



Universidade de Brasília Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**Caracterização *in silico* e avaliação da atividade anti-hemostática do antígeno 5
da saliva de *Rhodnius neglectus*, vetor da doença de Chagas**

GIULIA CAUSIN VIEIRA

Brasília - DF

2023

GIULIA CAUSIN VIEIRA

Caracterização *in silico* e avaliação da atividade anti-hemostática do antígeno 5 da saliva de *Rhodnius neglectus*, vetor da doença de Chagas

Orientadora: Dra. Carla Nunes de Araújo

Coorientadora: Dra. Paula Beatriz de Medeiros Santiago

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília - Faculdade de Medicina, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas.

Brasília - DF

2023

Pesquisa realizada no Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro (LIPH) - Departamento de Biologia Celular - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Apoio financeiro da FAP-DF, CAPES e CNPq.

Dedico este trabalho aos meus pais, Roberto Causin
Vieira e Maria de Fátima Causin Vieira.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fé que me sustenta e pela força que me dá para conquistar meus objetivos.

A toda minha família, em especial meus pais, que participaram da minha caminhada, estando presentes em todos os momentos, me auxiliando sempre em tudo que precisei e me dando suporte emocional. É muito gratificante poder compartilhar essa vitória com vocês.

A minha querida e admirável orientadora, Profa. Dra. Carla Nunes de Araújo, pela oportunidade que me deu de ingressar no mestrado, por ter me conduzido dentro da área de pesquisa científica, pelos ensinamentos valiosos e pela orientação de forma atenciosa, encorajadora e exemplar.

À Dra. Paula Beatriz de Medeiros Santiago, minha coorientadora, a quem pude contar com a ajuda em vários momentos. Agradeço pelo apoio, conselhos, ensinamentos e incentivo durante a realização do projeto.

Aos profissionais da educação, que de alguma forma fizeram parte de toda a minha carreira acadêmica e contribuíram para a minha formação. Quero deixar explícita minha profunda admiração por essa profissão. A minha conquista, hoje, só foi possível graças aos ensinamentos de vocês.

A todos os professores e colegas do Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro pelos conhecimentos compartilhados e momentos de aprendizado. Em especial, aos membros do grupo da saliva pelo apoio durante as atividades desenvolvidas neste trabalho.

Ao pesquisador Eric Faudry pelo suporte dado para realização dessa pesquisa e também pelos ensinamentos.

Aos meus amigos pelo incentivo e companheirismo. Não irei citá-los, pois sabem quem são.

Ao CNPq, CAPES e FAPDF (00193-00000825/2021-19) pelo financiamento deste trabalho, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília pela oportunidade de realização do mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui. Nunca desista do seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”

Albert Einstein

RESUMO

Os triatomíneos são insetos hematófagos transmissores do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Sua saliva é rica em compostos que neutralizam as respostas hemostáticas e imunológicas do hospedeiro. O antígeno 5 (Ag5), membro da superfamília CAP, composta por proteínas ricas em resíduos de cisteína (**CRISP** - *cysteine rich secretory proteins*), pelo **Antígeno 5** e por proteínas relacionadas à patogenicidade em plantas (**Pathogenesis-related** – PR1), foi relatado na saliva de artrópodes como responsável por causar fortes respostas alérgicas. Este estudo teve como objetivo caracterizar o antígeno 5 salivar de *Rhodnius neglectus* (RnAg5) através de abordagens de bioinformática, produzir o RnAg5 recombinante e avaliar seu potencial de inibir a hemostasia. Análises *in silico* foram realizadas para prever a presença de peptídeo sinal, localização celular e modificações pós-traducionais. A estrutura tridimensional (3D) do RnAg5 foi obtida através do servidor Alphafold, e os aminoácidos que compõem epítomos de células B foram preditos com os servidores ElliPro, BepiPred e SeRenDIP. Com a finalidade de priorizar ligantes promissores, foram realizados cálculos de *docking* molecular, com o servidor web DockThor. Afim de analisar a relação evolutiva de membros da família Ag5, foi realizada análise filogenética. A sequência Ag5 foi clonada no vetor pET100/D-TOPO e expressa em *Escherichia coli* Rosetta(DE3)pLysS com isopropil B-D-tiogalactopiranosídeo 1 mM a 37°C e purificada por cromatografia de afinidade de íons metálicos imobilizados. Posteriormente, foram realizados ensaios de coagulação sanguínea e agregação plaquetária na presença do RnAg5 recombinante para avaliar seu potencial inibitório. O RnAg5 demonstrou possuir um peptídeo sinal no N-terminal, sendo putativamente secretado pela via clássica, possuindo sítios de modificação pós-traducional. Visando o RnAg5 como um marcador de exposição a picadas de triatomíneos, foram identificados resíduos de aminoácidos que compõem epítomos lineares e epítomos conformacionais. O *docking* molecular indicou o fator de ativação de plaquetas, leucotrieno D4 e E4, prostaglandina I2, tromboxano A2 e prostaglandina E2 como potenciais ligantes do RnAg5. O RnAg5 recombinante foi expresso em corpos de inclusão e também na fração solúvel, sendo esse o primeiro estudo em que essa proteína foi expressa na fração solúvel através de sistema heterólogo de expressão procaríoto. A expressão da proteína recombinante foi confirmada por *western blotting* utilizando anticorpo anti-histidina. Apesar do RnAg5 recombinante não ter apresentado atividade anticoagulante ou inibidora da agressão plaquetária nesse estudo, os resultados computacionais abrem perspectivas do seu potencial biotecnológico.

Palavras-chaves: Antígeno 5; *Rhodnius neglectus*; bioinformática estrutural de proteínas; proteína recombinante; anticoagulante; antiagregante plaquetário.

ABSTRACT

Triatomines are hematophagous insects that transmit the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. Their saliva is rich in compounds that counteract host hemostatic and immune responses. Antigen 5 (Ag5), a member of Cysteine-Rich Secretory Proteins, Antigen 5 and Pathogenesis-Related 1 Proteins (CAP) superfamily, has been reported in arthropod saliva as responsible for causing strong allergic responses. This study aimed to characterize *Rhodnius neglectus* salivary antigen 5 (RnAg5) through bioinformatics approaches, produce recombinant RnAg5 and evaluate its potential to inhibit hemostasis. In silico analyzes were performed to predict signal peptide presence, cellular localization and post-translational modifications. The three-dimensional (3D) structure of RnAg5 was obtained using the AlphaFold server, and the amino acids that compose B cell epitopes were predicted using the ElliPro, BepiPred and SeRenDIP servers. In order to identify promising ligands, molecular docking calculations were performed with the DockThor web server. In order to analyze the evolutionary relationship of members of the Ag5 family, phylogenetic analysis was also performed. The Ag5 sequence was cloned into the pET100/D-TOPO vector and expressed in *Escherichia coli* Rosetta(DE3)pLysS with 1 mM isopropyl B-D-thiogalactopyranoside at 37°C and purified by immobilized metal ion affinity chromatography. Subsequently, coagulation and platelet aggregation assays were performed in the presence of recombinant RnAg5 to evaluate its inhibitory potential. RnAg5 has been shown to have a signal peptide at the N-terminus, putatively being secreted by the classical pathway, with post-translational modification sites. Aiming for a marker of exposure to triatomine bites, were identified amino acid residues that form linear epitopes and conformational epitopes. Molecular docking indicated platelet activating factor, leukotriene D4 and E4, prostaglandin I2, thromboxane A2 and prostaglandin E2 as potential ligands for RnAg5. Recombinant RnAg5 was expressed in inclusion bodies and also in the soluble fraction, this being the first study in which this protein was expressed in the soluble fraction using a heterologous prokaryotic expression system. Recombinant protein expression was confirmed by western blotting using anti-histidine tag antibody. Although recombinant RnAg5 did not show anticoagulant or platelet inhibitory activity in this study, the computational results open up perspectives on its biotechnological potential.

Keywords: Antigen 5; *Rhodnius neglectus*; structural bioinformatics of proteins; recombinant protein; anticoagulant; platelet antiaggregant.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Prevalência global da doença de Chagas, 2017. O número de casos registrados estão indicados na legenda, sendo o país com maior prevalência o Brasil, com mais de 1.000.000 casos. Fonte: HOTEZ et al., 2020. 18
- Figura 2.** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. (1) Os triatomíneos se alimentam de sangue infectado, ingerindo as formas tripomastigotas presente no hospedeiro vertebrado infectado. (2) As formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas e multiplicam-se no intestino médio do inseto. (3) As formas epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos no intestino posterior. (4-5) Os tripomastigotas metacíclicos, formas infectantes, são eliminados junto com as fezes, e entram no hospedeiro através do local da picada ou mucosas. (6) Os tripomastigotas entram na corrente sanguínea e penetram em vários tipos celulares, onde se diferenciam em formas amastigotas e se multiplicam. (7) As formas amastigotas, então, se transformam em tripomastigotas, provocando lise celular e sua liberação na corrente sanguínea podendo invadir novas células. Quando ingeridos pelos barbeiros, iniciam um novo ciclo (1). Fonte: adaptado de BERN, 2011. 20
- Figura 3.** Distribuição geográfica do triatomíneo *Rhodnius neglectus*. Os estados em que já foi relatada a presença dessa espécie de triatomíneo estão destacados em verde. Fonte: Acervo pessoal baseado nas referências Galvão e Gurgel-Gonçalves, 2014 e Ramos et al., 2018..... 23
- Figura 4.** Visão Clássica da Cascata de coagulação. Fatores que participam das vias intrínseca e extrínseca da coagulação. Ambas vias convergem para uma via comum, na qual o fator Xa ativa o fator II (protrombina) no fator IIa (trombina). O fator IIa ativa o fibrinogênio em fibrina. Fonte: Adaptado de Coelho e Moreira, 2001. 25
- Figura 5.** Imagem da glândula salivar de *Rhodnius neglectus*, na qual é possível observar a coloração avermelhada devido a presença da nitroforina. Fonte: Santiago, 2016. 27
- Figura 6.** Modelo esquemático do fluxo para realizar um docking molecular. Fonte: Adaptado de NEVES et al., 2021..... 35
- Figura 7.** Representação esquemática da metodologia empregada na execução do estudo do Antígeno 5 salivar de *R. neglectus* (RnAg5). 38
- Figura 8.** Mapas dos plasmídeos. (A) Vetor de expressão pET100/D-TOPO. (B) A sequência de nucleotídeos do RnAg5 foi inserida no pET100/D-TOPO pela empresa ThermoFisher Scientific. O plasmídeo foi purificado a partir de bactérias transformadas e a concentração determinada por espectroscopia. A construção final foi verificada por sequenciamento. Fonte: ThermoFisher Scientific..... 45
- Figura 9.** Árvore filogenética das sequências de aminoácidos recuperadas na busca de proteínas da família Antígeno 5/CAP de triatomíneos. Árvore filogenética com todas as sequências do Ag5 recuperadas na busca BLAST contra triatomíneos. Em vermelho estão as sequências com domínio crisp (ID: pfam08562) e em verde estão as sequências com domínio semelhante a CAP_GAPR1 (ID: cd05382). A árvore foi construída e editada por meio do software MEGA, com os valores bootstrap (N = 1000) mostrados ao lado dos ramos. As sequências de proteínas da família Ag5 são representadas por seis letras seguidas pelo número NCBI GI. As letras derivam das três primeiras letras do gênero e das três primeiras letras do nome da espécie. 57
- Figura 10.** Árvore filogenética das sequências de aminoácidos recuperadas na busca de proteínas da família Antígeno 5/CAP de artrópodes. Árvore filogenética com todas as sequências do Ag5 recuperadas na busca BLAST contra organismos artrópodes. Os subclados estão coloridos de acordo com a ordem de cada espécie. Cor – Ordem

(Família): Vermelho – Hemíptera (Triatominae, Miridae, Cimicidae); Amarelo – Diptera (Culicidae, Cecidomyiidae, Stratiomyidae, Tephritidae, Calliphoridae, Diopsidae, Drosophilidae); Verde – Hymenoptera (Formicidae, Vespidae, Figitidae, Orussidae, Cephidae); Magenta – Lepidoptera (Pieridae, Noctuidae, Nymphalidae); Azul escuro – Orthoptera (Acrididae, Gryllidae); Roxo – Coleoptera (Chrysomelidae); Azul claro – Aranae (Eresidae); Lilás – Acarina (Ixodidae); Laranja – Scolopendromorpha (Scolopendridae). A árvore foi construída por meio do software MEGA e editada pelo programa FigTree. As sequências de proteínas da família Ag5 são representadas por seis letras seguidas pelo número NCBI GI. As letras derivam das três primeiras letras do gênero e das três primeiras letras do nome da espécie. 58

Figura 11. Sequência aminoacídica do Antígeno 5 de *R. neglectus*. O peptídeo sinal está destacado de roxo. Resíduos preditos a sofrerem fosforilação estão marcados em azul e resíduos preditos a sofrerem glicosilação estão marcados de vermelho. .. 61

Figura 12. Modelos tridimensionais preditos do RnAg5. (A) modelo predito pelo programa RaptorX. (B) modelo predito pelo programa AlphaFold. (C) modelo predito pelo programa trRosetta. (D) modelo predito pelo programa Swiss-Model. (E) sobreposição de todos os modelos. Imagem gerada por meio do software PyMOL. 62

Figura 13. Estrutura tridimensional predita do RnAg5 pelo servidor AlphaFold. Em amarelo estão destacadas as cinco α -hélices: α 1 (33-52), α 2 (71-83), α 3 (115-136), α 4 (145-154) e α 5 (221-248), e de magenta estão destacadas as seis fitas β : β 1 (23-28), β 2 (101-109), β 3 (161-170), β 4 (176-185), β 5 (208 –211) e β 6 (218–220). Imagem gerada por meio do software PyMOL. 63

Figura 14. Alinhamento da sequência do RnAg5 com 2 sequências de Antígeno 5 presentes no PDB. Alinhamento de sequências e a estrutura tridimensional do RnAg5 com os motivos da superfamília CAP (CAP3, CAP 4, CAP1, CAP2) e o motivo típico [ILVP]Y da família Ag5 em destaque. (A) Alinhamento com a sequência de RnAg5 e com as sequências de duas proteínas da família Ag5 presentes no PDB, a Ves v 5 (código 1QNX) da *Vesputula vulgaris*, e Sol i 3 (código 2VZN) de *Solenopsis invicta*. As cisteínas conservadas estão marcadas de verde. Os resíduos conservados estão marcados de preto, já os resíduos semi conservados estão marcados de cinza claro. Alinhamento realizado através do programa Clustal Omega e editado com o software BioEdit. (B) Estrutura tridimensional do RnAg5 com os motivos CAP em destaque. Imagem gerada por meio do software PyMOL. 64

Figura 15. Resíduos que compõem epítomos conformacionais preditos pelos programas ElliPro e SeRenDIP 2.0 demonstrados no modelo tridimensional. Modelo tridimensional indicando, em azul, os resíduos previstos em comum pelos programas ElliPro e SeRenDIP 2.0 que formam epítomos conformacionais. Resíduos: K5-I26, A52-M64, S82-D85, N89-I93, K95-P99, T110-G114, E116, K117, V134-K146, Y167-R178, P187-G189, M191-K213, P215-L217, I224-I226, K228-K233, F236-L241, Y243, L244. (A) Cartoon (B) Superfície. Imagem gerada por meio do software PyMOL..... 65

Figura 16. Resíduos que compõem epítomos lineares preditos pelos programas ElliPro e BepiPred 2.0 demonstrados no modelo tridimensional. Modelo tridimensional indicando, em vermelho, os resíduos previstos em comum pelos programas ElliPro e BepiPred 2.0 que formam epítomos lineares. Resíduos: G7-I26, A51-M64, N89-P99, S109-K117, V134-K146, K169-W176, G189 -L217. (A) Cartoon (B) Superfície. Imagem gerada por meio do software PyMOL. 65

Figura 17. Sítio de ligação predito pelos programas Ftsite, PockDrug e PrankWeb demonstrado no modelo tridimensional. Os resíduos preditos em comum (Gly1 Pro2 Tyr86 Gly87 His88 Gln102 N103 Ile104 Phe143 Val145 Gly148 His149 Asn190) pelos programas Ftsite, PockDrug e PrankWeb estão destacados na estrutura com

coloração magenta, bem como os motivos da superfamília CAP (CAP3, CAP 4, CAP1, CAP2). (A) Cartoon (B) Superfície. Imagem gerada por meio do software PyMOL. .66	
Figura 18. Interações entre os ligantes e o Ag5 no docking molecular. A análise das interações foi feita com o programa PLIP. (A) Fator de ativação de plaquetas. (B) Leucotrieno D4. (C) Leucotrieno E4. (D) Prostaglandina I2. (E) Tromboxano A2. (F) Prostaglandina E2. (G) ADP. (H) Legenda das interações.....	68
Figura 19. Purificação da RnAg5 por cromatografia de afinidade em coluna HisTrap HP. (A) Gel de poliacrilamida 12% das frações da purificação do RnAg5, corado por azul de Coomassie. (B) Western blotting das frações da purificação do RnAg5 utilizando o anticorpo anti-His na diluição 1:2000. MW – Marcador de massa molecular (kDa); 1 – Extrato total; 2 – Lavagem com 25mM de Imidazol; 3 – Lavagem com 50mM de Imidazol; 4 a 11 – Eluição com 200mM de Imidazol; 12 – Eluição com 500mM de Imidazol.....	70
Figura 20. Teste de inibição da agregação plaquetária induzida por ADP. A agregação plaquetária foi avaliada através da absorbância medida em leitora de microplaca EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer®), utilizando placas de 96 poços. O Teste foi realizado em triplicata. O agonista ADP foi utilizado em uma concentração de 5 µM. Para o controle negativo (C-) foi utilizado PBS.O tempo foi medido em um intervalo de 5 minutos.....	71
Figura 21. Teste de inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno. A agregação plaquetária foi avaliada através da absorbância medida em leitora de microplaca EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer®), utilizando placas de 96 poços. O Teste foi realizado em triplicata. O agonista colágeno foi utilizado em uma concentração de 1 µM. Para o controle negativo (C-) foi utilizado PBS.O tempo foi medido em um intervalo de 5 minutos.	71
Figura 22. Representação em gráfico do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. O teste foi realizado com 6 µM de RnAg5. Para o controle positivo foram utilizadas duas glândulas salivares de <i>Rhodnius neglectus</i> . Para controle negativo (C-) foi utilizado PBS. O experimento foi realizado em triplicata no aparelho Coagulômetro CloTimer (CLOT®).....	72
Figura 23. Representação em gráfico do Tempo de Protrombina. Para avaliar o potencial de inibição da coagulação a partir da via extrínseca, foram utilizadas duas glândulas salivares de <i>Rhodnius neglectus</i> . Como controle negativo (C-) foi utilizado PBS. O experimento foi realizado em triplicata no aparelho Coagulômetro CloTimer (CLOT®).	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes espécies de triatomíneos e suas sequências de Ag5 recuperadas do NCBI.	54
Tabela 2. Análise in silico da sequência de aminoácidos do RnAg5.	60
Tabela 3. Predição da estrutura tridimensional e pontuação gerada pelo programa MolProbity das análises dos modelos.....	61
Tabela 4. Pontuação de afinidade gerada pelo docking molecular realizado com os ligantes em destaque.....	67
Tabela 5. Condições de expressão do RnAg5 salivar recombinante.....	69

LISTA DE ABREVIações

ADP – Adenosina difosfato

AMP – Monofosfato de adenosina

AG5 – Antígeno 5

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

CAP – *Cysteine-Rich Secretory Proteins, Antigen 5 and Pathogenesis-Related 1 Proteins*

CASP – *Critical Assessment of Protein Structure Prediction*

CisLT – Cisteinil-leucotrienos

DTN – Doença Tropical Negligenciada

IPTG – Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

LB – Luria Bertani

NaCl – Cloreto de sódio

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

PAF – Fator de Ativação Plaquetária

PBS – *Phosphate-buffered saline*

PDB – *Protein Data Bank*

PPP – Plasma pobre em plaquetas

PRP – Plasma rico em plaquetas

RCSB – *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*

RnAg5 - Antígeno 5 salivar de *R. neglectus*

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

TBS – *Tris-buffered saline*

TP – Tempo de Protrombina

TTPA – Tempo de tromboplastina parcial ativada

TxA2 – Tromboxano A2

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	177
1.1 Doença de Chagas	17
1.1.1 Histórico	17
1.1.2 Doença de Chagas como Doença Tropical Negligenciada	17
1.1.3 Transmissão e ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.1.4 Sintomatologia, diagnóstico e tratamento da Doença de Chagas.....	20
1.2 Triatomíneos	22
1.2.1 <i>Rhodnius neglectus</i>	22
1.3 Hemostasia	23
1.4 Saliva dos triatomíneos	26
1.4.1 Antígeno 5.....	27
1.5 Análise filogenética	29
1.6 Bioinformática estrutural de proteínas	29
1.6.1 Predição de estrutura tridimensional	30
1.6.2 Imunoinformática	30
1.6.3 Predição de sítios de ligação.....	32
1.6.4 <i>Docking</i> Molecular	32
2 JUSTIFICATIVA	366
3 OBJETIVOS	377
3.1 Objetivos Gerais	377
3.2 Objetivos Específicos	377
4 METODOLOGIA	388
4.1 Estratégias <i>in silico</i>	39
4.1.1 Análises filogenéticas das sequências de Antígeno 5 de triatomíneos e artrópodes.....	39
4.1.2 Análise da sequência de aminoácidos do Antígeno 5 salivar de <i>R. neglectus</i>	40
4.1.3 Predição da estrutura tridimensional do Antígeno 5 salivar de <i>R. neglectus</i>	41
4.1.4 Predição de epítomos de Células B.....	42
4.1.5 Predição de sítios de ligação a ligantes.....	42
4.1.6 <i>Docking</i> Molecular	43
4.2 Estratégias <i>in vitro</i>	444

4.2.1 Clonagem do Antígeno 5 salivar de <i>R. neglectus</i>	444
4.2.2 Expressão do Antígeno 5 salivar de <i>R. neglectus</i>	455
4.2.2.1 Linhagens de bactérias utilizadas.....	455
4.2.2.2 Transformação de <i>E. coli</i> com pET100/D-TOPO_RnAg5.....	46
4.2.2.3 Indução da expressão do Antígeno 5 salivar de <i>R. neglectus</i> recombinante	466
4.2.3 Análise da solubilidade por SDS-PAGE	477
4.2.4 <i>Western blotting</i>	488
4.2.5 Purificação do Antígeno 5 salivar de <i>R. neglectus</i> recombinante.....	488
4.3 Criação de triatomíneos	499
4.3.1 Obtenção da saliva	499
4.4 Avaliação da agregação plaquetária na presença do RnAg5	499
4.5 Avaliação da coagulação sanguínea na presença do RnAg5 e da saliva de <i>R. neglectus</i>	51
4.5.1 Avaliação do tempo de protrombina na presença da saliva de <i>R. neglectus</i>	51
4.5.2 Avaliação do tempo de trompoplastina parcial ativada na presença de RnAg5	51
5 RESULTADOS.....	533
5.1 Resultados <i>in silico</i>	53
5.1.1 Análise filogenética.....	53
5.1.1.1 Filogenia do Antígeno 5 de triatomíneos.....	53
5.1.1.2 Filogenia das Proteínas Antígeno 5 de artrópodes.....	58
5.1.2 Análise <i>in silico</i> da sequência de aminoácidos do Antígeno 5 de <i>R. neglectus</i>	60
5.1.3 Predição da estrutura tridimensional.....	61
5.1.4 Predição de epítomos de Célula B.....	64
5.1.5 Predição de sítios de ligação.....	66
5.1.6 <i>Docking</i> Molecular.....	66
5. 2 Resultados <i>in vitro</i>.....	69
5.2.1 Expressão do Antígeno 5 recombinante de <i>Rhodnius neglectus</i>	69
5.2.2 Purificação do Antígeno 5 recombinante de <i>Rhodnius neglectus</i>	70
5.2.3 Agregação plaquetária na presença do RnAg5.....	70
5.2.4 Avaliação da coagulação sanguínea na presença do RnAg5.....	72

6 DISCUSSÃO.....	74
6.1 Estratégias <i>in silico</i>.....	74
6.2 Estratégias <i>in vitro</i>.....	79
7 CONCLUSÕES	833
8 PERSPECTIVAS.....	844
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	855

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

1.1.1 Histórico

A doença de Chagas foi descrita pelo médico brasileiro Carlos Chagas, que em 1907 foi convidado para participar de um projeto de erradicação da malária no estado de Minas Gerais, Brasil. Após um ano de sua presença na região, já com o surto controlado, percebeu a presença de um inseto hematófago com hábitos noturnos, chamado de “barbeiro”, no interior das habitações humanas e decidiu investigá-los. Depois de examinar o intestino desses insetos, encontrou numerosos protozoários flagelados, e conseguiu provar experimentalmente que essas formas flageladas eram transmitidas aos macacos após o contato com o inseto. Chagas nomeou o novo parasito de *Trypanosoma cruzi* em homenagem a seu mentor, Oswaldo Cruz. Devido à prevalência do inseto nas residências rurais, Chagas suspeitou que o parasito pudesse infectar humanos e iniciou sua busca por um possível caso humano da doença. Em 1909, ele conheceu Berenice, uma menina de dois anos que se tornou o primeiro caso registrado de infecção aguda por *T. cruzi*. As descobertas de Chagas foram extremamente importantes para a história da parasitologia e da medicina, pois ele retratou tanto as características clínicas quanto o ciclo completo do parasito, indicando o inseto vetor e o patógeno com seus diferentes estágios de desenvolvimento (Chagas, 1909).

1.1.2 Doença de Chagas como Doença Tropical Negligenciada

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu a doença de Chagas como uma doença tropical negligenciada (DTN) em 2005, e hoje essa patologia faz parte de um grupo de 20 doenças tropicais consideradas negligenciadas. As DTNs são um conjunto de enfermidades associadas a moradias precárias, desnutrição, falta de saneamento básico e pouco ou nenhum acesso aos serviços de saúde. Historicamente, essas doenças não têm recebido atenção adequada nos níveis local, nacional e internacional, o que resulta em falta de investimento no desenvolvimento de fármacos, vacinas e programas para seu tratamento e prevenção (WHO, 2023).

Estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente na América Latina, estejam infectadas pelo *T. cruzi*. A doença é

encontrada principalmente em áreas endêmicas de países da América Latina, por exemplo Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela (WHO, 2023). A Figura 1 mostra a prevalência global da doença de Chagas.

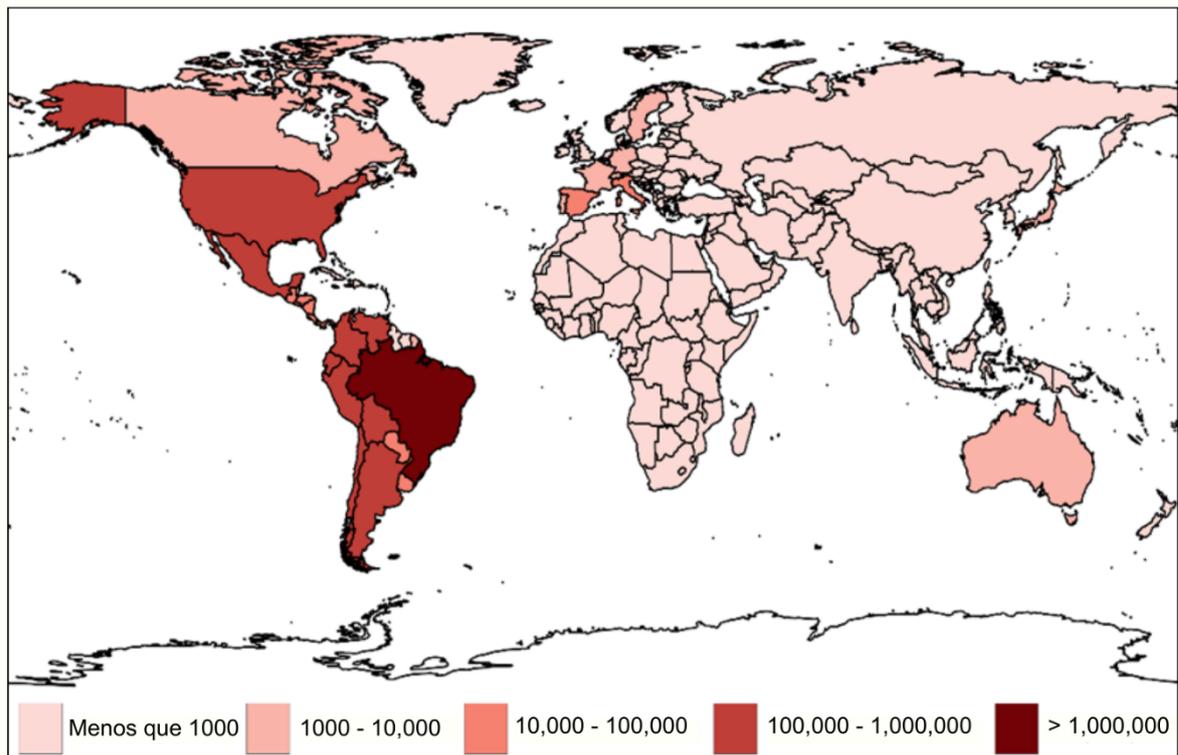


Figura 1. Prevalência global da doença de Chagas, 2017. O número de casos registrados estão indicados na legenda, sendo o país com maior prevalência o Brasil, com mais de 1.000.000 casos. Fonte: HOTEZ *et al.*, 2020.

1.1.3 Transmissão e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

Os mecanismos de transmissão do *T. cruzi* ao homem podem ser divididos em primários e secundários. Entre os principais mecanismos primários estão a transmissão vetorial (Figura 2), transfusional sanguínea, oral ou congênita. Os mecanismos secundários são considerados menos frequentes, como acidentes de laboratório, manipulação de animais infectados, ingestão de carne crua de animais infectados, transplantes de órgãos de doadores infectados pelo *T. cruzi* (Coura, 2015).

A transmissão vetorial é considerada a principal forma de transmissão, que ocorre através da deposição das fezes contaminadas com o parasita nas mucosas ou na pele do hospedeiro vertebrado, na região onde o vetor inseriu a probóscide para

se alimentar, pois o hospedeiro, ao se coçar, promove a entrada dos parasitas no local da picada (Coura, 2015).

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida heteroxeno, ou seja, apresenta um hospedeiro definitivo, vertebrado, podendo ocorrer em diferentes espécies de mamíferos, e um hospedeiro intermediário, invertebrado, que são os insetos hemípteros da Família Reduviidae e subfamília Triatominae (De Souza; De Carvalho; Barrias, 2010; Patino; Ramírez, 2017).

O *T. cruzi* possui variações morfológicas e funcionais, alternando entre estágios que sofrem divisão binária e as formas não replicativas e infectantes. Durante a fase do ciclo no hospedeiro invertebrado, o *T. cruzi* se diferencia em epimastigotas e então, no intestino posterior do inseto, estes diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos (um processo conhecido como metaciclogênese), os quais, eliminados pelas fezes do hospedeiro invertebrado, são capazes de infectar o hospedeiro vertebrado. Nos mamíferos, os tripomastigotas metacíclicos se desenvolvem em formas amastigotas e se multiplicam no interior de células nucleadas, posteriormente se diferenciam em tripomastigotas e são liberados na corrente sanguínea após as células do hospedeiro se romperem. Durante a alimentação do inseto, as formas tripomastigotas que se encontram no sangue do hospedeiro vertebrado infectado são ingeridas pelos insetos e assim se inicia um novo ciclo (De Souza; De Carvalho; Barrias, 2010; Martín-Escolano; Marín; Rosales; Tsaousis *et al.*, 2022).

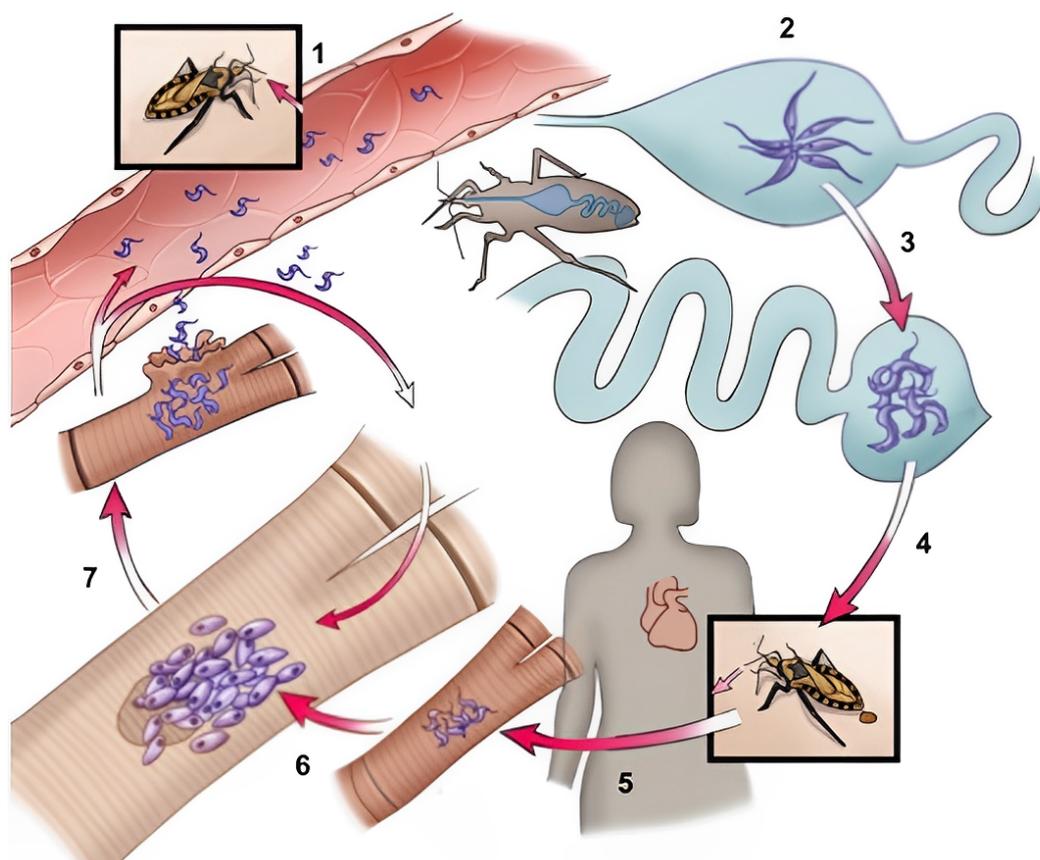


Figura 2. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. (1) Os triatomíneos se alimentam de sangue infectado, ingerindo as formas tripomastigotas presente no hospedeiro vertebrado infectado. (2) As formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas e multiplicam-se no intestino médio do inseto. (3) As formas epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos no intestino posterior. (4-5) Os tripomastigotas metacíclicos, formas infectantes, são eliminados junto com as fezes, e entram no hospedeiro através do local da picada ou mucosas. (6) Os tripomastigotas entram na corrente sanguínea e penetram em vários tipos celulares, onde se diferenciam em formas amastigotas e se multiplicam. (7) As formas amastigotas, então, se transformam em tripomastigotas, provocando lise celular e sua liberação na corrente sanguínea podendo invadir novas células. Quando ingeridos pelos barbeiros, iniciam um novo ciclo (1). Fonte: adaptado de BERN, 2011.

1.1.4 Sintomatologia, diagnóstico e tratamento da Doença de Chagas

Após a infecção pelo *T. cruzi*, a doença pode seguir duas fases distintas. Na fase aguda, observa-se aumento da parasitemia. Embora nesta fase a doença seja geralmente assintomática, pode haver alguns sintomas, como febre, inflamação, taquicardia, fadiga, que podem desaparecer espontaneamente na maioria dos pacientes (Clayton, 2010; Lidani; Andrade; Bavia; Damasceno *et al.*, 2019). Além disso, é possível verificar os sinais patognomônicos nesse período inicial, após o contato do hospedeiro invertebrado contaminado com o hospedeiro vertebrado. A lesão inicial depende do local onde ocorre a picada do vetor, na pele pode ser formado um nódulo inflamatório conhecido como chagoma de inoculação e, caso a picada aconteça próxima aos olhos, o indivíduo pode desenvolver um edema bupalpebral

unilateral, conhecido como sinal de Romaña (Echavarría; Echeverría; Stewart; Gallego *et al.*, 2021).

Passada a fase aguda, a maioria dos infectados continua com a fase assintomática, mas cerca de 30% dos infectados evoluem para a fase crônica, a qual pode ser indeterminada ou sintomática. A forma indeterminada da doença de Chagas é um período de latência, que pode durar 30 anos ou mais. Após essa fase, alguns pacientes podem desenvolver uma fase sintomática em que se observa declínio da parasitemia e manifestações neurológicas, cardíacas e/ou digestivas, bem como comorbidades neuropsiquiátricas e alterações comportamentais (Clayton, 2010; Echavarría; Echeverría; Stewart; Gallego *et al.*, 2021; Ozaki; Guariento; De Almeida, 2011; Suárez; Nolder; García-Mingo; Moore *et al.*, 2022).

O diagnóstico da doença de Chagas se dá em sua grande maioria por exames de sangue, por meio de métodos laboratoriais de visualização do parasito e por presença de anticorpos no soro. No pico da infecção aguda, formas tripomastigotas podem estar presentes no sangue periférico e ser visualizadas através da microscopia óptica. Além disso, também pode ser feita a detecção do DNA do *T. cruzi* por reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR). A sorologia não é útil no estágio agudo (Suárez; Nolder; García-Mingo; Moore *et al.*, 2022).

Ao entrar na fase crônica da infecção, no entanto, a parasitemia torna-se extremamente baixa e intermitente, pois os tripomastigotas invadem células nucleadas nos tecidos, portanto a microscopia não é suficientemente sensível. Nesse caso, a sorologia é utilizada para o diagnóstico primário, como por exemplo os testes de ensaio imunoenzimáticos (*enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA) ou de anticorpo fluorescente indireto (OPAS, 2023; Suárez; Nolder; García-Mingo; Moore *et al.*, 2022).

Sem vacina disponível, a intervenção terapêutica é limitada a duas drogas, benzonidazol e nifurtimox (Pinazo; Gascon, 2015), sendo o benzonidazol mais utilizado no contexto brasileiro (DIAS; RAMOS; GONTIJO; LUQUETTI *et al.*, 2016). Sua administração é recomendada em qualquer estágio da doença, desde que os danos aos órgãos não sejam avançados, e ambos os medicamentos são eficientes para o tratamento da doença se administrados logo após a infecção, no início da fase aguda (Pérez-Molina; Molina, 2018; WHO, 2023a). Entretanto, a resposta ao tratamento pode variar de acordo com a linhagem do *T. cruzi* e a eficácia é variável

quando o tratamento é realizado durante a fase crônica da infecção (Scarim; Jornada; Chelucci; De Almeida *et al.*, 2018).

1.2 Triatomíneos

Os triatomíneos, responsáveis pela transmissão do *T. cruzi*, pertencem à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (Schofield; Galvão, 2009). Atualmente, existem 155 espécies e três fósseis distribuídas em 18 gêneros distribuídos em cinco tribos: Aberproseniini, Bolboderini, Cavercolini, Rhodniini e Triatomini, sendo que todas as espécies são consideradas potenciais vetores do *T. cruzi* e são amplamente distribuídas pelas Américas (Alevi; De Oliveira; Da Silva Rocha; Galvão, 2021; Galvão, 2021; Gil-Santana; Chavez; Pita; Panzera *et al.*, 2022).

No Brasil, existem 66 espécies de triatomíneos, representadas por dez gêneros, incluindo *Alberprosenia*, *Belminus*, *Cavernicola*, *Eratyrus*, *Microtriatoma*, *Panstrongylus*, *Parabelminus*, *Psammolestes*, *Rhodnius* e *Triatoma* (Da Rosa; Justino; Nascimento; Mendonça *et al.*, 2017; Ramos; Castro; Souza; Oliveira *et al.*, 2018). Em particular, *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* são gêneros de importância epidemiológica, uma vez que algumas de suas espécies completam o ciclo biológico em habitações humanas (Cavassin; Kuehn; Kopp; Thomaz-Soccol *et al.*, 2014).

1.2.1 *Rhodnius neglectus*

O gênero *Rhodnius* pertence a tribo Rhodniini e compreende 21 espécies descritas atualmente, 14 encontradas no Brasil e, desses, 7 apresentam maior importância epidemiológica, embora todas sejam consideradas potenciais transmissores do *T. cruzi*, sendo que a maioria das espécies de *Rhodnius* vive em palmeiras (Da Rosa; Justino; Nascimento; Mendonça *et al.*, 2017; Galvão, 2014; Galvão; Gurgel-Gonçalves, 2014; Lent; Wygodzinsky, 1979).

O epíteto que dá nome a espécie, *neglectus*, vem do latim e significa negligenciado, uma referência ao fato dessa espécie ter permanecido desconhecida por muitos anos. Essa espécie se encontra presente em 14 estados do Brasil: Acre, Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Paraná, Piauí, São Paulo e Tocantins, e no Distrito Federal (Figura 3) (Galvão; Gurgel-Gonçalves, 2014; Ramos; Castro; Souza; Oliveira *et al.*, 2018).

A espécie *Rhodnius neglectus* é importante na transmissão enzoótica de *T.*

cruzi e do protozoário *Trypanosoma rangeli*. Ela se alimenta principalmente de sangue de aves e é frequentemente encontrada em palmeiras e ninhos de pássaros em ambientes silvestres, no entanto já foi reportada habitando áreas urbanas. A invasão dos ambientes domiciliares foi relatada diversas vezes (Carcavallo; Galindez Girón; Jurberg; Lent, 1998; Gurgel-Goncalves; Cuba, 2009; Gurgel-Gonçalves; Cuba, 2007; Gurgel-Gonçalves; Ramalho; Duarte; Palma *et al.*, 2004; Rodrigues; Pauliquevis Junior; Da Silva; Wanderley *et al.*, 2014).

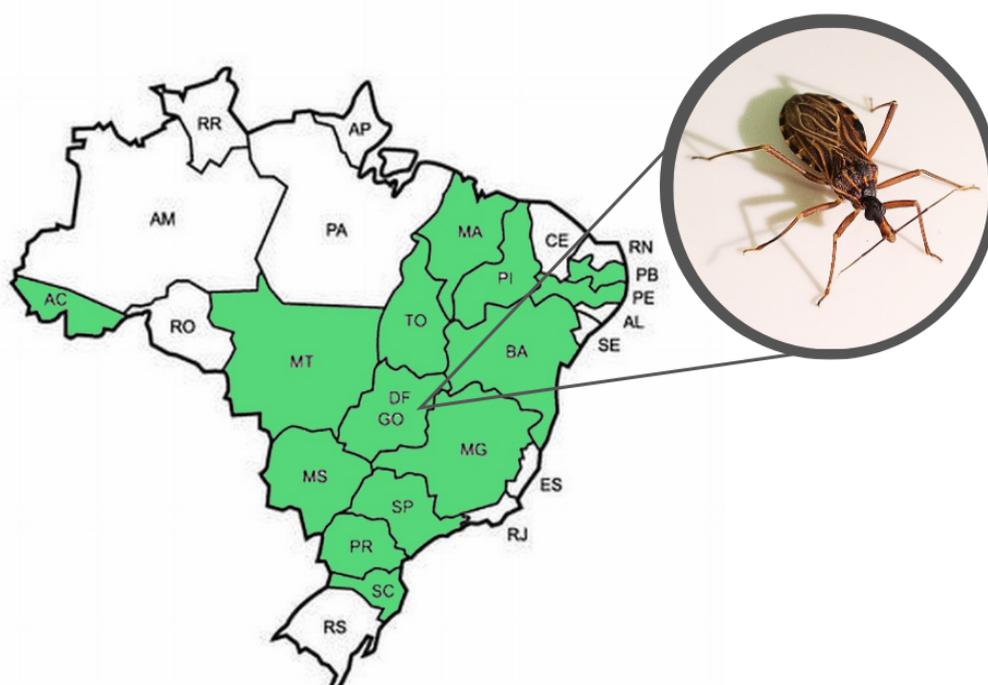


Figura 3. Distribuição geográfica do triatomíneo *Rhodnius neglectus*. Os estados em que já foi relatada a presença dessa espécie de triatomíneo estão destacados em verde. Fonte: Acervo pessoal baseado nas referências Galvão e Gurgel-Gonçalves, 2014 e Ramos *et al.*, 2018

1.3 Hemostasia

A hemostasia é um processo fisiológico dinâmico, que controla e interrompe o sangramento no local da lesão, mantendo o fluxo sanguíneo normal dentro do corpo. Isso ocorre por meio da indução da coagulação sanguínea, processo pelo qual a ativação dos fatores de coagulação forma um coágulo sanguíneo que estanca o sangramento (Palta; Saroa; Palta, 2014).

A hemostasia pode ser dividida em primária e secundária. A hemostasia primária é uma agregação de plaquetas formando um tampão no local danificado das células endoteliais expostas. Ela resulta de interações complexas entre plaquetas,

parede do vaso e proteínas adesivas levando à formação do tampão plaquetário inicial. As células endoteliais que revestem a parede vascular exibem as propriedades antitrombóticas devido a múltiplos fatores, como fosfolipídios neutros, síntese e secreção de inibidores de plaquetas, inibidores de coagulação e ativadores de fibrinólise. Em contraste, a camada subendotelial é altamente trombogênica e contém colágeno e fator de Von Willebrand (vWF) (Lippi; Favalaro, 2013; Palta; Saroa; Palta, 2014).

Após uma lesão vascular, o vWf atua como uma ponte entre o colágeno endotelial e os receptores de superfície plaquetária GpIb e promove a adesão plaquetária. Após a adesão, ocorre a desgranulação com a liberação de vários fatores, incluindo o cálcio. Este se liga aos fosfolipídios que aparecem secundariamente à ativação plaquetária e fornecem uma superfície para montagem de vários fatores de coagulação. O tromboxano A₂ (TxA₂), produzido por plaquetas ativadas, junto com o Adenosina difosfato (ADP) aumentam a agregação plaquetária, levando à formação do tampão plaquetário, que isola temporariamente a lesão vascular. A ligação do ADP também causa uma alteração conformacional nos receptores GpIIb/IIIa presentes na superfície das plaquetas causando deposição de fibrinogênio. A geração de trombina também catalisa a conversão desse fibrinogênio em fibrina, o que aumenta a estabilidade do tampão plaquetário e agora é conhecido como hemostasia secundária (Broos; Feys; De Meyer; Vanhoorelbeke *et al.*, 2011; Gale, 2011; Ruggeri, 2007).

A hemostasia secundária inclui as duas principais vias de coagulação. O conceito de coagulação do sangue remonta ao ano de 1964, em que Macfarlane propôs o modelo em cascata, que introduz a ordem na qual os fatores de coagulação são ativados. Este modelo foi seguido pelo modelo em cascata de David e Ratnoff, no qual cada fator de coagulação é uma proenzima (zimógeno) aguardando a clivagem proteolítica mediada pelo predecessor para iniciar sua atividade, evitando assim a ativação ou degradação indiscriminada (Davie; Ratnoff, 1964; Macfarlane, 1964; Versteeg; Heemskerk; Levi; Reitsma, 2013). A ativação de cada zimogênio é representada pelo sufixo da letra “a” ao numeral romano que identifica esse zimogênio em particular (Bos; Van ‘T Veer; Reitsma, 2015).

A cascata de coagulação (Figura 4) pode ser dividida em duas vias, via intrínseca e extrínseca, sendo que ambas convergem para uma via comum. A via intrínseca consiste nos fatores I, II, IX, X, XI e XII. A via extrínseca consiste nos fatores

I, II, VII e X. A via comum consiste nos fatores I, II, V, VIII, X. Os fatores circulam pela corrente sanguínea como zimogênios e são ativados por serino proteases, que atuam como catalisadores para clivar o próximo zimogênio e, finalmente, clivar o fibrinogênio. A via intrínseca é ativada através do colágeno endotelial exposto, e a via extrínseca é ativada através do fator tecidual liberado pelas células endoteliais após dano externo (Al-Koussa; Alzaim; El-Sabban, 2022; Grover; Mackman, 2019).

Para manter o equilíbrio da hemostasia é necessária a ação de antiagregantes. A própria trombina atua como um feedback negativo, ativando o plasminogênio em plasmina, a qual estimula a produção de antitrombina além de atuar diretamente na malha de fibrina decompondo-a. A antitrombina diminui a produção de trombina a partir da protrombina e a quantidade de fator X ativado. As proteínas C e S também atuam na prevenção da coagulação, principalmente pela inativação dos fatores V e VIII (Achneck; Sileshi; Parikh; Milano *et al.*, 2010; Bonar; Lippi; Favalaro, 2017).

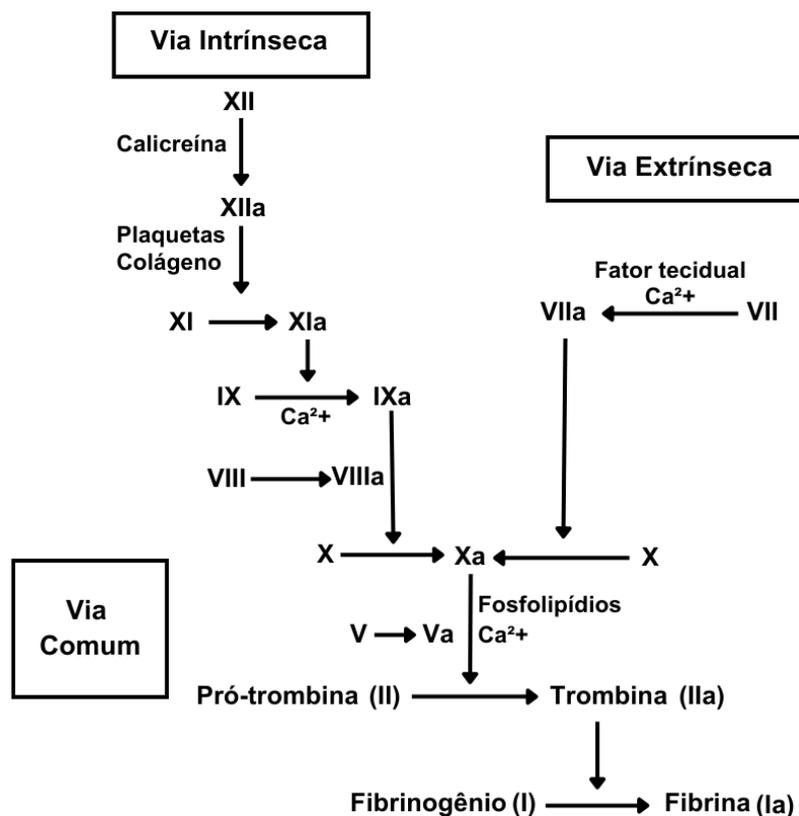


Figura 4. Visão Clássica da Cascata de coagulação. Fatores que participam das vias intrínseca e extrínseca da coagulação. Ambas vias convergem para uma via comum, na qual o fator Xa ativa o fator II (protrombina) no fator IIa (trombina). O fator IIa ativa o fibrinogênio em fibrina. Fonte: Adaptado de Coelho e Moreira, 2001.

1.4 Saliva dos triatomíneos

Durante a alimentação, os artrópodes hematófagos são desafiados pelas complexas respostas hemostáticas e imunológicas do hospedeiro, que evitam a perda de sangue após a picada. Por isso, os triatomíneos possuem moléculas salivares que visam superar essas barreiras, a fim de atingir um fluxo sanguíneo contínuo no local da lesão para conseguirem se alimentar (Santiago; De Araújo; Charneau; Praça *et al.*, 2020).

A saliva desses insetos é rica em proteínas com atividades anticoagulantes, vasodilatadoras, inibidoras da agregação plaquetária, anti-inflamatórias e imunomoduladoras. Já foi demonstrado que, no sítio da picada, a saliva é um poderoso indutor do recrutamento de células mononucleares fagocitárias, e os tripomastigotas metacíclicos eliminados nas fezes, por ocasião do repasto sanguíneo, interagem com as células do sistema imune e instalam a infecção. Ou seja, o patógeno é favorecido pela ação da saliva. Assim, o hábito hematofágico do triatomíneo liga os três elementos da doença: vetor-parasito-hospedeiro (Champagne, 2004; Mesquita; Carneiro; Bafica; Gazos-Lopes *et al.*, 2008; Santiago; Assumpção; De Araújo; Bastos *et al.*, 2016).

Neste contexto, a saliva dos triatomíneos é uma mistura importante de moléculas que interagem com moléculas do hospedeiro e tem sido objeto de estudo na pesquisa em Doença de Chagas. Os estudos dos sialomas (do grego sialo, significa saliva) são realizados a partir de análises transcriptômicas e proteômicas das glândulas salivares/saliva e têm contribuído para descrever a diversidade e possíveis mecanismos de ação das moléculas salivares dos triatomíneos. O conhecimento sobre a composição salivar dos animais hematófagos tem crescido com o avanço da ciência (Ciprandi; Horn; F.; Termignoni, 2003; Santiago; Assumpção; De Araújo; Bastos *et al.*, 2016; Santiago; De Araújo; Charneau; Praça *et al.*, 2020).

Alguns compostos salivares isolados ou seus análogos têm mostrado potencial para o desenvolvimento de drogas para uso nas práticas clínicas (Assumpção; Charneau; Santiago; Francischetti *et al.*, 2011; Ciprandi; Horn; F.; Termignoni, 2003; Santiago; Assumpção; De Araújo; Bastos *et al.*, 2016). Consequentemente, a diversidade molecular e o modo de ação dessas moléculas têm sido cada vez mais estudados. Um exemplo são as nitroforinas salivares do gênero *Rhodnius*, que conferem a cor cereja característica da glândula desses insetos (Figura 5). As nitroforinas formam um complexo estável com o óxido nítrico, que atua neutralizando

a hemostasia, e também podem sequestrar a histamina liberada pelos mastócitos do hospedeiro, reduzindo a inflamação e a resposta imune (Andersen; Montfort, 2000; De Araújo; Bussacos; Sousa; Hecht *et al.*, 2012; Ribeiro; Walker, 1994).



Figura 5. Imagem da glândula salivar de *Rhodnius neglectus*, na qual é possível observar a coloração avermelhada devido a presença da nitroforina. Fonte: Santiago, 2016.

Embora as funções anti-hemostáticas sejam mediadas por famílias bem conhecidas de proteínas salivares, como as lipocalinas, apirases e os inibidores de serino proteases, ou como as serpinas e os peptídeos contendo os domínios Kazal e/ou Kunitz, a maioria dessas moléculas ainda não foi caracterizada bioquímica e funcionalmente (Mans; Francischetti, 2010; Ribeiro; Francischetti, 2003).

1.4.1 Antígeno 5

Uma proteína salivar que tem despertado interesse, por estar presente na saliva de vários artrópodes, é o Antígeno 5 (Ag5). Essa molécula é membro da superfamília CAP, a qual é composta por proteínas ricas em resíduos de cisteína (CRISP - *cysteine rich secretory proteins*), pelo Antígeno 5 e por proteínas relacionadas à patogenicidade em plantas (Pathogenesis-related – PR1). A proteína foi estudada pela primeira vez por King *et al.* (1978), que identificou uma proteína de aproximadamente 23 kDa no veneno da vespa *Dolichovespula maculata*, denominando-a de Ag5. Desde então, essa proteína tem sido associada com o desencadeamento de uma forte resposta alérgica em humanos e frequentemente relatada como o componente mais alergênico do veneno de diferentes espécies de vespas sociais, como as pertencentes aos gêneros *Dolichovespula*, *Vespa*, *Vespula*, *Polistes* e *Polybi*, e de diferentes espécies de formigas (Bazon; Silveira; Simioni; Brochetto-Braga, 2018; Hoffman, 1997; Hoffman, 1985; Pantera; Hoffman; Carresi;

Cappugi *et al.*, 2003). O Ag5 constitui um elemento-chave para o diagnóstico de alergias a venenos, visto que o diagnóstico de estados patológicos tem se mostrado eficaz através da determinação de anticorpos IgE específicos no soro de pacientes (Vos; Köhler; Müller; Stretz *et al.*, 2013).

Posteriormente, o Ag5 foi descrito no intestino de *Drosophila melanogaster* (Kovalick; Schreiber; Dickason; Cunningham, 1998) e na saliva de diferentes artrópodes hematófagos, como flebotomíneos (Charlab; Valenzuela; Rowton; Ribeiro, 1999), carrapatos (Mans; Andersen; Francischetti; Valenzuela *et al.*, 2008) e de algumas espécies de triatomíneos (De Araújo; Bussacos; Sousa; Hecht *et al.*, 2012; Santiago; Assumpção; De Araújo; Bastos *et al.*, 2016). Em carrapatos, moscas e mosquitos, essa proteína pode estar envolvida na modulação do sistema imunológico do hospedeiro ou na prevenção da coagulação para prolongar a hematofagia (Gibbs; Roelants; O'bryan, 2008; Hoffman, 2006). Além disso, a presença da proteína também foi verificada em helmintos, e foi utilizado como base para desenvolvimento de vacinas por Anand *et al.* (2007), que descreveram um protótipo de vacina contendo um homólogo do Ag5 para Filariose Linfática, causada pelo helminto *Wuchereria bancrofti*.

Entre os triatomíneos, o Ag5 foi descrito nos sialotranscriptomas de *Rhodnius prolixus* (Ribeiro; Andersen; Silva-Neto; Pham *et al.*, 2004), *Triatoma infestans* (Assumpção; Francischetti; Andersen; Schwarz *et al.*, 2008), *Dipetalogaster maximus* (Assumpção; Charneau; Santiago; Francischetti *et al.*, 2011), *Triatoma matogrossensis* (Assumpção; Eaton; Pham; Francischetti *et al.*, 2012), *Triatoma rubida* (Ribeiro; Assumpção; Pham; Francischetti *et al.*, 2012) e *R. neglectus* (Santiago; Assumpção; De Araújo; Bastos *et al.*, 2016). Estudos indicam que a proteína apresenta atividade de inibição da agregação plaquetária mediada por colágeno (Assumpção; Ma; Schwarz; Reiter *et al.*, 2013). Neste contexto, o Ag5 salivar do triatomíneo *R. neglectus* é uma molécula promissora e sua investigação funcional pode ser útil tanto para o desenvolvimento de novos marcadores biológicos quanto para o desenvolvimento de fármacos utilizados para o tratamento de doenças trombóticas.

1.5 Análise filogenética

A análise de sequências de aminoácidos é fundamental para o estudo da evolução molecular e entre as principais ferramentas de análise de evolução está a

árvore filogenética. As árvores filogenéticas são montadas com base em algoritmos que consideram os números de aminoácidos ou bases incompatíveis entre sequências alinhadas (Charleston, 2013). Nessa estratégia, comparações múltiplas podem ser caracterizadas por números idênticos que correspondem as diferenças de bases e colocadas no mesmo nível evolutivo. A árvore resultante representa uma hipótese sobre os caminhos de desenvolvimento que levaram à diversidade existente.

A justificativa para basear os estudos evolutivos de proteínas em suas diferenças nas sequências de aminoácidos está no mecanismo de mutação, que altera bases na sequência de codificação, resultando consecutivamente em alterações de aminoácidos individuais. Proteínas com alta identidade de sequência tendem a possuir similaridade em função e relação evolutiva, e os resultados obtidos da análise filogenética são representados por uma árvore filogenética, na qual as sequências são agrupadas com base em similaridades de sequência (Wang; Weber, 2021).

1.6 Bioinformática estrutural de proteínas

A Bioinformática é um campo de pesquisa que visa compreender melhor dados biológicos, mais especificamente de biomoléculas, por meio de modelos e algoritmos de Ciência da Computação. Realiza a coleta, armazenamento, recuperação, manipulação e modelagem de dados para análise, visualização ou predição por meio do desenvolvimento de algoritmos e estratégias computacionais (Bilotta; Tradigo; Veltri, 2019).

As proteínas são moléculas grandes e complexas formadas pela união de aminoácidos, e que podem assumir diferentes formas e desempenhar diversas funções a nível celular nos organismos. Elas são necessárias para o desempenho e regulação de tecidos e órgãos dos seres vivos. Atualmente, há um número crescente de estruturas e sequências de proteínas depositadas em bancos de dados especializados (Akcapinar; Sezerman, 2017; Ewing; Chu; Elisma; Li *et al.*, 2007; Keskin; Gursoy; Ma; Nussinov, 2008). Devido ao crescente número de estruturas e sequências, a utilização de estratégias computacionais se mostra bastante eficaz, já que o poder computacional acompanha esse crescimento e pode lidar com a grande quantidade de dados de forma adequada.

1.6.1 Predição de estrutura tridimensional

A informação da sequência primária de uma proteína não é suficiente para conseguir entender sua função. Para auxiliar nessa tarefa, a compreensão acerca da sua conformação tridimensional se faz necessária. Frente a essa necessidade, surgiram bancos de dados, como o *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB Protein Data Bank; RCSB.org)* (Bittrich; Bhikadiya; Bi; Chao *et al.*, 2023), que tem como objetivo fornecer acesso a ferramentas para exploração, visualização e análise de estruturas tridimensionais de proteínas determinadas experimentalmente através do arquivo *Protein Data Bank (PDB)* e também modelos de estruturas computadas (CSM) (Berman; Westbrook; Feng; Gilliland *et al.*, 2000).

Além disso, iniciativas como o *Critical Assessment of Protein Structure Prediction (CASP)* (Moult; Fidelis; Kryshtafovych; Schwede *et al.*, 2018), um experimento comunitário de avaliação e teste dos métodos de previsão estrutural de proteína, fornecendo padrões de avaliação e definições, têm promovido o desenvolvimento de métodos de predição de proteínas. O núcleo da predição da estrutura da proteína é a suposição de que o estado nativo da proteína é aquele de menor energia livre. Assim, os métodos de predição da estrutura de proteínas combinam a amostragem de possíveis conformações com um ranqueamento dessas conformações por meio de funções de energia, visando encontrar o estado de menor energia (Anfinsen, 1972).

1.6.2 Imunoinformática

A imunoinformática é uma ciência que ajuda a obter informações imunológicas significativas usando softwares e aplicativos de bioinformática. Uma das aplicações mais importantes da imunoinformática é a predição de uma variedade de epítomos específicos para reconhecimento por células T, previsão de ligação do MHC de classe I e II, e reconhecimento por células B. Através desse método, regiões antigênicas das proteínas-alvo podem ser detectadas e, em comparação com testes de laboratório, há a redução de custos e tempo (Backert; Kohlbacher, 2015; Davies; Flower, 2007).

Regiões antigênicas, chamadas epítomos, são regiões de antígenos que são identificadas pelas células do sistema imunológico. Os epítomos são tipicamente regiões de superfície de proteínas que são reconhecidas por anticorpos e podem ser

classificadas como lineares ou conformacionais. Epítomos lineares são fragmentos de aminoácidos contínuos na sequência e epítomos conformacionais consistem em resíduos de aminoácidos que podem ser separados na sequência primária da proteína, mas são aproximados fisicamente por meio do dobramento da proteína (El-Manzalawy; Dobbs; Honavar, 2017).

O conhecimento dos resíduos que formam um epítomo é a chave para desvendar mecanismos de doenças, para aplicações em desenho de vacinas, imunoterapia e o seu conhecimento pode ser o passo inicial para o desenvolvimento de biomarcadores (Chen; Wang; Guo; Shen, 2012; Sharon; Rynkiewicz; Lu; Yang, 2014).

Um biomarcador é definido como uma molécula indicadora de processos biológicos ou patogênicos, ou uma resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (GROUP, 2001). Os biomarcadores são frequentemente classificados em termos de biomarcadores de exposição, efeito e susceptibilidade. O desenvolvimento de marcadores de superfície celular e anticorpos são comumente usados para avaliar o estado do sistema imunológico e podem ser detectados usando sangue total ou soro e plasma por uma infinidade de métodos (Swenberg; Fryar-Tita; Jeong; Boysen *et al.*, 2008).

Vários métodos experimentais estão disponíveis para determinar epítomos de células B, mas são onerosos, demorados e alguns requerem um alto nível de experiência em laboratório (Kavitha; K; Saritha; R *et al.*, 2013). É por isso que o desenvolvimento de ferramentas *in silico* tem atraído muita atenção. Os primeiros métodos focavam em epítomos lineares de células B e dependiam de características derivadas de sequências primárias de antígenos. Logo no início seu poder preditivo mostrou não ser melhor do que aleatório (Blythe; Flower, 2005), uma conclusão que foi confirmada em um estudo recente (Galanis; Nastou; Papandreou; Petichakis *et al.*, 2021). À medida que mais estruturas de raios-X de complexos anticorpo-antígeno foram depositadas no PDB (Berman; Westbrook; Feng; Gilliland *et al.*, 2000), vários métodos baseados em estruturas foram desenvolvidos para prever epítomos conformacionais de células B, que contêm resíduos que não são necessariamente contínuos ao longo da sequência da proteína, ou seja, considera o enovelamento.

A maioria dos preditores utiliza apenas dados derivados da sequência de proteínas do antígeno e, portanto, são baseados na sequência primária. Os preditores

baseados em estrutura utilizam apenas a estrutura 3D de um antígeno. Além disso, alguns métodos híbridos empregam ambas as abordagens para melhor desempenho preditivo (Galanis; Nastou; Papandreou; Petichakis *et al.*, 2021).

1.6.3 Predição de sítios de ligação

Nos organismos vivos, os processos biológicos envolvem proteínas que fazem interações com outras moléculas. Essas interações entre proteínas e moléculas ocorrem em um sítio específico da proteína, conhecido como sítio de ligação. O sítio de ligação é composto por resíduos de aminoácidos em posições específicas na proteína, geralmente localizados em cavidades presentes na superfície da proteína (Kandel; Tayara; Chong, 2021).

Os métodos computacionais para predição de sítios de ligação permitem a identificação de sítios com base em informações de sequência e estrutura tridimensional, e diferem de métodos experimentais por serem mais baratos e rápidos. Além disso, a combinação de métodos computacionais pode melhorar a precisão e a eficiência da previsão dos sítios de ligação, desempenhando importante papel em projetos de pesquisas (Marrone; Briggs; McCammon, 1997; Kubinyi, 1998; Tong *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2011).

Os sítios de ligação têm sido de grande interesse nas áreas de *docking* molecular e design de compostos, já que a identificação sítios de ligação não apenas ajuda a explorar mecanismos de interações intermoleculares, mas também a compreender propriedades funcionais das proteínas que levam à descoberta de fármacos (Seco; Luque; Barril, 2009; Ballester; Mitchell, 2010; Durrant; McCammon, 2011; Zhao; Cao; Zhang, 2020).

1.6.4 Docking Molecular

O *docking* molecular é o método mais popular de desenho de fármacos com base na estrutura que tem sido amplamente utilizado desde o início dos anos 1980, sendo uma ferramenta chave para predizer a melhor orientação de ajuste de um ligante em uma proteína, ou seja, o *docking* descreve o encaixe de duas moléculas no espaço tridimensional (Kuntz; Blaney; Oatley; Langridge *et al.*, 1982).

O *docking* provou ser um importante componente de projetos de descoberta de fármacos, seja no âmbito acadêmico ou na indústria. As três principais motivações

são os avanços na biologia estrutural, o impressionante desenvolvimento dos computadores e a crescente disponibilidade de estruturas 3D de proteínas e bancos de dados de compostos (Morris; Lim-Wilby, 2008).

A abordagem de *docking* molecular permite caracterizar o comportamento de pequenas moléculas no sítio de ligação das proteínas alvo, assim como elucidar as interações moleculares entre uma pequena molécula e uma proteína em nível atômico, o que permite analisar processos bioquímicos fundamentais. Programas baseados em diferentes algoritmos foram desenvolvidos para realizar estudos de *docking* molecular, o que tornou o *docking* uma ferramenta cada vez mais importante na pesquisa farmacêutica (Mcconkey; Sobolev; Edelman, 2002; Sousa; Ribeiro; Coimbra; Neves *et al.*, 2013).

Antes de realizar o *docking*, a estrutura tridimensional do alvo macromolecular e os ligantes devem ser preparados, as cadeias laterais e *loops* de proteínas ausentes são adicionados, estados de protonação são atribuídos e esquemas de carga molecular simplificados são calculados. Em seguida, um espaço de pesquisa de ancoragem definido pelo usuário (conhecido como *grid box*) é calculado com base nas coordenadas do sítio de ligação (Kitchen; Decornez; Furr; Bajorath, 2004; Pinzi; Rastelli, 2019).

A metodologia do *docking* consiste em calcular a melhor orientação que uma molécula assume para formar um complexo estável com um receptor, sendo composta por dois componentes fundamentais: o algoritmo de busca e a função de pontuação (Wang; Sun; Yao; Li *et al.*, 2016). O algoritmo de busca tem como objetivo gerar diversas poses do ligante dentro da caixa de simulação delimitada na proteína. A função de pontuação prevê as constantes de afinidade ligante-proteína e pode classificar uma série de compostos, ranqueando os ligante mais ou menos promissores de se ligar à proteína (Guedes; De Magalhães; Dardenne, 2014).

Os algoritmos de busca se enquadram em três grandes categorias: sistemático, estocástico e determinístico. Algoritmos sistemáticos tem como objetivo explorar exaustivamente todo o espaço permitido para a simulação, exploram todos os graus de liberdade do ligante durante a busca (Guedes; De Magalhães; Dardenne, 2014; Wang; Sun; Yao; Li *et al.*, 2016; Weng; Gao; Wang; Wang *et al.*, 2020).

Já a busca estocástica é uma busca de refinamento, como por exemplo por meio de algoritmos genéticos, e pode não explorar todo o espaço de simulação

permitido. É frequentemente usada quando o sítio de ligação já é conhecido (Wang; Sun; Yao; Li *et al.*, 2016; Weng; Gao; Wang; Wang *et al.*, 2020). Os métodos estocásticos alteram aleatoriamente todos os graus de liberdade dos ligantes (translacionais, rotacionais e conformacionais) a cada passo, gerando uma grande diversidade de soluções. Essas poses de ligantes são avaliadas de acordo com um critério probabilístico para decidir se cada uma será rejeitada ou não (Guedes; De Magalhães; Dardenne, 2014). Um exemplo de programa que implementa algoritmos estocásticos é o DockThor (Santos; Guedes; Karl; Dardenne, 2020). A principal desvantagem desses métodos é que não há garantia de convergência para a solução ótima, e execuções múltiplas e independentes do algoritmo são necessárias para maximizar a probabilidade de encontrar o mínimo global de energia (Guedes; De Magalhães; Dardenne, 2014).

Nos métodos determinísticos, o estado atual do sistema determina as modificações a serem feitas, levando ao seu próximo estado. O resultado final é altamente dependente da estrutura de entrada inicial, porque dada exatamente a mesma configuração inicial do sistema e um determinado conjunto de parâmetros, o estado final será sempre o mesmo. Dinâmica molecular é um exemplo de método determinístico (Guedes; De Magalhães; Dardenne, 2014).

As funções clássicas de pontuação, como por exemplo, baseada em campo de força, alocam um conjunto comum de termos de energia que conduzem linearmente à pontuação. As funções de pontuação baseadas em campo de força são derivadas de um campo de força clássico e consistem em uma soma de termos de energia, geralmente consideram as energias de interação do complexo proteína-ligante e a energia interna do ligante. Os principais problemas relacionados a essa função de são os choques atômicos decorrentes de forte repulsão em curtas distâncias resultantes do potencial de Lennard-Jones e superestimação de interações entre átomos carregados. Um exemplos de programa que utiliza essa função de pontuação é o DockThor (Guedes; Barreto; Marinho; Krempser *et al.*, 2021; Santos; Guedes; Karl; Dardenne, 2020) (Halgren, 1996).

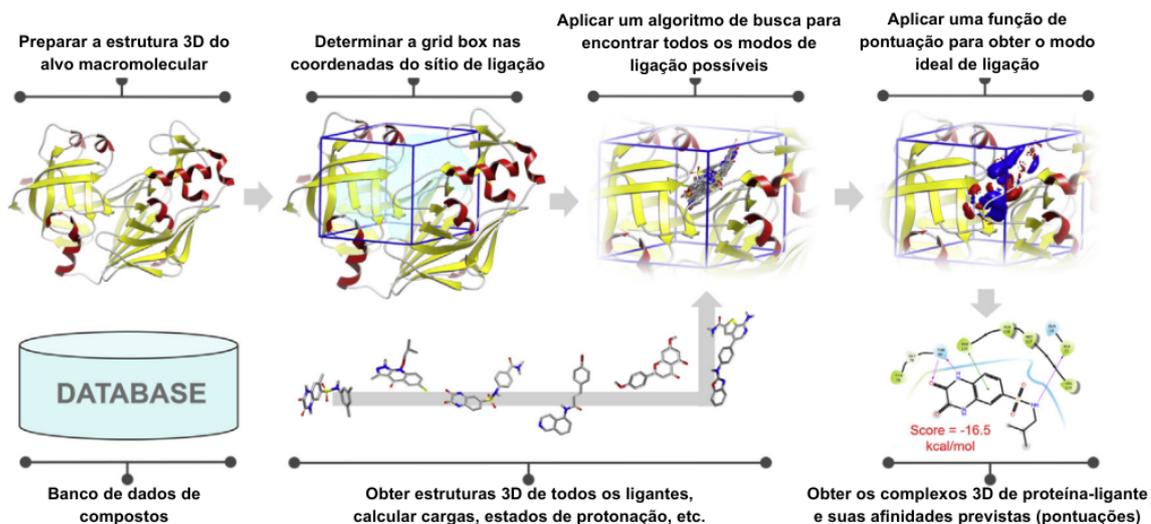


Figura 6. Modelo esquemático do fluxo para realizar um docking molecular. Fonte: Adaptado de NEVES *et al.*, 2021.

2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que o sistema imunológico tem a capacidade de reagir e distinguir entre um número enorme de diferentes proteínas, as quais formam a mais abundante e diversificada classe de antígenos. A interação entre um anticorpo e seu antígeno ocorre de forma específica e com alta afinidade, sendo a investigação de alérgenos salivares um passo fundamental para o conhecimento dessa interação. Embora reportado na maioria dos sialomas de artrópodes como potencial alérgeno, estudos das funções de membros da família do Antígeno 5 (Ag5) presentes na saliva dos triatomíneos são escassos. Assim, a análise *in silico* e de bioinformática estrutural dessa proteína, bem como sua produção por sistemas de expressão heterólogos, poderão contribuir para uma avaliação do Ag5 de *R. neglectus* e a sua possível função, tanto na influência sobre o sistema hemostático quanto imunológico do hospedeiro. Além disso, o Ag5 pode ser avaliado como potencial biomarcador, indicando a exposição à picada dos triatomíneos, podendo auxiliar no diagnóstico precoce da doença de Chagas. Por fim, o Ag5 pode ser alvo para o desenvolvimento de fármacos baseados em biomoléculas anti-hemostáticas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Este estudo teve como objetivos gerais: 1) utilizar abordagens de bioinformática para estudar o Antígeno 5 salivar de *R. neglectus* (RnAg5), vetor da doença de Chagas; e 2) produzir a proteína RnAg5 recombinante e avaliar seu potencial inibitório da agregação plaquetária e da coagulação sanguínea.

3.2 Objetivos Específicos

1. Realizar a análise *in silico* da sequência primária e a predição da estrutura tridimensional do RnAg5;
2. Predizer a presença de epítomos de células B no RnAg5;
3. Priorizar potenciais ligantes através de *docking* molecular;
4. Produzir o RnAg5 recombinante em sistema heterólogo de expressão usando *Escherichia coli*;
5. Purificar o RnAg5 recombinante por cromatografia de afinidade;
6. Realizar ensaios de coagulação sanguínea e agregação plaquetária na presença do RnAg5 recombinante para avaliar seu potencial inibitório.

4 METODOLOGIA

A estratégia computacional e experimental para realização dos objetivos propostos está retratada no fluxograma abaixo.

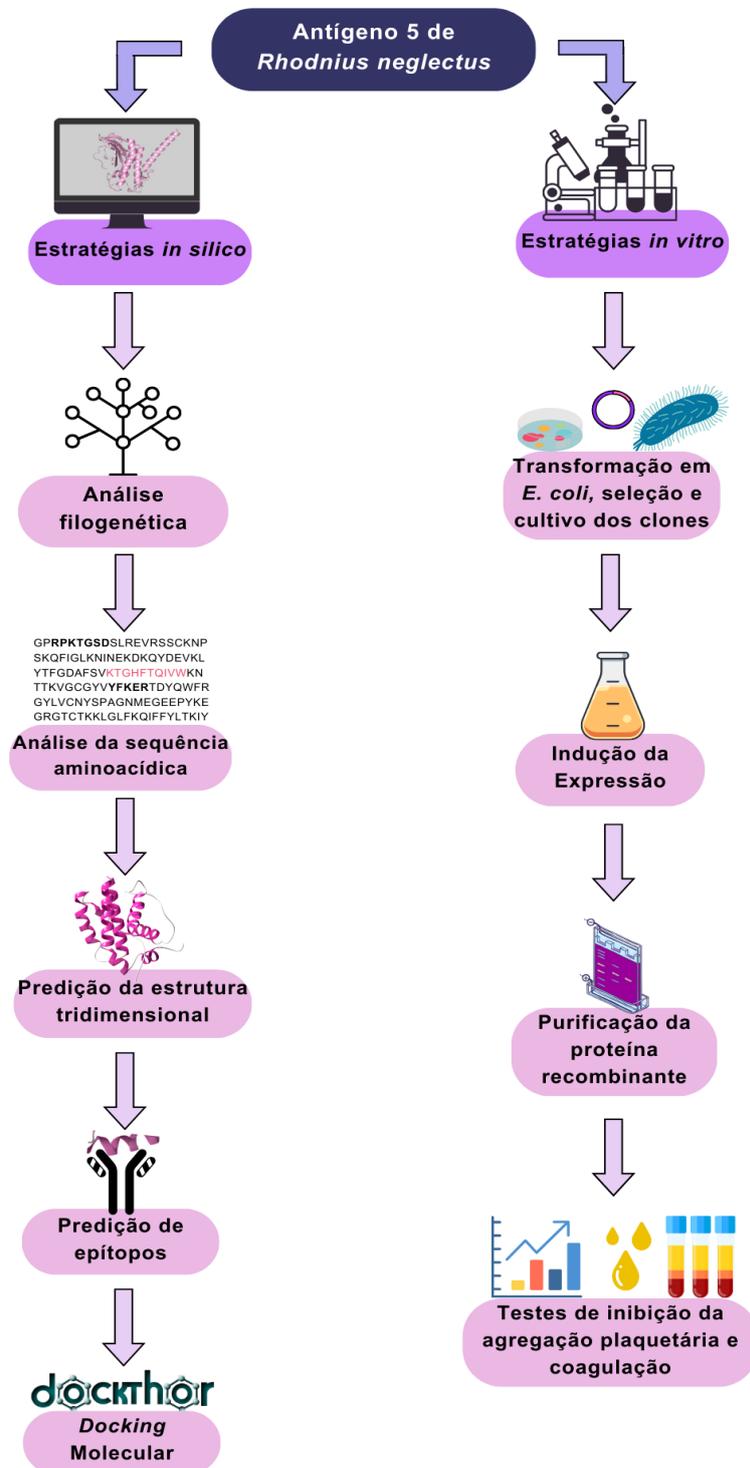


Figura 7. Representação esquemática da metodologia empregada na execução do estudo do Antígeno 5 salivar de *R. neglectus* (RnAg5).

4.1 Estratégias *in silico*

4.1.1 Análise filogenética das sequências de Antígeno 5 de triatomíneos e artrópodes.

As sequências da proteína Ag5 foram recuperadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>, após selecionar o banco de dados *Non-redundant protein sequences* (nr) e selecionando o tax ID 70999 – Triatominae. As seguintes palavras-chave foram utilizadas: SCP, Antigen5, Antigen 5, Ag5, scp/Ag5, scp/Antigen 5, putative Antigen 5 e putative Antigen-5. Sequências fragmentadas também foram consideradas, devido à possibilidade de informações que poderiam fornecer. Em seguida, as sequências de triatomíneos recuperadas foram utilizadas para buscar proteínas da família Ag5 de outros artrópodes usando a ferramenta PSI-BLAST (*Position-Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool*) no NCBI, disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. As pesquisas foram feitas usando 0,005 como *threshold* contra o ID de Arthropoda (ID 6656) no banco de dados de sequências de proteínas não redundantes. As primeiras 20 sequências homólogas com o valor *E-value* de corte de 1E-10 e > 40% de identidade foram consideradas para análise posterior. Sequências preditas e hipotéticas foram descartadas. As sequências obtidas foram então submetidas à ferramenta de pesquisa CD-Search (*Search for Conserved Domains*) (Lu; Wang; Chitsaz; Derbyshire *et al.*, 2020; Marchler-Bauer; Bo; Han; He *et al.*, 2017; Marchler-Bauer; Bryant, 2004; Marchler-Bauer; Derbyshire; Gonzales; Lu *et al.*, 2015; Marchler-Bauer; Lu; Anderson; Chitsaz *et al.*, 2011), disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, para confirmar se continham o domínio da superfamília CAP, ID: cl00133. Apenas as sequências contendo o domínio foram submetidas à análise filogenética. A fim de obter uma melhor observação dos resultados, foram selecionadas até 8 espécies por gênero. Sequências com menos de 150 aminoácidos e repetidas foram desconsideradas, assim como sequências muito semelhantes. Por fim, as sequências de proteínas da família Ag5 foram recuperadas no formato FASTA e estão representadas por seis letras seguidas da identificação GI do NCBI. As letras derivam das três primeiras letras do gênero e das três primeiras letras do nome da espécie.

O programa BioEdit (HALL, 1999) foi usado para editar e integrar o alinhamento múltiplo do conjunto de sequências obtido usando Clustal Omega

(Sievers; Wilm; Dineen; Gibson *et al.*, 2011). O software MEGA (Tamura; Stecher; Kumar, 2012) foi utilizado para inferir a árvore evolutiva e editar graficamente a árvore resultante das sequências de Ag5 de triatomíneos, usando o método estatístico de máxima verossimilhança, sendo a confiabilidade da árvore testada pelo método bootstrap (N = 1000). O programa FigTree (RAMBAUT, 2010) foi utilizado para editar a árvore com as sequências de Ag5 de artrópodes.

4.1.2 Análise da sequência de aminoácidos do Antígeno 5 salivar de *R. neglectus*

A sequência de aminoácidos do RnAg5 foi extraída do banco de dados UniProt (número de acesso A0A0P4VT29). Ela possui 274 resíduos de aminoácidos e codifica para uma proteína de aproximadamente 31 kDa.

Com o objetivo de realizar a caracterização da sequência de aminoácidos da proteína e definir suas propriedades, foi realizada uma análise *in silico* utilizando programas/servidores específicos. O servidor *SignalP 6.0* (Teufel; Almagro Armenteros; Johansen; Gíslason *et al.*, 2022) prevê a presença de peptídeo sinal e a localização de seus locais de clivagem em proteínas de Eukarya. Já o servidor *GlycoEP* (Chauhan; Rao; Raghava, 2013) é utilizado para verificar se as proteínas de células eucarióticas sofrem modificações pós-traducionais como N-glicosilação, O-glicosilação ou C-glicosilação e, em caso positivo, indica as possíveis posições de glicosilação na sequência proteica. O *NetPhos 3.1* (Blom; Sicheritz-Pontén; Gupta; Gammeltoft *et al.*, 2004) prevê locais de fosforilação de serina, treonina ou tirosina em proteínas eucarióticas usando conjuntos de redes neurais. O *TargetP 2.0* (Almagro Armenteros; Salvatore; Emanuelsson; Winther *et al.*, 2019) prevê a presença de peptídeo sinal (SP), peptídeo de trânsito mitocondrial (mTP), peptídeo de trânsito de cloroplasto (cTP) ou peptídeo de trânsito luminal tilacóide (ITP), sendo que para as sequências que é previsto uma pré-sequência N-terminal, também é previsto um local de clivagem potencial.

4.1.3 Predição da estrutura tridimensional do Antígeno 5 salivar de *R. neglectus*

Para realizar a predição da estrutura tridimensional, foram utilizados os cinco servidores listados a seguir. O servidor Swiss-Model (Bertoni *et al.*, 2017; Bienert *et al.*, 2017; Guex; Peitsch; Schwede, 2009; Studer *et al.*, 2020; Waterhouse *et al.*, 2018) e Phyre 2 (Kelley *et al.*, 2015) predizem as estruturas tridimensionais da proteína com base na modelagem comparativa, por homologia.

Os servidores AlphaFold (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2022), trRosetta (Du *et al.*, 2021; Su *et al.*, 2021; Wang; Peng; Yang, 2022) e Raptor X (Källberg *et al.*, 2012) realizam as predições de estruturas tridimensionais através da metodologia de aprendizado profundo. Já o servidor I-Tasser (Yang; Zhang, 2015; Zheng *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2022) realiza a predição estrutural por uma técnica chamada reconhecimento de enovelamento (ou *threading*). Os modelos de estrutura de comprimento total são construídos por meio da remontagem de fragmentos estruturais de modelos de segmentação.

Todos os modelos obtidos foram refinados pelo servidor GalaxyRefine2 (Ko; Park; Heo; Seok, 2012; Seok *et al.*, 2021; Shin *et al.*, 2014) e a qualidade de suas estruturas foi analisada pelo programa MolProbity (Chen *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 2007). O programa MolProbity fornece os valores de *clashscore*, relativo a análise de sobreposição de átomos, portanto, quanto menor o valor melhor; *Ramachandran favored*, referente a distribuição dos ângulos de torção do esqueleto da proteína nas regiões favorecidas, que correspondem às estruturas secundárias regulares, quanto maior porcentagem melhor; *Molprobity score*, o qual representa as estatísticas centrais de qualidade da proteína, é uma combinação ponderada de log do *clashscore*, percentual de *Ramachandran not favored* e percentual de rotâmeros de cadeia lateral ruins, fornecendo um número que reflete a resolução cristalográfica na qual esses valores seriam esperados, nesse caso, quanto menor o valor, melhor é o modelo.

A visualização das estruturas e as imagens foram feitas com o programa PyMOL (Schrödinger, 2020).

4.1.4 Predição de epítomos de Células B

A predição dos epítomos lineares e conformacionais foi realizada utilizando a sequência de aminoácidos e a estrutura tridimensional do RnAg5. Os três programas listados a seguir foram utilizados.

O programa ElliPro (Ponomarenko; Bui; Li; Fusseder *et al.*, 2008) realiza tanto a predição de epítomos conformacionais, quanto de epítomos lineares, com base na estrutura tridimensional. Esse programa caracteriza proteínas antigênicas representando a estrutura da proteína como um elipsóide e então calcula, com base na protuberância estrutural, o índice de protrusão dos resíduos fora do elipsóide.

O programa BepiPred-2.0 (Jespersen; Peters; Nielsen; Marcatili, 2017) realiza a predição de epítomos lineares com base na sequência de aminoácidos da proteína. Esse software utiliza métodos *machine learning* e é treinado em dados de epítomos derivados de estruturas cristalizadas, ele emprega um modelo de *random forest* para treinar epítomos anotados de estruturas de proteínas anticorpo-antígeno e, em seguida, usa o modelo treinado para prever sequências de antígenos recém-geradas.

O servidor SeRenDIP-CE (Hou; Stringer; Waury; Capel *et al.*, 2021) prediz epítomos conformacionais, como base na sequência de aminoácidos. Esse servidor é baseado em um modelo *random forest* e incorpora vários recursos que podem ser derivados da sequência, incluindo conservação, estrutura secundária prevista, área acessível a solventes e comprimento de proteína.

Ao final foi realizada uma sobreposição de epítomos para determinar os epítomos conformacionais e lineares que foram preditos em comum pelos programas. A visualização das estruturas e as imagens foram feitas com o programa PyMOL (Schrödinger, 2020).

4.1.5 Predição de sítios de ligação a ligantes

Os sítios de ligação para ligantes foram preditos com o auxílio dos três programas descritos a seguir.

O servidor FTsite (Ngan; Hall; Zerbe; Grove *et al.*, 2012) realiza um mapeamento computacional, utilizando 16 pequenas sondas moleculares diferentes ao redor da proteína e encontra posições favoráveis usando funções empíricas de energia livre. As sondas individuais são agrupadas e os agrupamentos são

classificados com base na energia livre média. Os resíduos de aminoácidos em contato com as sondas do agrupamento constituem o sítio de ligação do ligante previsto.

O servidor PockDrug (Hussein; Borrel; Geneix; Petitjean *et al.*, 2015) prediz a drogabilidade usando diferentes métodos de estimativa de bolso de ligações: bolsões estimados guiados pela proximidade do ligante (extraídos pela proximidade a um ligante de uma estrutura de holoproteína usando vários limiares) e bolsões estimados não guiados pela proximidade do ligante (com base em átomos de aminoácidos que formam a superfície de cavidades de ligação potenciais).

O servidor PrankWeb (Jendele; Krivak; Skoda; Novotny *et al.*, 2019) é uma ferramenta baseada em aprendizado de máquina para previsão rápida e precisa dos locais de ligação do ligante a partir da estrutura da proteína.

4.1.6 Docking Molecular

As estruturas 3D dos ligantes selecionados para o docking foram recuperados do banco de dado ChemSpider (Pence; Williams, 2010), disponível em <http://www.chemspider.com/>. A estrutura tridimensional predita da proteína foi otimizada com o auxílio do programa Maestro (Schrödinger, 2023), em um pH igual a 7,4. Os ligantes selecionados foram preparados com o programa Avogadro (Hanwell *et al.*, 2012), utilizando um pH igual a 7,4.

O *docking* molecular foi realizado através do servidor DockThor (Guedes *et al.*, 2021; Guedes; De Magalhães; Dardenne, 2014; Santos; Guedes; Karl; Dardenne, 2020). Esse servidor utiliza uma *grid box* para definir o espaço de pesquisa, e usa o algoritmo genético DMRTS, algoritmo genético de estado estacionário de solução múltipla baseado em aglomeração fenotípica, como o algoritmo de busca, sendo que tanto a proteína quanto o ligante (incluindo moléculas de cofator) são tratados com o mesmo campo de força no experimento de encaixe. O DockThor utiliza duas funções *scoring*, uma para predição da pose para um determinado ligante e outra para prever a afinidade de ligação proteína/ligante (utilizando a pose selecionada com a função anterior). Para a predição da pose é utilizada a função energia total do campo de força clássico MMFF94S. A função para predição da afinidade de ligação proteína/ligante é utilizada para ranquear os ligantes.

As interações do *docking* molecular entre proteína e ligante foram analisadas com o programa PLIP (Salentin et al., 2015), disponível em <https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>.

A visualização das estruturas e as imagens foram feitas com o programa PyMOL (Schrödinger, 2020).

4.2 Estratégias *in vitro*

4.2.1 Clonagem do Antígeno 5 salivar de *R. neglectus*

A sequência codificadora completa do RnAg5 (número de acesso UniProt A0A0P4VT29) foi clonada no vetor pET100/D-TOPO (Figura 8), pela empresa ThermoFisher. A sequência do RnAg5 possui 825 nucleotídeos que codificam para uma proteína com 274 resíduos de aminoácidos. Como mencionado anteriormente, um peptídeo sinal contendo 26 resíduos de aminoácidos foi predito usando o programa SignalP (resíduos de 1 a 26). Essa sequência foi desconsiderada para clonagem no vetor pET100/D-TOPO. Dessa forma, a sequência inserida no vetor consistiu dos aminoácidos 27 ao 274, após otimização para expressão em *Escherichia coli*.

O vetor pET100/D-TOPO possui um promotor T7, que nada mais é que uma sequência de DNA de bacteriófago que é reconhecida pela T7 RNA polimerase, e permite que a transcrição do DNA seja iniciada. Além disso, o vetor possui uma sequência do gene operon *lac* (*lacO*), perto do promotor T7, esse gene é regulável, podendo ser induzido ou reprimido. Nesse caso, a inibição ocorre pela proteína repressora *lac* (*LacI*), que se liga com afinidade ao locus *lacO* na ausência de lactose. Essa ligação impede a RNA polimerase de se associar ao promotor, bloqueando a transcrição dos genes posteriores. Quando a lactose, ou seu análogo, IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo), é adicionado, a proteína repressora *LacI* tem sua conformação alterada e perde a afinidade pelo *lacO*, permitindo que a RNA polimerase faça a transcrição (Overton, 2014; Reznikoff, 1992).

O vetor também apresenta um sítio de ligação ao ribossomo (RBS), responsável pelo recrutamento ribossomal durante o início da tradução de proteínas; duas sequências que codificam para caudas na porção N-terminal (uma com seis resíduos de histidina - 6xHis, e a outra com o epítopo Xpress™), essas sequências permitem a detecção pelo *western blotting*, por exemplo, e também a purificação da

proteína por cromatografia de afinidade à cauda de histidina; um sítio para enteroquinase (EK), que possibilita a remoção da cauda de histidina após a purificação da proteína recombinante; um gene de resistência ao antibiótico ampicilina, que permite que a seleção da bactéria foi transformada (Bornhorst; Falke, 2000; Salis, 2011; Tengattini; Rinaldi; Piubelli; Kupfer *et al.*, 2018). A sequência foi clonada direcionalmente no vetor.

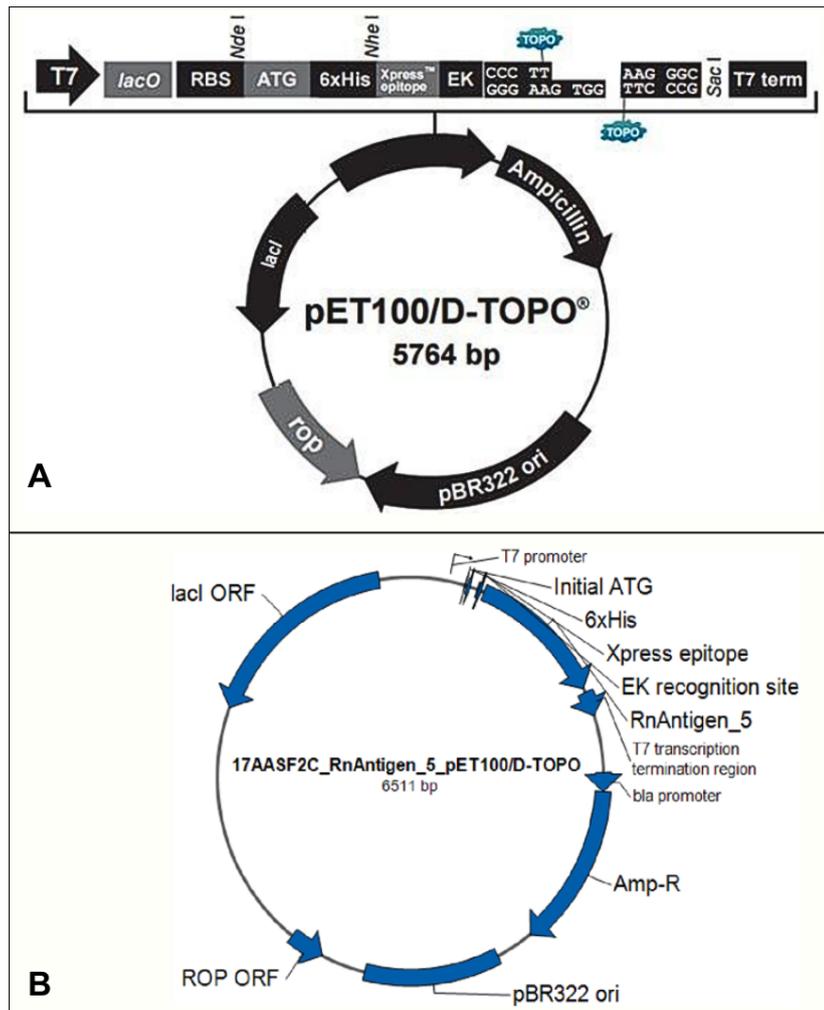


Figura 8. Mapas dos plasmídeos. (A) Vetor de expressão pET100/D-TOPO. (B) A sequência de nucleotídeos do RnAg5 foi inserida no pET100/D-TOPO pela empresa ThermoFisher Scientific. O plasmídeo foi purificado a partir de bactérias transformadas e a concentração determinada por espectroscopia. A construção final foi verificada por sequenciamento. Fonte: ThermoFisher Scientific.

4.2.2 Expressão do Antígeno 5 salivar de *R. neglectus*

4.2.2.1 Linhagens de bactérias utilizadas

Duas linhagens de bactérias *E. coli* competentes foram utilizadas: BL21(DE3) e Rosetta(DE3)pLysS. Ambas podem expressar proteínas recombinantes utilizando o

promotor T7, que está presente no vetor pET100/D-TOPO. O plasmídeo pLysS carrega o gene que codifica para a lisozima T7 que diminui a expressão basal do gene alvo antes da adição de IPTG ao meio de cultura. Esse plasmídeo induz resistência ao cloranfenicol. A linhagem Rosetta(DE3)pLysS difere da linhagem BL21(DE3) por expressar melhor as proteínas que contêm códons raros (KANE, 1995).

4.2.2.2 Transformação de *E. coli* com pET100/D- TOPO_RnAg5

O plasmídeo pET100/D-TOPO_RnAg5 (20 ng/μL) foi utilizado para transformar bactérias competentes *E. coli* das linhagens BL21(DE3) e Rosetta(DE3)pLysS (50 μL) descritas acima. Após a adição do vetor às bactérias, ambos foram incubados por 30 min no gelo. Após esse período, foram submetidas a um choque térmico no banho-maria a 42°C por 1 min e 30 s, e em seguida foram incubados no gelo por 2 min. Posteriormente, foram adicionados 800 μL de meio SOC às bactérias que cresceram sob agitação de 200 rpm a 37°C por 1 h. Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar contendo 100 μg/mL de ampicilina (e 34 μg/mL de cloranfenicol quando a linhagem de *E. coli* apresentava o pLysS) e incubadas em estufa a 37°C por 16 h para crescimento das colônias.

4.2.2.3 Indução da expressão do Antígeno 5 salivar de *R. neglectus* recombinante

Os clones de *E. coli* BL21(DE3) e Rosetta(DE3)pLysS transformados com o plasmídeo do RnAg5 foram cultivados 37°C sob agitação constante de 200 rpm, até atingirem diferentes densidades a 600 nm (OD de 0,2 – 0,6) (espectrofotômetro Pharmacia LKB Ultrospec III) e a expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de diferentes concentrações de IPTG (0,1 mM a 1 mM. Após a adição do agente indutor, as culturas foram incubadas variando o tempo (3 a 22 h) e a temperatura (15 a 37°C), sob agitação de 200 rpm.

Após o período de incubação, as bactérias foram sedimentadas a 4.400 x g por 20 min a 4°C (centrífuga z 326 K, Hermle Labortechnik). Os sobrenadantes foram descartados e as bactérias sedimentadas foram lisadas por dois métodos: químico, utilizando o reagente BugBuster® (Novagen) acrescido de coquetel de inibidores de protease 1X (*cOplete Mini EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche) e DNase, seguindo as instruções do fabricante; ou através do método mecânico por

sonicação. Nesse caso, as bactérias sedimentadas foram ressuspensas em 10 mL de tampão de lise gelado (25mM de Tris pH 8,0 e 500mM de NaCl (Cloreto de sódio); 10 mL para o sedimento de uma cultura de 500 mL) acrescido de coquetel de inibidores de protease 1X (*cOmplete Mini EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche), e lisadas em gelo por 30 s, utilizando o sonicador Sonics Vibra-Cell, com 50% de amplitude. O lisado foi transferido para microtubos (eppendorfs) e centrifugado a 16.000 x g por 20 min a 4°C. As frações solúvel e insolúvel foram separadas e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *western blotting*.

4.2.3 Análise da solubilidade por SDS-PAGE

A fim de analisar o perfil eletroforético unidimensional das frações solúvel e insolúvel, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), sob condições desnaturantes e redutoras (Laemmli, 1970).

As amostras foram diluídas em tampão de amostra 5x [Tris HCl 50 mM pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, β -Mercaptoetanol (β - ME) 15 mM] e fervidas por 5 min antes de serem aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada em sistema MiniProtean®3 Cell (BioRad), à temperatura ambiente, com voltagem constante de 90 V durante passagem pelo gel concentrador e 120 V pelo gel separador, com tampão de corrida Tris-Glicina (25 mM Tris HCl, pH 8,8, 250 mM glicina e SDS 0,1%). Como padrão de massa molecular, foi utilizado o marcador *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific™). Para visualização das proteínas, o gel foi submerso em solução de coloração azul de Coomassie (metanol 45%, ácido acético 10%, Coomassie Brilliant Blue R-250) por 2 h sob agitação constante a temperatura ambiente, e posteriormente transferido à solução descorante (ácido acético 10% e metanol 10%) sob agitação lenta à temperatura ambiente até a visualização das bandas proteicas.

A eletroforese em SDS-PAGE também foi utilizada para analisar as frações eluídas da cromatografia de afinidade, realizada para purificação das proteínas recombinantes.

4.2.4 Western blotting

Para confirmar a expressão das proteínas recombinantes, foi realizada análise por *western blotting* após separação das amostras por SDS-PAGE e transferência para uma membrana de nitrocelulose Amersham™ Protran® Supported 0.45 µm (GE Healthcare). A membrana foi submersa em tampão Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, SDS 0,1% (m/v) e metanol 20% (v/v), por 5 min antes do início da transferência. Utilizou-se o sistema de transferência Trans-Blot Turbo Transfer System. Após a transferência, as bandas foram visualizadas com solução Ponceau (Ponceau S 0,2% p/v; ácidoacético 1%). A membrana foi bloqueada em solução *Tris- buffered saline* (TBS) (Tris 50 mM, pH 7.5 e NaCl 150 mM) contendo 5% (m/v) de leite desnatado por 1 h. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído anti-His (Sigma-Aldrich®) 1:2000 em TBS contendo 0,1% (v/v) de Tween 20 e 1% (m/v) de leite desnatado por 1 h a temperatura ambiente. Após essa etapa de incubação, a membrana foi lavada quatro vezes por 5 min a temperatura ambiente, sob agitação, com TBS contendo 0,1% de Tween 20. Depois, foi incubada com o anticorpo secundário (*goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugated*) diluído 1:5.000 em TBS Tween 20 0,1% e leite desnatado 1% (m/v) por 1,5 h. Por fim, a membrana foi lavada sete vezes com TBS Tween 20 0,1%. Após as lavagens, as bandas de proteínas imunorreativas foram visualizadas utilizando o substrato quimioluminescente de peroxidase (*ECL™ Prime Western blotting detection reagent*, GE Healthcare) no equipamento FUSION Solo X (vilber).

4.2.5 Purificação do Antígeno 5 salivar de *R. neglectus* Recombinante

Após a confirmação da expressão das proteínas recombinantes pela técnica de *western blotting*, as frações do lisado bacteriano com o Ag5 recombinante foram usadas para purificação por cromatografia de afinidade em Coluna HisTrap HP (GE Healthcare) com resina de afinidade Ni Sepharose High Performance (HP) conectada a um sistema purificador AKTA Purifier 100 FPLC System w/ UPC-900 (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada em 25mM de Tris pH 8,0, 500mM de NaCl, com fluxo de 1 ml/min. Após a injeção da amostra (fração solúvel), a coluna foi lavada com o mesmo tampão contendo 25mM e 50mM de imidazol. A eluição foi realizada com 25mM de Tris pH 8,0, 500mM de NaCl, e duas concentrações de imidazol,

200mM e 500mM, a um fluxo de 1 ml/min. As frações contendo o RnAg5 recombinante, confirmadas por SDS-PAGE e western blotting, foram combinadas (4 ml) e, posteriormente, concentradas e dialisadas em um concentrador Centricon (cut-off de 10 kDa). A fração concentrada foi quantificada no aparelho NanoDrop (ThermoFisher Scientific).

4.3 Criação de triatomíneos

Os triatomíneos da espécie *R. neglectus* foram coletados em 1982 em Itambaracá/Paraná (Santiago; Assumpção; De Araújo; Bastos *et al.*, 2016). Eles são mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, onde são conservados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, com umidade relativa de $70 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12 h. Ovos, ninfas de 1° ao 5° estágios e em média 25 adultos mantidos separadamente em frascos de polietileno para desenvolvimento e acasalamento. Os triatomíneos são alimentados quinzenalmente em sangue de aves (*Gallus gallus domesticus*) por 30 min. Insetos adultos de ambos os sexos foram usados nos experimentos.

4.3.1 Obtenção da saliva

As glândulas salivares foram extraídas dos insetos adultos de ambos os sexos escolhidos aleatoriamente. Com o auxílio de um estereomicroscópio, cada triatomíneo foi posicionado ventralmente sobre uma lâmina de vidro, a cabeça foi deslocada cuidadosamente com uma pinça cirúrgica expondo o par de glândulas. Essas foram recolhidas utilizando uma seringa de 0,3 mm, armazenadas em um microtubo de 1,5 mL e mantidas em gelo até o término da coleta. Em seguida, as glândulas foram perfuradas e o extrato salivar foi centrifugado a $16000 \times g$ por 15 min a 4°C . Após a centrifugação, a fração solúvel foi recolhida e utilizada para os testes de coagulação e agregação.

4.4 Avaliação da agregação plaquetária na presença do RnAg5

A avaliação da agregação plaquetária é baseada na variação de quantidade de luz refletida e absorvida de um plasma rico em plaquetas (PRP) sob a ação de

diferentes agonistas da agregação, como por exemplo ADP e colágeno. O ensaio avalia a porcentagem de agregação plaquetária. O procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sob o número 48142021.1.0000.8093. Os participantes assinaram o Termo de consentimento livre e esclarecido. Primeiramente, o sangue de um doador voluntário sadio foi coletado por punção venosa, com o uso de material tipo Vacutainer descartável, após jejum de no mínimo 4 horas. O doador relatou não haver feito uso de nenhum medicamento que pudesse interferir na agregação plaquetária nos 10 dias anteriores à coleta. O sangue foi coletado em tubos contendo citrato de sódio 3,8% e os testes realizados em, no máximo, 4 h. O PRP e o plasma pobre em plaquetas (PPP) foram obtidos pela centrifugação do sangue a 200 x g por 10 min e 000 x g por 10 min (Sharma; Sachdeva; Kumar; Bose *et al.*, 2021).

A agregação plaquetária foi avaliada através da absorbância medida em leitora de microplaca EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer®), utilizando placas de 96 poços. O comprimento de onda utilizado para o ensaio foi de 405 nm (Bednar; Condra; Gould; Connolly, 1995). O PPP foi utilizado como branco. O PRP, 175µL, foi incubado com 15 µL de PBS (*Phosphate-buffered saline*), para controle negativo, 15 µL de saliva extraída das glândulas de *R. neglectus* (1 ou 2 glândulas), para controle positivo, e 15 µL de RnAg5 (6 µM), por 3 minutos, a 37°C sob agitação constante de 150 rpm. Após esse período, a absorbância foi registrada. Posteriormente, foram adicionados 5 µM de ADP (Sigma-Aldrich®) ou 1 µg colágeno tipo I (Sigma-Aldrich®) e a leitura foi realizada a cada 1 minuto, durante 5 minutos, a 37°C, sob agitação constante de 150 rpm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A quantidade de luz absorvida inicialmente é obtida quando estão as plaquetas em suspensão, não foram ativadas. Após a adição do agonista (ADP ou colágeno), as plaquetas são ativadas e iniciam a agregação, permitindo uma passagem maior de luz. Assim, a diferença entre os valores de absorbância observada na condição basal e após a adição dos agonistas representa a intensidade de agregação plaquetária observada. A taxa de agregação plaquetária foi calculada utilizando a seguinte fórmula: Taxa de Agregação plaquetária = $[\text{OD}(\text{Sem agonista}) - \text{OD}(\text{Agonista})] / [\text{OD}(\text{Sem agonista}) - \text{OD}(\text{Branco})] \times 100$ (French *et al.*, 2018; Ramakrishna; Singh; Krishnamurthy, 2022). Ao fim do ensaio,

os arquivos contendo os dados brutos foram coletados e convertidos em formato Excel® para tabulação e análise.

4.5 Avaliação da coagulação sanguínea na presença do RnAg5 e da saliva de *R. neglectus*

4.5.1 Avaliação do tempo de protrombina na presença da saliva de *R. neglectus*

O Tempo de Protrombina (TP), mede o tempo necessário (em segundos) para o sangue coagular após a adição de uma enzima ativadora conhecida como tromboplastina. A ativação da cascata de coagulação é dependente de fatores de coagulação específicos encontrados no sangue, a saber, fator II (protrombina), V, VII, X e fibrinogênio. O teste consiste na medida do tempo de coagulação do plasma após a adição de uma fonte de fator tissular (tromboplastina) e cálcio. Este processo culminará com a ativação do fator x, resultando na formação do coágulo de fibrina (Yang; Moosavi, 2023).

Para o teste foi utilizado o Plasma Controle normal CLOT®. Foram adicionados 80 µL de plasma com 20 µL de PBS, para controle negativo, e 20 µL de saliva extraída das glândulas de *R. neglectus* (2 glândulas). As amostras foram incubadas para pré-aquecimento a 37°C, durante 3 minutos, sob agitação. Em seguida 0,1 mL da amostra foi pipetado na cuveta contendo 0,2 mL do reagente TP CLOT® (composto de extrato de cérebro de coelho e cloreto de cálcio), disparando simultaneamente o cronômetro. O experimento foi realizado em triplicata no aparelho Coagulômetro CloTimer (CLOT®). Os valores normais se situam entre 10 e 14 segundos. Ao fim do ensaio, os dados foram coletados e um gráfico foi gerado a partir do programa Prism (GraphPad) para melhor visualização dos dados.

4.5.2 Avaliação do tempo de tromboplastina parcial ativada na presença de RnAg5

O Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) analisa a via intrínseca da cascata da coagulação, avaliando os fatores VIII, IX, XI, XII. O TTPA baseia-se no princípio de que no plasma citratado, a adição de um substituto plaquetário, ativador do fator XII e CaCl₂ permite a formação de um coágulo estável. O teste TTPA envolve especificamente a recalcificação do plasma uma vez que a amostra tenha

sido incubada com um substituto de plaquetas e um ativador do fator XII. A ativação do sistema de coagulação em uma amostra de plasma na presença de um substituto plaquetário, ativador do fator XII e CaCl_2 leva à formação de um coágulo estável. O tempo desde a ativação até a formação de um coágulo estável é registrado em segundos e representa o TTPA. A ausência do fator tecidual (tromboplastina) nessa reação levou ao uso do termo “parcial” (Ignjatovic, 2013).

O teste consiste na determinação do tempo de coagulação do plasma citratado, após a adição do reagente que contém um ativador plasmático (ácido elágico) e fosfolípedes. Os fosfolípedes atuam como substitutos das plaquetas. Após incubação ocorre a ativação, sendo adicionado posteriormente o cloreto de cálcio (recalcificação).

Para o teste foi utilizado o Plasma Controle normal CLOT®. Primeiramente, 0,1 mL do reagente TTPA CLOT foi incubado juntamente com 80 μL de plasma com 20 μL de PBS, para controle negativo, 20 μL de saliva extraída das glândulas de *R. neglectus* (2 glândulas), e 20 μL de RnAg5 (6 μM), a 37°C, durante 3 minutos, sob agitação. Posteriormente, 0,1 mL de cloreto de cálcio (CaCl_2) pré-aquecido foi adicionado e o cronômetro foi disparado simultaneamente. O teste foi realizado em triplicata no aparelho Coagulômetro CloTimer (CLOT®). Os valores normais se situam entre 28 e 43 segundos. Ao fim do ensaio, os dados foram coletados e um gráfico foi gerado a partir do programa Prism (GraphPad) para melhor visualização dos dados.

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS *IN SILICO*

5.1.1 Análise filogenética

5.1.1.1 Filogenia do Antígeno 5 de triatomíneos

A Tabela 1 mostra as 45 sequências de Ag5 de Triatominae obtidas da busca no NCBI. Na figura 9 é possível verificar a árvore filogenética dessas sequências. Conforme mostrado na Tabela 1, as sequências apresentaram em sua maioria o domínio CAP_euk (ID: cd05380). Algumas sequências também apresentaram outros domínios da superfamília CAP, como o domínio associado à Família Crisp, Crisp (ID: pfam08562), ou o domínio da proteína 1 relacionada à patogênese de plantas associada ao Golgi, semelhante a CAP_GAPR1 (ID: cd05382).

Tabela 1. Diferentes espécies de triatomíneos e suas sequências de Ag5 recuperadas do NCBI.

Organismo	Número de acesso GenBank	Número de aa	Peso molecular (Da)	Referência	Domínio	
					Nome	ID
<i>Dipetalogaster maximus</i>	AEM97929.1	184	20,911	Assumpção, T. C. et al, 2011	CAP_euk	cd05380
	AEM97973.1	249	27,840	Assumpção, T. C. et al, 2011	CAP_euk	cd05380
	AEM97975.1	249	27,770	Assumpção, T. C. et al, 2011	CAP_euk	cd05380
<i>Panstrongylus chinai</i>	BBA30650.1	235	26,687	Kato, H. et al, 2017	CAP super family	cl00133
<i>Panstrongylus lignarius</i>	JAW10215.1	436	49,184	Nevoa, J. C. et al, 2018	CAP_GAPR1-like	cd05382
	JAW12565.1	231	25,961	Nevoa, J. C. et al, 2018	CAP_euk	cd05380
	JAW12474.1	238	26,726	Nevoa, J. C. et al, 2018	CAP_euk	cd05380
	JAW12580.1	230	26,067	Nevoa, J. C. et al, 2018	CAP_euk	cd05380
	JAW13199.1	195	22,713	Nevoa, J. C. et al, 2018	CAP_euk	cd05380
<i>Panstrongylus megistus</i>	JAC85903.1	202	23,462	Ribeiro, J. M.; Schwarz, A.; Francischetti, M. B. I, 2015	CAP_euk	cd05380
	JAC87376.1	436	49,172	Ribeiro, J. M.; Schwarz, A.; Francischetti, M. B. I, 2015	CAP_GAPR1-like	cd05382
	JAC86189.1	242	27,480	Ribeiro, J. M.; Schwarz, A.; Francischetti, M. B. I, 2015	CAP_euk	cd05380

Organismo	Número de acesso GenBank	Número de aa	Peso molecular (Da)	Referência	Domínio	
					Nome	ID
<i>Rhodnius neglectus</i>	JAI53467.1	207	23,439	Santiago, P. B. et al, 2016	CAP_euk	cd05380
	JAI55660.1	245	27,991	Santiago, P. B. et al, 2016	CAP_euk	cd05380
	JAI53306.1	195	21,935	Santiago, P. B. et al, 2016	CAP_euk	cd05380
	JAI52842.1	169	18,792	Santiago, P. B. et al, 2016	CAP_euk	cd05380
	JAI53690.1	201	22,259	Santiago, P. B. et al, 2016	CAP_euk	cd05380
	JAI54394.1	437	49,467	Santiago, P. B. et al, 2016	CAP_GAPR1-like	cd05382
	JAI55661.1	274	31,317	Santiago, P. B. et al, 2016	CAP_euk	cd05380
<i>Rhodnius prolixus</i>	MOY45699.1	270	30,524	Cardoso, J. C. et al, 2020	CAP_euk	cd05380
	AAQ20832.1	250	28,229	Ribeiro, J. M. et al, 2004	CAP_euk	cd05380
	JAA77212.1	237	26,357	Ribeiro, J. M. et al, 2004	CAP_euk	cd05380
	JAA77412.1	437	49,467	Ribeiro, J. M. et al, 2004	CAP_GAPR1-like	cd05382
	JAA75960.1	228	25,759	Ribeiro, J. M. et al, 2004	CAP_euk	cd05380
<i>Triatoma dimidiata</i>	JAP02347.1	155	18,191	Santiago, P. B. et al, 2018	CAP_euk	cd05380
	JAP05627.1	436	49,079	Santiago, P. B. et al, 2018	CAP_GAPR1-like	cd05382
	JAP05961.1	237	27,270	Santiago, P. B. et al, 2018	CAP super Family	cl00133
	BAI50822.1	239	26,834	Kato, H. et al, 2010	Crisp	pfam08562
	BAI50838.1	241	27,502	Kato, H. et al, 2010	CAP_euk	cd05380
	BAI50854.1	230	26,197	Kato, H. et al, 2010	CAP_euk	cd05380
	JAC17714.1	436	49,163	Schwarz, A. et al., 2014	CAP_GAPR1-like	cd05382

Organismo	Número de acesso GenBank	Número de aa	Peso molecular (Da)	Referência	Domínio	
					Nome	ID
<i>Triatoma infestans</i>	JAC18571.1	204	23,116	Schwarz, A. et al., 2014	CAP_euk	cd05380
	JAC18655.1	233	26,777	Schwarz, A. et al., 2014	CAP_euk	cd05380
	JAC18558.1	237	27,306	Schwarz, A. et al., 2014	CAP super family	cl00133
					Crisp	pfam08562
	JAC18593.1	197	22,447	Schwarz, A. et al., 2014	CAP_euk	cd05380
<i>Triatoma matogrossensis</i>	ABR27897.1	244	28,106	Assumpção, T. C. et al, 2008	CAP_euk	cd05380
	ADN29828.1	237	27,181	Assumpção, T. C. et al, 2012	CAP_euk	cd05380
	ADN29901.1	185	20,925	Assumpção, T. C. et al, 2012	CAP_euk	cd05380
<i>Triatoma rubida</i>	AER92504.1	182	20,539	Ribeiro, J. M. et al, 2012	CAP_euk	cd05380
	AER92505.1	172	19,473	Ribeiro, J. M. et al, 2012	CAP_euk	cd05380
	AER92506.1	156	17,651	Ribeiro, J. M. et al, 2012	CAP_euk	cd05380
<i>Triatoma sórdida</i>	MCD9136526.1	241	27,530	Praça, Y. R. et al, 2021	CAP_euk	cd05380
	MCD9136527.1	240	27,370	Praça, Y. R. et al, 2021	CAP_euk	cd05380
	MCD9136528.1	240	27,450	Praça, Y. R. et al, 2021	CAP_euk	cd05380
	MCD9136529.1	239	27,350	Praça, Y. R. et al, 2021	CAP_euk	cd05380

A análise da árvore filogenética das sequências do Ag5 (Figura 9) mostrou que as sequências que apresentam os domínios Crisp e CAP_GAPR1-like formaram clados separados, destacados em vermelho e verde, respectivamente.

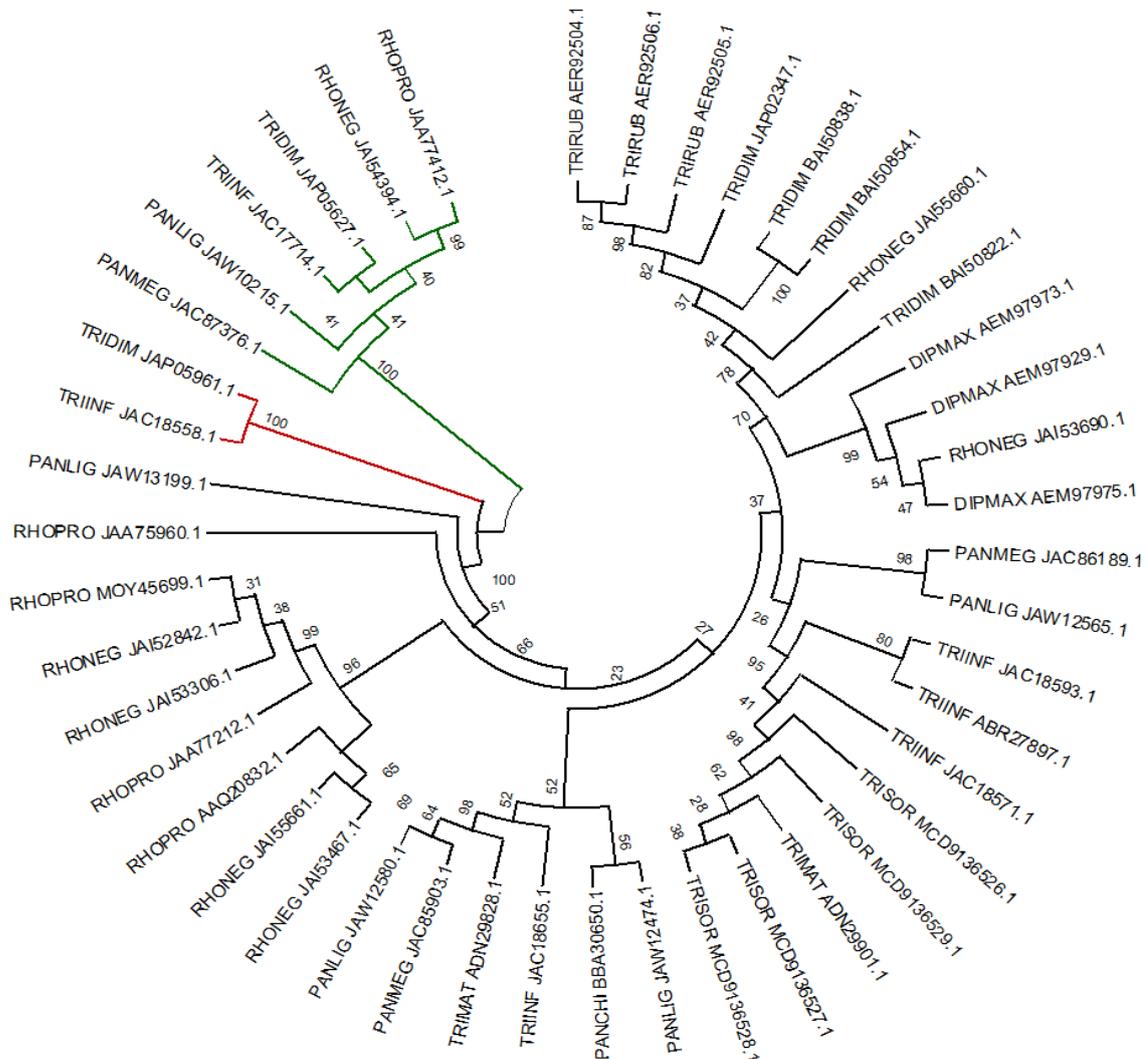


Figura 9. Árvore filogenética das sequências de aminoácidos recuperadas na busca de proteínas da família Antígeno 5/CAP de triatomíneos. Árvore filogenética com todas as sequências do Ag5 recuperadas na busca BLAST contra triatomíneos. Em vermelho estão as sequências com domínio crisp (ID: pfam08562) e em verde estão as sequências com domínio semelhante a CAP_GAPR1 (ID: cd05382). A árvore foi construída e editada por meio do software MEGA, com os valores bootstrap (N = 1000) mostrados ao lado dos ramos. As sequências de proteínas da família Ag5 são representadas por seis letras seguidas pelo número NCBI GI. As letras derivam das três primeiras letras do gênero e das três primeiras letras do nome da espécie.

família Antígeno 5/CAP de artrópodes. Árvore filogenética com todas as sequências do Ag5 recuperadas na busca BLAST contra organismos artrópodes. Os subclados estão coloridos de acordo com a ordem de cada espécie. Cor – Ordem (Família): Vermelho – Hemiptera (Triatominae, Miridae, Cimicidae); Amarelo – Diptera (Culicidae, Cecidomyiidae, Stratiomyidae, Tephritidae, Calliphoridae, Diopsidae, Drosophilidae); Verde – Hymenoptera (Formicidae, Vespidae, Figitidae, Orussidae, Cephidae); Magenta – Lepidoptera (Pieridae, Noctuidae, Nymphalidae); Azul escuro – Orthoptera (Acrididae, Gryllidae); Roxo – Coleoptera (Chrysomelidae); Azul claro – Aranae (Eresidae); Lilás – Acarina (Ixodidae); Laranja – Scolopendromorpha (Scolopendridae). A árvore foi construída por meio do software MEGA e editada pelo programa FigTree. As sequências de proteínas da família Ag5 são representadas por seis letras seguidas pelo número NCBI GI. As letras derivam das três primeiras letras do gênero e das três primeiras letras do nome da espécie.

5.1.2 Análise *in silico* da sequência de aminoácidos do Antígeno 5 de *R. neglectus*

A sequência do RnAg5 (número de acesso UniProt A0A0P4VT29) possui 274 resíduos de aminoácidos e aproximadamente 31 kDa.

A análise da sequência revelou que o RnAg5 possui um peptídeo sinal na porção *N*- terminal e é putativamente secretado pela via clássica de secreção. De acordo com o programa Glyco EP, o RnAG5 apresenta 10 resíduos preditos a sofrerem glicosilação e, pela análise do programa *NetPhos* 3.1, possui 23 sítios preditos a serem fosforilados (Tabela 2 e Figura 11).

Tabela 2. Análise *in silico* da sequência de aminoácidos do RnAg5.

Programa	Referência	Análise	Resultado
SignalP 6.0	Teufel <i>et al.</i> , 2022	Peptídeo Sinal	1-26 aa
TargetP	Almagro <i>et al.</i> , 2019	Localização Celular	Secretada Via clássica
Glyco EP: O-glicosilação	Chauhan; Rao; Raghava, 2013	Glicosilação na hidroxila de serina, treonina e tirosina	Treonina 94, 173, 177, 185 e 231; Serina 170 e 212
Glyco EP: N-glicosilação	Chauhan; Rao; Raghava, 2013	Glicosilação no nitrogênio de asparagina ou arginina	Asparagina 46, 183 e 210.
Glyco EP: C-glicosilação	Chauhan; Rao; Raghava, 2013	Glicosilação no carbono de triptofano	Não foram preditos sítios potenciais
NetPhos 3.1	Blom <i>et al.</i> , 2004	Fosforilação de serina, treonina e tirosina.	Serina 36, 42, 108, 134, 135, 170, 212 e 237; Tirosina 112, 148, 157, 200 e 223; Treonina 32, 122, 144, 164, 173, 177, 184, 229, 238 e 271.

MVQYCSLEVGLLASIVFLSSMVLVVRPGRPRPKTGSDSLREVRSSCKNPSKQFIGLKNINEKDKQLLLNKH
 NKYREKVAAGKEPPQPKAENMILLTWSDAALQAKAWASGCDYGHNNPEIKKTKKPMGQNIYMKSSSTEN
 GLEKTFKKYIPEMVKGWYDEVKLYTFGDASFVKTGHFTQIVWKNTTKVGCYVYFKERTDYQWFRGYL
 VCNYSYPAGNMEGEEPYKEGRGTCTGNLVASTKYPHLCQKKKEIIKKLGLFKQIFSYQILFYLTKIY

Figura 11. Sequência aminoacídica do Antígeno 5 de *R. neglectus*. O peptídeo sinal está destacado em roxo. Resíduos preditos a sofrerem fosforilação estão marcados em azul e resíduos preditos a sofrerem glicosilação estão marados de vermelho.

5.1.3 Predição da estrutura tridimensional de RnAg5

A estrutura tridimensional do RnAg5 foi predita utilizando 5 servidores diferentes. A sequência foi submetida sem peptídeo sinal. Os modelos obtidos foram submetidos ao refinamento pelo programa GalaxyRefine2 com o intuito de melhorar suas estruturas, posteriormente, foram submetidos ao servidor MolProbit, para avaliação da qualidade. As pontuações obtidas nos parâmetros de análise *Molprobit score*, *Clashscore* e *Ramachandran Favored* (Tabela 3) foram utilizadas para análise de qualidade e classificação dos modelos, para as análises posteriores de epítomos de células B e *docking* molecular.

Tabela 3. Predição da estrutura tridimensional e pontuação gerada pelo programa MolProbit das análises dos modelos.

PROGRAMAS	METODOLOGIA	MOLPROBIT		
		Molprobit score	Clashscore	Ramachandran Favored
AlphaFold	Deep Learning	0.79	0.99	99.19%
Swiss-Model	Homologia	0.81	1.09	98.24%
trRosetta	Deep Learning	1.10	0.99	95.53%
RaptorX	Homologia	1.21	1.99	96.34 %
Phyre2	Homologia	1.28	1.64	94.69%
I-Tasser	Threading	1.27	0.75	90.65%

Todos os modelos foram refinados pelo programa GalaxyRefine2. Após o refinamento foram obtidas as pontuações no servidor MolProbit. Em negrito está a análise feita do modelo gerado pelo programa AlphaFold, que obteve melhor pontuação.

Os modelos obtidos podem ser observados na Figura 12.

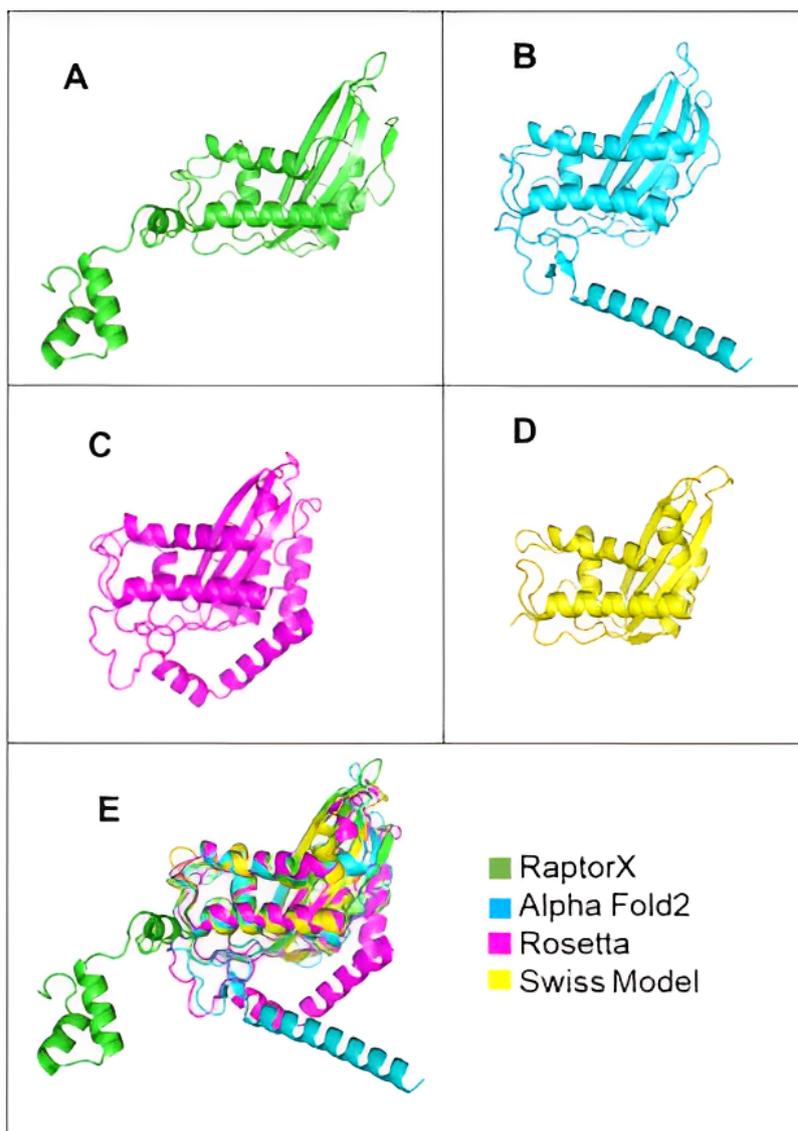


Figura 12. Modelos tridimensionais preditos do RnAg5. (A) modelo predito pelo programa RaptorX. (B) modelo predito pelo programa AlphaFold. (C) modelo predito pelo programa trRosetta. (D) modelo predito pelo programa Swiss-Model. (E) sobreposição de todos os modelos. Imagem gerada por meio do software PyMOL.

O melhor modelo gerado, com base nas análises de pontuação e análise da estrutura foi o modelo predito pelo servidor AlphaFold (Figura 13). A estrutura consiste em cinco α -hélices e seis fitas β .

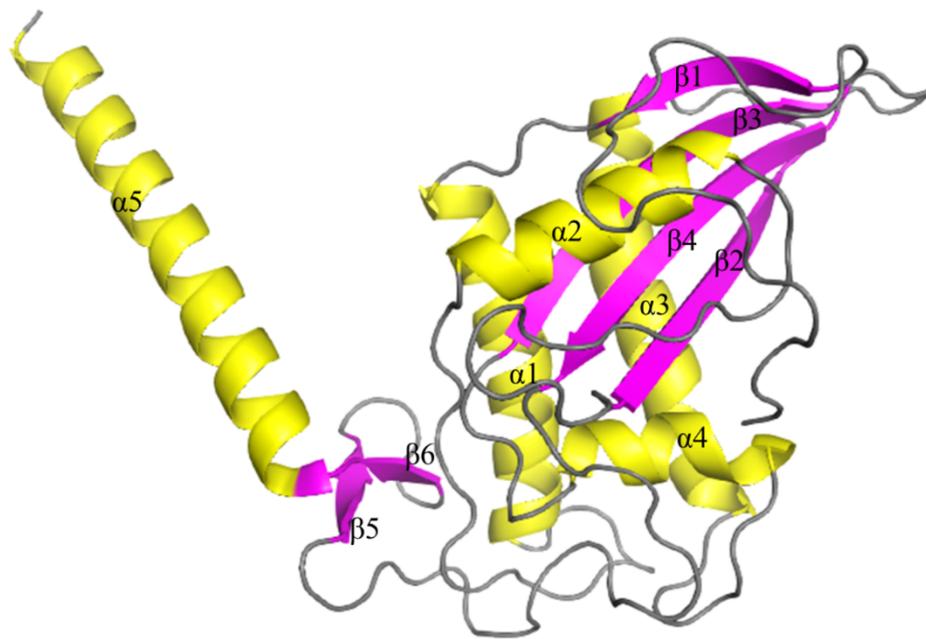


Figura 13. Estrutura tridimensional predita do RnAg5 pelo servidor AlphaFold. Em amarelo estão destacadas as cinco α -hélices: $\alpha 1$ (33-52), $\alpha 2$ (71-83), $\alpha 3$ (115-136), $\alpha 4$ (145-154) e $\alpha 5$ (221-248), e de magenta estão destacadas as seis fitas β : $\beta 1$ (23-28), $\beta 2$ (101-109), $\beta 3$ (161-170), $\beta 4$ (176-185), $\beta 5$ (208 –211) e $\beta 6$ (218–220). Imagem gerada por meio do software PyMOL.

A estrutura tridimensional apresentou o domínio característico da superfamília CAP, a dobra α - β - α -sanduíche. Esse domínio possui quatro motivos de assinatura: CAP1, CAP2, CAP3 e CAP4 (Figura 14).

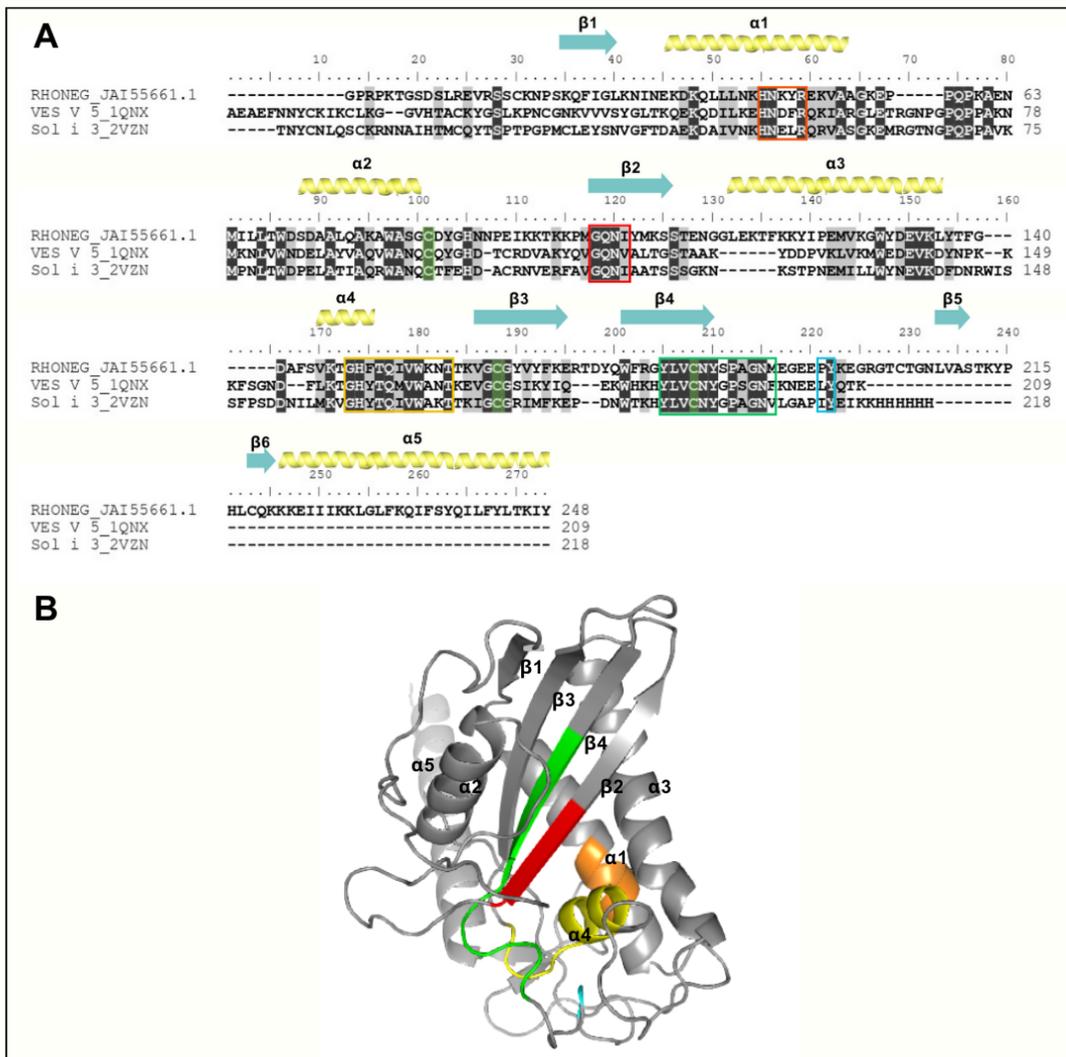


Figura 14. Motivos da superfamília CAP (CAP3, CAP 4, CAP1, CAP2) e o motivo típico [ILVP]Y da família Ag5 destacados no alinhamento do Ag5 e na estrutura tridimensional. (A) Alinhamento com a sequência de RnAg5 e com as sequências de duas proteínas da família Ag5 presentes no PDB, a Ves v 5 (código 1QNX) da *Vespa vulgaris*, e Sol i 3 (código 2VZN) de *Solenopsis invicta*. As cisteínas conservadas estão marcadas de verde. Os resíduos conservados estão marcados de preto, já os resíduos semi conservados estão marcados de cinza claro. Alinhamento realizado através do programa Clustal Omega e editado com o software BioEdit. (B) Estrutura tridimensional do RnAg5 com os motivos CAP em destaque. Imagem gerada por meio do software PyMOL.

5.1.4 Predição de epítomos de Célula B

A predição de aminoácidos que compõem possíveis epítomos de células B foi feita com base na sequência primária de aminoácidos e na estrutura tridimensional. Para predição de epítomos conformacionais, foram utilizados os programas ElliPro e SeRenDIP.

Foram preditos 127 resíduos de aminoácidos que compõem epítomos conformacionais. Os resíduos preditos foram destacados na estrutura proteica do RnAg5 (Figura 15).

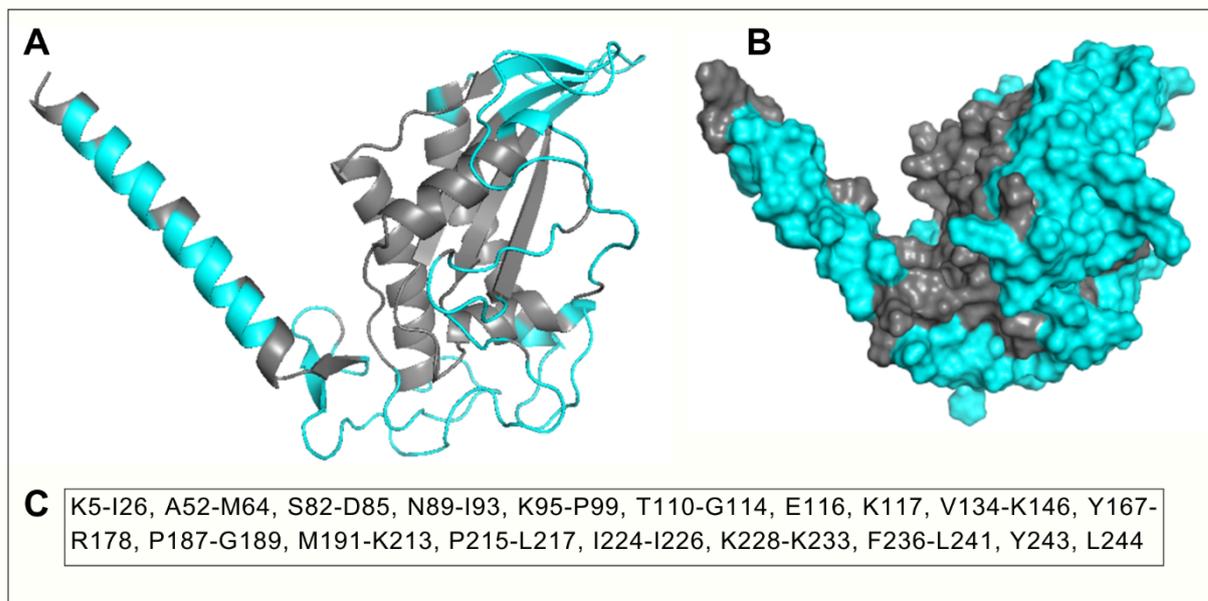


Figura 15. Resíduos que compõem epítomos conformacionais preditos pelos programas ElliPro e SeRenDIP demonstrados no modelo tridimensional. Modelo tridimensional indicando, em azul, os 127 resíduos preditos em comum pelos dois programas. (A) Cartoon. (B) Superfície. (C) Resíduos preditos: K5-I26, A52-M64, S82-D85, N89-I93, K95-P99, T110-G114, E116, K117, V134-K146, Y167-R178, P187-G189, M191-K213, P215-L217, I224-I226, K228-K233, F236-L241, Y243, L244. Imagem gerada por meio do software PyMOL.

Os aminoácidos que compõem epítomos lineares foram preditos com o auxílio dos programas ElliPro e BepiPred 2.0. Foram preditos 104 resíduos de aminoácidos que compõem epítomos lineares. Os resíduos foram destacados na estrutura tridimensional do RnAg5 (Figura 16).

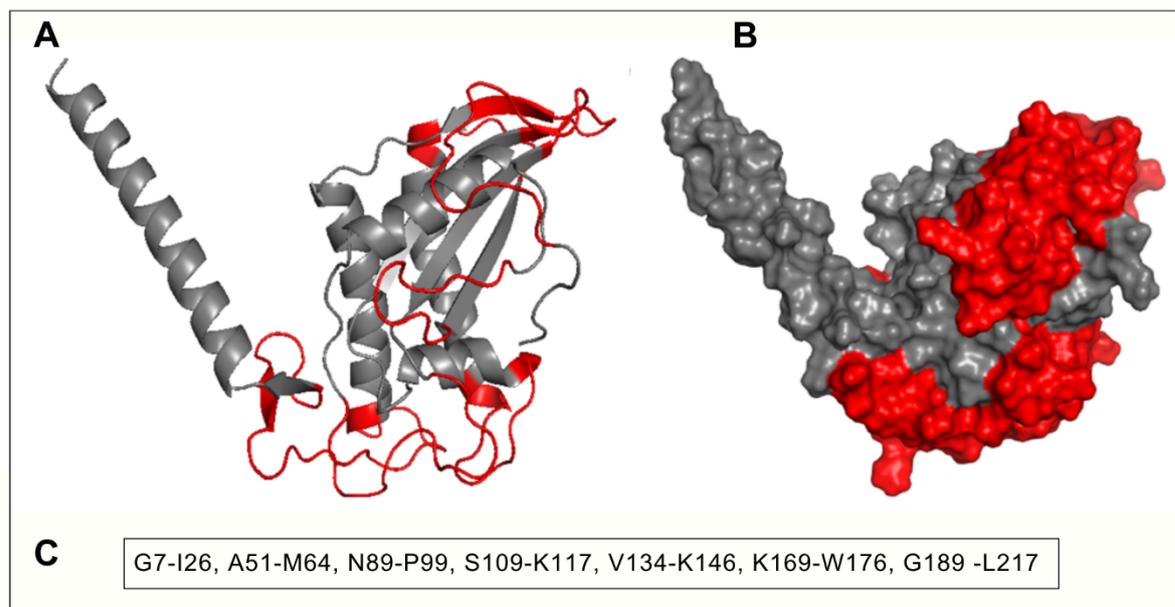


Figura 16. Resíduos que compõem epítomos lineares preditos pelos programas ElliPro e BepiPred 2.0 demonstrados no modelo tridimensional. Modelo tridimensional indicando, em vermelho, os 104 resíduos preditos em comum pelos dois programas. (A) Cartoon. (B) Superfície. (C) Resíduos preditos:

G7-I26, A51-M64, N89-P99, S109-K117, V134-K146, K169-W176, G189 -L217. Imagem gerada por meio do software PyMOL.

5.1.5 Predição de sítios de ligação

A predição de sítios de ligação para ligantes foi realizada utilizando os programas Ftsite, Pock Drug e Prank web. Os três programas previram um sítio em comum (Figura 17), que foi utilizado como local para realização do *docking* molecular. Foram selecionados 16 ligantes para realização do *docking* molecular, com base nas propriedades pró-hemostáticas e na relação com o processo de hemostasia e coagulação.

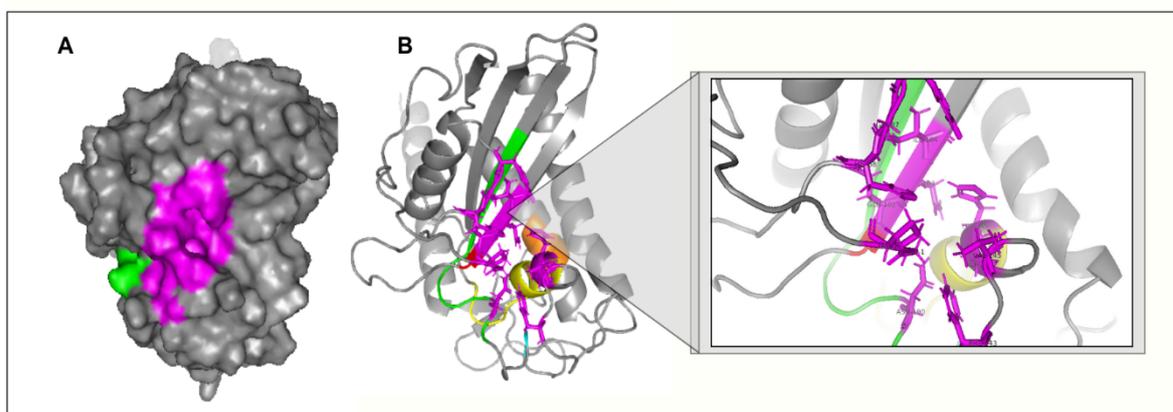


Figura 17. Sítio de ligação predito pelos programas Ftsite, PockDrug e PrankWeb demonstrado no modelo tridimensional. Os resíduos preditos em comum (Gly1 Pro2 Tyr86 Gly87 His88 Gln102 N103 Ile104 Phe143 Val145 Gly148 His149 Asn190) pelos programas Ftsite, PockDrug e PrankWeb estão destacados na estrutura com coloração magenta, bem como os motivos da superfamília CAP (CAP3, CAP 4, CAP1, CAP2). (A) Cartoon (B) Superfície. Imagem gerada por meio do software PyMOL.

5.1.6 Docking Molecular

As estruturas 3D dos ligantes foram obtidas no banco ChemSpider e o *docking* molecular foi realizado com o programa DockThor. Na Tabela 4, se encontram os valores de afinidade do *docking* fornecidos pelo programa DockThor. As interações entre os ligantes e o RnAg5 no *docking* molecular foram analisadas por meio do programa PLIP (Figura 18).

Tabela 4. Pontuação de afinidade gerada pelo docking molecular realizado com os ligantes em destaque.

Ligantes	Afinidade (Kcal/mol)
Fator de ativação de plaquetas	-8.72
Leucotrieno D4	-8.16
Leucotrieno E4	-7.88
Prostaglandina I2	-7.70
Tromboxano A2	-7.68
Prostaglandina E2	-7.39
ADP	-6.93

Os ligantes estão colocados em ordem decrescente de acordo com a melhor pontuação de afinidade obtida. *Docking* molecular realizado pelo servidor web DockThor.

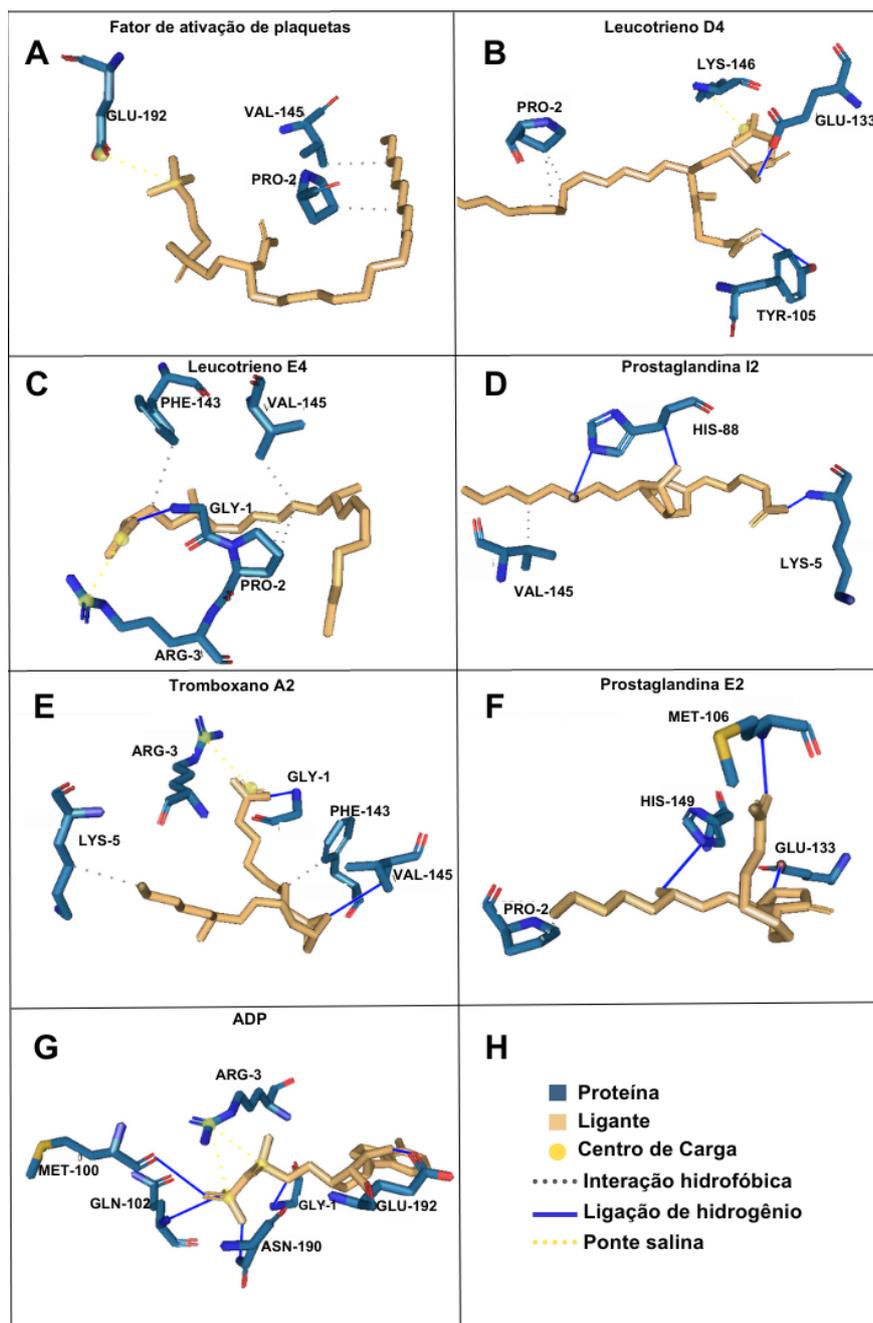


Figura 18. Interações entre os ligantes e o Ag5 no docking molecular. A análise das interações foi feita com o programa PLIP. (A) Fator de ativação de plaquetas. (B) Leucotrieno D4. (C) Leucotrieno E4. (D) Prostaglandina I2. (E) Tromboxano A2. (F) Prostaglandina E2. (G) ADP. (H) Legenda das interações.

Ao analisar as pontuações de afinidade e as interações entre os ligantes e os resíduos do RnAg5, o *docking* sugere que os compostos fator de ativação de plaquetas, leucotrieno D4 e E4, prostaglandina I2, tromboxano A2 e prostaglandina E2 podem ser ligantes do RnAg5.

5.2 RESULTADOS *IN VITRO*

5.2.1 Expressão do Antígeno 5 recombinante de *Rhodnius neglectus*

A produção do RnAg5 recombinante foi otimizada testando diferentes condições: diferentes linhagens bacterianas (Rosetta(DE3)pLysS e BL21(DE3)), variando a densidade óptica (0,2-0,8), a temperatura (18 °C, 25 °C e 37 °C) e o tempo de indução (3h00min-22h00min). Os níveis de expressão do RnAg5 recombinante nas diferentes condições foram analisados por SDS-PAGE e *western blotting*. A linhagem de *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS apresentou o RnAg5 recombinante tanto na fração solúvel, quando na fração insolúvel em todas as condições testadas (Tabela 5).

Tabela 5. Condições de expressão do RnAg5 salivar recombinante.

Condição	Linhagem bacteriana	Temp	OD	IPTG	Período indução	FS (S / N)	FI (S / N)
1	Rosetta(DE3)pLysS	37 °C	0,2	1	03h00min	S	S
2	Rosetta(DE3)pLysS	37 °C	0,7	1	03h00min	S	S
3	Rosetta(DE3)pLysS	18 °C	0,2	1	21h15min	S	S
4	Rosetta(DE3)pLysS	18 °C	0,7	1	19h25min	S	S
5	Rosetta(DE3)pLysS	25 °C	0,2	1	22h00min	S	S
6	Rosetta(DE3)pLysS	25 °C	0,8	1	19h55min	S	S
7	BL21(DE3)	37 °C	0,2	1	03h00min	N	N
8	BL21(DE3)	37 °C	0,6	1	03h00min	N	N

Em negrito está a condição selecionada para seguir com os testes. Temp = temperatura; OD = densidade óptica; IPTG= isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo; FS = Fração solúvel; FI = Fração insolúvel; S = sim, presente; N = não, ausente.

A primeira condição de expressão 5 (Rosetta(DE3)pLysS, OD 0,2 e 37 °C) foi selecionada para realizar a produção em maior escala para purificação e posterior utilização do RnAg5 salivar recombinante nos testes de inibição da agregação plaquetária e coagulação.

5.2.2 Purificação do Antígeno 5 recombinante de *Rhodnius neglectus*

As bactérias induzidas produziram uma proteína com peso molecular esperado (~31kDa) para o RnAg5. A fração solúvel da cultura foi submetida a purificação e analisada por *western blotting* usando anticorpo anti-cauda de histidina, pelo qual foi reconhecida especificamente (Figura 19). Após concentração e diálise das frações que continham o RnAg5 recombinante, sua concentração foi medida como sendo igual a 2,644 mg/mL. O controle do experimento foi realizado transformando-se a linhagem *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS com o plasmídeo sem o gene de interesse, sob as mesmas condições de expressão e purificação do RnAg5.

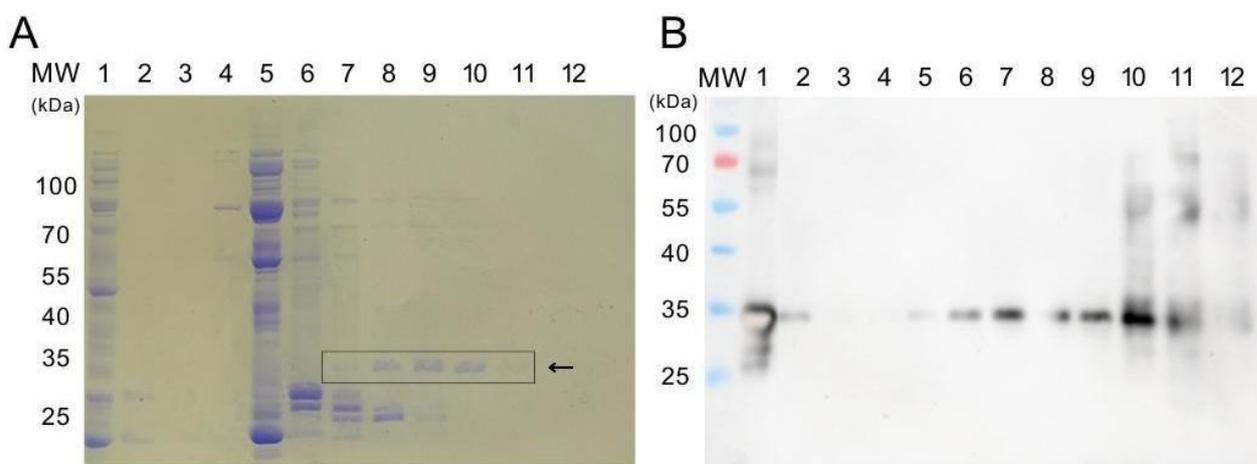


Figura 19. Purificação da RnAg5 por cromatografia de afinidade em coluna HisTrap HP. (A) Gel de poliacrilamida 12% das frações da purificação do RnAg5, corado por azul de Coomassie. (B) Western blotting das frações da purificação do RnAg5 utilizando o anticorpo anti-His na diluição 1:2000. MW – Marcador de massa molecular (kDa); 1 – Extrato total; 2 – Lavagem com 25mM de Imidazol; 3 – Lavagem com 50mM de Imidazol; 4 a 11 – Eluição com 200mM de Imidazol; 12 – Eluição com 500mM de Imidazol.

5.2.3 Agregação plaquetária na presença do RnAg5

A proteína recombinante RnAg5 foi avaliada quanto a sua capacidade de inibir ou retardar a agregação plaquetária na presença dos agonistas ADP e colágeno (Figura 20 e 21).

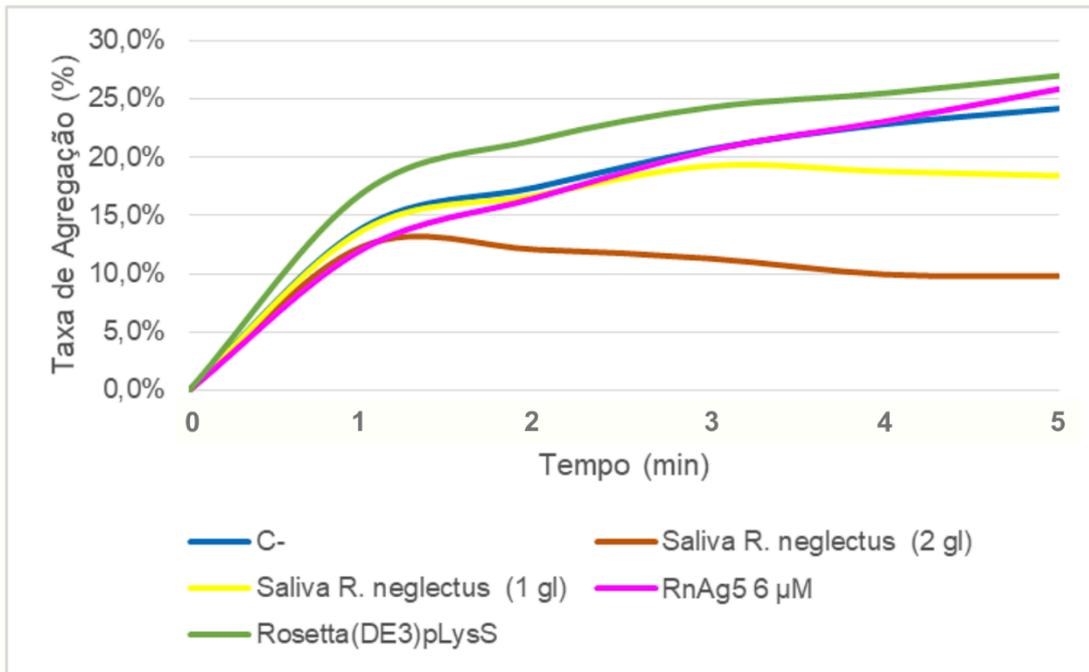


Figura 20. Teste de inibição da agregação plaquetária induzida por ADP. A agregação plaquetária foi avaliada através da absorbância medida em leitora de microplaca EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer®), utilizando placas de 96 poços. O Teste foi realizado em triplicata. O agonista ADP foi utilizado em uma concentração de 5 µM. Para o controle negativo (C-) foi utilizado PBS. O tempo foi medido em um intervalo de 5 minutos.

Figura. Teste de inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno.

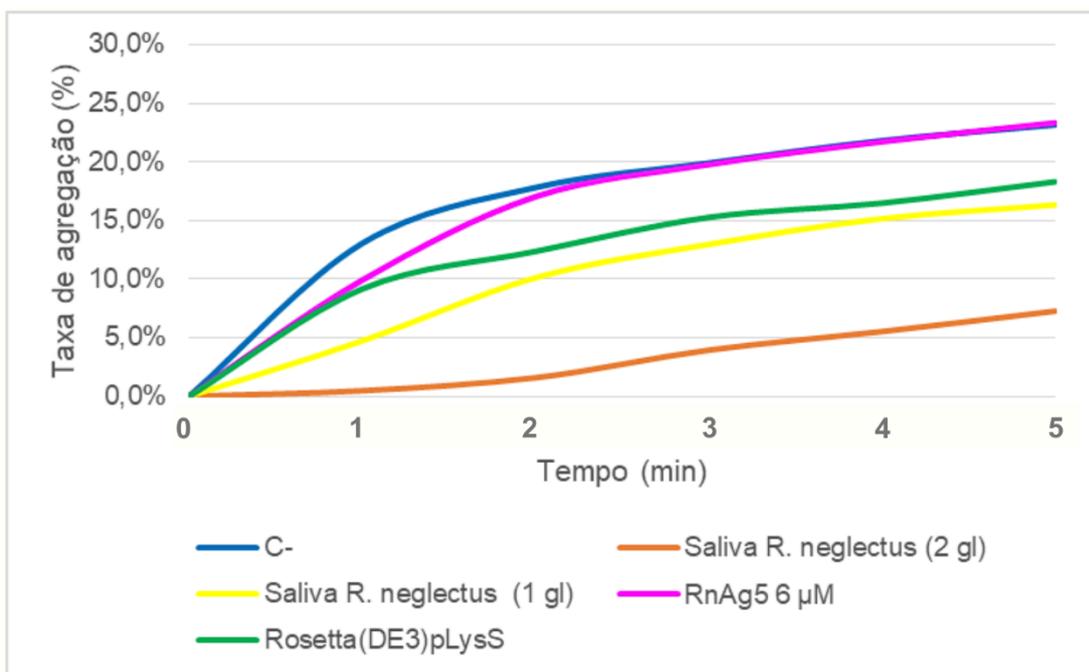


Figura 21. Teste de inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno. A agregação plaquetária foi avaliada através da absorbância medida em leitora de microplaca EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer®), utilizando placas de 96 poços. O Teste foi realizado em triplicata. O agonista colágeno foi utilizado em uma concentração de 1 µM. Para o controle negativo (C-) foi utilizado PBS. O tempo foi medido em um intervalo de 5 minutos.

5.2.4 Avaliação da coagulação sanguínea na presença do RnAg5 e da saliva de *R. neglectus*

A proteína recombinante RnAg5 e a saliva de *R. neglectus* foram avaliadas quanto a sua capacidade de inibir ou retardar a coagulação, interferindo na via intrínseca e extrínseca da cascata de coagulação (Figura 22 e 23).

A saliva conseguiu retardar o tempo de coagulação no teste de Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada mostrando sua capacidade de intervir na via intrínseca da coagulação, já o RnAg5 não demonstrou influência sobre essa via (figura 22). Em relação ao teste de Tempo de Protrombina (Figura 23), a saliva de *R. Neglectus* não retardou o tempo de coagulação.

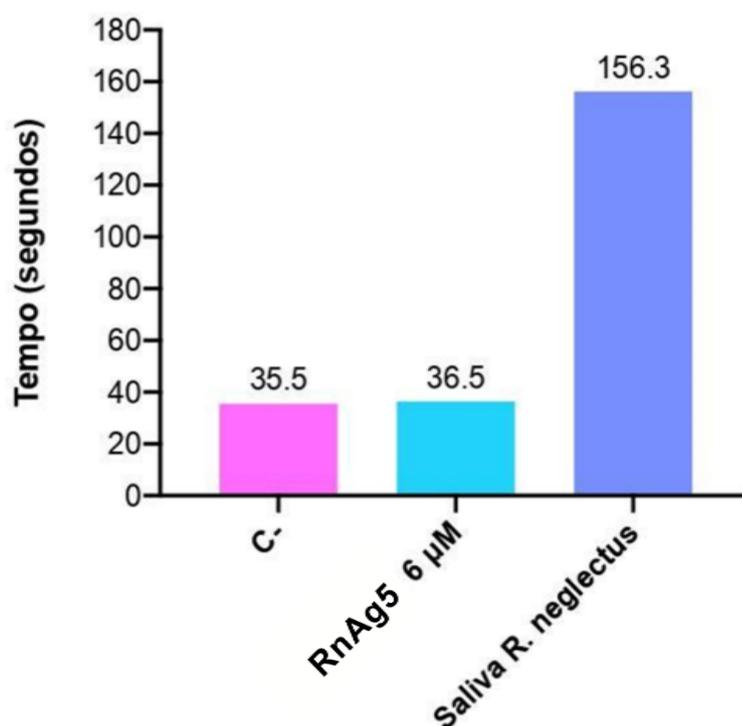


Figura 22. Representação em gráfico do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. O teste foi realizado com 6 µM de RnAg5. Para o controle positivo foram utilizadas duas glândulas salivares de *Rhodnius neglectus*. Para controle negativo (C-) foi utilizado PBS. O experimento foi realizado em triplicata no aparelho Coagulômetro CloTimer (CLOT®).

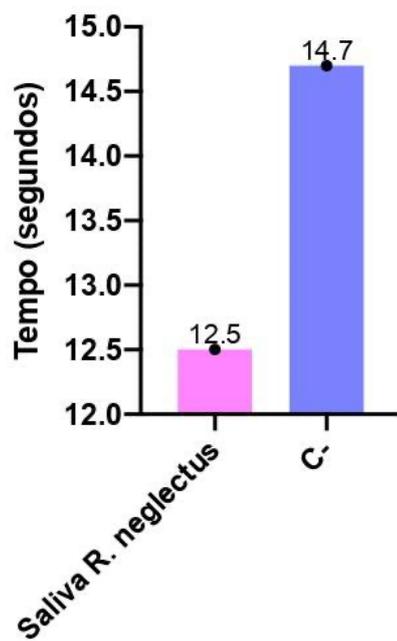


Figura 23. Representação em gráfico do Tempo de Protrombina. Para avaliar o potencial de inibição da coagulação a partir da via extrínseca, foram utilizadas duas glândulas salivares de *Rhodnius neglectus*. Como controle negativo (C-) foi utilizado PBS. O experimento foi realizado em triplicata no aparelho Coagulômetro CloTimer (CLOT®).

6 DISCUSSÃO

6.1 ESTRATÉGIAS *IN SILICO*

Como resultado da busca no NCBI por sequências de Ag5 descritas em triatomíneos, 44 sequências são de transcritos de glândulas salivares, e apenas uma sequência, MOY45699.1, é resultante da análise do transcriptoma do testículo do triatomíneo *Rhodnius prolixus* (Cardoso; Ribeiro; Santos; Pereira et al., 2020). Todas as sequências apresentaram o domínio CAP_euk da superfamília CAP, sendo que duas sequências apresentaram também o domínio da família CRISP, e seis sequências o domínio GAPR1 (Tabela 1).

Assim como na análise realizada por Gibbs *et al.* (2008), as sequências que possuem as famílias CRISP e GAPR1-like formaram clados distintos (Figura 9). A família da proteína 1 relacionada à patogênese de plantas associada ao Golgi (GAPR1), também chamada de proteína 2 relacionada à patogênese do glioma (GLIPR-2), que possui o domínio CAP_GAPR1-like, está associada a formação de fibrilas do tipo amiloide na presença de lipossomas contendo fosfolípidios ácidos (Olricks; Mahalka; Kaloyanova; Kinnunen *et al.*, 2014) e foi identificada em camundongos como uma proteína regulada positivamente na fibrose renal e está envolvida na geração de miofibroblastos que contribuem para a fibrose (Baxter; Crowell; George; Getman *et al.*, 2007). A subfamília GAPR-1 foi recentemente descrita como o ancestral evolutivo mais antigo dentro da superfamília CAP (Abraham; Chandler, 2017), o que corrobora com a análise obtida na árvore filogenética da Figura 9.

Apenas duas sequências de triatomíneos apresentaram o domínio Crisp (Tabela 6). Já foi descrito que proteínas com o domínio Crisp atuam como inibidores de canais iônicos e anticoagulantes em venenos de répteis (Yamazaki; Morita, 2004). Os CRISPs também desempenham papéis importantes na reprodução e no sistema imunológico de vários organismos do reino animal e são pouco descritos na saliva de animais invertebrados (Gibbs; Roelants; O'bryan, 2008; Koppers; Reddy; O'bryan, 2011).

Ao analisar a árvore filogenética das sequências de Ag5 de artrópodes (Figura 10), é possível observar um grande ramo que contém as sequências de Ag5 das ordens Hemiptera (vermelho), Diptera (amarelo) e Hymenoptera (verde). As sequências dessas ordens agruparam em clados específicos, e podemos observar as

sequências de Ag5 de triatomíneos formando um grande clado (vermelho). O segundo clado mais abundante pertence à ordem Diptera, representado por diferentes espécies de mosquitos, organismos os quais a fêmea é capaz de realizar hematofagia.

Insetos como triatomíneos e alguns insetos da ordem Diptera, como Culicidae, realizam hematofagia, perfurando a pele do hospedeiro. Neste contexto, vários mecanismos de defesa são utilizados pelo hospedeiro vertebrado a fim de contrapor o extravasamento sanguíneo ocasionado pela lesão tecidual e vascular decorrentes da picada, tais como vasoconstrição, agregação plaquetária e coagulação sanguínea. Esses mecanismos culminam com uma redução do fluxo sanguíneo. Para neutralizar a resposta do hospedeiro e obter um fluxo sanguíneo contínuo durante a picada, os insetos hematófagos possuem uma saliva composta por proteínas e moléculas que atuam na anticoagulação, inibição da agregação plaquetária e vasodilatação (Champagne, 2004; Fontaine; Diouf; Bakkali; Missé *et al.*, 2011). Há evidências de que o Ag5 presente na saliva desses insetos pode ter um papel importante na aquisição de sangue. Na mosca *Tabanus yao*, também da ordem Diptera, a proteína Antígeno 5 interferiu na agregação plaquetária e na formação de trombos obtidos pela aquisição de um motivo RGD (Ma; Wang; Yang; Wu *et al.*, 2009) e desintegrina RTS (Ma; Gao; An; Song *et al.*, 2010).

A segunda ordem mais abundante é a dos himenópteros. O Ag5 presente na saliva de animais da ordem Hymenoptera, representados principalmente por formigas e vespas, tem sido extensivamente estudado como um potente alérgeno (Bazon; Silveira; Simioni; Brochetto-Braga, 2018; Hoffman, 1993; Hoffman, 1985; King; Kochoumian; Lam, 1987; Pantera; Hoffman; Carresi; Cappugi *et al.*, 2003). As picadas desses insetos são um dos desencadeadores mais frequentes de anafilaxia grave mediada por IgE em adultos (Worm; Eckermann; Dölle; Aberer *et al.*, 2014).

A presença de membros da família do Antígeno 5 no veneno de vespas e de outros insetos não hematófagos, sugere que seu papel não está exclusivamente relacionado aos mecanismos de aquisição de sangue, e que essas proteínas podem exercer diferentes papéis biológicos.

A sequência de aminoácidos do RnAg5 extraída do banco de dados UniProt (número de acesso A0A0P4VT29) utilizada para as análises *in silico* e *in vitro* apresentou 26 aminoácidos preditos a formarem um peptídeo sinal, ou seja, peptídeos de sinalização para que a proteína vá para a via secretora da célula (Tabela 2 e Figura

11). Após a translocação pela membrana celular, o peptídeo sinal é removido da proteína (Teufel; Almagro Armenteros; Johansen; Gíslason *et al.*, 2022). A sequência também apresentou potenciais sítios de glicosilação e fosforilação, duas modificações pós-traducionais que desempenham importantes papéis quanto às funções das proteínas, isso porque a glicosilação tem o potencial de regular o dobramento, a conformação e estabilidade das proteínas, e o grupo fosfato, por ter carga negativa, pode alterar a conformação dessas moléculas. Desse modo, a proteína pode ter suas características modificadas (Millar; Heazlewood; Giglione; Holdsworth *et al.*, 2019; Ramazi; Zahiri, 2021; Saraswathy; Ramalingam, 2011).

Uma proteína, no ambiente natural, geralmente se enovela espontaneamente em uma estrutura terciária específica, denominada estrutura nativa, na qual cada átomo ocupa uma posição única no espaço tridimensional da molécula, e ter o conhecimento sobre a estrutura proteica é fundamental para compreender sua função (Branden; Tooze, 1998; Finkelstein; Ptitsyn, 2016). A estrutura tridimensional pode ser determinada experimentalmente, como por exemplo, por ressonância magnética nuclear, cristalografia de raios X e criomicroscopia eletrônica de transmissão (Dill; Maccallum, 2012). No entanto, essas tecnologias experimentais são geralmente onerosas, demoradas e trabalhosas. Em contraste com essas tecnologias, as abordagens de predição da estrutura da proteína usando técnicas computacionais são eficientes, sem custo e ecologicamente corretas (Kuhlman; Bradley, 2019).

As estruturas tridimensionais do RnAg5 preditas por técnicas computacionais foram avaliadas pelo programa MolProbity (Tabela 3). Dentre as predições realizadas pelos servidores, a que obteve melhores pontuações pela avaliação MolProbity foi a estrutura predita pelo programa AlphaFold (Figura 12). O AlphaFold é um programa de inteligência artificial desenvolvido pela DeepMind, projetado como um sistema de aprendizagem profunda (Jumper; Evans; Pritzel; Green *et al.*, 2021). O software é considerado, atualmente, um dos melhores programas para previsão de estrutura de proteína, sendo destaque na competição bienal CASP (Kryshtafovych; Schwede; Topf; Fidelis *et al.*, 2021; Moulton; Fidelis; Kryshtafovych; Schwede *et al.*, 2018), uma avaliação dos métodos de previsão estrutural de proteína, nos anos de 2018 e 2020 (Callaway, 2023; Kryshtafovych; Schwede; Topf; Fidelis *et al.*, 2021).

O programa Swiss-Model também forneceu um modelo que obteve boa pontuação na avaliação MolProbity (Tabela 2), com valor de *Molprobity score* igual a

0.81. Apesar da pontuação obtida, esse servidor não obteve a estrutura terciária de uma parte da sequência de Ag5, por isso a estrutura gerada (Figura 12 D e 12 E) apresentou um tamanho menor quando comparada com os demais modelos (Bertoni; Kiefer; Biasini; Bordoli *et al.*, 2017). Portanto, modelo fornecido pelo Swiss-Model é pouco confiável.

O modelo criado pelo servidor AlphaFold foi o escolhido para dar sequência as análises. A estrutura apresentou uma dobra α - β - α -sanduíche (Figura 13), na qual duas camadas de α -hélices flanqueiam as folhas β antiparalelas, que formam o núcleo da proteína, característica de todos os membros da superfamília CAP (Gibbs; Roelants; O'bryan, 2008), e observado nas estruturas de Ag5 cristalizadas no PDB 1QNX (Henriksen; King; Mirza; Monsalve *et al.*, 2001) de *Vespula vulgaris* e 2VZN (Padavattan; Schmidt; Hoffman; Marković-Housley, 2008) de *Solenopsis invicta*. O empacotamento apertado das α -hélices em ambos os lados da folha β central resulta em um núcleo molecular compacto e bipartido, que é estabilizado por interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e pontes dissulfeto (Guo; Teng; Niu; Liu *et al.*, 2005; Szyperski; Fernández; Mumenthaler; Wüthrich, 1998; Wang; Shen; Guo; Lou *et al.*, 2005).

A característica dos membros da superfamília CAP é a presença de um domínio CAP conhecido como SCP (*Sperm Coating Protein*). Esse domínio contém quatro motivos de assinatura altamente conservados (CAP1–4), conforme descrito no banco de dados PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>): CAP1 [GDER][HR][FYWH][TVS][QA][LIVM][LIVMA]Wxx[STN]; CAP2 [LIVMFYH][LIVMFY]xC[NQRHS]Yx[PARH]x[GL]N[LIVMFYWDN]; CAP3 (HNxxR); CAP4 (G[EQ]N[ILV]); e motivo [ILVP]Y encontrado próximo do C-terminal em proteínas da família Ag5 (Gibbs; Roelants; O'bryan, 2008). Juntos, os motivos formam a dobra α - β - α -sanduíche, como observado no alinhamento e na estrutura 3D da Figura 14.

A conformação tridimensional de um alérgeno define as partes acessíveis na superfície da molécula ou epítomos que interagem com os anticorpos. Um epítomo de célula B é a porção de superfície de um antígeno que interage com um anticorpo para induzir uma resposta imune celular ou humoral. Devido às características de especificidade de ligação, os epítomos de células B possuem um enorme potencial para aplicações relacionadas à imunologia (Greenbaum; Andersen; Blythe; Bui *et al.*,

2007; Siman-Tov; Zemel; Tur Kaspas; Gershoni, 2013; Yang; Yu, 2009). A identificação de epítomos de células B em antígenos-alvo é importante para compreender a interação antígeno-anticorpo e é uma das etapas principais no projeto de vacinas de subunidades dirigidas por epítomos, testes de imunodiagnóstico e produção de anticorpos (El-Manzalawy; Dobbs; Honavar, 2017).

Estimando o RnAg5 como biomarcador, a fim de identificar se um indivíduo foi exposto à picada do vetor da doença de Chagas, foi realizada a predição de epítomos de células B. Ao analisar as predições de epítomo é possível verificar que foram preditos mais epítomos conformacionais do que lineares (Figuras 15 e 16). Pesquisas estimaram que cerca de 90% dos epítomos de células B correspondem a epítomos conformacionais (El-Manzalawy; Dobbs; Honavar, 2017; Van Regenmortel Mhv, 1996), corroborando os resultados observados no modelo do RnAg5.

O sítio de ligação predito no RnAg5 para realizar o docking molecular (Figura 17) é composto em sua maioria por aminoácidos apolares, como glicina, prolina, isoleucina, fenilalanina e valina, que conferem ao sítio de ligação uma característica hidrofóbica, sendo um local onde moléculas lipídicas, como o fator de ativação plaquetária (PAF) e os lipídeos eicosanóides incluindo leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos, poderiam se ligar (Ayon, 2020; Dennis; Norris, 2015).

Os eicosanóides são mediadores lipídicos bioativos que participam do processo inflamatório e hemostático do hospedeiro, auxiliando na agregação plaquetária. Por exemplo, o tromboxano A₂ (TxA₂) e o fator de ativação plaquetária (PAF), são agonistas da agregação plaquetária, assim como o difosfato de adenosina (ADP). Neste contexto, a hidrólise de ADP em AMP (monofosfato de adenosina) e Pi (fosfato inorgânico) é realizada por proteínas conhecidas como apirases (Francischetti, 2010; Travers; Rohan; Sahu, 2021), uma estratégia comum observada nos vetores hematófagos.

Os cisteinil-leucotrienos (CisLT), Leucotrienos C₄, D₄ e E₄, são os leucotrienos mais ativos fisiologicamente. O Leucotrieno C₄, é secretado pelas células e convertido extracelularmente em LTD₄ e LTE₄. Embora CisLT promovam a contração do músculo liso e consequente vasoconstrição em outros tecidos, como no pulmão, eles provocam uma resposta vasodilatadora na pele humana. Além disso, causam o aumento da permeabilidade vascular e do transporte intersticial na pele, favorecendo a formação de edema. Os CisLT são liberados no sítio da picada por mastócitos

(Colazzo; Gelosa; Tremoli; Sironi *et al.*, 2017; Sirois, 1984). Já a prostaglandina E2 (PGE 2) é um eicosanóide importante que pode exercer efeitos vasopressores ou vasodepressores (Swan; Breyer, 2011).

Na literatura não há uma estrutura de Ag5 cristalizada com um ligante no sítio de ligação analisado para que possa ser realizada uma comparação ou estabelecido um parâmetro de uma energia de afinidade que seria considerada ótima para ligação. Entretanto, na literatura há registro de uma proteína que faz parte da superfamília CAP, a triablsin-15 (PDB: 3U3U), presente na saliva da mosca hematófaga *Tabanus yao*, que foi cocristalizada junto com o ligante leucotrieno E4 (Xu; Francischetti; Lai; Ribeiro *et al.*, 2012). A ligação também ocorreu em uma cavidade hidrofóbica da proteína, e essa capacidade de interagir com lipídeos está presente em proteínas da superfamília CAP (Asojo; Darwiche; Gebremedhin; Smant *et al.*, 2018; Kelleher; Darwiche; Rezende; Farias *et al.*, 2014; Xu; Francischetti; Lai; Ribeiro *et al.*, 2012).

Ao analisar as interações entre os ligantes e o RnAg5 (Figura 18), os resíduos de aminoácidos fenilalanina, alanina, valina, histidina e lisina presentes nas interações com quase todos os ligantes da Figura 18, com exceção do ADP, já foram relatados como parte importante do sítio de ligação da proteína triablsin-15 (PDB: 3U3U), interagindo com o ligante leucotrieno E4. Além disso, as interações hidrofóbicas realizadas com esses ligantes são frequentes em ligantes de alta eficiência (Ferreira; Schapira, 2017). Em relação a pontuação de afinidade (Tabela 4), os ligantes fator de ativação de plaquetas, leucotrieno D4 e E4, prostaglandina I2, tromboxano A2 e prostaglandina E2 também apresentaram boas pontuações. O *docking* molecular, portanto, sugere esses compostos como ligantes para o RnAg5.

6.2 ESTRATÉGIAS *IN VITRO*

Ao realizar a hematofagia, as glândulas salivares dos triatomíneos liberam potentes substâncias anti-hemostáticas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras que ajudam ativamente o artrópode a obter uma refeição bem-sucedida de sangue com fluxo contínuo (Santiago; Assumpção; De Araújo; Bastos *et al.*, 2016). As proteínas salivares de artrópodes já demonstraram possuir a capacidade de inibir a coagulação sanguínea, a agregação plaquetária e a ativação do complemento, além de induzir a vasodilatação e a modulação do sistema imune.

A produção de proteínas para estudos estruturais, ensaios funcionais e também para aplicações terapêuticas tem crescido bastante e o sistema muito utilizado para sua produção é o sistema de expressão heterólogo. A expressão heteróloga envolve a introdução do gene que codifica uma proteína de interesse de uma espécie na célula de outra espécie, permitindo assim que as células hospedeiras expressem a proteína estranha. Para que um gene heterólogo seja expresso de forma eficiente, ele deve ser transcrito e traduzido de forma eficiente pela maquinaria celular hospedeira. A expressão heteróloga no sistema hospedeiro *E. coli* muitas vezes é preferida por ser uma metodologia mais barata, além de oferecer tempos de cultura rápidos e altos rendimentos de proteína (Assenberg; Wan; Geisse; Mayr, 2013; Genuth; Barna, 2018).

Ao analisar o resultado da expressão do RnAg5 em sistema heterólogo, é possível verificar que sua expressão se deu na cepa Rosetta(DE3)pLysS, mas não foi obtida na cepa BL21(DE3) (Tabela 5). A expressão de proteínas eucarióticas por *E. coli* é afetada pelo viés de códon. As frequências com as quais diferentes códons são usados, que se correlacionam com a quantidade de seus tRNAs correspondentes, variam entre os organismos, por exemplo, eucariotos comumente usam o códon AGG para Arginina, que raramente é usado em *E. Coli*. A expressão de um gene eucariótico com numerosos códons raros em bactérias pode afetar a expressão através do término prematuro da tradução, ou da paralisação da tradução, bem como a mudança de estrutura e incorporação incorreta de aminoácidos. As cepas hospedeiras Rosetta(DE3)pLysS são derivados de BL21 e fornecem tRNAs para os códons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA, portanto são projetadas para aumentar a expressão de proteínas eucarióticas que contêm códons raros, como é o caso do RnAg5 (Gustafsson; Govindarajan; Minshull, 2004; Kopanic; Al-Mugotir; Zach; Das *et al.*, 2013).

A estratégia de otimização de códon foi realizada para otimizar e aumentar a expressão do RnAg5, mesmo assim a proteína só foi obtida na linhagem Rosetta(DE3)pLysS. A tentativa de usar a otimização de códon não foi considerada vantajosa para expressão em *E. coli* BL21(DE3). Resultado semelhante já foi observado na produção de antígeno de *Toxoplasma gondii* em sistema de expressão heterólogo procarioto (Jirapattharasate; Udonsom; Prachasuphap; Jongpitisub *et al.*, 2021).

Ao contrapor a hemostasia, os triatomíneos desafiam diversos mecanismos moleculares do hospedeiro. As plaquetas participam da primeira etapa da hemostasia interagindo com a matriz extracelular exposta, que contém um grande número de macromoléculas adesivas, como colágeno e fibronectina. Sob condições de lesão, a ligação das plaquetas à matriz extracelular é mediada pela interação entre o receptor de plaquetas, glicoproteína (GP)Ib e o vWF ligado ao colágeno. A ligação entre GPIb e vWF mantém a plaqueta em contato próximo com a superfície exposta. Essa interação permite que o receptor de colágeno GPVI se ligue ao colágeno. Isso desencadeia a mudança conformacional das integrinas para um estado de alta afinidade, permitindo-lhes assim mediar a adesão firme ao colágeno e também promover a liberação de TXA₂ e ADP. O ADP, por sua vez, se liga ao receptor P2Y₁ acoplado a proteína G nas plaquetas, o que causa uma alteração conformacional da plaqueta, facilitando o processo de agregação plaquetária (Francischetti, 2010; Hechler; Gachet, 2011; Varga-Szabo; Pleines; Nieswandt, 2008).

No ensaio de avaliação da agregação plaquetária, o RnAg5, na concentração de 6 µM, não demonstrou possuir capacidade de inibir a agregação plaquetária na presença do agonista ADP (Figura 20) e na presença do agonista colágeno (Figura 21). Assim como o Ag5 de *R. neglectus*, o Ag5 presente na saliva do triatomíneo *Dipetalogaster maxima* também não apresentou função de inibição da agregação plaquetária induzida por ADP. Contudo, ao contrário do resultado obtido com o RnAg5, o Ag5 de *D. máxima* apresentou potencial de inibir a agregação na presença do agonista colágeno (Assumpção; Ma; Schwarz; Reiter *et al.*, 2013).

O tempo de coagulação sanguínea na presença do RnAg5 também foi avaliado. A presença da proteína não alterou o tempo de coagulação (Figura 22). Em contrapartida, a saliva de *R. neglectus*, demonstrou agir sobre a via intrínseca prolongando o tempo de coagulação (156.6 segundos, ver Figura 22). Além da saliva de *R. neglectus*, foi observado que a saliva de *Rhodnius prolixus* também age na via intrínseca, inibindo o fator VIII da coagulação (Champagne; Nussenzveig; Ribeiro, 1995; Hellmann; Hawkins, 1964). Da mesma forma, a proteína a dimiconina, presente na saliva do *Triatoma dimidiata*, tem potencial de inibir essa via, impedindo a ativação do fator XII (Ishimaru *et al.*, 2012).

Em contrapartida, ao analisar os efeitos da saliva de *R. neglectus* sobre a via extrínseca através do teste de Tempo de Protrombina (Figura 23), a mesma não

mostrou interferir nessa via da coagulação sanguínea. Resultado diferente foi observado com a saliva do *T. infestans*, a qual prolongou o tempo de coagulação após ativação das vias intrínsecas e extrínsecas de coagulação (Pereira; Souza; Vargas; Martins et al., 1996).

7. CONCLUSÕES

O RnAg5 foi caracterizado *in silico*, sendo estabelecida sua estrutura tridimensional e possíveis epítomos para células B, visando seu potencial como biomarcador. O *docking* molecular foi realizado e mostrou como potenciais ligantes o fator de ativação de plaquetas, leucotrieno D4 e E4, prostaglandina I2, tromboxano A2 e prostaglandina E2.

Esse foi o primeiro estudo em que o Antígeno 5 de *Rhodnius neglectus* foi expresso na fração solúvel através de sistema heterólogo de expressão procarioto, sendo sua expressão confirmada por *western blotting*.

O RnAg5 recombinante não apresentou atividade de anticoagulante ou antiagregante plaquetário nos ensaios realizados. No entanto, mais testes são necessários para completa caracterização dessa proteína.

8. PERSPECTIVAS

1. Realizar a validação dos dockings através de ensaios experimentais de ligação do RnAg5 com os ligantes utilizados no *docking*;
2. Expressar o RnAg5 em sistema de expressão eucarioto;
3. Produzir anticorpos contra o RnAg5 recombinante.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, A.; CHANDLER, D. E. Tracing the Evolutionary History of the CAP Superfamily of Proteins Using Amino Acid Sequence Homology and Conservation of Splice Sites. **J Mol Evol**, 85, n. 3-4, p. 137-157, Oct 2017.
- ACHNECK, H. E.; SILESHI, B.; PARIKH, A.; MILANO, C. A. *et al.* Pathophysiology of bleeding and clotting in the cardiac surgery patient: from vascular endothelium to circulatory assist device surface. **Circulation**, 122, n. 20, p. 2068-2077, Nov 16 2010.
- AKCAPINAR, G. B.; SEZERMAN, O. U. Computational approaches for. **Biosci Rep**, 37, n. 2, Apr 28 2017.
- AL-KOUSSA, H.; ALZAIM, I.; EL-SABBAN, M. E. Pathophysiology of Coagulation and Emerging Roles for Extracellular Vesicles in Coagulation Cascades and Disorders. **J Clin Med**, 11, n. 16, Aug 22 2022.
- ALEVI, K. C. C.; DE OLIVEIRA, J.; DA SILVA ROCHA, D.; GALVÃO, C. Trends in Taxonomy of Chagas Disease Vectors (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): From Linnaean to Integrative Taxonomy. **Pathogens**, 10, n. 12, Dec 15 2021.
- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J.; SALVATORE, M.; EMANUELSSON, O.; WINTHER, O. *et al.* Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. **Life Sci Alliance**, 2, n. 5, Oct 2019.
- ALTAR, C. A. The Biomarkers Consortium: on the critical path of drug discovery. **Clin Pharmacol Ther**, 83, n. 2, p. 361-364, Feb 2008.
- ANAND, S. B.; GNANASEKAR, M.; THANGADURAI, M.; PRABHU, P. R. *et al.* Immune response studies with *Wuchereria bancrofti* vespidual allergen homologue (WbVAH) in human lymphatic filariasis. **Parasitol Res**, 101, n. 4, p. 981-988, Sep 2007.
- ANDERSEN, J. F.; MONTFORT, W. R. The crystal structure of nitrophorin 2. A trifunctional antihemostatic protein from the saliva of *Rhodnius prolixus*. **J Biol Chem**, 275, n. 39, p. 30496-30503, Sep 29 2000.
- ANFINSEN, C. B. The formation and stabilization of protein structure. **Biochem J**, 128, n. 4, p. 737-749, Jul 1972.
- ASOJO, O. A.; DARWICHE, R.; GEBREMEDHIN, S.; SMANT, G. *et al.* *Heligmosomoides polygyrus* Venom Allergen-like Protein-4 (HpVAL-4) is a sterol binding protein. **Int J Parasitol**, 48, n. 5, p. 359-369, Apr 2018.
- ASSENBERG, R.; WAN, P. T.; GEISSE, S.; MAYR, L. M. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. **Curr Opin Struct Biol**, 23, n. 3, p. 393-402, Jun 2013.
- ASSUMPÇÃO, T. C.; CHARNEAU, S.; SANTIAGO, P. B.; FRANCISCHETTI, I. M. *et*

al. Insight into the salivary transcriptome and proteome of *Dipetalogaster maxima*. **J Proteome Res**, 10, n. 2, p. 669-679, Feb 04 2011.

ASSUMPÇÃO, T. C.; EATON, D. P.; PHAM, V. M.; FRANCISCHETTI, I. M. *et al.* An insight into the sialotranscriptome of *Triatoma matogrossensis*, a kissing bug associated with fogo selvagem in South America. **Am J Trop Med Hyg**, 86, n. 6, p. 1005-1014, Jun 2012.

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

ASSUMPÇÃO, T. C. F.; MA, D.; SCHWARZ, A.; REITER, K. *et al.* Salivary antigen-5/CAP family members are Cu²⁺-dependent antioxidant enzymes that scavenge O₂• and inhibit collagen-induced platelet aggregation and neutrophil oxidative burst. **J Biol Chem**, 288, n. 20, p. 14341-14361, May 17 2013.

AYON, J. N. Features, roles and chiral analyses of proteinogenic amino acids. **AIMS Molecular Science**, 7, n. 3, p. 229-268, 2020.

BACKERT, L.; KOHLBACHER, O. Immunoinformatics and epitope prediction in the age of genomic medicine. **Genome Med**, 7, p. 119, Nov 20 2015.

BALLESTER, PJ; MITCHELL, JB Uma abordagem de aprendizado de máquina para prever a afinidade de ligação proteína-ligante com aplicações em acoplamento molecular. **Bioinformática**, 26, n. 9, pág. 1169-1175, 01 de maio de 2010.

BAXTER, R. M.; CROWELL, T. P.; GEORGE, J. A.; GETMAN, M. E. *et al.* The plant pathogenesis related protein GLIPR-2 is highly expressed in fibrotic kidney and promotes epithelial to mesenchymal transition in vitro. **Matrix Biol**, 26, n. 1, p. 20-29, Jan 2007.

BAZON, M. L.; SILVEIRA, L. H.; SIMIONI, P. U.; BROCHETTO-BRAGA, M. R. Current Advances in Immunological Studies on the Vespidae Venom Antigen 5: Therapeutic and Prophylaxis to Hypersensitivity Responses. **Toxins (Basel)**, 10, n. 8, 07 2018.

BEDNAR, B.; CONDRÁ, C.; GOULD, R. J.; CONNOLLY, T. M. Platelet aggregation monitored in a 96 well microplate reader is useful for evaluation of platelet agonists and antagonists. **Thrombosis research**, 77, n. 5, p. 453-463, 1995.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G. *et al.* The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res**, 28, n. 1, p. 235-242, Jan 01 2000.

BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **N Engl J Med**, 364, n. 26, p. 2527-2534, Jun 30 2011.

BERTONI, M.; KIEFER, F.; BIASINI, M.; BORDOLI, L. *et al.* Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 10480, Sep 05 2017.

BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; BEER, T. A. P. D.; TAURIELLO, G. *et al.* The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. *Nucleic Acids Research*. 45 2017.

BILOTTA , M.; TRADIGO , G.; VELTRI, P. Bioinformatics Data Models, Representation and Storage. *In: Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 2019. v. 1, p. 110-116.

BITTRICH, S.; BHIKADIYA, C.; BI, C.; CHAO, H. *et al.* RCSB Protein Data Bank: Efficient Searching and Simultaneous Access to One Million Computed Structure Models Alongside the PDB Structures Enabled by Architectural Advances. *J Mol Biol*, 435, n. 14, p. 167994, Jul 15 2023.

BLOM, N.; SICHERITZ-PONTÉN, T.; GUPTA, R.; GAMMELTOFT, S. *et al.* Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4, n. 6, p. 1633-1649, Jun 2004.

BLYTHE, M. J.; FLOWER, D. R. Benchmarking B cell epitope prediction: underperformance of existing methods. *Protein Sci*, 14, n. 1, p. 246-248, Jan 2005.

BONAR, R. A.; LIPPI, G.; FAVALORO, E. J. Overview of Hemostasis and Thrombosis and Contribution of Laboratory Testing to Diagnosis and Management of Hemostasis and Thrombosis Disorders. *Methods Mol Biol*, 1646, p. 3-27, 2017.

BORNHORST, J. A.; FALKE, J. J. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol*, 326, p. 245-254, 2000.

BOS, M.; VAN 'T VEER, C.; REITSMA, P. Molecular biology and biochemistry of the coagulation factors and pathways of hemostasis. *In: KAUSHANSKY K, L. M. A., & PRCHAL J.T., & LEVI M.M., & PRESS O.W., & BURNS L.J., & CALIGIURI M (Ed.). Williams Hematology*. 20108th ed. New York: McGraw Hill, 2015. p. 614–616.

BRANDEN , C.; TOOZE, J. **Introduction to protein structure**. 2 ed. New York: Garland Science, 1998.

BROOS, K.; FEYS, H. B.; DE MEYER, S. F.; VANHOORELBEKE, K. *et al.* Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev*, 25, n. 4, p. 155-167, Jul 2011.

CALLAWAY, E. After AlphaFold: protein-folding contest seeks next big breakthrough. *Nature*, 613, n. 7942, p. 13-14, Jan 2023.

CARCAVALLO, R. U.; GALINDEZ GIRÓN, I.; JURBERG, J.; LENT, H. **Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas**. Rio de Janeiro: 1998. 1217 p., v. 3).

CARDOSO, J. C.; RIBEIRO, J. M. C.; SANTOS, D. V. D.; PEREIRA, M. H. *et al.* Analysis of the testicle's transcriptome of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *bioRxiv*, 2020.

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

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase 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**, 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHAMPAGNE, D. E. Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods. **Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord**, 4, n. 4, p. 375-396, Dec 2004.

CHAMPAGNE, D. E.; NUSSENZVEIG, R. H.; RIBEIRO, J. M. Purification, partial characterization, and cloning of nitric oxide-carrying heme proteins (nitrophorins) from salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **J Biol Chem**, 270, n. 15, p. 8691-8695, Apr 14 1995.

CHARLAB, R.; VALENZUELA, J. G.; ROWTON, E. D.; RIBEIRO, J. M. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 96, n. 26, p. 15155-15160, Dec 1999.

CHARLESTON, M. Phylogeny. In: **Brenner's Encyclopedia of Genetics**. s ed. New York: Elsevier, 2013. p. 598-600.

CHAUHAN, J. S.; RAO, A.; RAGHAVA, G. P. In silico platform for prediction of N-, O- and C-glycosites in eukaryotic protein sequences. **PLoS One**, 8, n. 6, p. e67008, 2013.

CHEN, J.; WANG, Y.; GUO, D.; SHEN, B. A systems biology perspective on rational design of peptide vaccine against virus infections. **Curr Top Med Chem**, 12, n. 12, p. 1310-1319, 2012.

CHEN, V. B.; ARENDALL, W. B.; HEADD, J. J.; KEEDY, D. A. *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 66, n. Pt 1, p. 12-21, Jan 2010.

CIPRANDI, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São Paulo. 25: 250-262 p. 2003.

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, 465, n. 7301, p. S4-5, Jun 24 2010.

COELHO, T.; MOREIRA, A. **Função hemostática e sua avaliação**. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto – Serviço de Fisiologia 2001.

COLAZZO, F.; GELOSA, P.; TREMOLI, E.; SIRONI, L. *et al.* Role of the Cysteinyl Leukotrienes in the Pathogenesis and Progression of Cardiovascular Diseases. **Mediators Inflamm**, 2017, p. 2432958, 2017.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 110, n. 3, p. 277-282, May 2015.

DA ROSA, J. A.; JUSTINO, H. H. G.; NASCIMENTO, J. D.; MENDONÇA, V. J. *et al.* A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera , Reduviidae , Triatominae). **Zookeys**, n. 675, p. 1-25, 2017.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. WATERFALL SEQUENCE FOR INTRINSIC BLOOD CLOTTING. **Science**, 145, n. 3638, p. 1310-1312, Sep 18 1964.

DAVIES, M. N.; FLOWER, D. R. Harnessing bioinformatics to discover new vaccines. **Drug Discov Today**, 12, n. 9-10, p. 389-395, May 2007.

DAVIS, I. W.; LEAVER-FAY, A.; CHEN, V. B.; BLOCK, J. N. *et al.* MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Res**, 35, n. Web Server issue, p. W375-383, Jul 2007.

DE ARAÚJO, C. N.; BUSSACOS, A. C.; SOUSA, A. O.; HECHT, M. M. *et al.* Interactome: Smart hematophagous triatomine salivary gland molecules counteract human hemostasis during meal acquisition. **J Proteomics**, 75, n. 13, p. 3829-3841, Jul 16 2012.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol**, 2010, 2010.

DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nat Rev Immunol**, 15, n. 8, p. 511-523, Aug 2015.

DIAS, J. C.; RAMOS, A. N.; GONTIJO, E. D.; LUQUETTI, A. *et al.* [Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015]. **Epidemiol Serv Saude**, 25, n. spe, p. 7-86, Jun 2016.

DILL, K. A.; MACCALLUM, J. L. The protein-folding problem, 50 years on. **Science**, 338, n. 6110, p. 1042-1046, Nov 23 2012.

DU, Z.; SU, H.; WANG, W.; YE, L. *et al.* The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction. **Nat Protoc**, 16, n. 12, p. 5634-5651, Dec 2021.

DURRANT, JD; MCCAMMON, JA Simulações de dinâmica molecular e descoberta de medicamentos. **BMC Biol** , 9, pág. 71, 28 de outubro de 2011.

ECHAVARRÍA, N. G.; ECHEVERRÍA, L. E.; STEWART, M.; GALLEGU, C. *et al.* Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. **Curr Probl Cardiol**, 46, n. 3, p. 100507, Mar 2021.

EL-MANZALAWY, Y.; DOBBS, D.; HONAVAR, V. G. In Silico Prediction of Linear B-Cell Epitopes on Proteins. **Methods Mol Biol**, 1484, p. 255-264, 2017.

EWING, R. M.; CHU, P.; ELISMA, F.; LI, H. *et al.* Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. **Mol Syst Biol**, 3, p. 89, 2007.

FERREIRA DE FREITAS, R.; SCHAPIRA, M. Uma análise sistemática das interações proteína-ligante atômica no PDB. **Medchemcomm**, 8, n. 10, pág. 1970-1981, 01 de outubro de 2017.

FINKELSTEIN, A. V.; PTITSYN, O. B. **Protein physics: a course of lectures**. 2 ed. Amsterdam Elsevier, 2016.

FONTAINE, A.; DIOUF, I.; BAKKALI, N.; MISSÉ, D. *et al.* Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. **Parasit Vectors**, 4, p. 187, Sep 28 2011.

FRANCISCHETTI, I. M. Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. **Toxicon**, 56, n. 7, p. 1130-1144, Dec 15 2010.

FRENCH, S. L.; THALMANN, C.; BRAY, P. F.; MACDONALD, L. E. *et al.* A function-blocking PAR4 antibody is markedly antithrombotic in the face of a hyperreactive PAR4 variant. **Blood Adv**, 2, n. 11, p. 1283-1293, Jun 12 2018.

GALANIS, K. A.; NASTOU, K. C.; PAPANDREOU, N. C.; PETICHAKIS, G. N. *et al.* Linear B-Cell Epitope Prediction for In Silico Vaccine Design: A Performance Review of Methods Available via Command-Line Interface. **Int J Mol Sci**, 22, n. 6, Mar 22 2021.

GALE, A. J. Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. **Toxicol Pathol**, 39, n. 1, p. 273-280, Jan 2011.

GALVÃO, C. **Vetores da doença de chagas no Brasil**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. DOI 10.7476/9788598203096. 289 p.

GALVÃO, C. Taxonomy. *In: Triatominae – The Biology of Chagas Disease Vetores*: Springer, Cham, 2021. p. 15–38.

GALVÃO, C.; GURGEL-GONÇALVES, R. Vetores conhecidos no Brasil. *In: GALVÃO, C. (Ed.). Vetores conhecidos no Brasil*. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. p. 88-170.

GENUTH, N. R.; BARNA, M. Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: from genes to organisms. **Nat Rev Genet**, 19, n. 7, p. 431-452, Jul 2018.

GIBBS, G. M.; ROELANTS, K.; O'BRYAN, M. K. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. **Endocr Rev**, 29, n. 7, p. 865-897, Dec 2008.

GIL-SANTANA, H. R.; CHAVEZ, T.; PITA, S.; PANZERA, F. *et al.* . **Zookeys**, 1104, p. 203-225, 2022.

GREENBAUM, J. A.; ANDERSEN, P. H.; BLYTHE, M.; BUI, H. H. *et al.* Towards a consensus on datasets and evaluation metrics for developing B-cell epitope prediction tools. **J Mol Recognit**, 20, n. 2, p. 75-82, 2007.

GROUP. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clin Pharmacol Ther**, 69, n. 3, p. 89-95, Mar 2001.

GROVER, S. P.; MACKMAN, N. Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 39, n. 3, p. 331-338, Mar 2019.

GUEDES, I. A.; BARRETO, A. M. S.; MARINHO, D.; KREMPSE, E. *et al.* New machine learning and physics-based scoring functions for drug discovery. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 3198, Feb 04 2021.

GUEDES, I. A.; DE MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor-ligand molecular docking. **Biophys Rev**, 6, n. 1, p. 75-87, Mar 2014.

GUERX, N.; PEITSCH, M. C.; SCHWEDE, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. **Electrophoresis**, 30 Suppl 1, p. S162-173, Jun 2009.

GUO, M.; TENG, M.; NIU, L.; LIU, Q. *et al.* Crystal structure of the cysteine-rich secretory protein stecrisp reveals that the cysteine-rich domain has a K⁺ channel inhibitor-like fold. **J Biol Chem**, 280, n. 13, p. 12405-12412, Apr 01 2005.

GURGEL-GONCALVES, R.; CUBA, C. A. Predicting the potential geographical distribution of *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae) based on ecological niche modeling. **J Med Entomol**, 46, n. 4, p. 952-960, Jul 2009.

GURGEL-GONÇALVES, R.; CUBA, C. Estrutura de populações de *Rhodnius neglectus* Lent e *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg (Hemiptera, Reduviidae) em ninhos de pássaros (Furnariidae) presentes na palmeira *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil. **Rev Bras Zoologia**, n. 2491, p. 157-163, 2007.

GURGEL-GONÇALVES, R.; RAMALHO, E. D.; DUARTE, M. A.; PALMA, A. R. *et al.* Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 46, n. 6, p. 323-330, 2004.

GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHULL, J. Codon bias and heterologous protein expression. **Trends Biotechnol**, 22, n. 7, p. 346-353, Jul 2004.

HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **J Comput Chem**, 17, p. 490-519, 1996.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 41, p. 95-98, 1999.

HANWELL, M.D.; CURTIS, D.E.; LONIE, D.C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E;

HUTCHISON, G.R. Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization, and Analysis Platform. **Journal of Cheminformatics**, n. 4, p. 17, 2012.

HECHLER, B.; GACHET, C. P2 receptors and platelet function. **Purinergic Signal**, 7, n. 3, p. 293-303, Sep 2011.

HELLMANN, K.; HAWKINS, R. I. ANTICOAGULANT AND FIBRINOLYTIC ACTIVITIES FROM RHODNIUS PROLIXUS STAL. **Nature**, 201, p. 1008-1009, Mar 07 1964.

HENRIKSEN, A.; KING, T. P.; MIRZA, O.; MONSALVE, R. I. *et al.* Major venom allergen of yellow jackets, Ves v 5: structural characterization of a pathogenesis-related protein superfamily. **Proteins**, 45, n. 4, p. 438-448, Dec 01 2001.

HOFFMAN, D. Allergens in Hymenoptera venom. XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. **The Journal of allergy and clinical immunology**, 92, n. 5, p. 707-716, 1993.

HOFFMAN, D. Reactions to less common species of fire ants. **The Journal of allergy and clinical immunology**, 100, n. 5, p. 679-683, 1997.

HOFFMAN, D. R. Allergens in Hymenoptera venom XV: The immunologic basis of vespid venom cross-reactivity. **J Allergy Clin Immunol**, 75, n. 5, p. 611-613, May 1985.

HOFFMAN, D. R. Hymenoptera venom allergens. **Clin Rev Allergy Immunol**, 30, n. 2, p. 109-128, Apr 2006.

HOTEZ, P.; BOTTAZZI, M. E.; STRUB-WOURGAFT, N.; SOSA-ESTANI, S. *et al.* A new patient registry for Chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis**, 14, n. 10, p. e0008418, Oct 2020.

HOU, Q.; STRINGER, B.; WAURY, K.; CAPEL, H. *et al.* SeRenDIP-CE: sequence-based interface prediction for conformational epitopes. **Bioinformatics**, 37, n. 20, p. 3421-3427, Oct 25 2021.

HUSSEIN, H. A.; BORREL, A.; GENEIX, C.; PETITJEAN, M. *et al.* PockDrug-Server: a new web server for predicting pocket druggability on holo and apo proteins. **Nucleic Acids Res**, 43, n. W1, p. W436-442, Jul 01 2015.

IGNJATOVIC, V. Activated partial thromboplastin time. **Methods Mol Biol**, 992, p. 111-120, 2013.

ISHIMARU, Y.; GOMEZ, E. A.; ZHANG, F.; MARTINI-ROBLES, L. *et al.* Dimiconin, a novel coagulation inhibitor from the kissing bug, *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease. **J Exp Biol**, 215, n. Pt 20, p. 3597-3602, Oct 15 2012.

JENDELE, L.; KRIVAK, R.; SKODA, P.; NOVOTNY, M. *et al.* PrankWeb: a web server for ligand binding site prediction and visualization. **Nucleic Acids Res**, 47, n. W1, p. W345-W349, Jul 02 2019.

JESPERSEN, M. C.; PETERS, B.; NIELSEN, M.; MARCATILI, P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. **Nucleic Acids Res**, 45, n. W1, p. W24-W29, Jul 03 2017.

JIRAPATTHARASATE, C.; UDONSOM, R.; PRACHASUPHAP, A.; JONGPITISUB, K. *et al.* Development and evaluation of recombinant GRA8 protein for the serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in goats. **BMC Vet Res**, 17, n. 1, p. 27, Jan 09 2021.

JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; GREEN, T. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, 596, n. 7873, p. 583-589, Aug 2021.

KANDEL, J.; TAYARA, H.; CHONG, K. T. PURESNet: previsão de locais de ligação proteína-ligante usando rede neural residual profunda. **J Cheminform**, 13, n. 1, pág. 65, 08 de setembro de 2021.

KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Curr Opin Biotechnol**, 6, n. 5, p. 494-500, Oct 1995.

KATO, H.; JOCHIM, R. C.; GOMEZ, E. A.; SAKODA, R. *et al.* A repertoire of the dominant transcripts from the salivary glands of the blood-sucking bug, *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease. **Infect Genet Evol**, 10, n. 2, p. 184-191, Mar 2010.

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

KAVITHA, K.; SARITHA, R. *et al.* Computational prediction of continuous B-cell epitopes using random forest classifier. *In: 2013 Fourth International Conference on Computing, Communications and Networking Technologies (ICCCNT), 2013, Tiruchengode, India.* p. 1 – 5.

KELLEHER, A.; DARWICHE, R.; REZENDE, W. C.; FARIAS, L. P. *et al.* *Schistosoma mansoni* venom allergen-like protein 4 (SmVAL4) is a novel lipid-binding SCP/TAPS protein that lacks the prototypical CAP motifs. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 70, n. Pt 8, p. 2186-2196, Aug 2014.

KELLEY, L. A.; MEZULIS, S.; YATES, C. M.; WASS, M. N. *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nat Protoc**, 10, n. 6, p. 845-858, Jun 2015.

KESKIN, O.; GURSOY, A.; MA, B.; NUSSINOV, R. Principles of protein-protein interactions: what are the preferred ways for proteins to interact? **Chem Rev**, 108, n. 4, p. 1225-1244, Apr 2008.

KING ET AL. Protein allergens of white-faced hornet, yellow hornet, and yellow jacket venoms. **Biochemistry**, 17, n. 24, p. 5165-5174, Nov 28 1978.

KING, T.; KOCHOUMIAN, L.; LAM, T. Immunochemical observations of antigen 5, a major venom allergen of hornets, yellowjackets and wasps. *J Biol Chem*, 24, n. 8, p. 857-864, 1987.

KING, T. P.; SOBOTKA, A. K.; ALAGON, A.; KOCHOUMIAN, L. *et al.* Protein allergens of white-faced hornet, yellow hornet, and yellow jacket venoms. *Biochemistry*, 17, n. 24, p. 5165-5174, Nov 28 1978.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov*, 3, n. 11, p. 935-949, Nov 2004.

KO, J.; PARK, H.; HEO, L.; SEOK, C. GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement. *Nucleic Acids Res*, 40, n. Web Server issue, p. W294-297, Jul 2012.

KOPANIC, J. L.; AL-MUGOTIR, M.; ZACH, S.; DAS, S. *et al.* An Escherichia coli strain for expression of the connexin45 carboxyl terminus attached to the 4th transmembrane domain. *Front Pharmacol*, 4, p. 106, 2013.

KOPPERS, A. J.; REDDY, T.; O'BRYAN, M. K. The role of cysteine-rich secretory proteins in male fertility. *Asian J Androl*, 13, n. 1, p. 111-117, Jan 2011.

KOVALICK, G. E.; SCHREIBER, M. C.; DICKASON, A. K.; CUNNINGHAM, R. A. Structure and expression of the antigen 5-related gene of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol*, 28, n. 7, p. 491-500, Jul 1998.

KRYSHTAFOVYCH, A.; SCHWEDE, T.; TOPF, M.; FIDELIS, K. *et al.* Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP)-Round XIV. *Proteins*, 89, n. 12, p. 1607-1617, Dec 2021.

KUBINYI, H. Abordagens combinatórias e computacionais no projeto de medicamentos baseados em estrutura. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 1, n. 1, pág. 16-27, julho de 1998.

KUHLMAN, B.; BRADLEY, P. Advances in protein structure prediction and design. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20, n. 11, p. 681-697, Nov 2019.

KUNTZ, I. D.; BLANEY, J. M.; OATLEY, S. J.; LANGRIDGE, R. *et al.* A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol*, 161, n. 2, p. 269-288, Oct 25 1982.

KÄLLBERG, M.; WANG, H.; WANG, S.; PENG, J. *et al.* Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc*, 7, n. 8, p. 1511-1522, Jul 19 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, n. 5259, p. 680-685, Aug 15 1970.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae),

and their significance as vectors of Chagas disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. New York. 163: 123–520 p. 1979.

LIDANI, K. C. F.; ANDRADE, F. A.; BAVIA, L.; DAMASCENO, F. S. *et al.* Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. **Front Public Health**, 7, p. 166, 2019.

LIPPI, G.; FAVALORO, E. J. Laboratory hemostasis: milestones in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. **Clin Chem Lab Med**, 51, n. 1, p. 91-97, Jan 2013.

LU, S.; WANG, J.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K. *et al.* CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. **Nucleic Acids Res**, 48, n. D1, p. D265-D268, Jan 08 2020.

MA, D.; GAO, L.; AN, S.; SONG, Y. *et al.* A horsefly saliva antigen 5-like protein containing RTS motif is an angiogenesis inhibitor. **Toxicon**, 55, n. 1, p. 45-51, Jan 2010.

MA, D.; WANG, Y.; YANG, H.; WU, J. *et al.* Anti-thrombosis repertoire of blood-feeding horsefly salivary glands. **Mol Cell Proteomics**, 8, n. 9, p. 2071-2079, Sep 2009.

MACFARLANE, R. G. AN ENZYME CASCADE IN THE BLOOD CLOTTING MECHANISM, AND ITS FUNCTION AS A BIOCHEMICAL AMPLIFIER. **Nature**, 202, p. 498-499, May 02 1964.

MANS, B. J.; ANDERSEN, J. F.; FRANCISCHETTI, I. M.; VALENZUELA, J. G. *et al.* Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. **Insect Biochem Mol Biol**, 38, n. 1, p. 42-58, Jan 2008.

MANS, B. J.; FRANCISCHETTI, I. M. Sialomic perspectives on the evolution of blood-feeding behavior in arthropods: future therapeutics by natural design. *In*: KINI, R. M. E. A. (Ed.). **Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside**. 1^a ed. Dordrecht: Springer, 2010. cap. Chapter 3, p. 21-44.

MARCHLER-BAUER, A.; BO, Y.; HAN, L.; HE, J. *et al.* CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. **Nucleic Acids Res**, 45, n. D1, p. D200-D203, Jan 04 2017.

MARCHLER-BAUER, A.; BRYANT, S. H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. **Nucleic Acids Res**, 32, n. Web Server issue, p. W327-331, Jul 01 2004.

MARCHLER-BAUER, A.; DERBYSHIRE, M. K.; GONZALES, N. R.; LU, S. *et al.* CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Res**, 43, n. Database issue, p. D222-226, Jan 2015.

MARCHLER-BAUER, A.; LU, S.; ANDERSON, J. B.; CHITSAZ, F. *et al.* CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Res**, 39, n. Database issue, p. D225-229, Jan 2011.

MARRONE, T.J.; BRIGGS, J.M.; MCCAMMON, J.A. Projeto de medicamentos baseado em estrutura: avanços computacionais. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 37, pág. 71-90, 1997.

MARTÍN-ESCOLANO, J.; MARÍN, C.; ROSALES, M. J.; TSAOUSIS, A. D. *et al.* An Updated View of the. **ACS Infect Dis**, 8, n. 6, p. 1107-1115, Jun 10 2022.

MCCONKEY, B.; SOBOLEV, V.; EDELMAN, M. The performance of current methods in ligand-protein docking. **Current Science**, 83, p. 845–855, 2002.

MENEGUETTI, D. E. A. First report of *Rhodnius montenegrensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in the State of Acre, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Minas Gerais. 48: 471-473 p.

MESQUITA, R. D.; CARNEIRO, A. B.; BAFICA, A.; GAZOS-LOPES, F. *et al.* Trypanosoma cruzi infection is enhanced by vector saliva through immunosuppressant mechanisms mediated by lysophosphatidylcholine. **Infect Immun**, 76, n. 12, p. 5543-5552, Dec 2008.

MILLAR, A. H.; HEAZLEWOOD, J. L.; GIGLIONE, C.; HOLDSWORTH, M. J. *et al.* The Scope, Functions, and Dynamics of Posttranslational Protein Modifications. **Annu Rev Plant Biol**, 70, p. 119-151, Apr 29 2019.

MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular docking. **Methods Mol Biol**, 443, p. 365-382, 2008.

MOULT, J.; FIDELIS, K.; KRYSHTAFOVYCH, A.; SCHWEDE, T. *et al.* Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP)-Round XII. **Proteins**, 86 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 7-15, Mar 2018.

NEVES, B. J.; MOTTIN, M.; MOREIRA-FILHO, J. T.; SOUSA, B. K. P. *et al.* Chapter 4 - Best Practices for Docking-Based Virtual Screening. *In: Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design*, 2021. p. 75-98.

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

NGAN, C. H.; HALL, D. R.; ZERBE, B.; GROVE, L. E. *et al.* FTSite: high accuracy detection of ligand binding sites on unbound protein structures. **Bioinformatics**, 28, n. 2, p. 286-287, Jan 15 2012.

OLRICHS, N. K.; MAHALKA, A. K.; KALOYANOVA, D.; KINNUNEN, P. K. *et al.* Golgi-Associated plant Pathogenesis Related protein 1 (GAPR-1) forms amyloid-like fibrils by interaction with acidic phospholipids and inhibits A β aggregation. **Amyloid**, 21, n. 2, p. 88-96, Jun 2014.

OPAS. PAHO | Enfermedad de Chagas. 2019. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743<=es. Acesso em: 06 jul 2023.

OVERTON, T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts. **Drug Discov Today**, 19, n. 5, p. 590-601, May 2014.

OZAKI, Y.; GUARIENTO, M. E.; DE ALMEIDA, E. A. Quality of life and depressive symptoms in Chagas disease patients. **Qual Life Res**, 20, n. 1, p. 133-138, Feb 2011.

PADAVATTAN, S.; SCHMIDT, M.; HOFFMAN, D. R.; MARKOVIĆ-HOUSLEY, Z. Crystal structure of the major allergen from fire ant venom, Sol i 3. **J Mol Biol**, 383, n. 1, p. 178-185, Oct 31 2008.

PALTA, S.; SAROA, R.; PALTA, A. Overview of the coagulation system. **Indian J Anaesth**, 58, n. 5, p. 515-523, Sep 2014.

PANTERA, B.; HOFFMAN, D. R.; CARRESI, L.; CAPPUGI, G. *et al.* Characterization of the major allergens purified from the venom of the paper wasp *Polistes gallicus*. **Biochim Biophys Acta**, 1623, n. 2-3, p. 72-81, Oct 13 2003.

PATINO, L. H.; RAMÍREZ, J. D. RNA-seq in kinetoplastids: A powerful tool for the understanding of the biology and host-pathogen interactions. **Infect Genet Evol**, 49, p. 273-282, Apr 2017.

PENCE, H. E.; WILLIAMS, A. ChemSpider: An Online Chemical Information Resource. 87, n. 11, p. 1123–1124, 2010.

PEREIRA, M. H.; SOUZA, M. E.; VARGAS, A. P.; MARTINS, M. S. *et al.* Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/Triatominae). **Acta Trop**, 61, n. 3, p. 255-261, May 1996.

PINAZO, M.; GASCON, J. Chagas disease: from Latin America to the world. **Reports in Parasitology**, 4, p. 7–14, 2015.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **Int J Mol Sci**, 20, n. 18, Sep 04 2019.

PONOMARENKO, J.; BUI, H. H.; LI, W.; FUSSEDER, N. *et al.* ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. **BMC Bioinformatics**, 9, p. 514, Dec 02 2008.

PÉREZ-MOLINA, J.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

PRAÇA, Y. R.; SANTIAGO, P. B.; CHARNEAU, S.; MANDACARU, S. C. *et al.* An Integrative Sialomic Analysis Reveals Molecules From *Triatoma sordida*. **Front Cell Infect Microbiol**, 11, p. 798924, 2021.

RAMAKRISHNA, K.; SINGH, N.; KRISHNAMURTHY, S. Diindolylmethane ameliorates platelet aggregation and thrombosis: In silico, in vitro, and in vivo studies. **Eur J Pharmacol**, 919, p. 174812, Mar 15 2022

RAMAZI, S.; ZAHIRI, J. Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. **Database (Oxford)**, 2021, Apr 07 2021.

RAMBAUT, A. **FigTree v1.3.1**. Edinburgh: Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, 2010.

RAMOS, L. J.; CASTRO, G. V. S.; SOUZA, J. L.; OLIVEIRA, J. *et al.* First report of *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from the State of Acre, Brazil, and the Brazilian Western Amazon Region. **Rev Soc Bras Med Trop**, 51, n. 2, p. 212-214, 2018.

REZNIKOFF, W. S. The lactose operon-controlling elements: a complex paradigm. **Mol Microbiol**, 6, n. 17, p. 2419-2422, Sep 1992.

RIBEIRO, J. M.; ANDERSEN, J.; SILVA-NETO, M. A.; PHAM, V. M. *et al.* Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochem Mol Biol**, 34, n. 1, p. 61-79, Jan 2004.

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

RIBEIRO, J. M.; FRANCISCHETTI, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annu Rev Entomol**, 48, p. 73-88, 2003.

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

RIBEIRO, J. M.; WALKER, F. A. High affinity histamine-binding and antihistaminic activity of the salivary nitric oxide-carrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*. **J Exp Med**, 180, n. 6, p. 2251-2257, Dec 01 1994.

RODRIGUES, V. L.; PAULIQUEVIS JUNIOR, C.; DA SILVA, R. A.; WANDERLEY, D. M. *et al.* Colonization of palm trees by *Rhodnius neglectus* and household and invasion in an urban area, Araçatuba, São Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 56, n. 3, p. 213-218, 2014.

RUGGERI, Z. M. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. **Thromb Res**, 120 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S5-9, 2007.

SALENTIN, S.; SCHREIBER, S.; HAUPT, VJ; ADASME, MF *et al.* PLIP: perfilador de interação proteína-ligante totalmente automatizado. **Ácidos Nucleicos Res**, 43, n. W1, pág. W443-447, 01 de julho de 2015.

SALIS, H. M. The ribosome binding site calculator. **Methods Enzymol**, 498, p. 19-

42, 2011.

SANTIAGO, P. B. **Descrição extensiva dos sialomas de *Rhodnius neglectus* e *Triatoma dimidiata*, vetores da doença de Chagas.** 2016. (Tese (doutorado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

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

SANTIAGO, P. B.; DE ARAÚJO, C. N.; CHARNEAU, S.; BASTOS, I. M. D. *et al.* Exploring the molecular complexity of *Triatoma dimidiata* sialome. **J Proteomics**, 174, p. 47-60, Mar 01 2018.

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

SANTOS, K. B.; GUEDES, I. A.; KARL, A. L. M.; DARDENNE, L. E. Highly Flexible Ligand Docking: Benchmarking of the DockThor Program on the LEADS-PEP Protein-Peptide Data Set. **J Chem Inf Model**, 60, n. 2, p. 667-683, Feb 24 2020.

SARASWATHY, N.; RAMALINGAM, P. Phosphoproteomics. *In*: **Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics**, 2011.

SECO, J.; LUQUE, FJ; BARRIL, X. Detecção de sítio de ligação e índice de drogabilidade a partir de primeiros princípios. **J Med Chem**, 52, n. 8, pág. 2363-2371, 23 de abril de 2009.

SCARIM, C. B.; JORNADA, D. H.; CHELUCCI, R. C.; DE ALMEIDA, L. *et al.* Current advances in drug discovery for Chagas disease. **Eur J Med Chem**, 155, p. 824-838, Jul 15 2018.

SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Trop**, 110, n. 2-3, p. 88-100, 2009.

SCHRÖDINGER. Maestro, Schrödinger, LLC. New York, NY, 2023.

SCHRÖDINGER, L.; DELANO, W. **PyMOL** 2020.

SCHWARZ, Alexandra *et al.* An Updated Insight into the Sialotranscriptome of *Triatoma infestans*: Developmental Stage and Geographic Variations. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 12, 2014.

SEOK, C.; BAEK, M.; STEINEGGER, M.; PARK, H. *et al.* Accurate protein structure prediction: what comes next? *Bio Design*. 9: 47-50 p. 2021.

SHARMA, P.; SACHDEVA, M. U. S.; KUMAR, N.; BOSE, S. *et al.* A comparative study between light transmission aggregometry and flow cytometric platelet

aggregation test for the identification of platelet function defects in patients with bleeding. **Blood Res**, 56, n. 2, p. 109-118, Jun 30 2021.

SHARON, J.; RYNKIEWICZ, M. J.; LU, Z.; YANG, C. Y. Discovery of protective B-cell epitopes for development of antimicrobial vaccines and antibody therapeutics. **Immunology**, 142, n. 1, p. 1-23, May 2014.

SHIN, W.-H.; LEE, G. R.; HEO, L.; LEE, H. *et al.* Prediction of Protein Structure and Interaction by GALAXY Protein Modeling Programs. **Bio Design**. 2: 1-11 p. 2014.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol Syst Biol**, 7, p. 539, Oct 11 2011.

SIMAN-TOV, D. D.; ZEMEL, R.; TUR KASPA, R.; GERSHONI, J. M. The use of epitope arrays in immunodiagnosis of infectious disease: hepatitis C virus, a case study. **Anal Biochem**, 432, n. 2, p. 63-70, Jan 15 2013.

SIROIS P; P., B. Pharmacology of the leukotrienes. **J Pharmacol.**, 15, p. 53-68, 1984.

SOBOLEV, O. V.; AFONINE, P. V.; MORIARTY, N. W.; HEKKELMAN, M. L. *et al.* A Global Ramachandran Score Identifies Protein Structures with Unlikely Stereochemistry. **Structure**, 28, n. 11, p. 1249-1258.e1242, Nov 03 2020.

SOUSA, S. F.; RIBEIRO, A. J.; COIMBRA, J. T.; NEVES, R. P. *et al.* Protein-ligand docking in the new millennium--a retrospective of 10 years in the field. **Curr Med Chem**, 20, n. 18, p. 2296-2314, 2013.

STUDER, G.; REMPFER, C.; WATERHOUSE, A. M.; GUMIENNY, R. *et al.* QMEANDisCo-distance constraints applied on model quality estimation. **Bioinformatics**, 36, n. 6, p. 1765-1771, Mar 01 2020.

SU, H.; WANG, W.; DU, Z.; PENG, Z. *et al.* Improved Protein Structure Prediction Using a New Multi-Scale Network and Homologous Templates. **Advanced Science**. 8 2021.

SUÁREZ, C.; NOLDER, D.; GARCÍA-MINGO, A.; MOORE, D. A. J. *et al.* Diagnosis and Clinical Management of Chagas Disease: An Increasing Challenge in Non-Endemic Areas. **Res Rep Trop Med**, 13, p. 25-40, 2022.

SWAN, C. E.; BREYER, R. M. Prostaglandin E2 modulation of blood pressure homeostasis: studies in rodent models. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, 96, n. 1-4, p. 10-13, Nov 2011.

SWENBERG, J. A.; FRYAR-TITA, E.; JEONG, Y. C.; BOYSEN, G. *et al.* Biomarkers in toxicology and risk assessment: informing critical dose-response relationships. **Chem Res Toxicol**, 21, n. 1, p. 253-265, Jan 2008.

SZYPERSKI, T.; FERNÁNDEZ, C.; MUMENTHALER, C.; WÜTHRICH, K. Structure

comparison of human glioma pathogenesis-related protein GliPR and the plant pathogenesis-related protein P14a indicates a functional link between the human immune system and a plant defense system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95, n. 5, p. 2262-2266, Mar 03 1998.

TAEGER, A.; BLANK, S. M.; LISTON, A. D. World Catalog of Symphyta (Hymenoptera). 2580, Z.: 1-1064 p. 2010.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. **MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. Molecular Biology and Evolution** n. 38, p. 3022-3027, 2012.

TENGATTINI, S.; RINALDI, F.; PIUBELLI, L.; KUPFER, T. *et al.* Enterokinase monolithic bioreactor as an efficient tool for biopharmaceuticals preparation: on-line cleavage of fusion proteins and analytical characterization of released products. **J Pharm Biomed Anal**, 157, p. 10-19, Aug 05 2018.

TEUFEL, F.; ALMAGRO ARMENTEROS, J. J.; JOHANSEN, A. R.; GÍSLASON, M. H. *et al.* SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. **Nat Biotechnol**, 40, n. 7, p. 1023-1025, Jul 2022.

TONG, AH; DREES, B.; NARDELLI, G.; BADER, GD *et al.* Uma estratégia experimental e computacional combinada para definir redes de interação de proteínas para módulos de reconhecimento de peptídeos. **Ciência**, 295, n. 5553, pág. 321-324, 11 de janeiro de 2002.

TRIVERS, J. B.; ROHAN, J. G.; SAHU, R. P. New Insights Into the Pathologic Roles of the Platelet-Activating Factor System. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 12, p. 624132, 2021.

VAN REGENMORTELMHV. Mapping Epitope Structure and Activity: From One-Dimensional Prediction to Four-Dimensional Description of Antigenic Specificity. **Methods**, 9, n. 3, p. 465-472, Jun 1996.

VARADI, M.; ANYANGO, S.; DESHPANDE, M.; NAIR, S. *et al.* AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. **Nucleic Acids Res**, 50, n. D1, p. D439-D444, Jan 07 2022.

VARGA-SZABO, D.; PLEINES, I.; NIESWANDT, B. Cell adhesion mechanisms in platelets. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 28, n. 3, p. 403-412, Mar 2008.

VERSTEEG, H. H.; HEEMSKERK, J. W.; LEVI, M.; REITSMA, P. H. New fundamentals in hemostasis. **Physiol Rev**, 93, n. 1, p. 327-358, Jan 2013.

VILHELMSSEN, L. Phylogeny and classification of the extant basal lineages of the Hymenoptera (Insecta). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 131, n. 4, p. 393-442, 2001.

VOS, B.; KÖHLER, J.; MÜLLER, S.; STRETZ, E. *et al.* Spiking venom with rVes v 5

improves sensitivity of IgE detection in patients with allergy to *Vespula* venom. **J Allergy Clin Immunol**, 131, n. 4, p. 1225-1227, 1227.e1221, Apr 2013.

WANG, J.; SHEN, B.; GUO, M.; LOU, X. *et al.* Blocking effect and crystal structure of natrin toxin, a cysteine-rich secretory protein from *Naja atra* venom that targets the BKCa channel. **Biochemistry**, 44, n. 30, p. 10145-10152, Aug 02 2005.

WANG, W.; PENG, Z.; YANG, J. Single-sequence protein structure prediction using supervised transformer protein language models. *Nature Computational Science*. 2: 804–814 p. 2022.

WANG, X.; WEBER, G. F. Quantitative Analysis of Protein Evolution: The Phylogeny of Osteopontin. **Front Genet**, 12, p. 700789, 2021.

WANG, Z.; SUN, H.; YAO, X.; LI, D. *et al.* Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power. **Phys Chem Chem Phys**, 18, n. 18, p. 12964-12975, May 14 2016.

WATERHOUSE, A.; BERTONI, M.; BIENERT, S.; STUDER, G. *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research. Web Server issue*. 46 2018.

WENG, G.; GAO, J.; WANG, Z.; WANG, E. *et al.* Comprehensive Evaluation of Fourteen Docking Programs on Protein-Peptide Complexes. **J Chem Theory Comput**, 16, n. 6, p. 3959-3969, Jun 09 2020.

WHO. **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**. 2023a. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 06 jul 2023

WHO. **Neglected tropical diseases**. p. <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases>. Acesso em: 06 jul 2023 2023.

WORM, M.; ECKERMANN, O.; DÖLLE, S.; ABERER, W. *et al.* Triggers and treatment of anaphylaxis: an analysis of 4,000 cases from Germany, Austria and Switzerland. **Dtsch Arztebl Int**, 111, n. 21, p. 367-375, May 23 2014.

XU, X.; FRANCISCHETTI, I. M.; LAI, R.; RIBEIRO, J. M. *et al.* Structure of protein having inhibitory disintegrin and leukotriene scavenging functions contained in single domain. **J Biol Chem**, 287, n. 14, p. 10967-10976, Mar 30 2012.

YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Toxicon**, 44, n. 3, p. 227-231, Sep 01 2004.

YANG, J.; ZHANG, Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. **Nucleic Acids Res**, 43, n. W1, p. W174-181, Jul 01 2015.

YANG, R.; MOOSAVI, L. Prothrombin Time. *In: StatPearls*. Treasure Island (FL), 2023.

YANG, X.; YU, X. An introduction to epitope prediction methods and software. **Rev Med Virol**, 19, n. 2, p. 77-96, Mar 2009.

ZHANG, Z.; LI, Y.; LIN, B.; SCHROEDER, M. *et al.* Identificação de cavidades na superfície de proteínas usando múltiplas abordagens computacionais para previsão de sítios de ligação de medicamentos. **Bioinformática**, 27, n. 15, pág. 2083-2088, 01 de agosto de 2011.

ZHAO, J.; CAO, Y.; ZHANG, L. Explorando os métodos computacionais para previsão do local de ligação proteína-ligante. **Estrutura de Computação Biotechnol J**, 18, p. 417-426, 2020.

ZHENG, W.; ZHANG, C.; LI, Y.; PEARCE, R. *et al.* Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. **Cell Rep Methods**, 1, n. 3, Jul 26 2021.

ZHOU, X.; ZHENG, W.; LI, Y.; PEARCE, R. *et al.* I-TASSER-MTD: a deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction. **Nat Protoc**, 17, n. 10, p. 2326-2353, Oct 2022.