UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

LARA DE MELO SANTOS

OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE UMA SERINO PROTEASE DA SALIVA DO TRIATOMÍNEO *Rhodnius neglectus*

BRASÍLIA, 2024

LARA DE MELO SANTOS

OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE UMA SERINO PROTEASE DA SALIVA DO TRIATOMÍNEO *Rhodnius neglectus*

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Carla Nunes de Araújo
Coorientadora: Prof(a). Thais Alves da Costa Lamounier

BRASÍLIA, 2024

LARA DE MELO SANTOS

OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE UMA SERINO PROTEASE DA SALIVA DO TRIATOMÍNEO *Rhodnius neglectus*

BANCA EXAMINADORA

_____

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Carla Nunes de Araújo
(Faculdade de Ceilândia – UnB)

_____

Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Thais Alves da Costa Lamounier
(Faculdade de Ceilândia – UnB)

_____

Prof(a). Dr(a). Tatiana Ramos Lavich
(Faculdade de Ceilândia – UnB)

_____

M.Sc. Kaio Luís da Silva Bentes
(Universidade Católica de Brasília - UCB)

BRASÍLIA, 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo suporte;
À minha orientadora, Drª Carla Nunes de Araújo, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação e apoio contínuo ao longo de todo o processo;
À equipe do LIPH pelos ensinamentos, em especial à Gabriela Dantas pelo acolhimento, conselhos e por ter me guiado em praticamente todas as etapas deste trabalho; e à Laura Athayde pela amizade e apoio;
À minha coorientadora, Drª Thais Alves da Costa Lamounier, por aceitar o convite de coorientação;
À banca examinadora por ter aceitado o convite e dedicarem seu tempo para avaliar a defesa desta monografia;
E ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e à FAPDF (0193.00002600/2022-70) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO **6**
ABSTRACT **7**
LISTA DE FIGURAS **8**
LISTA DE ABREVIATURAS **9**
1. INTRODUÇÃO **10**
1.1. A DOENÇA DE CHAGAS 10
1.2. A TRANSMISSSÃO VETORIAL DO *Trypanosoma cruzi* 11
1.3. OS VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS 13
1.4. A SALIVA DOS TRIATOMÍNEOS 14
1.5. PROTEASES SEMELHANTES A TRIPSINA 15
1.6. JUSTIFICATIVA 17
2. OBJETIVOS **18**
2.1. OBJETIVO GERAL 18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 18
3. METODOLOGIA **19**
3.1. TRANSFORMAÇÃO DE *Escherichia coli* E SELEÇÃO DE CLONES BACTERIANOS 19
3.2. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE, OBTENÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL E INSOLÚVEL DAS BACTÉRIAS 20
3.3. PURIFICAÇÃO EM COLUNA DE AFINIDADE AO NÍQUEL 20
3.4. ANÁLISE EM GEL SDS-PAGE E *WESTERN BLOT* 21
3.5. TESTES DE ATIVIDADE *IN VITRO* 22
4. RESULTADOS **23**
4.1. EXPRESSÃO DA SERINO PROTEASE SEMELHANTE A TRIPSINA RECOMBINANTE DE *R. neglectus* 23
4.2. PURIFICAÇÃO DA SERINO PROTEASE SEMELHANTE A TRIPSINA RECOMBINANTE DE *R. neglectus* 24
4.3. TESTES DE ATIVIDADE *IN VITRO* 25
5. DISCUSSÃO **26**
6. CONCLUSÃO **28**
7. PERSPECTIVAS **29**
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **30**

RESUMO

Os triatomíneos são os vetores do protozoário *Trypanosoma cruzi,* agente etiológico da Doença de Chagas. Estima-se que cerca de 7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo *T. cruzi*. A Doença de Chagas pode resultar em morbidade grave e mortalidade. A distribuição dos triatomíneos principalmente na América Latina determina a prevalência da doença nessa área. Durante a alimentação sanguínea, o triatomíneo libera sua saliva no local da picada, a qual contém uma mistura complexa de compostos farmacologicamente ativos que evitam a hemostasia do hospedeiro e facilitam a ingestão de sangue. O objetivo deste estudo foi produzir uma serino protease semelhante a tripsina da saliva de *Rhodnius neglectus* (RnTryp) em sistema heterólogo de expressão procarioto e realizar sua caracterização funcional. O gene da RnTryp foi clonado no vetor de expressão pET_100/D-TOPO e a RnTryp recombinante (rRnTryp) foi expressa em *Escherichia coli* BL21(DE3). Após a purificação em coluna de afinidade ao níquel, SDS-PAGE e *Western blotting* foram realizados para confirmar a expressão da rRnTryp. A rRnTryp foi parcialmente purificada da fração bacteriana solúvel em tampão de eluição contendo de 80 a 200 mM de imidazol. A rRnTryp não foi capaz de hidrolisar o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC, substrato da calicreína, que atua na promoção da vasodilatação. Em conclusão, a rRnTryp foi enriquecida por cromatografia de afinidade e poderá ser utilizada em outros testes de atividade para a caracterização de suas funções na hematofagia e nas interações entre o vetor e o hospedeiro vertebrado.

Palavras chaves: Triatomíneos, Proteínas Salivares, Serino protease, Tripsina, Hemostasia.

ABSTRACT

Triatomines are vectors of the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. It is estimated that around 7 million people worldwide are infected with *T. cruzi*. Chagas disease can result in serious morbidity and mortality. The distribution of triatomines in Latin America determines the prevalence of the disease in this area. During blood feeding, the triatomine releases its saliva at the bite site, which contains a complex mixture of pharmacologically active compounds that prevent host hemostasis and facilitate blood ingestion. This study aimed to produce a trypsin-like serine protease from *Rhodnius neglectus* (RnTryp) saliva in a heterologous prokaryotic expression system and perform its functional characterization. The RnTryp gene was cloned into the expression vector pET_100/D-TOPO, and the recombinant RnTryp (rRnTryp) was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). After purification on a nickel affinity column, SDS-PAGE and Western blotting were performed to confirm the expression of rRnTryp. Recombinant RnTryp was purified from the soluble bacterial fraction in an elution buffer containing 80 to 200 mM imidazole, but was not able to hydrolyze the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-AMC, a kallikrein substrate. Kallikrein acts to promote vasodilation. In conclusion, rRnTryp was enriched by affinity chromatography and can be used in other activity tests to characterize its functions in hematophagy and interactions between the vector and the vertebrate host.

Keywords: Triatomines, Salivary Proteins, Serinoprotease, Trypsin, Hemostasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

Figura 2. Ciclo de vida de triatomíneos.

Figura 3. *Rhodnius neglectus.*

Figura 4. Representação esquemática da metodologia empregada na execução do estudo da serino protease semelhante a tripsina de *Rhodnius neglectus* (RnTryp).

Figura 5. Análise eletroforética da serino protease semelhante a tripsina recombinante de *R. neglectus* (rRnTryp), na fração solúvel e insolúvel bacteriana após indução da expressão em diferentes densidades óticas (entre 0,2 e 0,8).

Figura 6. Purificação da rRnTryp por cromatografia de afinidade ao níquel.

LISTA DE ABREVIATURAS

DC – Doença de Chagas

RAP – Peptídeos receptores ativados por proteases

RnTryp – serino protease semelhante a tripsina da saliva de *Rhodnius neglectus*

rRnTryp – serino protease semelhante a tripsina da saliva de *Rhodnius neglectus* recombinante

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Eletrophoresis*)

TBS – Tris Buffered Saline

TTBS – TBS com 0,1% de Tween

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

1. INTRODUÇÃO

1.1. A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (DC), também conhecida como Tripanossomíase Americana, é a infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que é transmitido por triatomíneos, popularmente conhecidos como “barbeiros”. Outras formas de transmissão, menos frequentes, são por ingestão de alimentos contaminados com as fezes do triatomíneo infectado (ALARCÓN DE NOYA et al., 2010), via congênita (LUQUETTI et al., 2015), por transfusão sanguínea (CANCINO-FAURE et al., 2015), transplante de órgãos (HUPRIKAR et al., 2013), e acidentes laboratoriais (HERWALDT, 2001).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a DC é uma das 20 doenças tropicais negligenciadas prioritárias e não recebe atenção devida de órgãos governamentais, mesmo em países onde é endêmica, dificultando o investimento em pesquisa, prevenção e tratamento. A DC afeta principalmente a América Latina, mas em todo o mundo, cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi*, levando em média a 12.000 mortes por ano, devido principalmente às complicações graves que ocorrem na fase crônica, e deixando cerca de 75 milhões de pessoas em risco de infecção. A incidência anual é de 30 a 40.000 casos, mas em muitos países as taxas de detecção são baixas (de 1% a 10%, no máximo) e as populações mais afetadas são as mais vulneráveis, que vivem em áreas rurais ou com condições precárias de saneamento básico, além de possuírem acesso limitado aos serviços de saúde. Assim, os pacientes com a doença enfrentam dificuldades para o diagnóstico e tratamento apropriados (WHO, 2023).

A DC possui duas fases, na fase aguda os indivíduos infectados são assintomáticos ou podem apresentar sintomas que podem durar algumas semanas, como febre prolongada (mais de 7 dias), dor de cabeça, fraqueza intensa, e inchaço, que pode ser localizado na pele no ponto de entrada do parasita; no rosto, especialmente ao redor dos olhos, acompanhado de vermelhidão; e também pode se espalhar para as pernas, causando edema nas extremidades. A fase crônica pode durar décadas e em relação aos sintomas é possível se manifestar nas formas indeterminada (assintomática), cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva, podendo levar

a quadros como insuficiência cardíaca, megacólon e megaesôfago (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

O tratamento é feito com antiparasitários específicos, como benznidazol e o nifurtimox, sendo mais eficaz na fase aguda, podendo ser utilizados na fase crônica em alguns casos. Por ser uma doença geralmente silenciosa no início, as alterações patológicas podem estar avançadas para serem revertidas na fase crônica sintomática. Como prevenção, a principal e mais eficiente medida é o controle vetorial, como uso de mosquiteiros; pulverização de locais com inseticidas residuais; boas práticas de higiene na preparação, transporte, armazenamento e consumo de alimentos; assim como também melhorias e limpeza nas casas para evitar infestação de vetores. Outras formas de prevenção são triagem de sangue em casos de transfusão e transplante de órgãos, e aumento da detecção e cuidado da população afetada em todo o mundo (WHO, 2024).

1.2. A TRANSMISSSÃO VETORIAL DO *Trypanosoma cruzi*

A transmissão vetorial do *T. cruzi* ocorre quando o triatomíneo infectado se alimenta de sangue satisfatoriamente, defeca e libera as formas tripomastigotas metacíclicas (MT: *metacyclic trypomastigotes*; Figura 1) em suas fezes perto do local da picada. Outras formas do parasito, como epimastigotas e epimastigotas infectantes, também podem ser liberados no local. Essas formas entram no hospedeiro através do local da picada ou de membranas mucosas. No interior do hospedeiro, elas invadem células próximas ao local da inoculação. Os MT se diferenciam em amastigotas intracelulares, formas replicativas que se reproduzem por fissão binária, se diferenciam novamente em tripomastigotas, sendo então liberados na circulação na corrente sanguínea (BT: *bloodstream trypomastigotes*). Os epimastigotas infectantes, ao invadirem a célula do hospedeiro vertebrado, se reproduzem por fissão binárias e se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos. Os tripomastigotas sanguíneos infectam células de diferentes tecidos e se transformam em amastigotas intracelulares em novos locais de infecção (FERREIRA et al., 2024)).

O triatomíneo se infecta ao se alimentar de sangue humano ou outro animal vertebrado que contém os tripomastigotas sanguíneos circulantes. No intestino médio anterior do inseto, os tripomastigotas ingeridos transformam-se em formas semelhantes a amastigotas, que no intestino médio posterior, se diferenciam em

epimastigotas infectantes e, posteriormente, epimastigotas, os quais se multiplicam por divisões binárias. Ao alcançarem o intestino posterior, passam por formas intermediárias até se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (revisado por Zanard e colaboradores, FERREIRA et al., 2024).

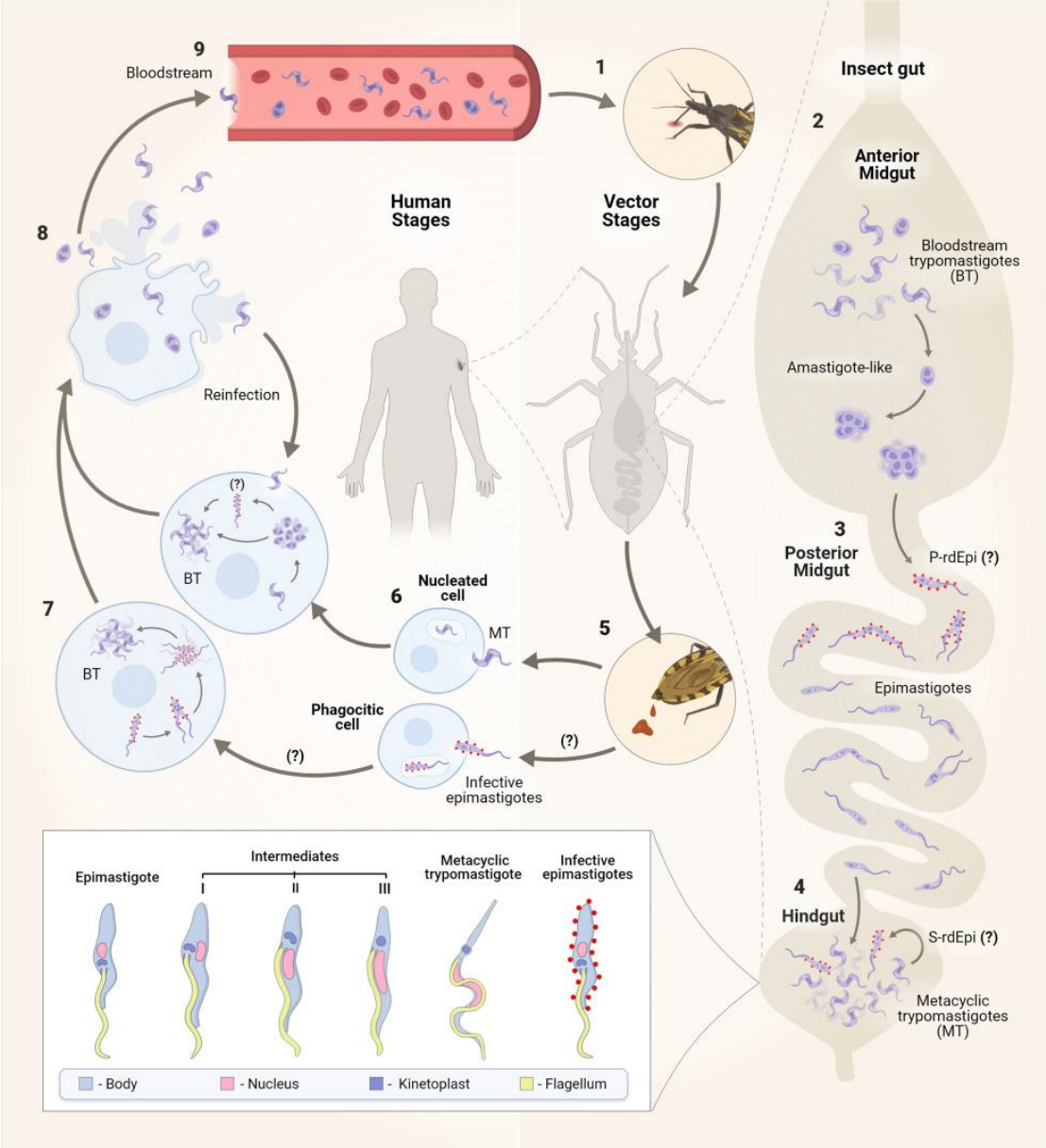


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypansoma cruzi*. BT: *Bloodstream trypomastigotes* (tripomastigotas sanguíneos); P-rdEpi: *Primary epimastigogenesis-recently differentiated epimastigotes* (epimastigotas recém-diferenciados da epimastigogênese primária); S-rdEpi: *Secondary epimastigogenesis-recently differentiated epimastigotes* (epimastigotas recém-diferenciados da epimastigogênese secundária); MT: *Metacyclic trypomastigotes* (tripomastigotas metacíclicos). (FERREIRA et al., 2024).

1.3. OS VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS

Os triatomíneos, vetores da DC, pertencem à família Reduviidae, subfamília Triatominae, são insetos hematófagos, ou seja, alimentam-se do sangue de animais vertebrados. A subfamília Triatominae inclui atualmente 154 espécies distribuídas em 18 gêneros e 5 tribos, sendo elas Cavernicolini, Rhodniini, Triatomini, Bolboderini e Alberproseniini (BELINTANI et al., 2020). Os principais gêneros com importância epidemiológica são *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius.* A maioria das espécies vive na região neotropical (México, Américas Central e Sul), mas algumas também podem ser encontradas nos Estados Unidos, centro-sul da África, sudeste da Ásia e norte da Austrália. Apenas no Brasil, há 64 espécies, entre elas cerca de dez são as mais importantes na epidemiologia devido às características comportamentais, como a adaptação em ambientes domésticos (JURBERG et al., 2015).

Os triatomíneos são hemimetábolos, e durante seu desenvolvimento passam pelos estágios de ovo, ninfa (cinco fases) e adulto (Figura 2). As ninfas, assim como os adultos de ambos os sexos, alimentam-se de sangue, logo, também são capazes de transmitir o protozoário (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

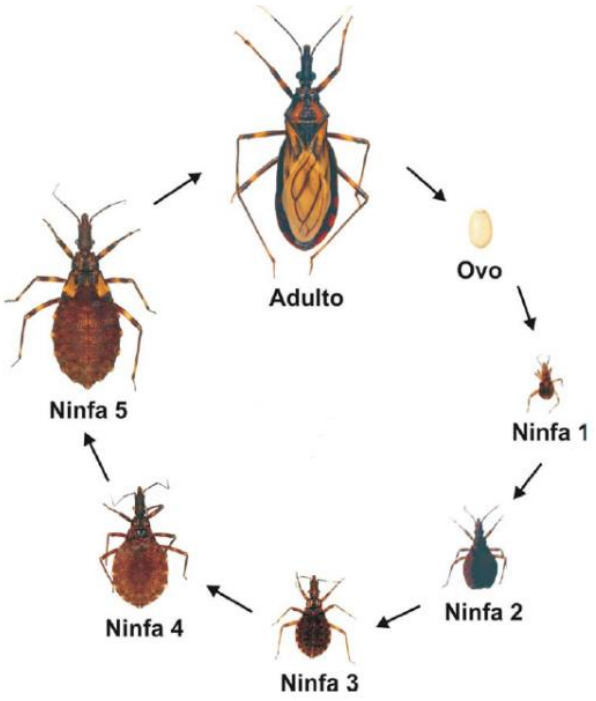


Figura 2. Ciclo de vida de triatomíneos. Fonte: Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. FIOCRUZ – Instituto Oswaldo Cruz, 2008.

O Rhodnius neglectus, um vetor secundário da DC, pode ser encontrado em diferentes estados do Brasil, como Bahia, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Paraná, São Paulo, Tocantins e no Distrito Federal. Seu habitat é silvestre, ou seja, facilmente encontrado em palmeiras e ninhos, porém se adaptam também em ambientes domésticos. Tem entre 17,5 e 20,5 mm de tamanho e possui coloração marrom escura, cabeça mais longa que o pronoto (primeiro seguimento torácico dorsal) e pernas sem manchas (Figura 3) (JURBERG et al., 2015).

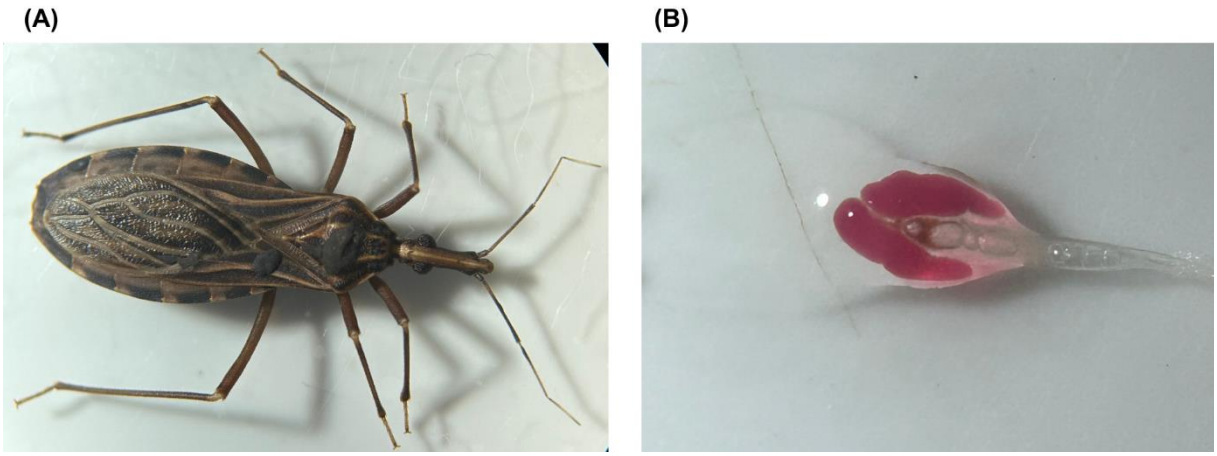


Figura 3. *Rhodnius neglectus*. **(A)** Triatomíneo **(B)** Glândula salivar. Acervo pessoal.

1.4. A SALIVA DOS TRIATOMÍNEOS

A picada do triatomíneo causa danos no tecido do hospedeiro que ativam os mecanismos para manter a hemostasia. O colágeno exposto faz com que as plaquetas se agreguem na parede do vaso, além de desencadear a vasoconstrição, que estreita os vasos sanguíneos, retardando o fluxo sanguíneo. A resposta endotelial também direciona as células inflamatórias para o local, como os mastócitos que liberam histamina (FRANCISCHETTI, 2010; RIBEIRO; WALKER, 1994). As moléculas secretadas na saliva dos triatomíneos modulam as defesas do hospedeiro realizando atividades anti-hemostáticas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras na interface vetor-hospedeiro. Elas são categorizadas com base no seu mecanismo de ação na vasodilatação/vasoconstrição, agregação plaquetária, coagulação sanguínea, respostas imunes, entre outros.

Os sialomas (conjunto de transcritos e proteínas presentes nas glândulas salivares) de algumas espécies de triatomíneos já foram descritos e têm aberto o campo de investigação para a seleção e o estudo de peptídeos e proteínas salivares e de suas funções (SANTIAGO et al., 2020). Alguns exemplos de proteínas salivares em triatomíneos são as lipocalinas, triabinas, apirases, antígeno 5, proteases e inibidores de proteases. As apirases são enzimas que catalisam a hidrólise de ATP (adenosina trifosfato) e ADP (adenosina difosfato) em AMP (adenosina monofosfato). O ADP é um agonista da inflamação e da agregação plaquetária e o ATP atua na ativação de neutrófilos (ASSUMPÇÃO et al., 2011). Os inibidores de serino proteases geralmente as inibem de forma irreversível. Eles pertencem a várias superfamílias, como do tipo Kazal e Kunitz, entre outras, e devem atuar como anticoagulantes (PATEL, 2017).

No gênero *Rhodnius,* a saliva apresenta coloração avermelhada (cereja) devido a presença de nitroforinas, hemeproteínas pertencentes à família das lipocalinas. Essas moléculas podem induzir a vasodilatação local pelo fato de serem carreadoras de óxido nítrico, além de outras propriedades adicionais. O óxido nítrico é muito reativo e instável, capaz de atravessar membranas e causar relaxamento do músculo liso vascular. Sua produção nas glândulas é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase, que utiliza L-arginina e oxigênio molecular como substratos. As nitroforinas se ligam ao óxido nítrico em pH baixo e o liberam quando o pH aumenta, como acontece quando a saliva é secretada no vertebrado, no pH aproximado de 7,4 (PAIM et al., 2017). Também previnem a inflamação sequestrando histamina liberada pelos mastócitos (RIBEIRO; WALKER, 1994). Dessa maneira, diminuem o tempo de contato do inseto com o hospedeiro vertebrado e melhoram o repasto sanguíneo. Uma lista detalhada das proteínas salivares de triatomíneos foi revisada por Santiago e colegas (SANTIAGO et al., 2020).

1.5. PROTEASES SEMELHANTES A TRIPSINA

As peptidases (proteases) são proteínas cataliticamente ativas, ou seja, enzimas. Elas quebram ligações peptídicas em proteínas/peptídeos por hidrólise, para que os aminoácidos possam ser reciclados e usados em outros processos, mas também para modificar proteínas. Existem nove tipos de proteases (serina, cisteína, treonina, aspártico, glutâmico, metalo proteases, asparagina, liase e mista), as quais

são classificadas por similaridades de sequência em aproximadamente 250 famílias e ainda em 60 grupos considerando as estruturas terciárias (RAWLINGS; BARRETT, 2014).

As serino proteases são um grupo numeroso ramificado em diversos tipos, as principais são do tipo tripsina, quimiotripsina, subtilisina, elastases, calicreína e catepsina (PATEL, 2017). A calicreína é responsável pela regulação da pressão arterial e ativação da inflamação, clivando os cininogênios e liberando cininas como a bradicinina e a calidina, esta última um decapeptídeo homólogo da bradicinina, estimulante do músculo liso e agente hipotensor que atua por meio da vasodilatação (KALINSKA et al., 2016). Apresentam um grupo hidroxila o qual favorece com que sejam mais ativas em valores de pH neutro ou ligeiramente alcalinos e normalmente não requerem cofatores para a atividade. Essas características as adequam para funções extracelulares (RAWLINGS; BARRETT, 2014). As serino proteases têm sido descritas em diferentes tecidos e com diversas funções nos organismos, por exemplo na reprodução e digestão (SANTIAGO et al., 2017).

A tripsina cliva ligações peptídicas após resíduos de aminoácidos de lisina ou arginina (PATEL, 2017), e atua na digestão de proteínas no intestino de animais vertebrados, bem como atua na coagulação sanguínea. Vários fatores atuam em uma “cascata” na qual cada enzima ativa a próxima proenzima por proteólise limitada, até que eventualmente a trombina seja formada. A trombina medeia um último passo de proteólise limitada para converter o fibrinogênio em fibrina que forma o coágulo. Assim, como cada enzima na cascata age como catalizador, pode gerar várias moléculas da próxima enzima ativa, logo amplificar o estímulo inicial para a coagulação (RAWLINGS; BARRETT, 2014).

Tem sido sugerido que proteases semelhantes à tripsina da saliva de triatomíneos podem desempenhar papéis específicos, processando substratos específicos, neutralizando os processos hemostáticos do hospedeiro para permitir o sucesso da alimentação sanguínea (SANTIAGO et al., 2016; SANTOS et al., 2007). A triapsina, uma protease semelhante a tripsina na saliva de *Triatoma infestans,* é responsável pela atividade de hidrólise de receptores ativados por proteases (peptídeos RAPs) e deve auxiliar a vasodilatação causada pela saliva do *T. infestans* observada durante a alimentação sanguínea desse inseto (SANTIAGO et al., 2016).

Os RAPs são uma subfamília de receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembrana e são ativados por serina proteases (KAWABATA;

KURODA, 2000; MACFARLANE et al., 2001; NYSTEDT et al., 1994; VU et al., 1991). Um ativador endógeno específico para RAP-1, RAP-3 e RAP-4 é a trombina, enquanto o RAP-2 é ativado pela tripsina, triptase e fatores de coagulação VIIa e Xa, mas não pela trombina (KAWABATA, 2002; KAWABATA; KURODA, 2000; MACFARLANE et al., 2001). Os RAPs, especialmente RAP-1 e RAP-2, são expressos em vários tecidos/células do corpo dos mamíferos e estão envolvidos em vários eventos biológicos (CENAC et al., 2002; COELHO et al., 2002; FIORUCCI et al., 2001; KAWABATA et al., 2001, 2006; KAWABATA; MATSUNAMI; SEKIGUCHI, 2008; SEKIGUCHI et al., 2006; SEKIGUCHI; TAKAOKA; KAWABATA, 2007; TANAKA et al., 2008). O RAP-2 desencadeia vasodilatação na maioria das artérias estudadas (KAWABATA, 2004; KAWABATA et al., 2004; MCGUIRE et al., 2002; WANG; HOLLENBERG; LOUTZENHISER, 2005). Além disso, o RAP-2 também está localizado nas células musculares lisas das artérias renais de camundongos e medeia a contração, podendo mediar respostas vasculares a diversos estímulos (MOFFATT; COCKS, 1998).

No sialoma de *R. neglectus* também foi descrita uma serino protease semelhante a tripsina (RnTryp), que é o objeto desse estudo (SANTIAGO et al., 2017).

1.6. JUSTIFICATIVA

É importante conhecer as funções das moléculas salivares de triatomíneos, vetores da DC, visto que são essenciais para permitir o repasto sanguíneo satisfatório dos vetores e consequentemente a transmissão do protozoário causador da doença. Caracterizar uma protease salivar poderá contribuir para entender seu papel junto aos outros componentes salivares do vetor e seu papel no hospedeiro, bem como o seu potencial como alvo visando o controle da DC, além do seu potencial biotecnológico.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo foi realizar a expressão de uma protease semelhante a tripsina da saliva de *R. neglectus* (RnTryp), vetor da doença de Chagas, e iniciar a sua caracterização funcional.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Expressar uma serino protease semelhante a tripsina recombinante (rRnTryp) em sistema heterólogo de expressão usando *Escherichia coli;*
2. Purificar a rRnTryp por meio de cromatografia de afinidade a íons metálicos;
3. Analisar a expressão da rRnTryp em gel SDS-PAGE e *western blot*;
4. Iniciar a caracterização funcional da rRnTryp por meio de testes de atividade.

3. METODOLOGIA

Todos os métodos presentes nesse estudo foram desenvolvidos no Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro (LIPH) do Instituto de Ciências Biológicas, *campus* Darcy Ribeiro, UnB. A estratégia experimental para a realização dos objetivos propostos está retratada no fluxograma abaixo (Figura 4).

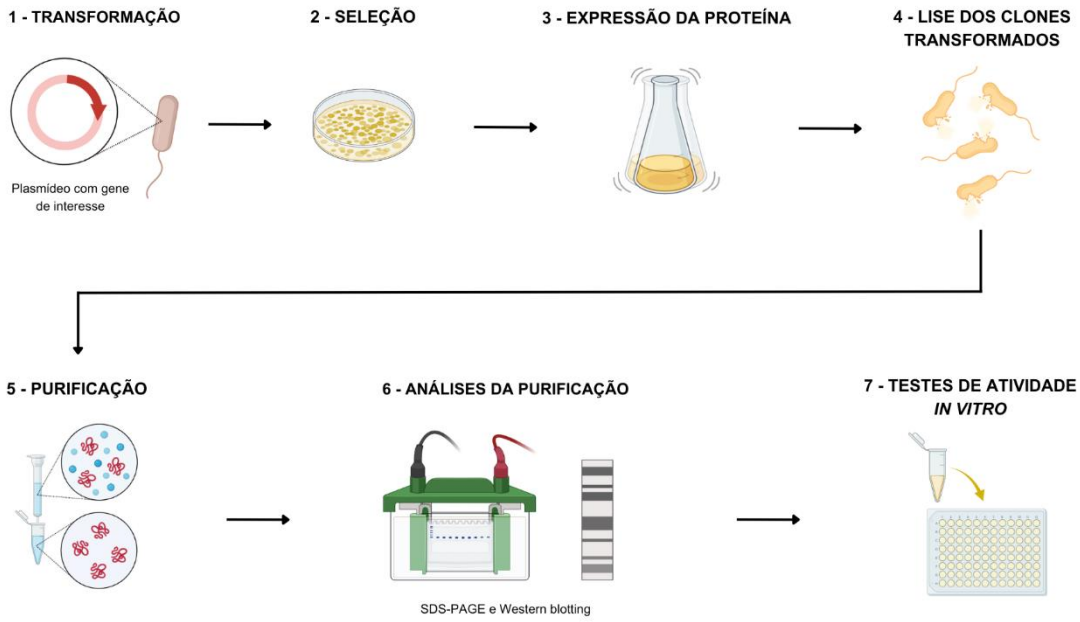


Figura 4. Representação esquemática da metodologia empregada na execução do estudo da serino protease semelhante a tripsina de *Rhodnius neglectus* (RnTryp). Feito com Biorender.com

3.1. TRANSFORMAÇÃO DE *Escherichia coli* E SELEÇÃO DE CLONES BACTERIANOS

As bactérias competentes *Escherichia coli* da linhagem BL21(DE3) (alíquota de 100 µL) foram transformadas com 2 µL (10 ng) do plasmídeo pET-100/D-TOPO contendo a sequência da serino protease semelhante à tripsina de *R. neglectus* (RnTryp; ID Uniprot: A0A0P4VQ38) por choque térmico, realizando uma incubação de 30 min no gelo seguida por 45 s em banho-maria à 42°C. Em seguida, os microtubos contendo as bactérias foram colocados no gelo por 2 min; 900 µL de meio LB (Luria Bertani) foram adicionados às bactérias e os tubos colocados em um *shaker* (Multitron Standard - INFORS HT) à 37°C, 225 rpm, durante 1 h. Após esse tempo, as bactérias foram plaqueadas em uma placa de Petri contendo 25 mL de meio LB ágar e

ampicilina (100 µL/mL). As placas foram incubadas em estufa à 37°C *overnight*. Cinco clones de transformantes foram selecionados para análise da expressão da RnTryp recombinante (rRnTryp) e estocados em glicerol (20%) a -80°C.

3.2. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE, OBTENÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL E INSOLÚVEL DAS BACTÉRIAS

Para avaliar a expressão da rRnTryp, um clone bacteriano transformado foi inoculado em três frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL) e incubados em um shaker (Multitron Standard - INFORS HT) a 37°C, sob agitação de 225 rpm até atingir as seguintes densidades ópticas (*optical density* = OD) em 600 nm: 0,2; 0,4; e 0,8. Depois, foram induzidos com IPTG (Isopropil-β-D1-tiogalactopiranosídeo estéril; concentração final 1 mM) por 3 horas, nas mesmas condições de temperatura e agitação. Ao término desse período, as células foram colhidas por centrifugação. Os sedimentos celulares foram ressuspensos em tampão *Binding Buffer* (BB = Tris 500 mM, pH 7,4; NaCl 25 mM) com benzonase e um coquetel de inibidores de protease 1x cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Mini (Roche), e lisados por sonicação, duas vezes por 30 segundos, em 20% de amplitude, a 4°C. O lisado foi clarificado por centrifugação a 16.000 x *g*, por 20 minutos a 4°C. A fração solúvel foi obtida a partir do sobrenadante, que foi transferido para microtubos Eppendorf. A fração insolúvel foi ressuspensa em tampão BB.

Após confirmar a expressão da rRnTryp, o clone foi inoculado em 500 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL). A cultura foi incubada a 37°C, a 225 rpm, até atingir OD_{600} entre 0,4 – 0,6. Em seguida, foi adicionado IPTG (concentração final: 1 mM). A cultura foi incubada por 3 horas, a 37°C e 225 rpm. Após o término da incubação, as células foram novamente colhidas por centrifugação e submetidas aos procedimentos descritos acima para obtenção da fração bacteriana solúvel, utilizada para purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade.

3.3. PURIFICAÇÃO EM COLUNA DE AFINIDADE AO NÍQUEL

A purificação da rRnTryp foi realizada por cromatografia de afinidade usando uma coluna com íons metálicos imobilizados carregada com resina Ni-Sepharose 6 fast Flow Trap (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Quinhentos

microlitros da resina foram depositados em uma coluna, lavados com 5 volumes de água milliQ com taxa de fluxo de 1,0 mL/min. A resina foi equilibrada com tampão de equilíbrio (fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM), à 0,4 mL/min. A amostra foi aplicada com a bomba desligada, e foi feita uma pausa de 15 minutos. Após esse tempo, a bomba foi ligada a 0,4 mL/min, e foi coletada a fração não ligada. Em seguida, a coluna foi lavada com tampões de mesma formulação do tampão de equilíbrio, com concentrações crescentes de imidazol (100 mM, 200 mM, 300 mM e 500 mM, para a primeira amostra). Duas a quatro frações de 500 μL de amostra foram coletadas para cada concentração de imidazol. Por fim, a resina foi lavada com água milliQ e armazenada a 4°C com 500 μL de etanol 20%. As frações eluídas foram analisadas em gel SDS-PAGE e *western blot*.

3.4. ANÁLISE EM GEL SDS-PAGE E *WESTERN BLOT*

Géis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Eletrophoresis*) na concentração de 12% (LAEMMLI, 1970) foram preparados para visualizar a presença da banda de peso molecular de aproximadamente 27,14 kDa da rRnTryp nas frações solúvel e insolúvel das bactérias e nas frações de purificação. Dois géis foram preparados em cada análise, um foi corado com solução corante contendo Coomassie (Coomassie Brilliant Blue 0,3%; Ácido acético 10%; Metanol 45%; Água 45%) por 30 min, e em seguida descorado com solução descorante (Metanol 45%; Ácido acético 10%; Água 45%) até visualização das bandas.

O outro gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (Amersham™ Protran®, GE Healthcare) utilizando sistema Trans-Blot® Turbo™ System (Bio-Rad). Antes da transferência, a membrana foi submersa por 15 min em tampão de transferência (Tris 25 mM, pH 8,3, Glicina 192 mM, Metanol 20%). Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau (Ponceau 0,1%, Ácido acético 5%) por 5 minutos para confirmação da transferência e visualização das bandas de proteínas. Em seguida, a membrana foi lavada com água destilada até completa remoção do Ponceau e bloqueada com Tris Buffered Saline (TBS = pH 7,5; Tris 50 mM; NaCl 150 mM) contendo 5% de leite desnatado por 1 h. A membrana foi incubada com o 1° anticorpo (Anti-HIS – Sigma Aldrich) diluído 1:2000 em TBS com 0,1% de Tween (TTBS) e 1% de leite desnatado, em temperatura ambiente, por 1 h, em agitação leve. Depois a membrana foi lavada quatro vezes com TTBS, sob leve

agitação e em seguida incubada com o 2° anticorpo (*Goat Anti-mouse*: GAM) diluído 1:100000 em TTBS com 1% de leite desnatado por 1 h e 30 min, em temperatura ambiente e agitação leve. Posteriormente, a membrana foi lavada sete vezes com TTBS em leve agitação. Após as lavagens, foi levada para revelar as bandas de proteínas imunorreativas com substrato quimioluminescente de peroxidase (ECL™ Prime Western Blotting System, GE Healthcare) no equipamento FUSION SOLO X – Chemiluminescence & Optional Fluorescence Imaging (Vilber).

3.5. TESTES DE ATIVIDADE *IN VITRO*

A atividade proteolítica da proteína recombinante foi avaliada *in vitro* com a utilização do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC (Sigma-Aldrich), um substrato para a serino protease calicreína plasmática. Z-Phe-Arg-AMC também atua como substrato para papaína, tripsina e catepsinas B, K, L e S. A atividade dessas proteases é quantificada pela liberação de 7-amino-4-metilcumarina (AMC) fluorescente livre que excita em 360-380 nm e emite em 440-460 nm.

As reações foram iniciadas diluindo-se a proteína recombinante em 100 mM de Tris-HCl (pH 7,5), com ausência de inibidores de proteases. Em seguida, substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC foi adicionado para uma concentração final de 20 µM em um volume final de 100 µL. A intensidade da fluorescência foi medida a cada 5 min durante 30 min por espectrofluorometria (SpectraMax, Molecular Devices, CA) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 380 e 460 nm. Para obtenção do branco, o substrato foi diluído nos tampões de reação. Esse valor foi automaticamente descontado pelo *software* do fluorômetro no momento da aquisição dos dados.

4. RESULTADOS

4.1. EXPRESSÃO DA SERINO PROTEASE SEMELHANTE A TRIPSINA RECOMBINANTE DE *R. neglectus*

A rRnTryp foi expressa pelo clone de *E. coli* BL21(DE3) transformado após indução da cultura em diferentes densidades ópticas. A banda de massa molecular correspondente (27,14 kDa) ao esperado para a proteína recombinante pode ser observada tanto nas frações solúveis quanto nas insolúveis das bactérias, *no western blot* (Figura 5). Embora a separação eletroforética da rRnTryp mostrou apenas uma banda nítida corada pelo azul de Coomassie em SDS-PAGE na altura esperada, por *western blot*, a rRnTryp desnaturada apareceu como duas bandas próximas de 27 kDa.

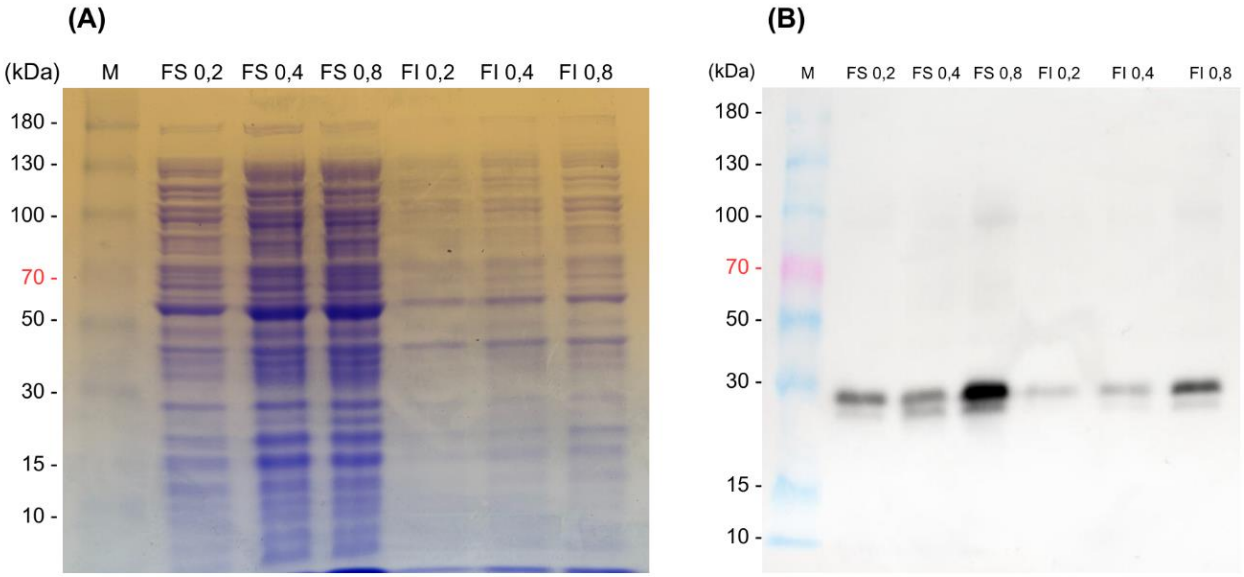


Figura 5. Análise eletroforética da serino protease semelhante a tripsina recombinante de *R. neglectus* (rRnTryp), na fração solúvel e insolúvel bacteriana após indução da expressão em diferentes densidades óticas (entre 0,2 e 0,8). A massa molecular da rRnTryp em SDS-PAGE é aproximadamente 27,14 kDa. (M) marcadores proteicos para massas moleculares. **(A)** Gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 12%), corado por azul de Coomassie. **(B)** *Western blot* (utilizando anticorpos anti-His; GAM).

4.2. PURIFICAÇÃO DA SERINO PROTEASE SEMELHANTE A TRIPSINA RECOMBINANTE DE *R. neglectus*

Quando a fração solúvel do transformante foi purificada por cromatografia de afinidade ao níquel, a rRnTryp foi eluída nas frações contendo entre 80 mM e 200 mM de imidazol (Figura 6).

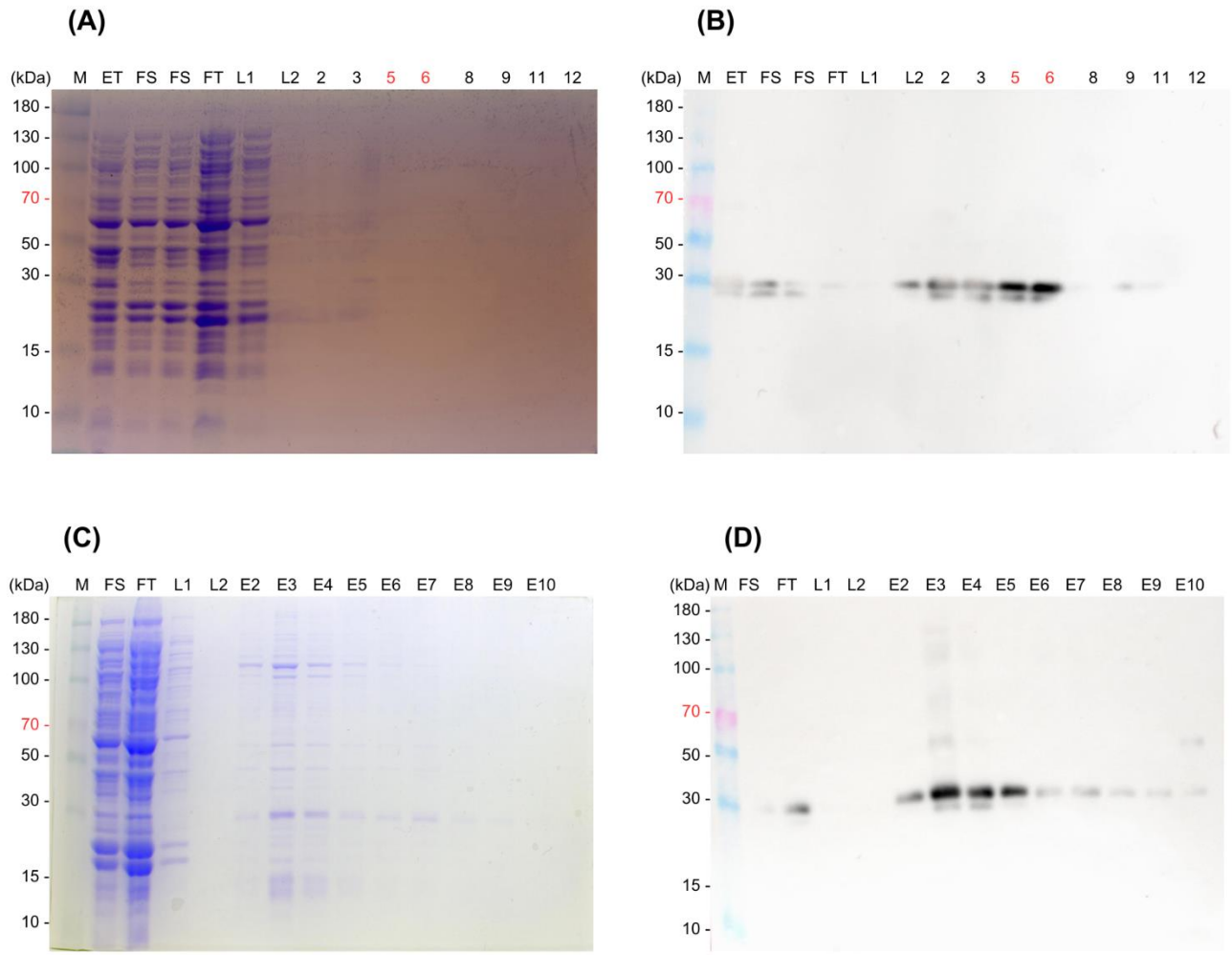


Figura 6. Purificação da rRnTryp por cromatografia de afinidade ao níquel. **(A)** A rRnTryp foi eluída em frações contendo entre 100 mM e 500 mM de imidazol. 100 mM (E2 – E3), 200 mM (E5 – E6), 300 mM de imidazol (E8 – E9) e 500 mM (E11 – E12). Gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 12%), corado por azul de Coomassie. **(B)** *Western blot* (utilizando anti-His; GAM). **(C)** A rRnTryp foi eluída em frações contendo entre 80 nM e 300 mM de imidazol. 80 mM (E2 – E4), 200 mM (E5 – E7) e 300 mM de imidazol (E8 – E10). Gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 12%), corado por azul de Coomassie. **(D)** *Western blot* (utilizando anti-His; GAM).

4.3. TESTES DE ATIVIDADE *IN VITRO*

A rRnTryp parcialmente purificada foi usada para investigar sua atividade sobre o substrato Z-Phe-Arg-AMC, um substrato fluorogênico para a serino protease calicreína plasmática, com o objetivo de investigar se a rRnTryp poderia ter um papel semelhante ao da calicreína na promoção da vasodilatação no hospedeiro durante a alimentação sanguínea do triatomíneo.

A rRnTryp não foi capaz de hidrolisar o substrato Z-Phe-Arg-AMC. Esse resultado indica que novos testes deverão ser realizados para investigar melhor o papel da RnTryp na alimentação sanguínea de *R. neglectus*.

5. DISCUSSÃO

O *R. neglectus,* assim como outros triatomíneos, possui uma variedade de moléculas em sua saliva para neutralizar as respostas hemostáticas do hospedeiro. Elas apresentam atividades antiplaquetárias, anticoagulantes, vasodilatadoras, entre outras, que ajudam na hematofagia e também na transmissão de patógenos (SANTIAGO et al., 2020). Entre essas proteínas, uma serino peptidase semelhante a tripsina foi descrita no sialoma do *R. neglectus* (SANTIAGO et al., 2017).

Em relação à capacidade de induzir vasodilatação, *Rhodnius prolixus* e o *Cimex lectularius* aproveitam as propriedades vasodilatadoras do óxido nítrico (ON). Esses insetos expressam e secretam na saliva um grupo de proteínas heme (nitroforinas) que armazenam e liberam ON nos vasos sanguíneos do hospedeiro durante a alimentação. Essas proteínas também são responsáveis, juntamente com outras famílias de proteínas, por diversas funções, como neutralizar histamina e inibir a coagulação sanguínea, entre outras (MONTFORT; WEICHSEL; ANDERSEN, 2000). Entretanto, as nitroforinas não estão presentes no gênero *Triatoma.* O *T. infestans* induz vasodilatação de maneira dependente do endotélio (RIBEIRO et al., 1993). A atividade da triapsina, uma serino protease semelhante a tripsina, presente na saliva dessa espécie de triatomíneo, é responsável pela atividade de modulação vasomotora, causando a vasodilatação (OLIVEIRA et al., 2021). Foi sugerido que proteases, semelhantes à tripsina, da saliva de outros hemípteros hematófagos podem processar substratos específicos, diferentemente das proteases digestivas típicas do tipo tripsina, neutralizando os processos hemostáticos do hospedeiro como uma adaptação evolutiva que permite o sucesso do comportamento de alimentação sanguínea (SANTIAGO et al., 2016; SANTOS et al., 2007).

Nesse trabalho, a sequência de uma serino protease semelhante a tripsina da saliva de *R. neglectus* foi clonada no vetor pET100/D-TOPO e expressa em bactérias *Escherichia coli* da linhagem BL21(DE3) tanto na fração solúvel quanto na fração insolúvel, sendo então purificadas parcialmente por cromatografia de afinidade a íons metálicos da fração solúvel bacteriana. As análises em SDS-PAGE e *western blot* mostraram bandas de proteínas na altura referente à massa molecular esperada (~27,14 kDa), mostrando que a bactéria foi capaz de produzir a protease recombinante.

As bactérias utilizadas nesse estudo carregam o gene clonado em um plasmídeo e multiplicam essa sequência de DNA em inúmeras cópias, além de traduzirem para a proteína de interesse. É um sistema simples, eficiente e importante na pesquisa básica. A intenção é que consiga produzir a proteína em grande quantidade sem ser tóxica para a bactéria, de forma solúvel e que também seja de fácil purificação. Porém, nem sempre as proteínas recombinantes são expressas de forma eficiente e solúveis (BANEYX, 1999).

A rRnTryp parcialmente purificada foi usada para investigar se poderia ter um papel semelhante ao da calicreína na promoção da vasodilatação no hospedeiro durante a alimentação sanguínea do triatomíneo. A calicreína é responsável pela regulação da pressão arterial e ativação da inflamação, clivando os cininogênios e liberando cininas como a bradicinina e a calidina, esta última um decapeptídeo homólogo da bradicinina, estimulante do músculo liso e agente hipotensor que atua por meio da vasodilatação. Os cininogênios são peptídeos pertencentes à superfamília das cistatinas. O cininogênio de alto peso molecular é fracionado pela calicreína plasmática para produzir a bradicinina. O cininogênio de baixo peso molecular é fracionado pela calicreína tecidual para produzir a calidina (KALINSKA et al., 2016). A rRnTryp não foi capaz de hidrolisar o substrato da calicreína e novos testes deverão ser realizados para investigar seu possível papel na alimentação sanguínea de *R. neglectus*.

Alguns fatores que podem ter interferido no resultado negativo da atividade são a conformação da proteína que pode ter sido comprometida, afetando sua funcionalidade; formação de agregados durante a expressão ou a purificação; as condições experimentais, como pH, temperatura, armazenamento, tempo de ação, bem como a concentração de proteína.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram a expressão recombinante de uma serino protease semelhante a tripsina da saliva do triatomíneo *R. neglectus* (rRnTryp) pela primeira vez, em sistema de expressão procarioto utilizando *E. coli* BL21(DE3), tanto na fração solúvel bacteriana quanto na insolúvel. A rRnTryp foi enriquecida por cromatografia de afinidade e poderá ser utilizada em testes de atividade para a caracterização de suas funções na hematofagia e nas interações entre o vetor e o hospedeiro vertebrado.

7. PERSPECTIVAS

1. Realizar a caracterização bioquímica e funcional da rRnTryp para investigar como ela pode contribuir para a hematofagia;

2. Produzir anticorpos contra a rRnTryp para realizar ensaios imunológicos visando identificar a proteína nativa na saliva de *R. neglectus* e suas interações com outras proteínas salivares, bem como se poderia haver reatividade cruzada com proteínas semelhantes na saliva de outras espécies de triatomíneos;

3. Investigar o potencial biotecnológico da rRnTryp por meio da caracterização funcional.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARCÓN DE NOYA, B. et al. Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas Disease at a School in Caracas, Venezuela. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 9, p. 1308–1315, maio 2010.

ASSUMPÇÃO, T. C. F. et al. Insight into the Salivary Transcriptome and Proteome of *Dipetalogaster maxima*. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 2, p. 669–679, 4 fev. 2011.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 411–421, 1 out. 1999.

BELINTANI, T. et al. Phylogenetic and phenotypic relationships of the Triatoma sordida subcomplex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Acta Tropica**, v. 212, p. 105679, dez. 2020.

CANCINO-FAURE, B. et al. Evidence of meaningful levels of Trypanosoma cruzi in platelet concentrates from seropositive blood donors. **Transfusion**, v. 55, n. 6, p. 1249–1255, 13 jun. 2015.

CENAC, N. et al. Induction of Intestinal Inflammation in Mouse by Activation of Proteinase-Activated Receptor-2. **The American Journal of Pathology**, v. 161, n. 5, p. 1903–1915, nov. 2002.

COELHO, A. et al. Proteinases and proteinase-activated receptor 2: A possible role to promote visceral hyperalgesia in rats. **Gastroenterology**, v. 122, n. 4, p. 1035–1047, abr. 2002.

FERREIRA, A. Z. L. et al. Metacyclogenesis as the Starting Point of Chagas Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 117, p. 1–21, 21 dez. 2024.

FIORUCCI, S. et al. Proteinase-activated receptor 2 is an anti-inflammatory signal for colonic lamina propria lymphocytes in a mouse model of colitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 13936–13941, 20 nov. 2001.

FRANCISCHETTI, I. M. B. Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1130–1144, dez. 2010.

HERWALDT, B. L. Laboratory-Acquired Parasitic Infections from Accidental Exposures. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 659–688, out. 2001.

HUPRIKAR, S. et al. Donor-Derived Trypanosoma cruzi Infection in Solid Organ Recipients in the United States, 2001–2011. **American Journal of Transplantation**, v. 13, n. 9, p. 2418–2425, set. 2013.

JURBERG, J. et al. **Atlas Iconográfico dos Triatomíneos do Brasil (Vetores da Doença de Chagas)**. Rio de Janeiro - RJ.

KALINSKA, M. et al. Kallikreins – The melting pot of activity and function. **Biochimie**, v. 122, p. 270–282, mar. 2016.

KAWABATA, A. et al. The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 11, p. 1443–1450, 1 jun. 2001.

KAWABATA, A. PAR-2: structure, function and relevance to human diseases of the gastric mucosa. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 4, n. 16, 13 jul. 2002.

KAWABATA, A. Distinct roles for protease-activated receptors 1 and 2 in vasomotor modulation in rat superior mesenteric artery. **Cardiovascular Research**, v. 61, n. 4, p. 683–692, 1 mar. 2004.

KAWABATA, A. et al. Receptor-activating peptides for PAR-1 and PAR-2 relax rat gastric artery via multiple mechanisms. **Life Sciences**, v. 75, n. 22, p. 2689–2702, out. 2004.

KAWABATA, A. et al. Suppression of pancreatitis-related allodynia/hyperalgesia by proteinase-activated receptor-2 in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 1, p. 54–60, 29 maio 2006.

KAWABATA, A.; KURODA, R. Protease-Activated Receptor (PAR), a Novel Family of G Protein-Coupled Seven Trans-membrane Domain Receptors: Activation Mechanisms and Physiological Roles. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 82, n. 3, p. 171–174, 2000.

KAWABATA, A.; MATSUNAMI, M.; SEKIGUCHI, F. Gastrointestinal roles for proteinase-activated receptors in health and disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. S1, 29 mar. 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.

LUQUETTI, A. O. et al. Congenital transmission of Trypanosoma cruzi in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 369–376, 14 mar. 2015.

MACFARLANE, S. R. et al. Proteinase-activated receptors. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 2, p. 245–82, jun. 2001.

MCGUIRE, J. J. et al. Multiple mechanisms of vascular smooth muscle relaxation by the activation of Proteinase-Activated Receptor 2 in mouse mesenteric arterioles. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 1, p. 155–169, 29 jan. 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doença de Chagas**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas>. Acesso em: 1 maio 2024.

MOFFATT, J. D.; COCKS, T. M. Endothelium-dependent and -independent responses to protease-activated receptor-2 (PAR-2) activation in mouse isolated renal arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, n. 4, p. 591–594, 3 out. 1998.

MONTFORT, W. R.; WEICHSEL, A.; ANDERSEN, J. F. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from Rhodnius prolixus and other blood-sucking arthropods. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1482, n. 1–2, p. 110–118, out. 2000.

NYSTEDT, S. et al. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 20, p. 9208–9212, 27 set. 1994.

OLIVEIRA, K. A. et al. Proteolytic activity of Triatoma infestans saliva associated with PAR-2 activation and vasodilation. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 27, 2021.

PAIM, R. M. M. et al. Functional aspects of salivary nitric oxide synthase of Rhodnius prolixus (Hemiptera, Reduviidae) and nitric oxide trafficking at the vector-host interface. **Scientific Reports**, v. 7, n. 16036, p. 1–13, 22 nov. 2017.

PATEL, S. A critical review on serine protease: Key immune manipulator and pathology mediator. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 45, n. 6, p. 579–591, nov. 2017.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Peptidases. Em: **Encyclopedia of Life Sciences**. [s.l.] Wiley, 2014.

RIBEIRO, J. M. C. et al. Reversible Binding of Nitric Oxide by a Salivary Heme Protein from a Bloodsucking Insect. **Science**, v. 260, n. 5107, p. 539–541, 23 abr. 1993.

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. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 6, p. 2251–2257, 1 dez. 1994.

SANTIAGO, P. B. et al. A Deep Insight into the Sialome of Rhodnius neglectus, a Vector of Chagas Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004581, 29 abr. 2016.

SANTIAGO, P. B. et al. Proteases of haematophagous arthropod vectors are involved in blood-feeding, yolk formation and immunity - a review. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 79, 13 dez. 2017.

SANTIAGO, P. B. et al. The Pharmacopea within Triatomine Salivary Glands. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 3, p. 250–265, mar. 2020.

SANTOS, A. et al. The sialotranscriptome of the blood-sucking bug Triatoma brasiliensis (Hemiptera, Triatominae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 7, p. 702–712, jul. 2007.

SEKIGUCHI, F. et al. Mechanisms for modulation of mouse gastrointestinal motility by proteinase-activated receptor (PAR)-1 and -2 in vitro. **Life Sciences**, v. 78, n. 9, p. 950–957, jan. 2006.

SEKIGUCHI, F.; TAKAOKA, K.; KAWABATA, A. Proteinase-activated receptors in the gastrointestinal system: a functional linkage to prostanoids. **Inflammopharmacology**, v. 15, n. 6, p. 246–251, 31 dez. 2007.

TANAKA, Y. et al. PAR2 triggers IL-8 release via MEK/ERK and PI3-kinase/Akt pathways in GI epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 377, n. 2, p. 622–626, dez. 2008.

VU, T.-K. H. et al. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. **Cell**, v. 64, n. 6, p. 1057–1068, mar. 1991.

WANG, X.; HOLLENBERG, M. D.; LOUTZENHISER, R. Redundant signaling mechanisms contribute to the vasodilatory response of the afferent arteriole to

proteinase-activated receptor-2. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 288, n. 1, p. F65–F75, jan. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Chagas Disease Day 2023 to focus on integrating universal care and surveillance at the primary care level**. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/14-04-2023-world-chagas-disease-day-2023-to-focus-on-integrating-universal-care-and-surveillance-at-the-primary-care-level>. Acesso em: 1 maio 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)>. Acesso em: 1 maio 2024.