

Caracterização in silico da sequência linear da proteína

fXa do Aedes Aegypti

In silico characterization of fXa protein linear sequence

from Aedes Aegypti

Caio Dias Machado

GRADUANDO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DO CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO JOSÉ – UNISJ; RIO DE JANEIRO – RJ

Dandara Rodrigues Leal

GRADUANDO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DO CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO JOSÉ – UNISJ; RIO DE JANEIRO – RJ

Gabriel Souza da Cruz Felissimo

GRADUANDO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DO CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO JOSÉ – UNISJ; RIO DE JANEIRO – RJ

Gabriel Washington Rodrigues Fernandes

GRADUANDO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DO CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO JOSÉ – UNISJ; RIO DE JANEIRO – RJ

Luã Cardoso de Oliveira

PROFESSOR DOUTOR DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS NO CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO JOSÉ – UNISJ; RIO DE JANEIRO - RJ

RESUMO

Os mosquitos de gênero *Aedes* são transmissores de doenças virais, chamadas de arboviroses, tais como a dengue, febre amarela urbana, chikungunya e zika. Tais doenças provocaram uma infestação, causando epidemias no estado do Rio de Janeiro onde em 2021 foram diagnosticados mais de 800 mil casos dessas doenças. O mosquito *Aedes aegypti* possui em sua saliva uma proteína chamada fXa, sendo esta, a responsável por atuar como anticoagulante nas peças bucais do inseto durante sua alimentação, mantendo o fluxo sanguíneo e evitando a coagulação. A descrição bioquímica desta proteína é importante para entender se no caso desta espécie de mosquito ocorre alguma modificação que favoreça a ação desta proteína. Para tanto foram utilizadas ferramentas de bioinformática para uma análise basal e bioquímica desta proteína, atrelado a uma revisão de sua ação. O Servidor ExPASy é um portal da Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) que consiste em um banco de servidores com um conjunto de informações moleculares de cadeias peptídicas (proteínas) além disso disponibiliza vários recursos científicos, bases de dados e ferramentas informáticas, em diferentes áreas científicas. Este trabalho utilizou uma abordagem *in silico* com auxílio de servidores presentes no portal ExPASy, para tal a sequência de aminoácidos de fXa foi coletado na base de dados proteico UniProt. Após essa coleta a sequência linear de aminoácidos foi confrontada com os servidores ProtoParam e o servidor Swiss-Model para a descrição de informações como índice-Gravy, porcentagem de aminoácidos, índice alifático, meia vida presuntiva da proteína *in vivo* e a sua modelagem tridimensional também presuntiva. Como próximos passos, o grupo deverá confrontar esses dados com proteínas homólogas em outros seres vivos, sendo assim a comparação bioquímica e funcional poderá ser realizada com mais precisão.

Palavras-Chave: proteína fXa, *Aedes aegypti* e coagulação sanguínea

ABSTRACT

Mosquitoes of the *Aedes* genus are transmitters of viral diseases, called arboviruses, such as dengue, urban yellow fever, chikungunya and zika. Such diseases caused an infestation, causing epidemics in the state of Rio de Janeiro where in 2021 more than 800 thousand cases of these diseases were diagnosed. The *Aedes aegypti* mosquito has a protein called fXa in its saliva, which is responsible for acting as an anticoagulant in the insect's mouthparts during feeding, maintaining blood flow and preventing clotting. The biochemical description of this protein is important to understand if, in the case of this mosquito species, there is any modification that favors the action of this protein. For that, bioinformatics tools were used for a basal and biochemical analysis of this protein, linked to a review of its action. The ExPASy Server is a portal of the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) consisting of a server bank with a set of molecular information on peptide chains (proteins). scientific. This work used an *in silico* approach with the help of servers present in the ExPASy pportal, for which the amino acid sequence of fXa was collected in the UniProt protein database. After this collection, the linear sequence of amino acids was confronted with the ProtoParam servers and the Swiss-Model server for the description of information such as Gravy-index, percentage of amino acids, aliphatic index, presumed half-life of the protein *in vivo* and its presumptive three-dimensional modeling. As next steps, the group will have to compare these data with homologous proteins in other living beings, so that the biochemical and functional comparison can be carried out with more precision.

fXa protein, *Aedes aegypti* and blood coagulation

INTRODUÇÃO

Os mosquitos de gênero *Aedes* (DIPTERA:CULICIDAE) podem ser transmissores de algumas doenças virais, chamadas de arboviroses, tais como a dengue, febre amarela urbana, chikungunya e zika (Beeb et al., 2010). Os mosquitos são encontrados em todos os estados do Brasil, sendo a temperatura ambiente, em torno de 25-30°C considerada a temperatura ótima para o desenvolvimento da sua larva, abaixo ou acima destas temperaturas, o *Aedes* diminui sua atividade, podendo abaixo de 5°C ou acima de 42°C o desenvolvimento ser impossibilitado (Prefeitura de Porto Alegre., 2023). A temperatura, junto com outros fatores interfere no desenvolvimento e na reprodução do mosquito, e consequentemente os casos podem reduzir ou por conta desses fatores. Dentre esses fatores destacam-se quantidade de água disponível, umidade do ambiente e as proteínas dos mosquitos, este último fator preponderante para o desenvolvimento que, inclusive remete a evolução da espécie (Nowak et al., 2018). Desta forma, o período do ano com maior transmissão ocorre nos meses mais chuvosos. O acúmulo de água parada contribui para a proliferação do mosquito e, assim, para a maior disseminação da doença.

Tais doenças provocaram uma infestação, causando epidemias no estado do Rio de Janeiro e também no Nordeste no ano de 1986 e os dados de infestação principalmente de dengue só cresceram. Apenas no ano de 2003, foram notificados mais de 450 mil casos de dengue nas Américas. Sendo mais da metade dos casos provenientes do continente Sul americano, onde se concentram 80% dos casos de dengue hemorrágica. E no ano anterior foram detectados 800 mil casos apenas no Brasil (Valle et al., 2007).

Desde o início dos anos 70, a Organização Mundial da Saúde (OMS) está envolvida, de maneira bastante ativa, no desenvolvimento e na promoção de estratégias de tratamento e controle da dengue, uma das doenças mais destacadas transmitidas pelos mosquitos de gênero *Aedes*. Com a Fundação Rockefeller, na primeira metade do século XX, foram realizadas intensas campanhas nas Américas. Entre os anos de 1923 e 1940, essa Fundação atuou contra a febre amarela nas cidades litorâneas do Nordeste, assim como em outros países (Valle et al., 2007).

No continente americano grandes medidas foram tomadas em parceria com a OMS, como o Programa de Erradicação do *Aedes aegypti* no Hemisfério Oeste. O Brasil também teve participação nesse programa em 1955, e no ano seguinte foi fundado o Departamento Nacional de Endemias Rurais (DENERu). Em abril de 1990, também foi criada a Fundação Nacional de Saúde (Funasa) tal organização ficou responsável pela coordenação das ações de controle da dengue. No Brasil, juntamente com outros países, como Austrália está ocorrendo o projeto denominado “Método Wolbachia: uma estratégia poderosa para o controle de arboviroses”. Com este projeto estuda-se a liberação de mosquitos *Aedes aegypti* juntamente com a bactéria Wolbachia, que previne que os vírus da zika, dengue e chikungunya se desenvolvam neste mosquito, o que pode ajudar na redução da transmissão dessas arboviroses. 60% dos insetos têm a bactéria contudo não pode ser encontrada naturalmente nos *Aedes aegypti* (MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2021).

O mosquito *Aedes aegypti* possui em sua saliva uma proteína chamada fXa, sendo a fXa (*factor Xa-directed*) responsável por atuar como anticoagulante nas peças bucais do inseto durante sua alimentação, mantendo o fluxo sanguíneo e evitando a coagulação. Sendo assim, a inibição dessa proteína poderia, em teoria, acarretar dificuldades para o mosquito se alimentar, uma vez que sem ter essa molécula anticoagulante, os fatores de coagulação poderiam agir de forma mais rápida, desfavorecendo a ação do *Aeds* (Stark et al., 1995; Termignoni et al., 2003).

Dada a importância dessas arboviroses para a saúde pública, se faz importante o estudo em todas as frentes, inclusive na pesquisa básica, em que se submete a estudo determinadas proteínas, enzimas e outras moléculas com ações específicas tanto nos vírus quanto no próprio mosquito se fazem necessárias, objetivo desse trabalho.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para detecção e busca das sequências de fXa foi utilizado o servidor Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), sob a palavra-chave “fXa AND Aeds aegypti”.

Após a seleção da sequência, esta foi submetida ao servidor ExPASy, que é um portal da Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) (<http://www.isb-sib.ch/>). Esse banco de dados possibilita o acesso a todo um conjunto de informações moleculares de proteínas além do que disponibiliza vários recursos científicos, bases de dados e ferramentas informáticas, em diferentes áreas científicas. Esta sequência também foi submetida ao servidor Swiss-Model, para presunção da sequência tridimensional dessa proteína.

RESULTADOS

Abaixo, na figura 1, demonstramos a sequência completa de aminoácidos da proteína coletada no uniprot, sob o número de acesso O76292_AEDAE:

<u>10</u> MYLKIVILVT	<u>20</u> FPLVCFTQDD	<u>30</u> TPLSKPMAID	<u>40</u> YQAEFAWDLY	<u>50</u> KKLQLGFTQN	<u>60</u> LAIAPYSLRK
<u>70</u> IFVCLQQLTV	<u>80</u> STNPASAALS	<u>90</u> EQLKMYLRFN	<u>100</u> PKGKLPDLVR	<u>110</u> RRYSSQRAML	<u>120</u> ERENSFNTTT
<u>130</u> LAAVIGREKK	<u>140</u> TNSFWDL PNS	<u>150</u> CAIFVGS LRP	<u>160</u> GSPKQMSRRF	<u>170</u> NAAMRNISKS	<u>180</u> GMQNFLSTSD
<u>190</u> IDRDLDFLIA	<u>200</u> DSWIFKGLWS	<u>210</u> YQFEEQH TTT	<u>220</u> CNFYTNSTSK	<u>230</u> GLMRFMYLQE	<u>240</u> YLKYG YFSEW
<u>250</u> NVEAVELPLH	<u>260</u> HGSSFSCMLM	<u>270</u> MPVKADIGVL	<u>280</u> IKSLNHRRFK	<u>290</u> DIYSKMSFSK	<u>300</u> TDVRLPQFTL
<u>310</u> RIKFSAKSIL	<u>320</u> QQFGFNAAFN	<u>330</u> ESVFHVFDNK	<u>340</u> NAVPLGDVIQ	<u>350</u> KVKLVM DHDG	<u>360</u> EQSAKMYVDR
<u>370</u> RMGNLFIAHQ	<u>380</u> PFIFVIFEKT	<u>390</u> QLVPIIVGHM	<u>400</u> VTASTPKDIG	<u>410</u> PESDEISCDR	<u>410</u> PPRYQ

Figura 1: Sequência linear de aminoácidos da proteína fXa de *Aeds Aegypti* sob o número de acesso O76292_AEDAE.

Pelo Servidor ExPasy foi submetida a sequência para a coleta das informações de primárias da proteína, conforme descrito abaixo:

Números de Aminoácidos: 415

Peso molecular: 47771.30

PI teórico: 9.29

Composição de Aminoácidos:

Ala (A)	24	5.8%
Arg (R)	22	5.3%
Asn (N)	19	4.6%
Asp (D)	22	5.3%
Cys (C)	6	1.4%
Gln (Q)	21	5.1%
Glu (E)	16	3.9%
Gly (G)	17	4.1%
His (H)	8	1.9%
Ile (I)	24	5.8%
Leu (L)	39	9.4%
Lys (K)	28	6.7%
Met (M)	17	4.1%
Phe (F)	31	7.5%
Pro (P)	20	4.8%
Ser (S)	36	8.7%
Thr (T)	21	5.1%
Trp (W)	5	1.2%
Tyr (Y)	15	3.6%
Val (V)	24	5.8%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

Composição atômica:

Carbon	C	2165
Hydrogen	H	3356
Nitrogen	N	570
Oxygen	O	604
Sulfur	S	23

Fórmula: C₂₁₆₅H₃₃₅₆N₅₇₀O₆₀₄S₂₃

Número total de átomos: 6718



Meia Vida estimada

O terminal N d sequência considerada é M encontrado (Met).

A meia Vida estimada é de 30 horas (reticulócitos de mamíferos, in vitro, 20 horas (levedura, in vivo). 10 horas (Escherichia coli, in vivo).

Índice de instabilidade

O índice de instabilidade (II) é calculado em 40,40

Isso classifica a proteína como instável.

Grande média de hidrocência (GRAVY): -0.190

Pelo Serviodor Swiss-Model, foi realizada a modelagem tridimensional da proteína, conforme demonstrado na figura 2.



Figura 2: Modelagem tridimensional da proteína fXa em que cada cor representa uma sequência terciária ou quaternária de aminoácidos, formando folhas alfa, cores laranja, amarelo e vermelha e folhas beta, cores azuis (todos os tons) e verde (todos os tons)

DISCUSSÃO

A pesquisa básica que descreve uma proteína, ou uma molécula singular é de extrema importância, pois pode ser o ponto de partida para um novo tratamento, ou uma nova profilaxia. Portanto estudos como o nosso se fazem necessários para o melhor entendimento dos agentes infecciosos e suas características moleculares.

Tendo essa perspectiva, descrevemos as informações mais básicas sobre a proteína fXa, que funciona como anticoagulante na picada de mosquitos *Aedes aegypti*, essa ação pode ser preponderante para o sucesso na entrada dos vírus arbovírus nessas picadas, pois o sangue sem coagular, inibe a linha primária de defesa que é a constituição da pele como barreira física e por consequência a coagulação do sangue em casos de trauma dessa barreira, que em condições normais aconteceria em torno de 5 a 15 minutos (Maji et al., 2018). Entender se esse processo, pode ser interrompido com essa substância anticoagulante pode ser determinante para, no futuro o desenvolvimento de um novo repelente para o mosquito, por exemplo.

Essa proteína demonstrou ter uma meia vida curta, em torno de 10-30 horas, porém é tempo suficiente para causar um distúrbio na coagulação a ponto do vírus entrar e ir ao local de infecção celular. Essa proteína demonstrou ter um ponto isoelétrico teórico de 9.29, em resumo o ponto isoelétrico dita o pH em que as proteínas estão com sua carga neutra. Contando que o pH do sangue é levemente básico (em torno de 7.4) (Boender et al., 2016), a entrada de uma proteína com pH muito mais básico, como é a fXa pode causar um distúrbio nessas interações.

Cabe ressaltar que o índice Gravy foi negativo, que demonstra a chance da proteína, in vivo, ser hidrofóbica (caso o seu número para este índice seja negativo). Sendo assim esta proteína provavelmente tem uma ação bem local no momento da picada, pois com as regiões hidrofóbicas expostas, a água presente no sangue, essas proteínas não teriam ação. Isto, junto com o índice de instabilidade reforça que provavelmente o mosquito produz uma quantidade muito grande desta proteína para ação local porque além de ter regiões que repelem água (hidrofóbicas) são instáveis e tem vida relativamente curta.

Reforçamos que trabalhos como esse precisam ser incentivados e produzidos é com esses entendimentos que podemos andar para novos produtos. Nessa linha, nosso grupo sugere que proteínas fXa de outros mosquitos sejam coletadas dos bancos de dados para que possa haver o efeito comparativo.

REFERÊNCIAS:

- Barata, Eudina AM de Freitas, Antônio Ismael P. da Costa, Francisco Chiaravalloti Neto, Carmen M. Glasser, José Maria S. Barata, e Delsio Natal. 2001. "População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil". *Revista de Saúde Pública* 35 (junho): 237–42. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102001000300004>.
- Boender, J., M. J. H. A. Kruip, e F. W. G. Leebeek. 2016. "A Diagnostic Approach to Mild Bleeding Disorders". *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 14 (8): 1507–16. <https://doi.org/10.1111/jth.13368>.
- Braga, Ima Aparecida, e Denise Valle. 2007. "*Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil". *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16 (2): 113–18. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742007000200006>.
- Ciprandi, Alessandra, Fabiana Horn, e Carlos Termignoni. 2003. "Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes". *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 25: 250–62. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842003000400012>.
- "Estudo confirma eficácia do Método Wolbachia para dengue". s.d. Fiocruz. Acedido a 23 de fevereiro de 2023. <https://portal.fiocruz.br/noticia/estudo-confirma-eficacia-do-metodo-wolbachia-para-dengue>.
- Jansen, Cassie C., e Nigel W. Beebe. 2010. "The Dengue Vector *Aedes Aegypti*: What Comes Next". *Microbes and Infection* 12 (4): 272–79. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.12.011>.
- Maji, Debnath, Maria De La Fuente, Erdem Kucukal, Ujjal D. S. Sekhon, Alvin H. Schmaier, Anirban Sen Gupta, Umut A. Gurkan, et al. 2018. "Assessment of Whole Blood Coagulation with a Microfluidic Dielectric Sensor". *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 16 (10): 2050–56. <https://doi.org/10.1111/jth.14244>.
- "O *Aedes aegypti* | Prefeitura de Porto Alegre". s.d. Acedido a 23 de fevereiro de 2023. <https://prefeitura.poa.br/sms/onde-esta-o-aedes/o-aedes-aegypti>.
- Ragonha, Flávio Henrique, e Rudiney Giovanne Nowak. 2018. "A EVOLUÇÃO E POTENCIALIZAÇÃO DO *Aedes aegypti* EM RELAÇÃO ÀS DOENÇAS NO BRASIL E NO ESTADO DO PARANÁ". *Arquivos do Mudi* 22 (1): 48–78. <https://doi.org/10.4025/arqmudi.v22i1.41521>.
- Stark, K. R., e A. A. James. 1995. "A Factor Xa-Directed Anticoagulant from the Salivary Glands of the Yellow Fever Mosquito *Aedes Aegypti*". *Experimental Parasitology* 81 (3): 321–31. <https://doi.org/10.1006/expr.1995.1123>.
- "SWISS-MODEL - SIB Swiss Institute of Bioinformatics | Expasy". s.d. Acedido a 23 de fevereiro de 2023. <https://www.expasy.org/resources/swiss-model>.
- "UniProt". s.d. Acedido a 23 de fevereiro de 2023. <https://www.uniprot.org/>.