.0541085		124		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	131	131	0.0192291		131		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	135	135	0.0324284		135		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	142	142	0.0270414		142		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	147	147	1.23144e-05		147		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	159	159	0.0120918		159		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	163	163	0.0323843		163		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	173	173	0.0489269		173		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	174	174	0.0446648		174		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	180	180	0.081683		180		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	183	183	0.0280933		183		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	202	202	0.0192315		202		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	220	220	0.106403		220		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	233	233	0.0129725		233		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	247	247	0.269232		247		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	253	253	0.255949		253		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	261	261	0.0250204		261		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	267	267	0.0393069		267		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	268	268	0.0647173		268		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	288	288	0.0295677		288		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	289	289	0.0421515		289		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	296	296	0.0201801		296		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	306	306	0.0140717		306		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	315	315	0.0100371		315		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	321	321	0.102404		321		.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	326	326	0.0189428		326		.

**Figura 14.** Predição de motivos de O-glicosilação da apirase T1H8D6 de *R. prolixus* na plataforma NetOGlyc 4.0. Pontuações superiores a 0.5 e marcadas com #POSITIVE são possíveis motivos de O-glicosilação para a sequência analisada.

### 5.1.7. Predição de peptídeo sinal na sequência da apirase de T1H8D6 de *Rhodnius prolixus*

Para a predição da presença do peptídeo sinal de secreção, bem como do sítio de clivagem, o programa SignalP 6.0 não foi capaz de prever a presença de peptídeo sinal para a sequência T1H8D6 analisada (Figura 15).

tr_T1H8D6_T1H8D6_RHOPR_Uncharacterized_p Previsão: Outro	Tipo de proteína protein OS Rhodnius prolixus	Outro OX 13249 PE	Peptídeo de Sinal (Seg/SPI)
	Probabilidade	1	0



**Figura 15. Predição de peptídeo sinal da apirase T1H8D6 de *R. prolixus* pela plataforma SignalP 6.0.** A plataforma SignalP 6.0 não foi capaz de prever a presença do peptídeo sinal de secreção para a sequência T1H8D6 de *R. prolixus*.

Entretanto, o programa SecretomeP 2.0 revelou a presença de peptídeo sinal. Quatro pontuações foram geradas pelo servidor: Network 1, Network 2, Network 3 e SecP score. O SecP score é o parâmetro determinante para análise da secreção pela via não clássica. Os padrões do servidor indicam a possibilidade de secreção pela via não clássica quando as pontuações de SecP são superiores a 0.6, sugerindo, portanto, que a apirase analisada não é secretada pela via não clássica de secreção (Figura 16).

Non-classically secreted proteins should obtain an NN-score / SecP score exceeding the threshold, but not at the same time be predicted to contain a signal peptide. The recommended thresholds are 0.5 for bacterial sequences and 0.6 for mammalian sequences.

*Note:* SecretomeP-2.0 occasionally fails without error messages and displays no results. If this happens, try submitting your data again.

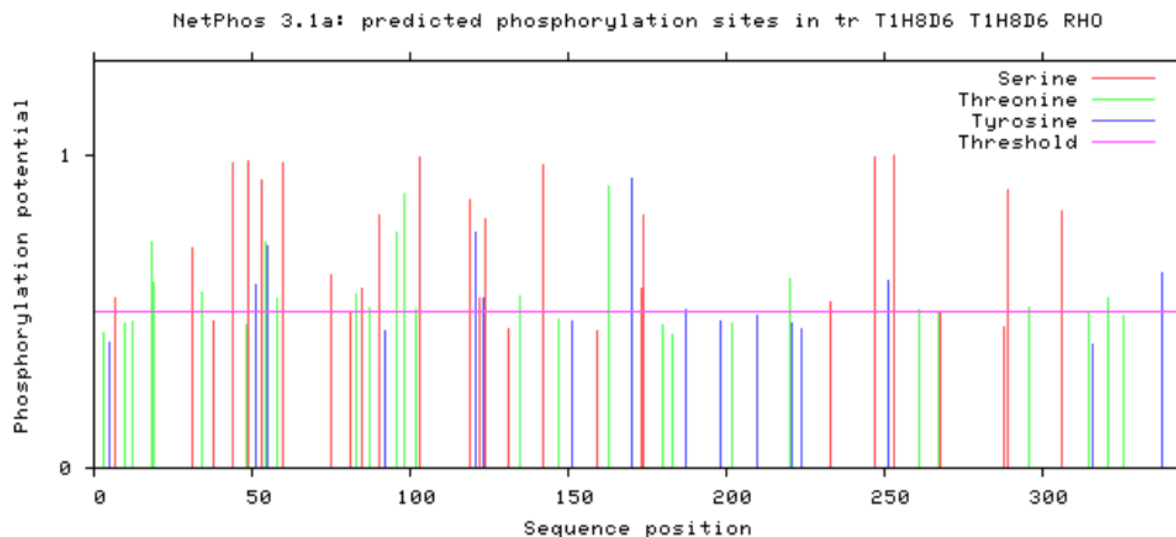
Network 1	Network 2	Network 3	SecP score	Sequence name
0.712795	0.072628	0.655205	0.480209	Sequence

**Figura 16. Análise da predição de secreção pela via não clássica utilizando o SecretomeP 2.0.** A plataforma SecretomeP não foi capaz de prever a secreção de peptídeo sinal pela via não clássica.

### 5.1.8. Predição de sítios de fosforilação na sequência da apirase T1H8D6 de *Rhodnius prolixus*.

Para determinar o grau de fosforilação, foi realizada uma análise *in silico* da sequência T1H8D6 de *R. prolixus*. Esta revelou que a T1H8D6 contém 46 sítios de fosforilação, a saber, 22 serinas (S), 8 tirosinas (Y) e 16 treoninas (T). O ponto de

corte do programa é de 0.5, sendo assim, resíduos de aminoácidos que ultrapassaram o limiar foram preditos como fosforilados (Figura 17)



**Figura 17. Predição dos sítios de fosforilação da apirase T1H8D6 de *R. prolixus*.** Barra horizontal representada em rosa indica o ponto de corte ou limiar. Resíduos de aminoácidos são preditos como fosforilados quando ultrapassam a barra horizontal. As barras verticais em vermelho indicam as serinas, em verde treoninas e em azul as tirosinas.

### 5.1.9. Predição de sítios de acetilação na sequência da apirase T1H8D6 de *Rhodnius prolixus*

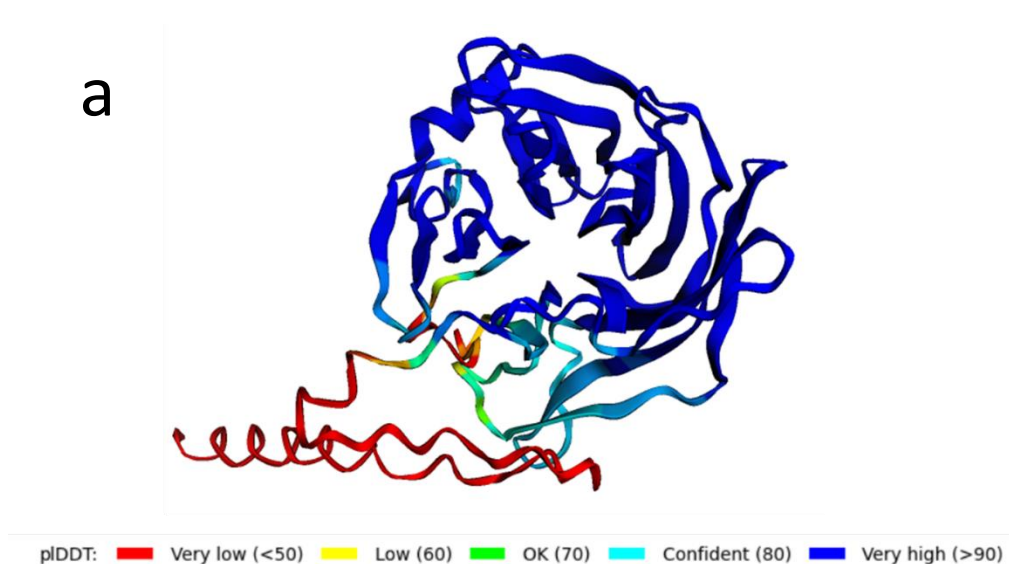
Para determinar outras modificações pós-traducionais como a predição de sítios de acetilação na apirase T1H8D6 de *R. prolixus*, foi utilizado a plataforma GPS-Pail 2.0. Esta retornou a quatro possíveis sítios de acetilação nos resíduos de aminoácidos 249, 255, 258 e 259 (Figura 18).

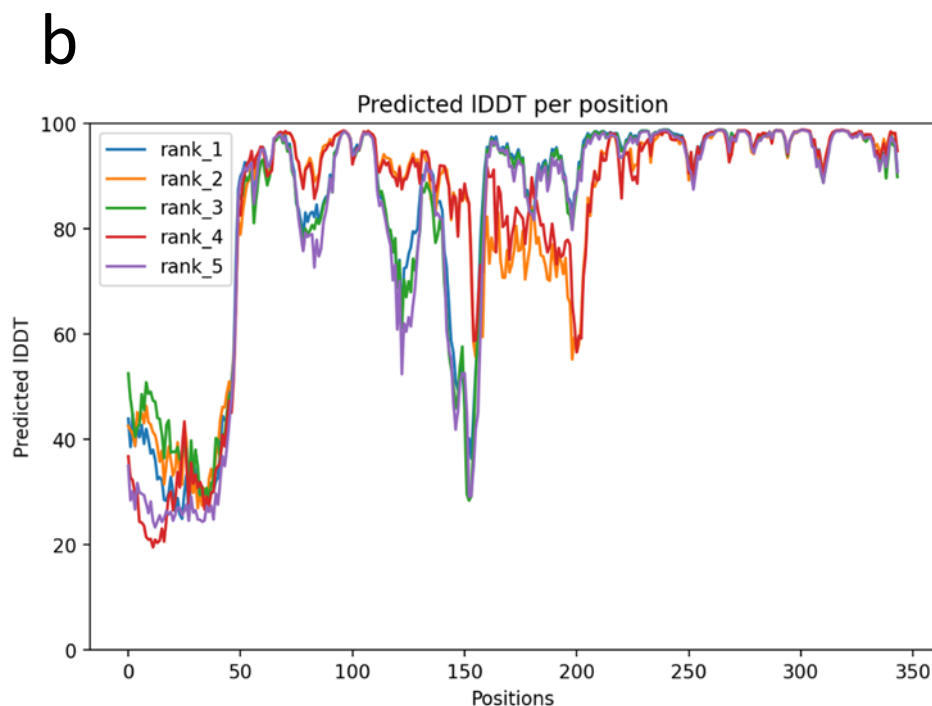
Position	Peptide	HAT	Score	Cutoff
249	LPRKMSRKA <del>Y</del> DSKKD	KAT2A	1,841	1,382
255	RFAYDSK <del>K</del> DERKGTN	KAT2A	1,783	1,382
258	YDSK <del>K</del> DEK <del>E</del> GTNELL	KAT2B	1,541	1,343
259	DSK <del>E</del> DEK <del>E</del> GTN <del>K</del> LLI	KAT2B	2,257	1,343

**Figura 18. Predição dos sítios de acetilação da sequência da apirase T1H8D6 de *R. prolixus*.** A plataforma GPS-Pail 2.0 previu a existência de quatro resíduos de aminoácidos acetilados nas posições 249, 255, 258 e 259.

### 5.1.10. Predição do modelo tridimensional da apirase T1H8D6 de *Rhodnius prolixus*

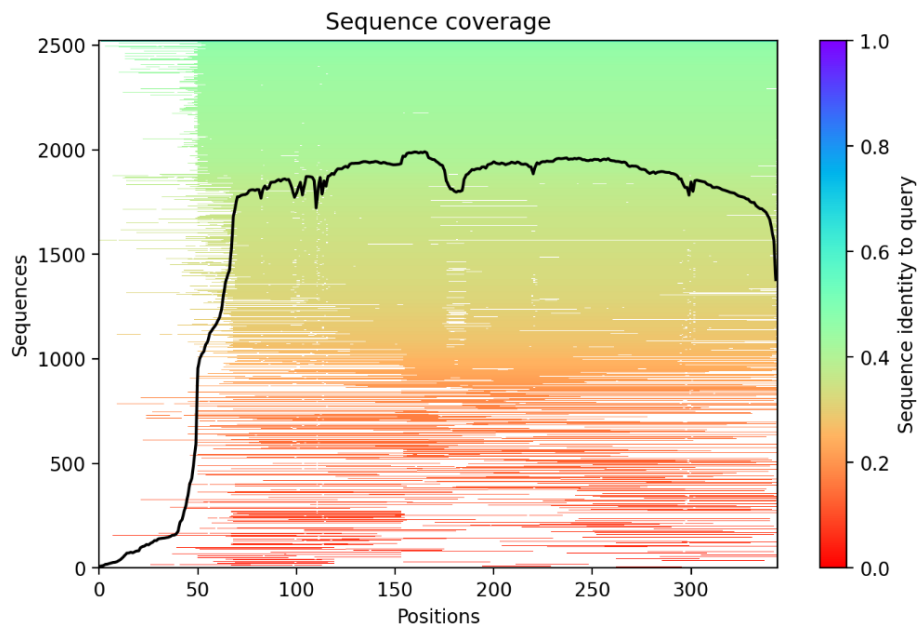
O modelo tridimensional da apirase T1H8D6 de *R. prolixus*, predito pelo programa AlphaFold 2 é apresentado na Figura 19-A, que mostra o pIcDDT obtido a partir da comparação entre cinco modelos (rank 1-5) que foram utilizados como referência para a predição do modelo tridimensional da apirase de T1H8D6 a partir da sequência fornecida. Os valores de pIcDDT maiores que 90 indicam que os modelos são muito precisos, e podem ser utilizados com maior confiança para a identificação e caracterização de sítios de ligação. Na figura 19-B, o eixo X indica a posição dos resíduos de aminoácidos da sequência fornecida e o eixo Y a métrica de comparação da estrutura com cinco modelos da rede de aprendizagem neural.





**Figura 19. Predição da estrutura tridimensional da apirase de *R. prolixus* (T1H8D6).** **a)** A métrica pIDDT é mensurada em percentual (0-100), onde valores abaixo de 50% são considerados como baixos (vermelho), 60% regular (amarelo), 70% bom (verde), 80% muito bom (ciano) e acima de 90% ótimo (azul marinho). **b)** Avaliação do teste da diferença entre a distância local de pares de átomos entre cinco modelos distintos. A predição do IDDT relaciona a posição dos resíduos de aminoácidos (eixo-x) com o nível de confiança que cada modelo produzido pelo ColabFold possui (eixo-y).

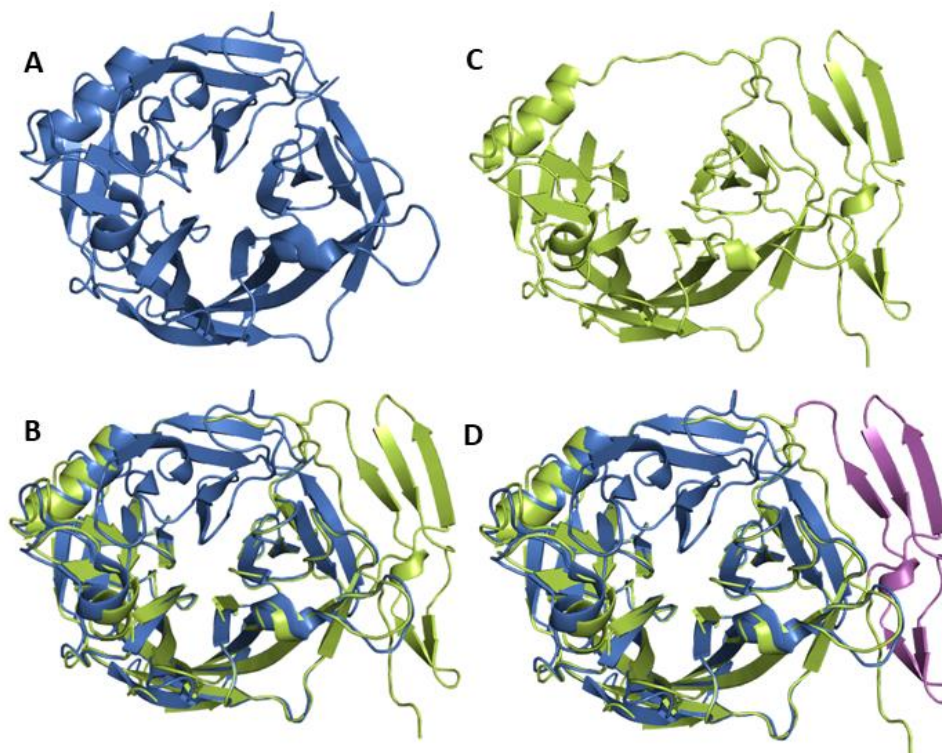
Aproximadamente pouco mais de 1500 sequências de apirases apresentam identidade com as sequências de *R. prolixus*, sendo que o grau de cobertura para a predição da estrutura da apirase T1H8D6 de *Rhodnius* varia entre 0.4 a 0.7. A linha preta no gráfico da Figura 19, que perpassa o gradiente indica o número médio de sequências encontradas (eixo-y) para cada posição dos aminoácidos (eixo-x) na sequência informada (Figura 20).



**Figura 20. Gráfico de cobertura de seqüências que compartilham graus de identidade com a seqüência de *R. prolixus*.** O eixo X indica a cobertura de seqüências possíveis que partilham algum grau de identidade com a apirase T1H8D6 de *R. prolixus*. No eixo Y, o gráfico de gradiente compara os graus de identidade das seqüências da rede neural com a apirase T1H8D6 de *R. prolixus*, os quais demonstram que nas posições 0-50 dos resíduos de aminoácidos da apirase há uma baixa similaridade com os modelos computacionais e entre os resíduos de aminoácidos 51- 344 os resíduos de aminoácidos representam uma maior identidade entre si (0.4 a 0,6) o que reflete em maior confiança na predição do modelo tridimensional.

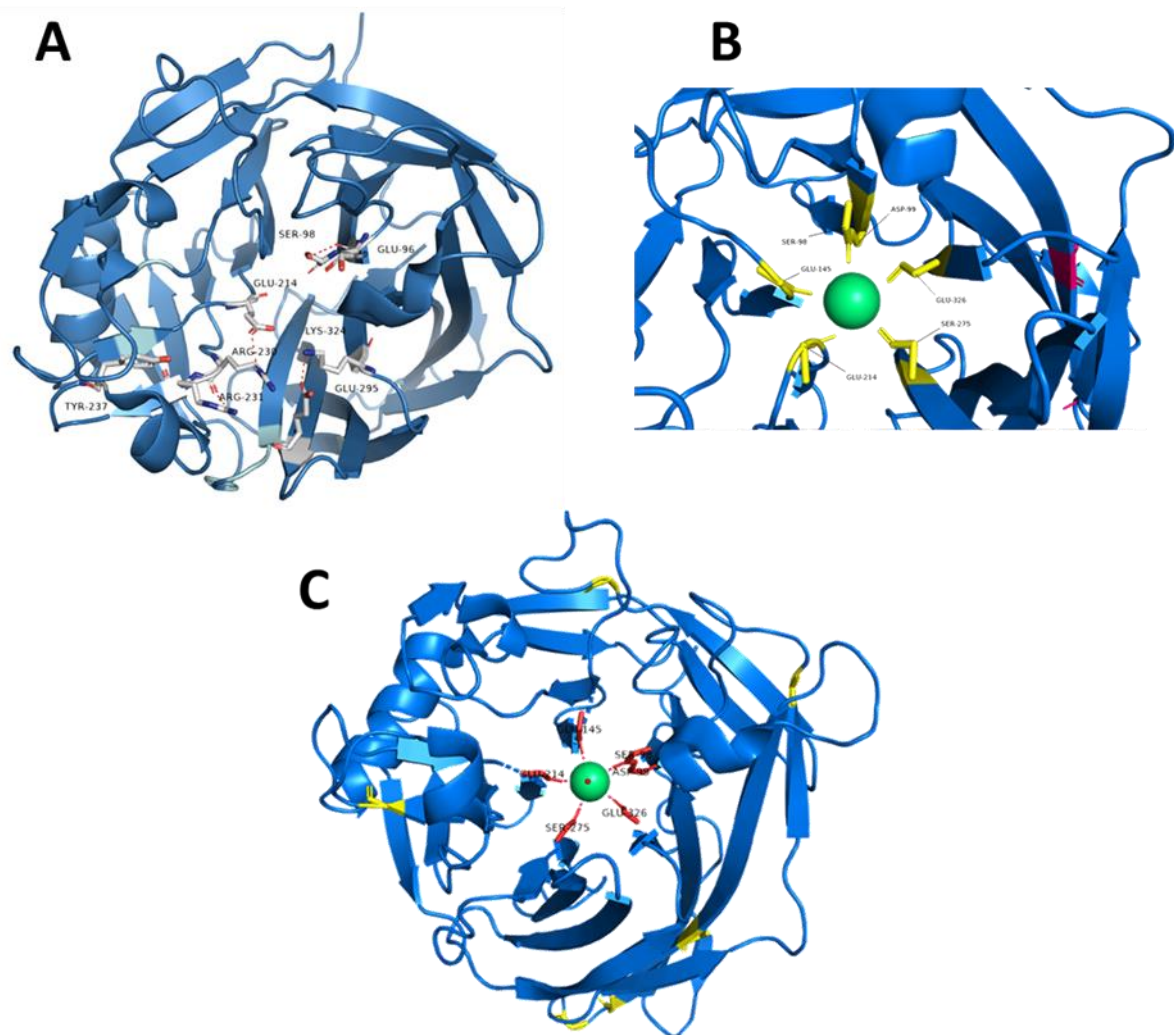
#### 5.1.11. Comparação entre as estruturas das apirases T1H8D6 de *Rhodnius prolixus* e a apirase Q8WVQ1 de *Homo sapiens*

O modelo da apirase T1H8D6 de *R. prolixus* foi comparado com a estrutura da apirase humana correspondente ao código Q8WVQ1 (Uniprot) e código PDB (*Protein Data Bank*) 1S18\_A, em sua forma monomérica, pelo programa Pymol utilizando o método padrão de alinhamento no qual o algoritmo do *software* alinha as estruturas utilizando duas etapas, a primeira alinhando as seqüências com o BLAST e a segunda com a matriz BLOSDUM62 para a detecção de resíduos que são correspondentes entre as estruturas (Figura 21)



**Figura 21. Comparação entre as estruturas tridimensionais da apirase cristalizada de *H. sapiens* codificado pelo gene CANT1 e de *R. prolixus* pela plataforma Pymol. (a) Estrutura da apirase de *H. sapiens* em azul, PDB 1S18 (Cadeia A); (b) Sobreposição das apirases de *R. prolixus* (verde) e *H. sapiens* (azul); (c) Estrutura da apirase de *R. prolixus* (verde) Uniprot, T1H8D6; (d) Sobreposição das estruturas de *R. prolixus* e *H. sapiens* com anotação em rosa de folhas- $\beta$  não alinhadas.**

O sítio catalítico da apirase humana é coordenada por oito resíduos de aminoácidos (Glu98, Ser100, Glu216, Arg232, Arg233, Tyr239, Glu297, Lys326), formando um bolsão de ligação para a clivagem do nucleotídeo (Figura 22 A). Um túnel central estabiliza o íon divalente  $\text{Ca}^{2+}$ , que desempenha um papel no sequestro do nucleotídeo a ser clivado pelo sítio catalítico da proteína (Ser100, Glu147, Ser277, Glu216, Glu328) (Figura 22 B e C).



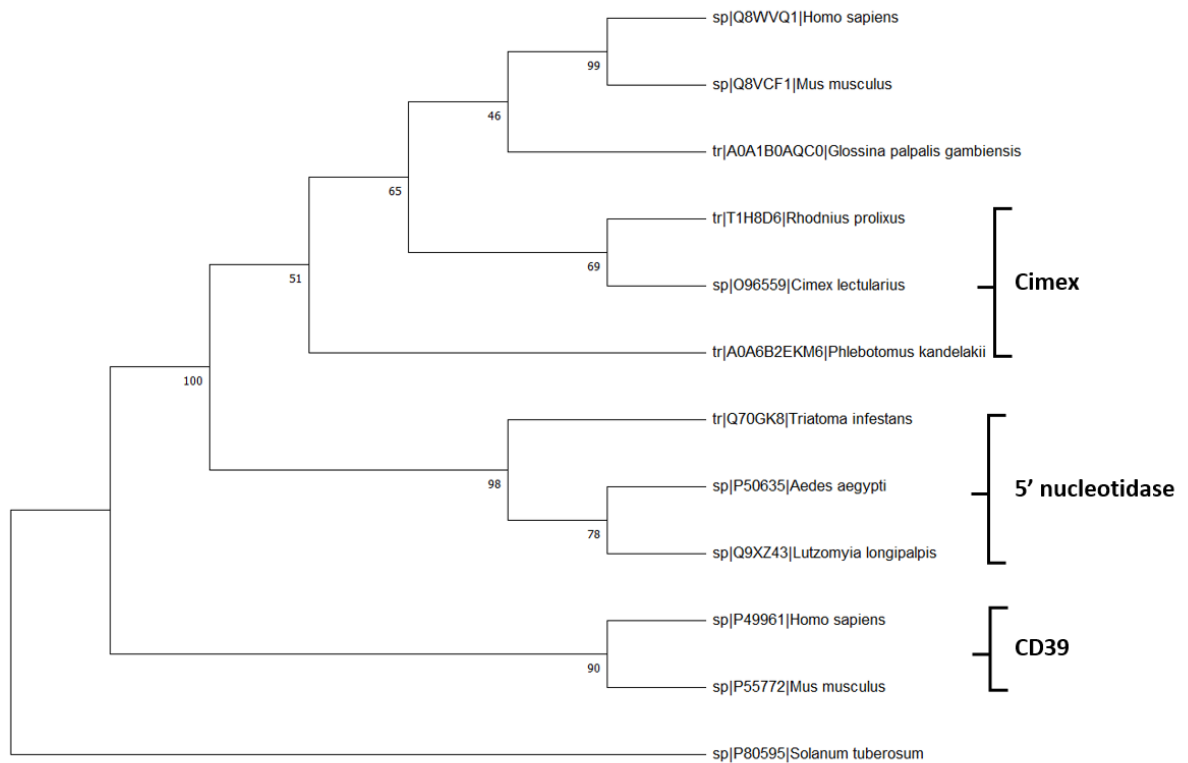
**Figura 22. Motivos de ligação ao sítio catalítico da proteína e de ligação ao Cálcio da apirase humana. (A)** Resíduos de aminoácidos representados em paus (sticks) formando o bolso de ligação à nucleotídeos; **(B)** Resíduos de aminoácidos em amarelo responsáveis pela estabilização do  $\text{Ca}^{2+}$  no túnel central (íon em verde); **(C)** Destaque para os resíduos Ser (S), Tyr (Y) e Thr (T) fosforilados (amarelo), além da demonstração de resíduos de aminoácidos que se ligam ao cálcio (vermelho).

### 5.1.12. Comparação filogenética da apirase T1H8D6 de *Rhodnius prolixus* com outras apirases

Com base na análise filogenética visualizada na (Figura 23), a sequência da apirase T1H8D6 de *R. prolixus* forma um clado com as sequências de *Cimex lectularius*\_ (O96559) e da espécie de flebotomíneo *Phlebotomus kandalakii*\_ (A0A6B2EKM6). Além disso, a apirase T1H8D6 DE *R. prolixus* foi agrupada separada da sequência Q70GK8 da apirase do triatomíneo *Triatoma infestans*, que



formou um clado com as sequências de apirases de *A. aegypti*\_P50635 e *Lutzomyia longipalpis*\_Q9XZ43, pertencentes à família 5' nucleotidases.



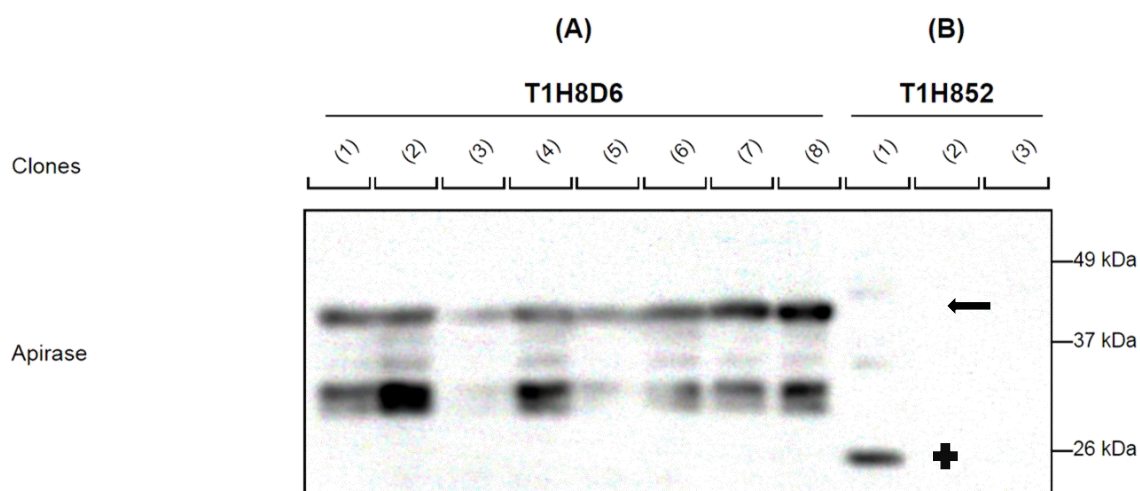
**Figura 23. Relações evolutivas entre as famílias de apirases de diferentes espécies.** O cladograma foi construído pelo software MEGA 11.0 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis). As sequências de aminoácidos dos organismos *Homo sapiens*\_Q8WVQ1; *Mus musculus*\_Q8VCF1; *Glossina palpalis gambiensis*\_A0A1B0AQC0; *Rhodnius prolixus*\_T1H8D6; *Cimex lectularius*\_O96559; *Phlebotomus kandelakii*\_A0A6B2EKM6; *Triatoma infestans*\_Q70GK8; *A. aegypti*\_P50635; *Lutzomyia longipalpis*\_Q9XZ43; *Homo sapiens*\_P49961; *Mus musculus*\_P55772; *Solanum tuberosum*\_P80595 foram submetidas para o programa e alinhadas internamente pelo Muscle. As relações filogenéticas foram analisadas pelo método de máxima verossimilhança entre as sequências de aminoácidos com um número de repetições de bootstrap igual a 1000.

Ao menos três membros de cada família de apirases foram selecionadas para compor o cladograma. As sequências escolhidas foram àquelas que apareceram nos primeiros resultados ao buscar pelas famílias de apirase Cimex, 5' nucleotidase e CD39 na plataforma Uniprot. Além disso, uma apirase vegetal de *Solanum tuberosum* (P80595) foi utilizada como controle negativo para validar a distância entre as famílias de apirases animais e vegetal.

## 5.2. EXPRESSÃO DAS APIRASES RECOMBINANTES DE *RHODNIUS PROLIXUS*

A linhagem de *E. coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo pET17b-apirase T1H8D6, após indução por IPTG, expressou proteínas com massas moleculares de aproximadamente 40 kDa, correspondendo ao tamanho esperado para essa apirase madura, conforme pode ser observado nos extratos celulares totais de oito clones bacterianos selecionados após a transformação. Apesar da banda no tamanho esperado, outras bandas também foram observadas entre 26 e 37 kDa, indicando uma possível degradação da proteína (Figura 24-A).

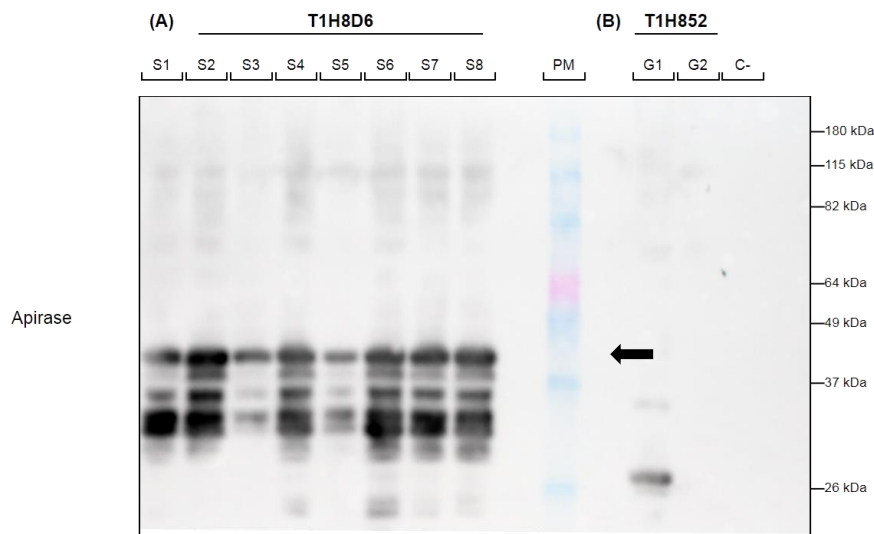
A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com o outro plasmídeo, o pET17b-apirase T1H852, após indução por IPTG, não expressou proteínas com massa molecular esperada, que era de aproximadamente 47 kDa, nos extratos celulares de dois clones bacterianos analisados. Em um dos clones (1), foram observadas bandas abaixo da massa molecular esperada (Figura 24-B).



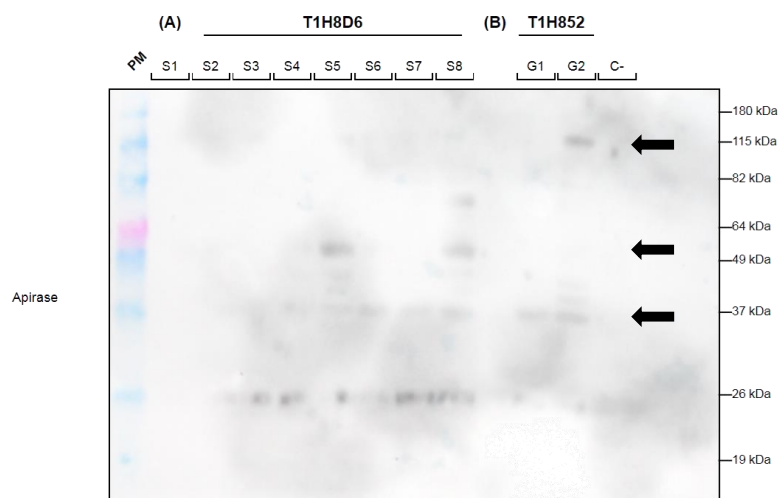
**Figura 24. Análise da expressão por western blotting de extrato total das Apirases T1H8D6 e T1H852 de *R. prolixus* marcados com anticorpo Anti-His na proporção 1:2000.** O extrato total foi obtido por meio de lise utilizando BugBuster, após indução com 1mM de IPTG nas condições padrões previamente descritos. **(A)** Expressão do extrato total da proteína recombinante após Lise das amostras dos clones (1 – 8) de T1H8D6 **(B)** Extrato total da proteína recombinante após Lise dos três clones (1 – 3) de T1H852. PM - O marcador de peso molecular - BenchMark™ Pre-Stained Protein, N° 10748010, Invitrogen. Seta demonstrando a altura esperada da apirase T1H8D6 com aproximadamente 40 kDa. Sinal de adição demonstrando a expressão da proteína T1H852 em tamanho abaixo do esperado, 50 kDa.

Posteriormente, foram separadas as frações insolúveis (FI) (Figura 25) e solúveis (FS) (Figura 26) dos clones selecionados. A expressão da apirase T1H8D6 recombinante foi expressa tanto na FI sob a forma de corpos de inclusão, como

também na FS onde foi possível observar dois padrões de expressão da proteína recombinante com tamanhos de 37 kDa e 50 kDa. Além disso, observou-se na FS da apirase T1H852 (clone G2) uma banda de aproximadamente 115 kDa um padrão de banda acima do esperado, que seria de aproximadamente 50 kDa. Outras tentativas de produzir a apirase recombinante na FS foram feitas, porém sem êxito (resultados não mostrados).



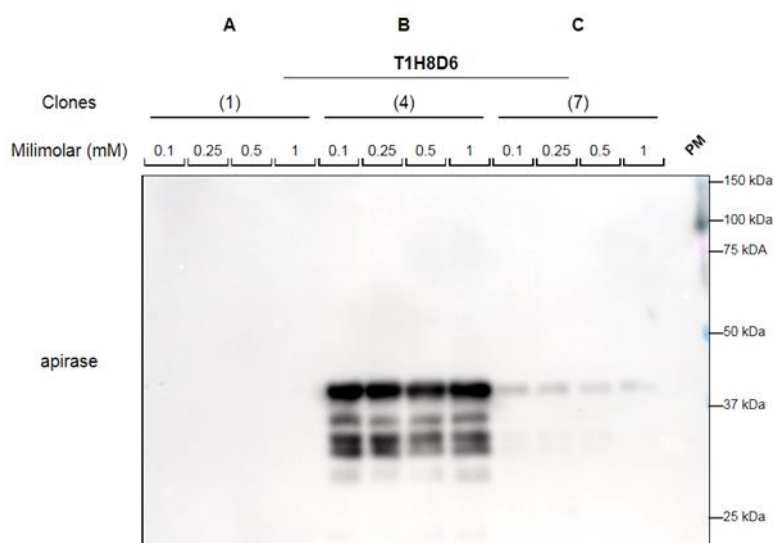
**Figura 25. Análise da expressão por Western Blotting da fração insolúvel das Apirases (TH18D6 e T1H852) de *R. prolixus* marcadas com anticorpo Anti-His na proporção 1:2000.** A seta demonstra os tamanhos esperados para TH18D6 (aproximadamente, 40kDa). **(a)** A porção salivar compreende as canaletas de S1-S8; PM - O marcador de peso molecular - BenchMark™ Pre-Stained Protein, N° 10748010, Invitrogen; **(b)** T1H852 nas canaletas (G1 e G2); Controle negativo, bactéria clonada com um plasmídeo sem expressão de proteínas (C-).



**Figura 26. Análise da expressão por Western Blotting da fração solúvel das Apirases T1H8D6 e T1H852 de *R. prolixus* marcadas com anticorpo Anti-His na proporção 1:2000.** PM - O marcador

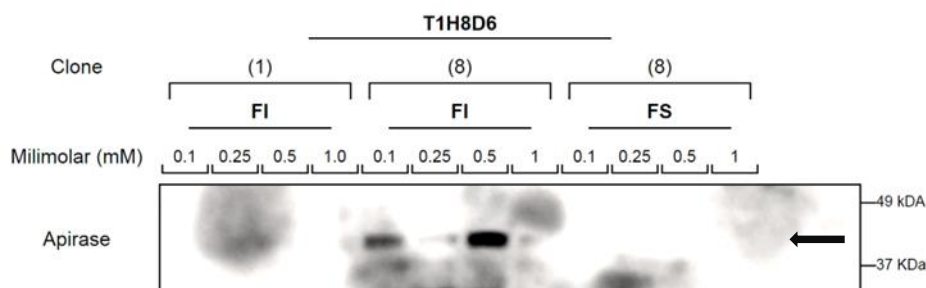
de peso molecular - BenchMark™ Pre-Stained Protein, N° 10748010, Invitrogen; **(a)** T1H8D6 compreende as canaletas de S1-S8; **(b)** T1H852 nas canaletas G1 e G2; Controle negativo, bactéria clonada com um plasmídeo sem expressão de proteínas (C-).

Visando otimizar a expressão da apirase T1H8D6 recombinante, variou-se a concentração do indutor IPTG (0.1, 0.25, 0.5 e 1.0 mM), entretanto não foram observadas diferenças aparentes quanto a expressão da proteína nas diferentes concentrações (Figura 27).



**Figura 27. Análise da expressão por Western Blotting da fração insolúvel em diferentes concentrações de IPTG (0.1, 0.25, 0.5, 1 mM) de T1H8D6 de *R. prolixus* clones 1, 4 e 7, marcados com anticorpo Anti-His na proporção 1:2000. (a) Clone 1 induzido em diferentes concentrações de IPTG; (b) Clone 4 induzido em diferentes concentrações de IPTG; (c) Clone 7 induzido em diferentes concentrações de IPTG; MW - O marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards, N° 1610374, Biorad.**

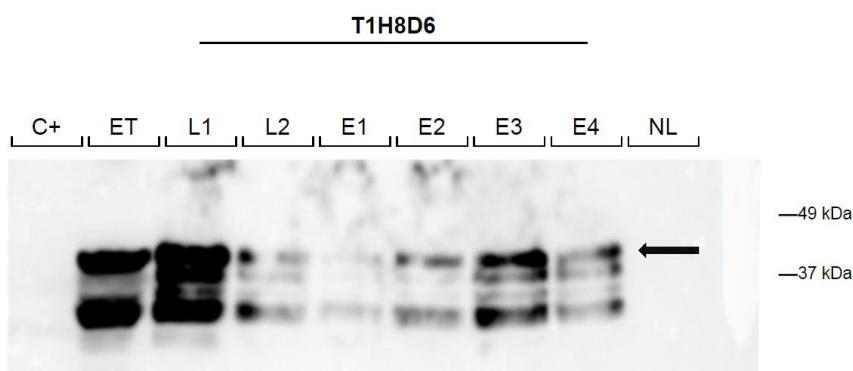
O clone 8 expressou a apirase T1H8D6 recombinante na presença de 0,1 a 1.0 mM de IPTG, apenas na fração insolúvel (FI) (Figura 28).



**Figura 28. Análise da expressão por Western Blotting da fração solúvel e insolúvel de T1H8D6 em diferentes concentrações de IPTG (0.1, 0.25, 0.5, 1 mM) da Apirase de *R. prolixus* clones 1 e 8.**

**8, marcadas com anticorpo Anti-His na proporção 1:2000. (a)** Frações insolúveis dos clones 1 e 8 em diferentes concentrações de IPTG; **(b)** Fração solúvel do clone 8 em diferentes concentrações de IPTG; PM - O marcador de peso molecular - BenchMark™ Pre-Stained Protein, N° 10748010, Invitrogen.

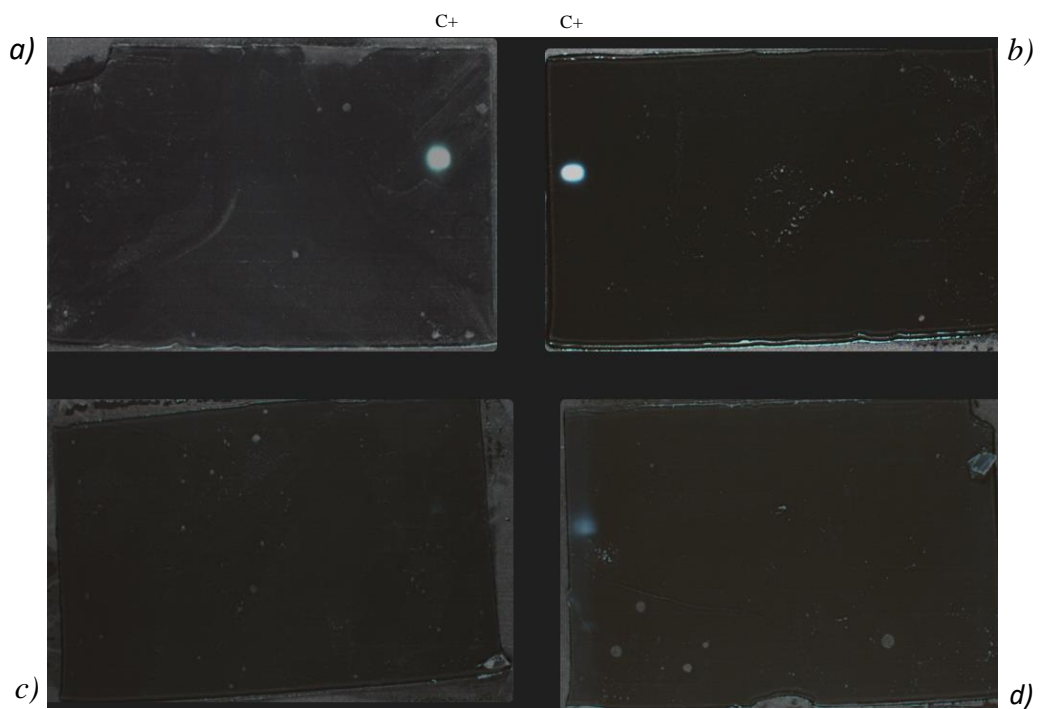
Não foi possível obter a apirase T1H8D6 solúvel e com alta pureza após purificação dos corpos de inclusão utilizando a tecnologia de purificação Ni-NTA, por esse motivo não se progrediu para diálise de gradiente de ureia adequado para renaturação. As proteínas foram eluídas durante as lavagens (L1), (L2) e nas eluições de E1 a E4. Não foi observada a presença da proteína no extrato não ligado (NL) (Figura 29)



**Figura 29. Análise da purificação dos Corpos de Inclusão de TH18D6 e verificação por Western Blotting marcados com anticorpo Anti-His na proporção 1:2000.** MW - PM - O marcador de peso molecular - BenchMark™ Pre-Stained Protein, N° 10748010, Invitrogen; C – Bactéria clonada com plasmídeo sem expressão de proteínas; ET – Extrato Total; L1 – Lavagem 1; L2 – Lavagem 2; E1 – Eluição 1; E2 – Eluição 2; E3 – Eluição 3; E4 – Eluição 4; NL – Não Ligado.

### **5.1.13. A apirase T1H8D6 recombinante de *R. prolixus* não apresentou atividade apirásica por zimograma**

A apirase T1H8D6 recombinante de *R. prolixus* não apresentou atividade difosfohidrolásica por zimograma. Quatro clones foram avaliados (1, 4, 7 e 8) tanto na fração solúvel (FS) como na fração insolúvel (FI) não sendo observada atividade apirásica da proteína recombinante, mostrando que apenas o controle positivo teve atividade ATPásica (C+) (Figura 30).



**Figura 30. Atividade de zimograma em gel 12% para detecção da atividade apirásica de T1H8D6 de *R. prolixus*.** (a) Gel de zimograma da fração insolúvel (FI) dos clones 1 e 4 da apirase recombinante de T1H8DE6 e como controle positivo a glândula salivar de *Rhodnius sp.* (b) Gel de zimograma da fração solúvel (FS) dos clones 1 e 4 da apirase recombinante de T1H8DE6 e como controle positivo a glândula salivar de *Rhodnius sp.* (c) Gel de zimograma da fração insolúvel (FI) dos clones 7 e 8 da apirase recombinante de T1H8DE6 e como controle positivo a glândula salivar de *Rhodnius prolixus* (d) Gel de zimograma da fração solúvel (FS) dos clones 7 e 8 da apirase recombinante de T1H8DE6 e como controle positivo a glândula salivar de *Rhodnius prolixus*.

## 6. DISCUSSÃO

As proteínas nas glândulas salivares de triatomíneos são indispensáveis para um maior sucesso na transmissão da DC, uma vez que aumentam a aptidão dos vetores para a transmissão do *T. cruzi* (Bentes, 2020; Hughes, 2013). O repertório de moléculas na saliva dos barbeiros é crucial para neutralizar a resposta imune do hospedeiro, e assim, garantir um sucesso alimentar durante o repasto sanguíneo (Ribeiro, 2004). Ao ancorar o aparelho picador-sugador causa-se uma laceração na pele do hospedeiro, o que desencadeia a exposição de fatores teciduais e colágeno assim como a liberação de grandes quantidades de nucleotídeos intracelulares, que são liberados por células lesionadas. O ADP liberado durante a injúria celular é um importante agonista da agregação plaquetária. Contudo, as proteínas salivares secretadas atuam inibindo a agregação plaquetária, promovendo a vasodilatação e um estado anti-inflamatório para facilitar o processo de ingurgitamento sanguíneo (Francischetti, 2010; Lavoipierre et al., 1959).

As apirases, enzimas que hidrolisam grupos fosfatos de nucleotídeos e nucleosídeos, são secretadas durante a alimentação, comumente atuando no catabolismo do ADP (Battastini; Schetinger, 2021; Plesner, 1995). Aqui, caracterizamos por bioinformática uma apirase das glândulas salivares do triatomíneo *R. prolixus*. A apirase T1H8D6 desse triatomíneo possui 40 kDa, contém duas  $\alpha$ -hélices e 22 folhas- $\beta$ , peptídeo sinal, não deve ser secretada pela via não-clássica, não apresenta domínios transmembrana, apresenta pelo menos três motivos de N-glicosilação e dois possíveis sítios de O-glicosilação, 46 sítios de fosforilação; forma um clado com as sequências de *Cimex lectularius*\_ (O96559) e da espécie de flebotomíneo *Phlebotomus kandelakii*\_ (A0A6B2EKM6), e não se agrupou com a sequência Q70GK8 de apirase do triatomíneo *Triatoma infestans*, pertencente à família 5' nucleotidase.

Embora não tão bem caracterizada, as análises computacionais da apirase de *R. prolixus* realizadas neste trabalho sugerem similaridade com a família de apirases Cimex. Tendo como referência a apirase de *H. sapiens* descrita por Dai e colaboradores (2014) as estruturas secundárias de *R. prolixus* compartilham os mesmos motivos de ligação à nucleotídeos e ao  $\text{Ca}^{2+}$ , que estão conservados entre as sequências analisadas. A partir do alinhamento das estruturas secundárias e da sobreposição dos modelos tridimensionais das estruturas, observou-se que a apirase

de *R. prolixus* se assemelha a família de apirases do percevejo *C. lectularius* em termos estruturais, dado que uma característica dessa família de apirases seria a estrutura de hélices  $\beta$  em forma de lâminas, modelo conhecido como  $\beta$ -propeller. O cladograma analisado (Figura 24) resgata relações de parentesco entre as espécies inferindo a origem de organismos a partir de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Conforme observado no cladograma, *R. prolixus* apresenta-se como grupo irmão de *C. lectularius* agrupados em um mesmo clado. Isso sugere que as duas espécies estabelecem uma relação mais próxima quando comparada às demais famílias de apirases 5' nucleotidase e CD39.

Curiosamente, a sequência de *R. prolixus* não possui cisteínas, e, portanto, não formam pontes dissulfeto. As proteínas quando apresentam pontes dissulfeto podem se tornar mais estáveis devido a presença de dois ou mais resíduos de cisteína que estabelecem ligações intermoleculares entre si. Dependendo da posição das cisteínas, as pontes dissulfeto auxiliam as proteínas em seu correto dobramento. Proteínas solúveis ou secretadas evidentemente precisam de maior estabilidade, uma vez que são afetadas por enzimas oxidantes e proteolíticas no citosol. Por este motivo, a formação de pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína podem resultar em uma melhor estabilidade da proteína semelhante à sua forma nativa. Por outro lado, modificações pós-traducionais como a ligação de pontes dissulfetos em sistema de expressão bacteriano podem representar um grande desafio, uma vez que *E. coli* está pouco adaptada a produzir tais modificações (Lobstein et al., 2012; Teixeira, 2012).

Em nosso grupo de pesquisa Faudry e colaboradores (2014) caracterizaram apirases de *T. infestans*, encontrando ao menos cinco apirases distintas no extrato salivar (88, 82, 79 e um duplete de 68-67 kDa), glicosiladas e que formam estruturas oligoméricas. Além disso, embora as apirases T1H8D6 e T1H852 de *R. prolixus* recombinantes sejam pouco elucidadas na literatura, trabalhos anteriores realizados também pelo nosso grupo de pesquisa identificaram as apirases salivares de *R. prolixus* por proteômica. O monômero da apirase salivar deveria apresentar um peso molecular de aproximadamente 45 kDa, o que condiz com a predição do peso molecular aproximado das duas sequências (T1H8D6 e T1H852). Os testes de atividade apirásica em Gel de Zimograma, demonstrou que as bandas proteicas entre 60 kDa e 130 kDa foram capazes de clivar nucleotídeos di e trifosfatos e ao menos cinco



bandas com atividade apirásica foram detectadas no extrato salivar total de *R. prolixus*, o que sugere a existência de isoformas da apirase salivar. (Rosa, 2014).

Os sistemas de produção de proteínas recombinantes em procariotos ainda são um grande desafio para a maioria das pesquisas científicas. A tecnologia do DNA recombinante em bactérias, principalmente em *E. coli* tem sido de grande utilidade para a caracterização bioquímica de proteínas, dado que esse sistema apresenta inúmeras vantagens como: otimização do tempo de expressão do crescimento de culturas, fácil manuseio e custo reduzido. Por outro lado, nem sempre é possível obter uma mesma expressão da proteína nativa de modo otimizado como essas proteínas são produzidas em suas condições selvagens devido à ausência de modificações pós-traducionais ou modificações inadequadas que podem ser impeditivos para que essas proteínas se tornem funcionais (Andersen; Krummem, 2002; Brodyk, 2009; Rosano; Ceccarelli, 2014; Young; Britton; Robinson, 2012).

As análises *in silico* da apirase de *R. prolixus* demonstraram que a proteína possui inúmeras modificações pós-traducionais como sítios de N -glicosilação, O-glicosilação e fosforilação. Outras modificações como palmitoilação (CSS-Palm 4.0), miristoilação (Expasy), não foram encontradas para a sequência analisada.

Comumente, deseja-se expressar a proteína recombinante ativa em sua forma solúvel sem que essa forme agregados celulares. O extrato solúvel, muitas vezes é um requisito para a caracterização de estudos funcionais, estruturais e bioquímicos de uma proteína. Adicionalmente, para uma boa parte das proteínas recombinantes expressas em sistemas heterólogos há a formação de agregados proteicos insolúveis ou também chamados de corpos de inclusão. Altos níveis de expressão gênica excedem a capacidade da célula de realizar o correto dobramento da proteína levando à formação dos CI e a baixa produção de chaperonas, proteínas que auxiliam no correto enovelamento de outras proteínas. (Corrêa, 2004; Rinas; Baynes, 1993; Rosano; Ceccarelli, 2014).

Neste trabalho buscou-se expressar as apirases recombinantes de *R. prolixus* T1H8D6 (~40 kDa) e T1H852 (~48 kDa) em sistema bacteriano, a 37°C, o que resultou na obtenção da proteína de aproximadamente 40 kDa (T1H8D6) nas frações solúvel e insolúvel, apresentando-se na forma de agregados celulares ou corpos de inclusão. Dong e colaboradores (2011) observaram que maior parte da apirase recombinante de *Aedes albopictus* encontra-se sob a forma de corpos de inclu-

são. Tais achados também foram condizentes com outros trabalhos que tentaram expressar a apirase recombinante em sistema heterólogo (Dias, 2016; Garcia, 2008; Karim; Lambert; Pioszak, 2023; Qiao; Pongsakul, 2015).

Agregados proteicos insolúveis de lisados celulares podem representar um grande desafio, dado que dificultam o processo de purificação e reenovelamento de proteínas. De acordo com Porowinska e colaboradores (2014) as tentativas de purificação das apirases a partir de suas fontes animais e vegetais muitas vezes não apresentam resultados satisfatórios, dado que, esses quase sempre se encontram em sua forma insolúvel e a atividade proteica é inativa. Além disso, em boa parte dos trabalhos, os ensaios de reenovelamento são requeridos.

Conhecidamente o ATP intracelular possui função energética para as células e tecidos do corpo humano. A maior parte do ATP encontra-se no interior das células, todavia essas moléculas podem ser liberadas para o meio extracelular de diversas formas, mais comumente por danos à membrana plasmática e inflamações. Ademais, o ATP também pode ser liberado de células intactas como por exemplo as células do sistema nervoso (Battastini; Zanin; Braganhol, 2011). Quando nucleotídeos tri e difosfatos estão no meio extracelular atuam como mensageiros/moléculas sinalizatórias, desencadeando respostas ao se ligarem aos seus receptores purinérgicos.

As formas em que essas enzimas são encontradas, varia de acordo com as suas famílias. A família CD39, possui dois domínios transmembrana e um sítio ativo voltado a porção extracelular (Zimmerman, 1999). A família 5' nucleotidase possui três formas, a mais comum delas encontra-se ancorada ao GPI da membrana plasmática, na forma solúvel e mais raramente com domínios transmembrana e sítio catalítico voltado à porção extracelular (Klemens et al., 1990; Zachowski; Evans; Paraf, 1987). Já a família de apirases do tipo Cimex são encontradas no extrato salivar de insetos hematófagos e secretadas, sobretudo como proteínas solúveis.

Os sistemas de produção de proteínas recombinantes em procariotos ainda são um grande desafio para a maioria das pesquisas científicas. A tecnologia do DNA recombinante em bactérias, principalmente em *E. coli* tem sido de grande utilidade para a caracterização bioquímica de proteínas, dado que esse sistema apresenta inúmeras vantagens como: otimização do tempo de expressão do crescimento de culturas, fácil manuseio e custo reduzido. Por outro lado, nem sempre é possível

obter uma mesma expressão da proteína nativa de modo fidedigno à forma em que essas proteínas são produzidas em suas condições selvagens, devido à ausência de modificações pós-traducionais ou modificações inadequadas que podem ser impeditivos para que essas proteínas se tornem funcionais (Andersen; Krummem, 2002; Brodyk, 2009; Rosano; Ceccarelli, 2014; Young; Britton; Robinson, 2012).

Para testar a atividade da apirase de *R. prolixus*, foi realizado o teste de atividade enzimática em gel de zimograma, não sendo encontrado nenhuma atividade da proteína expressa. Ademais, nas tentativas de purificação dos CI foi observado que a proteína interagiu fracamente à resina, saindo nas primeiras lavagens e eluições. Resultados similares também foram observados por Karim, Lambert e Pioszak (2022) ao tentarem purificar a apirase recombinante de *Solanum tuberosum*.

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo mostra que a apirase T1H8D6 de *R. prolixus*, de aproximadamente 40 kDa, contém duas  $\alpha$ -hélices e 22 folhas- $\beta$ , peptídeo sinal, não deve ser secretada pela via não-clássica, não apresenta domínios transmembrana, apresenta pelo menos três motivos de N-glicosilação e dois possíveis sítios de O-glicosilação, 46 sítios de fosforilação; forma um clado com as sequências de *Cimex lectularius*\_(O96559) e da espécie de flebotomíneo *Phlebotomus kandalakii*\_(A0A6B2EKM6), e não se agrupou com a sequência Q70GK8 de apirase do triatomíneo *Triatoma infestans*, pertencente à família 5' nucleotidase.

A apirase T1H8D6 recombinante de *R. prolixus* foi expressa em sistema de heterólogo *E. coli*, sendo possível obter a proteína na fração insolúvel formando agregados proteicos ou corpos de inclusão, e na fração solúvel. A proteína recombinante apresentou a massa molecular esperada de aproximadamente 40 kDa e foi detectada pela técnica de *western blotting*. Embora os corpos de inclusão tenham sido preparados com sucessivas lavagens e solubilizado em agente desnaturante, não foi possível realizar a purificação da proteína. A apirase T1H8D6 recombinante de *R. prolixus* não apresentou atividade difosfohidrolásica por zimograma. Por algum motivo ainda a ser investigado a apirase T1H852 recombinante de *R. prolixus* não foi expressa.

## 8. PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar testes de otimização da expressão da apirase T1H8D6 recombinante de *R. prolixus*;
- ✓ Purificar a apirase T1H8D6 recombinante de *R. prolixus* dos corpos de inclusão;
- ✓ Realizar ensaios de renaturação da apirase T1H8D6 recombinante de *R. prolixus* utilizando diferentes condições;
- ✓ Realizar testes de atividade apirásica pela liberação de fosfato inorgânico utilizando o método Fiske-Subbarow;
- ✓ Realizar testes de inibição da agregação plaquetária mediada pelo ADP.

## 9. REFERÊNCIAS

- AIRES, J. M. et al. Maxadilan (MAX)-Proteína salivar de *Lutzomyia longipalpis*: detecção de anticorpos antiMAX em leishmaniose tegumentar americana (LTA) e expressão gênica e protéica de MAX em *Lutzomyia neivai*. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 80, p. S333-S338, 2005.
- ALEVI, K. C. C. et al. Trends in taxonomy of Chagas disease vectors (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): From Linnaean to integrative taxonomy. **Pathogens**, v. 10, n. 12, p. 1627, 2021.
- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420-423, 2019.
- ALRASHDI, I. et al. Votucalis, a novel centrally sparing histamine-binding protein, attenuates histaminergic itch and neuropathic pain in mice. **Frontiers in pharmacology**, v. 13, p. 846683, 2022.
- ANDERSEN, D. C; KRUMMEN, L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 117-123, 2002.
- ANDERSEN, J. F. et al. The role of salivary lipocalins in blood feeding by *Rhodnius prolixus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America**, v. 58, n. 2, p. 97-105, 2005.
- ANDERSEN, J. F. et al. Insight into the Sialome of the Black Fly, *Simulium vittatum*. **Journal of proteome research**, v. 8, n. 3, p. 1474-1488, 2009.
- ANHÊ, A. C. B. et al. Estudo morfológico e ultraestrutural da glândula salivar de *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans* (Hemiptera, Triatominae). Tese de Doutorado. **Fiocruz**, 2011.
- BABU, M. M. et al. Shigella apyrase—a novel variant of bacterial acid phosphatases?. **FEBS letters**, v. 512, n. 1-3, p. 8-12, 2002.
- BHATTARAI, S.; et al. 2-Substituted  $\alpha$ ,  $\beta$ -methylene-ADP derivatives: Potent competitive ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibitors with variable binding modes. **Journal of medicinal chemistry**, v. 63, n. 6, p. 2941-2957, 2020.
- BATTASTINI, A. M., and SCHETINGER, M. R. C. O sistema purinérgico e a história das purinas. In: CARDOSO, A. M., MANFREDI, L. H., and MACIEL, S. F. V. O., eds. Sinalização purinérgica: implicações fisiopatológicas [online]. Chapecó: **Editora UFFS**, 2021, pp. 28-51.
- BENDTSEN, J. D. et al. Non-classical protein secretion in bacteria. **BMC microbiology**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2005.
- BHATTARAI, S. et al. 2-Substituted  $\alpha$ ,  $\beta$ -methylene-ADP derivatives: Potent competitive ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibitors with variable binding modes. **Journal of**

**medicinal chemistry**, v. 63, n. 6, p. 2941-2957, 2020.

BLAYA, C. et al. Análise da utilização dos novos inibidores da trombina na prática médica. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 71, p. 163-167, 1998.

BLOM, N. et al. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. **Proteomics**, v. 4, n. 6, p. 1633-1649, 2004.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological Control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International archives of allergy and immunology**, v. 114, n. 2, p. 103-110, 1997.

CAMPESATO, L. F. I. O silenciamento da ecto-5'-nucleotidase/CD73 altera a progressão de gliomas. Tese de Doutorado. 2010.

CARDOSO, A. M.; MANFREDI, L. H.; MACIEL, S. F. V. de O. Sinalização purinérgica: implicações fisiopatológicas. **Editora UFFS**, 2021.

CARVALHO, G. L. B. et al. Doença e Chagas: Sua transmissão através do consumo de açaí. **Acta de Ciências e Saúde**, v. 1, n. 1, p. 1-13, 2018.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHAMPAGNE, D. E. et al. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *A. aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 3, p. 694-698, 1995.

CHARNEAU, S. et al. The saliva proteome of the blood-feeding insect *Triatoma infestans* is rich in platelet-aggregation inhibitors. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 268, n. 2-3, p. 265-276, 2007.

COURA, José Rodrigues. Tripanosomose, doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 30-33, 2003.

CRUNKHORN, S. A apirase projetada evita a formação de coágulos. **Nat Rev Drugs Discov** 13, 725 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrd4444>

CORRÊA, E. M. Expressão heteróloga, purificação e caracterização das proteínas humanas DCRA (Down Syndrome Critical Region Gene A) e DSCR8 (Down Syndrome Critical Region Gene 8). 2004.

COSTA, T. M. de C. et al. Transcriptomas salivares e intestinais revelam proteínas específicas e expressão gênica diferencial em *Rhodnius neglectus* infectado e não infectado por *Trypanosoma cruzi*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2021.

DAI, J. et al. Structure and protein design of a human platelet function inhibitor. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 649-659, 2004.

DA SILVA, R. A. et al. Cuidados do domicílio pela população em área infestada por *Triatoma sordida*. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 34, n. 2, p. 267-267, 2010.

DE ARAUJO, C. N. et al. Interactome: Smart hematophagous triatomine salivary gland molecules counteract human hemostasis during meal acquisition. **J Proteomics**, v. 75, n. 13, p. 3829-41, Jul 16 2012. ISSN 1876-7737 (Electronic) 1874-3919

DEKEL, E; ALON, U. Optimality and evolutionary tuning of the expression level of a protein. **Nature**

, v. 436, n. 7050, p. 588-592, 2005.

DENG, S. et al. Hydrophobic cellulose films with excellent strength and toughness via ball milling activated acylation of microfibrillated cellulose. **Carbohydrate polymers**, v. 154, p. 129-138, 2016.

DE REZENDE, J. M.; RASSI, A. R. Por que os Triatomíneos são chamados de “barbeiros”? **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 37, n. 1, p. 75-83, 2008.

DENG, W. et al. GPS-PAIL: prediction of lysine acetyltransferase-specific modification sites from protein sequences. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 39787, 2016.

DIAS, JCP., and COURA, JR., org. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral [online]. Rio de Janeiro: **Editores FIOCRUZ**, 1997. 486 p. ISBN 85-85676- 31-0.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. S13-S22, 2007.

DIAS, L. C. et al. Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades. *Química Nova*, v. 36, p. 1552-1556, 2013.

DIOTAIUTI, L.; DIAS, J. C. P. Ocorrência e biologia do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em macaubeiras da periferia de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 293-301, 1984.

DIOTAIUTI, L. et al. Controle do *Triatoma sordida* no peridomicílio rural do município de Porteirinha, Minas Gerais, Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 3, n. 1, p. 21-25, 1998.

FAILER, B. U; BRAUN, N; ZIMMERMANN, H. Cloning, expression, and functional characterization of a Ca<sup>2+</sup>-dependent endoplasmic reticulum nucleoside diphosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 36978-36986, 2002.

FAUDRY, E. et al. *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 19607-19613, 2004.

- FERREIRA, L. F. et al. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. **Acta Tropica**, v. 75, n. 1, p. 79-84, 2000.
- FERREIRA, A. Z. L. et al. Metacyclogenesis as the Starting Point of Chagas Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 1, p. 117, 2023.
- FORATTINI, O. P. et al. Aspectos ecológicos da tripanossomose americana: II- Distribuição e dispersão local de triatomíneos em ecótopos naturais e artificiais. **Revista de Saúde Pública**, v. 5, p. 163-191, 1971.
- FORATTINI, O. P. et al. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana: XVII- Desenvolvimento da domiciliação triatomínea regional, em centro de endemismo de *Triatoma sordida*. **Revista de Saúde Pública**, v. 17, n. 3, p. 159-199, 1983.
- FORATTINI, O. P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, p. 964-998, 2006.
- FRANCISCHETTI, I. MB. Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1130-1144, 2010.
- FROGER, A; HALL, J. E. Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. **JoVE (Journal of visualized experiments)**, n. 6, p. e253, 2007.
- GALVÃO, C., org. Vetores da doença de chagas no Brasil [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, 289 p. **Zoologia: guias e manuais de identificação series**. ISBN 978-85-98203-09-6. Available from SciELO Books.
- GARCIA, E. S. et al. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 1, p. 11-21, 2007.
- GARCIA, J. C. L. Caracterização bioquímica e imunológica das enzimas recombinantes ATP-difosfolases 1 e 2 do parasita *Schistosoma mansoni*. 2008. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.
- GRINTHAL, A.; GUIDOTTI, G. Transmembrane domains confer different substrate specificities and adenosine diphosphate hydrolysis mechanisms on CD39, CD39L1, and chimeras. **Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1947-1956, 2002.
- GRINTHAL, A.; GUIDOTTI, G. CD39, NTPDase 1, is attached to the plasma membrane by two transmembrane domains. Why?. **Purinergic signalling**, v. 2, p. 391-398, 2006.
- GUPTA, R; BRUNAK, S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. In: **Biocomputing 2002**. 2001. p. 310-322.
- GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Distribuição geográfica, infestação domiciliar e infecção natural de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) no Estado do Piauí, Brasil, 2008. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 4, p. 57-64, 2010.



HARIDASS, E. T.; ANANTHAKRISHNAN, T. N. Functional morphology of the salivary system in some Reduviidae (Insecta-Heteroptera). In: **Proceedings of the Indian Academy of Sciences: Animal Sciences**. Indian Academy of Sciences, 1981. p. 145-160.

HASHIMOTO, K.; SCHOFIELD, C. J. Elimination of *Rhodnius prolixus* in central America. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 1-10, 2012.

HUGHES, A. L. Evolution of the salivary apyrases of blood-feeding arthropods. **Gene**, v. 527, n. 1, p. 123-130, 2013.

HWANG, W. S; WEIRAUCH, C. Evolutionary history of assassin bugs (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): insights from divergence dating and ancestral state reconstruction. **Journal PLOS One**. 2012.

KLAUSEN, K. et al. Cooperative control for multirotors transporting an unknown suspended load under environmental disturbances. **IEEE Transactions on Control Systems Technology**, v. 28, n. 2, p. 653-660, 2018.

KLEMENS, M. R. et al. Characterization of soluble vs membrane-bound human placental 5'-nucleotidase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 172, n. 3, p. 1371-1377, 1990.

KROPF, S. P. **Doença de Chagas, doença do Brasil: ciência, saúde e nação, 1909-1962**. Editora Fiocruz, 2009.

KÜNZLI, B. M. et al. Impact of CD39 and purinergic signalling on the growth and metastasis of colorectal cancer. **Purinergic signalling**, v. 7, p. 231-241, 2011.

LACOMBE, D. Anatomy and histology of salivary glands of triatomine bugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 557-564, 1999.

LAVOIEPIERRE, M. M. J. A description of the male and female of *Chorioptes crewei* Lavoipierre 1958 (Acarina: Psoroptidae), together with some remarks on the family Psoroptidae and a key to the genera contained in the family. **Acarologia**, v. 1, n. 3, p. 354-364, 1959.

LEAL, P. S.; DE OLIVEIRA, F. N. Transmissão vertical da doença de Chagas em gestantes. **Enfermagem Brasil**, v. 8, n. 6, p. 340-347, 2009.

LIMA, N. R. C. de et al. Distribuição, infecção natural e fontes alimentares de triatomíneos coletados em municípios do estado do Rio Grande do Sul e ações educativas na prevenção e vigilância da doença de chagas. Tese de Doutorado. Fiocruz, 2017.

LIYOU, N. et al. Localisation and functional studies on the 5'-nucleotidase of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental & applied acarology**, v. 24, p. 235-246, 2000

LOBSTEIN, J. et al. SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. **Microbial cell fac-**

**tories**, v. 11, p. 1-16, 2012.

LOMBARDO, F. et al. Promoter sequences of the putative *Anopheles gambiae* apyrase confer salivary gland expression in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 31, p. 23861-23868, 2000.

MACCORD, J.R.; JURBERG, P.; RAYMUNDO, J.S. Técnica para a observação do comportamento do *Triatoma infestans* (Klug, 1834) em uma miniatura de casa de pau-a-pique e sapê. **Mems Inst. Oswaldo Cruz** 78 (2) : 153- 163, 1983.

MANS, B. J. et al. Apyrase activity and platelet aggregation inhibitors in the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). **Experimental & applied acarology**, v. 22, p. 353-366, 1998.

MANS, B. J. et al. Purification and characterization of apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 120, n. 3, p. 617-624, 1998.

MANT, M. J.; PARKER, K. R. Two platelet aggregation inhibitors in tsetse (*Glossina*) saliva with studies of roles of thrombin and citrate in in vitro platelet aggregation. **British journal of haematology**, v. 48, n. 4, p. 601-608, 1981.

MARTINS, D. B. S. Expressão de antígenos salivares e avaliação da atividade apirásica salivar do triatomíneo *Rhodnius neglectus*, vetor da doença de Chagas. Dissertação de Mestrado. **Universidade de Brasília**, 2018.

MEYERHOF, O. The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 157, n. 1, p. 105-119, 1945.

MIRANDA, D. E. de Oliveira et al. Efeito do homogeneizado das glândulas salivares de *Migonemyia migonei* na infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em camundongos Balb. Tese de Doutorado. **Fiocruz**, 2021.

MIRDITA, M. et al. ColabFold: making protein folding accessible to all. **Nature methods**, v. 19, n. 6, p. 679-682, 2022.

MOECKEL, D. et al. Optimizing human apyrase to treat arterial thrombosis and limit reperfusion injury without increasing bleeding risk. **Science translational medicine**, v. 6, n. 248, p. 248ra105-248ra105, 2014.

MÖLLER, S; CRONING, M. DR; APWEILER, R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. **Bioinformatics**, v. 17, n. 7, p. 646-653, 2001.

MOLNAR, J. & LORAND, L. (1961) Studies on apyrases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 93, 353-363.

NEVES, D. P. Parasitologia humana. - 13. ed. – São Paulo: **Editores Atheneu**, 2016.

NEVOA, J. 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 Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006243, 2018.

PAIZ REYES, C. M. **Caracterización genética de los linajes de Trypanosoma cruzi encontrados en heces de los vectores Triatoma dimidiata y Rhodnius prolixus utilizando el gen de mini exón**. 2008. Tese de Doutorado. Universidad del Valle de Guatemala.

PERRUZZA, L. et al. The *Shigella flexneri* virulence factor apyrase is released inside eukaryotic cells to hijack host cell fate. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 6, p. e00775-23, 2023.

PINNAS, J. L. et al. Studies of kissing bug-sensitive patients: evidence for the lack of cross-reactivity between *Triatoma protracta* and *Triatoma rubida* salivary gland extracts. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 77, n. 2, p. 364-370, 1986.

PIRES, D. L. Identificação e caracterização funcional de atividade apirásica nas salivas de triatomíneos vetores da Doença de Chagas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de Brasília, 2006.

PLESNER, L. Ecto-ATPases: identities and functions. **International review of cytology**, v. 158, p. 141-214, 1995.

RASSI, A. et al. Clinical phases and forms of Chagas disease. In: **American Trypanosomiasis**. Elsevier, 2010. p. 709-741.

RIBEIRO, J. M. C.; GARCIA, E. S. The salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 26, n. 5, p. 303-307, 1980.

RIBEIRO, J. M. et al. Salivary apyrase of *A. aegypti*: characterization and secretory fate. **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**, v. 79, n. 1, p. 81-86, 1984.

RIBEIRO, J. M. C.; ROSSIGNOL, P. A.; SPIELMAN, A. Salivary gland apyrase determines probing time in anopheline mosquitoes. **Journal of insect physiology**, v. 31, n. 9, p. 689-692, 1985.

RIBEIRO, J. M. C et al. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 4, p. 599-610, 1998.

RIBEIRO, J. M. C. et al. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 34, n. 1, p. 61-79, 2004.

ROBERT, X; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic acids research**, v. 42, n. W1, p. W320-W324, 2014.

RODRIGUES, V. L. C. C. et al. Detecção de triatomíneos da espécie *Rhodnius neglectus* em área urbana de municípios da região de Araçatuba. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 63, p. 20-23, 2009.

- ROSA, M. C. D. Purificação parcial e caracterização da apirase salivar de *Rhodnius prolixus*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 2014.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.
- SANTIAGO, P. B. Descrição extensiva dos sialomas de *Rhodnius neglectus* e *Triatoma dimidiata*, vetores da doença de Chagas. Tese de Doutorado. **Universidade de Brasília**, 2017.
- SANTIAGO, P. B. et al. Proteomic mapping of multifunctional complexes within triatomine saliva. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 459, 2020.
- SANTOS, D. V. Sobre as Lipocalinas expressas em *Rhodnius prolixus*, um vetor da doença de Chagas. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2021.
- SARKIS, J. J. F.; GUIMARAES, J. A.; RIBEIRO, J. M. C. Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*. Kinetics and purification. **Biochemical Journal**, v. 233, n. 3, p. 885-891, 1986.
- SHIBATA, K. et al. Apyrase from pea stems: isolation, purification, characterization and identification of a NTPase from the cytoskeleton fraction of pea stem tissue. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 12, p. 881-888, 1999.
- SILVA, F. S. A importância hematofágica e parasitológica da saliva dos insetos hematófagos. **Revista Trópica–Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 3, n. 3, p. 3-17, 2009.
- SCHOFIELD, C. J. Biosystematics of the Triatominae. 1988.
- SCHOFIELD, C. J.; DIOTAIUTI, L; DUJARDIN, J.-P. The process of domestication in Triatominae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 375-378, 1999.
- SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta tropica**, v. 110, n. 2-3, p. 88-100, 2009.
- SMITH, T. M. et al. Cloning, expression, and characterization of a soluble calcium-activated nucleotidase, a human enzyme belonging to a new family of extracellular nucleotidases. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 406, n. 1, p. 105-115, 2002.
- STEENTOFT, C. et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. **The EMBO journal**, v. 32, n. 10, p. 1478-1488, 2013.
- STUTZER, C. et al. *Ornithodoros savignyi*: soft tick apyrase belongs to the 5'-nucleotidase family. **Experimental parasitology**, v. 122, n. 4, p. 318-327, 2009.
- TANG, L. et al. 5'-Nucleotidase plays a key role in uric acid metabolism of *Bombyx mori*. **Cells**, v. 10, n. 9, p. 2243, 2021.

TATSUNO, I. et al. Maxadilan specifically interacts with PAC1 receptor, which is a dominant form of PACAP/VIP family receptors in cultured rat cortical neurons. **Brain research**, v. 889, n. 1-2, p. 138-148, 2001.

TAMURA, K; STECHER, G; KUMAR, S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular biology and evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021.

TEIXEIRA, I. F. C. **Estudo de refolding oxidativo de proteínas**. Tese de Doutorado. Universidade do Algarve, 2012.

VADLAMANI, V. MK et al. Human soluble CD39 displays substrate inhibition in a substrate-specific manner. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 8958, 2023.

VALENZUELA, J. G. et al. Purification, cloning, and expression of an apyrase from the bed bug *Cimex lectularius*: A new type of nucleotide-binding enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 46, p. 30583-30590, 1998.

VALENZUELA, J. G. et al. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. 2, p. 229-237, 2001.

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p. S7-S12, 2000.

WANG, T.; GUIDOTTI, G. CD39 Is an Ecto-(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)-apyrase (\*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 17, p. 9898-9901, 1996.

WANG, Li et al. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 134, p. 365-372, 2008.

YOUNG, C. L.; BRITTON, Z. T.; ROBINSON, A. S. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. **Biotechnology journal**, v. 7, n. 5, p. 620-634, 2012.

ZANIN, R. F. et al. Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31205, 2012.

ZEBISCH, M. et al. Crystallographic evidence for a domain motion in rat nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) 1. **Journal of molecular biology**, v. 415, n. 2, p. 288-306, 2012.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic signalling**, v. 8, p. 437-502, 2012.

ZIMMERMANN, H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 6, p. 231-236, 1999.