

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de
Chagas

**EFEITO ANTIMICROBIANO E CITOLÍTICO DA
TRIALISINA RECOMBINANTE DA SALIVA DE *Triatoma*
*infestans***

PATRÍCIA SPOTO CORRÊA

Orientador: Prof. Dr. Antônio R. L.C. Teixeira

Co-orientadora: Dra. Marian D'Souza-Ault

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção de título de Doutor em Patologia Molecular.

Brasília

2002

Trabalho desenvolvido no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, com apoio financeiro do CNPq, Financiadora de Estudos e Projetos-FINEP.

DEDICATÓRIA

À Helder, meu querido esposo, pelo amor e estímulo nas horas boas e difíceis, que me ajudou a vencer mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais Paulo e Flávia que com amor e carinho me ensinaram a ser uma pessoa honesta e a nunca desistir dos meus objetivos

A minha querida avó Mary por ter estado sempre ao meu lado com suas orações e ao meu avô Flávio que apesar de não estar mais aqui entre nós tenho certeza que está orgulhoso de sua neta

Ao meu irmão Flávio pelo apoio e cumplicidade.

Aos meus familiares pelo carinho e palavras de estímulo.

À Deus meu Pai eterno a quem dedico toda minha existência

AGRADECIMENTOS

Ao professor Antônio Teixeira pelo apoio, orientação criteriosa, pela oportunidade de trabalho e por ter me ensinado que a ciência é algo fascinante.

A Marian D'Souza Ault por seus ensinamentos, co-orientação e pela sua amizade.

À pesquisadora Natália Florêncio Martins pela importante e carinhosa ajuda nas análises computacionais das sequências gênicas e modelagem molecular.

Aos Professores Silene Paulino Lozzi e Jaime Martins Santana pela sugestão, ajuda e crítica.

A Professora Liana Lauria Pires pelas palavras de estímulo e amizade

Ao Professor Berghman, pelo conhecimento transmitido.

À funcionária e aluna de pós-graduação Ana de Cássia pela prestimosa ajuda, principalmente na parte final deste trabalho.

A todos os colegas do LMPDC, Gilvânia, Glória, Carla, Daniela, Hellem, Cristina, Izabela, Davi, Erick, Patrícia Bello, Carolina, Mariana Machado, Mariana Campos, Tyara, Otávio, Edna, Jayme Pabba, Marco, Larissa, Bruno, Keila, Esther, Lorena, Kleber, Sócrates e em especial Nadjar, Rubens e Tereza, meu muito obrigado pela nossa convivência.

Pelos funcionários do LMPDC Geraldo, Adriana, Madalena, Miguel pelo apoio técnico e administrativo e em especial a Márcia pela amizade

Aos funcionários da Faculdade de Medicina Paulo Hipólito Bezerra Leite e Sr. José Tavares, sempre prestimosos.

Às amigas Gianne, Ângela Patrícia e Sarita pela amizade e palavras de carinho.

ÍNDICE

1. RESUMO	i
2. SUMMARY	iii
3. INTRODUÇÃO	1
3.1 Insetos hematófagos	1
3.2. Hematofagia e transmissão de patógenos	3
3.3. Hemiptera: Reduviidae	5
3.4. Adaptações Fisiológicas dos Insetos ao Hábito da Hematofagia	6
3.4.1. Vasodilatadores	7
3.4.2. Anestésicos	8
3.4.3. Anti-agregadores de plaquetas	9
3.4.4. Anticoagulantes	10
3.4.5. Fosfolipase A ₂	11
3.4.6 Hemolisinas	12
3.4.7. Peptídeos Antimicrobianos	13
3.4.7.1. Trialisina	17
3.5 Transmissão vetorial do <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
3.6. Repasto Sangüíneo	21
3.7. As Glândulas Salivares dos Triatomíneos	21
3.8. A Doença de Chagas	22
3.9. Tentativa de inibição do repasto do inseto hematófago	24
3.10. Expressão de Proteínas Recombinantes	26
4. TRABALHO PRÉVIO	27
5. PROPOSTA DE TRABALHO	27
6. OBJETIVOS	30

7. MATERIAL E MÉTODOS	32
7.1. Criação dos Triatomíneos	33
7.2. Obtenção de saliva	33
7.3. Extração de Tecido de <i>Triatoma infestans</i>	33
7.4. Construção da Biblioteca de cDNA	34
7.5. Seleção dos Clones	34
7.6. Northern blot	34
7.6.1. <i>Extração de RNA total</i>	34
7.6.2. <i>Análise de RNA por Eletroforese em Gel de Agarose</i>	35
7.6.3. Transferência do RNA para a Membrana	35
7.7. Extração de DNA Plasmidial	36
7.8. Extração de DNA Genômico	36
7.9. Análise de DNA por Eletroforese em Gel de Agarose	36
7.10. Análise de Restrição de DNA Plasmidial	37
7.11. Purificação de Fragmento de DNA	37
7.12. Southern Blot de DNA Genômico	37
7.13. Sondas Radiomarcadas	38
7.14. Purificação de sondas radiomarcadas	38
7.15. Hibridização	38
7.16. Sequenciamento de DNA	39
7.16.1. <i>Eletroforese do Gel de Sequenciamento</i>	39
7.17. Revelação de filmes Autorradiográfico	39
7.18. Ligação dos Fragmentos de DNA	40
7.19. Transformação de células de <i>E. coli</i>	40
7.20. Análise Computacional das Sequências Gênicas	40
7.21. Análise de Homologia em Banco de Dados	41
7.22. Modelagem Molecular	41
7.22.1. Obtenção dos modelos	42
7.22.2. <i>Construção dos modelos</i>	43
7.22.3. Validação do modelo	43
7.23. Expressão da Proteína Recombinante	43
7.24. Em sistema Baculovírus	43

7.24.1. Cultivo de Célula de Inseto	43
7.24.2. Construção do baculovírus recombinante	44
7.25. Em sistema procariótico	45
7.25.1. Construção dos vetores para expressão em <i>E. coli</i>	45
7.25.2. Expressão dos clones 1 e 30 em <i>E coli</i>	48
7.26. Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida	49
7.27. Imunização de coelhos e obtenção de anticorpos policlonais	50
7.28. <i>Western blot</i>	50
7.29. Imunocitocalização	51
7.30. Purificação da proteína recombinante	52
7.31. Ativação Proteolítica da Proteína recombinante	53
7.32. Caracterização funcional da proteína	53
7.32.1. Atividade Microbicida	53
7.32.1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	53
7.32.1.2. <i>Leishmania donovani</i>	54
7.32.2. Teste em Fibroblastos murino da Linhagem L6	54
7.32.3. Teste Fosfolipase A ₂	56
7.32.4. Teste Hemolítico	56
7.32.5. Teste Bacteriolítico	57
8. RESULTADOS	58
8.1. Varredura da biblioteca de cDNA da glândula salivar de <i>T. infestans</i>	58
8.2. Análises da Sequências Gênicas	58
8.3. Clone30	60
8.3.1. Clone 1	62
8.3.2. Clone 9	62
8.3.3. Clone 23	65
8.3.4. Clone 4	65
8.3.5. Clone 10	68
8.4. Análise de Homologia em Banco de Dados	70
8.5. Expressão Tecido Específico da Trialisina do <i>T. infestans</i>	74
8.6. Organização Genômica da Trialisina	75
8.7. Expressão da Trialisina em Baculovírus	76

8.8. Expressão Heteróloga do Clone 1 em Sistema Procariótico	77
8.9. Identificação e Imunocitocalização da Proteína Nativa	78
8.10. Expressão do Clone 30 em <i>E. coli</i>	80
8.11. Purificação da Proteína Recombinante	82
8.12. Ativação Enzimática da Proteína Recombinante	83
8.13. Caracterização Funcional da rTrialisina	85
8.13.1. Atividade Microbicida	85
8.13.2. Atividade Sobre Células L6 Infectadas por <i>T. cruzi</i>	87
8.13.3. Atividade Fosfolipásica A ₂	91
8.13.4. Atividade Bacteriolítica da rTrialisina	92
8.13.5. Atividade Hemolítica da rTrialisina	93
8.14. Estrutura Terciária da Trialisina	93
9. DISCUSSÃO	99
9.1. Análise das Seqüências Gênicas	99
9.3. Expressão e Purificação da Proteína Recombinante	102
9.4. Atividade Funcional da Trialisina	107
9.2. Modelagem Molecular	110
10. CONCLUSÕES	112
11. PERSPECTIVAS	114
12.REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	118
13. APÊNDICE	139

1-RESUMO

Insetos hematófagos têm grande interesse médico-biológico devido a transmissão de doenças endêmicas de alta prevalência, morbidade e mortalidade em populações humanas e de animais, em todos os continentes. Por exemplo, a doença de Chagas transmitida pelo triatomíneo *Triatoma infestans* está amplamente distribuída no continente americano, onde cerca de 18 milhões de pessoas já estariam infectadas com o *Trypanossoma cruzi*, o agente causal da doença.

Esses insetos produzem e armazenam proteínas farmacologicamente ativas em suas glândulas salivares, e as inoculam no hospedeiro durante o repasto. Ao inibir os mecanismos homeostáticos da sua presa, essas bioaminas facilitam o repasto do inseto e a transmissão do agente patógeno. O estudo de proteínas salivares com notável efeito farmacológico pode ser útil no estudo da filogenia e diversidade genética de insetos, mas elas também poderiam ser usadas como ferramentas para a caracterização dos processos hematológicos, vasculares, e teciduais relacionados às modificações que ocorrem no sítio da picada. Contudo, nós achamos que, igualmente importante, seria a produção de uma vacina contra a picada do inseto hematófago, criando imunoprofilaxia contra a transmissão do *T. cruzi*. A produção de vacina com proteínas recombinantes expressas na glândula salivar do triatomíneo é um objetivo em longo prazo no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas. O trabalho aqui apresentado faz parte dessa estratégia visando à identificação de genes e expressão de proteínas recombinantes com funções importantes no repasto do inseto.

Nós analisamos 20 clones oriundos de uma biblioteca de cDNA de glândula salivar de *T. infestans*. As seqüências gênicas desses clones mostraram similaridade, e não descartamos a possibilidade de se tratar de uma família multigênica. A proteína recombinante resultante da expressão do clone 30/LMPDC recebeu o nome de rTrialisina. Ainda que a seqüência do clone 30/LMPDC tenha 97% de similaridade com o gene da Trialisina (Amino

e cols., 2002), nós obtivemos a expressão da rTrialisina e descrevemos suas características funcionais ainda desconhecidas. Ademais, a modelagem molecular permitiu-nos conhecer parte da estrutura terciária da proteína e seu sítio ativo foi predito, o que também eram desconhecidos.

O cDNA completo do gene da Trialisina que codifica a pró-proteína foi inserido em um vetor de expressão de proteínas de fusão pGEX-5x-3. A proteína de fusão foi expressa sob a indução de IPTG em *E. coli* BL21(DE3) e purificada em cromatografia de afinidade com agarose ligada à glutationa. A proteína recombinante (rTrialisina) ativada pela saliva de *T. infestans* mostrou efeito citolítico sobre *E. coli*, *T. cruzi*, *L. donovani* e células murinas da linhagem L6. A atividade fosfolipásica A₂ da rTrialisina estaria relacionada com a sua atividade lítica formadora de poros. A rTrialisina foi expressa em *E. coli* e a proteína recombinante foi utilizada para a imunização de coelhos. Os anticorpos policlonais obtidos localizaram a expressão da proteína no primeiro par de glândulas salivares do inseto. De grande interesse, esses anticorpos inibiram parcialmente a atividade citolítica da rTrialisina *in vitro*.

Em resumo, os resultados desse trabalho adicionam informações e insumos para a avaliação da estratégia montada pela equipe de pesquisadores do LMPDC. Nós postulamos que juntamente com outras proteínas da saliva do triatomíneo, a rTrialisina deve ser testada como fração de imunógenos na formulação de vacina polivalente visando a imposição de dificuldades ao repasto do inseto hematófago transmissor da doença de Chagas. Uma possível atividade imunobiológica ou biotecnológica da rTrialisina deverá ser avaliada após sua expressão em vetor indicado para produção em larga escala. Diante desse potencial, a aplicabilidade da rTrialisina e de outras proteínas recombinantes produzidas no LMPDC deverão ser submetidos ao processo de patente.

2-SUMMARY

Blood-sucking insects have been studied for their bio-medical importance associated with the transmission of prevalent endemic diseases showing high morbidity and mortality all over the world. For example, Chagas disease transmitted by the reduviid bug (*Hemiptera: Reduviidae*) *T. infestans* is broadly distributed in the American Continent, where 18 million people became infected with *T. cruzi*, the causal agent of the disease

These insects store and secrete in their salivary gland pharmacologically active proteins, and insert these into the host during feeding. The host homeostatic inhibition mechanisms help insect feeding and the pathogen transfer. The study of salivary proteins study with notable pharmacological effect may be useful in understanding the genetic diversity and biogenetics of the insects, but it can be used as a tool for characterization of the hematological, vascular and tissue specific hematological processes. Therefore we see the importance of vaccine production against the hemathophagous insect bite, as prophylaxis against *T. cruzi* transmission. The vaccine production with recombinant protein expressed in the triatomine salivary gland is a future project in the LMPDC.

The work we have presented here is part of this strategy that intends to identify genes and express recombinant proteins with important functions for insect feeding.

We have analyzed 20 clones from the *T. infestans* salivary gland cDNA library. These clones sequences showed high similarity, and we don't discard the possibility of a multigene family. The recombinant protein that resulted from expression of the clone 30/LMPDC was named rTrialysin. The rTrialysin sequence showing 97% homology with Trialysin's gene (Amino et al., 2002) was further subjected to expression and the still unknown recombinant protein functional characterization was described. In addition, the molecular modeling helped to know part of the tertiary structure and the active site could be predicted.

The complete Trialysin cDNA that codes for a pre-protein was inserted into a fusion protein expression vector pGEX-5x-3. The fusion protein was expressed with IPTG induction in *E. coli* BL21(DE3) and purified by affinity chromatography with glutathione agarose. The recombinant protein processed by *T. infestans* saliva showed cytolytic effect against *E. coli*, *T. cruzi*, *L. donovani* and murine L6 cells. The rTrialysin phospholipase A₂ activity could be related to pore-forming activity of the rTrialysin. The rTrialysin was expressed in *E. coli* and the recombinant protein was used to immunize rabbits. The polyclonal antibodies recognized the native Trialysin in the first pair of salivary glands in the insect. These antibodies also inhibited partially the rTrialysin cytolyses *in vitro*.

In summary, the results of this work add information and evaluate the strategy set forth by the LMPDC staff researchers. We have planned that together with other proteins from the Triatomine salivary gland the rTrialysin should be tested with immunogenic fractions in the polyvalent vaccine preparation, creating difficulty for the haematophagous insect feeding vector of Chagas disease. Hence the immunobiological and biotechnological activities of the rTrialysin should be evaluated after expression on large scale. The rTrialysin and the other recombinant proteins expressed exclusively in the Triatomine salivary glands is promising for the future and therefore, its applicability needs Patent protection.

INTRODUÇÃO

3-INTRODUÇÃO

3.1) Insetos Hematófagos

Insetos hematófagos têm sido alvos de grandes interesses econômicos, sociais e biológicos, pois afetam as populações de animais silvestres, domésticos e ao próprio homem em todos os continentes. Além do dano causado aos hospedeiros, pelas lesões no local da picada e pelas reações alérgicas que desencadeiam, insetos hematófagos são vetores de agentes infecciosos.

Várias espécies de insetos hematófagos são vetores de agentes causadores de grandes endemias, tais como malária, leishmanioses, doença de Chagas, filarioses, dengue, etc. Ainda, esses insetos também são predadores de animais silvestres e domésticos, causando enormes perdas relacionadas com saúde e produção animal e seus derivados: leite, carne, etc. De fato, nas regiões tropicais cobertas por florestas úmidas, uma diversidade de espécies de insetos hematófagos causa danos à saúde humana e enorme dificuldade a colonização e ao uso da terra pelos seus habitantes.

Acredita-se que o hábito da hematofagia iniciou-se a partir de uma necessidade metabólica e bioquímica, onde a busca do elemento ferro ligado a proteínas do sangue (hemina) essencial para a oviposição, fertilidade e sobrevivência da espécie (Law, 2002 e Paschoa e cols., 2002). Esse fator decisivo pode ter sido incentivado por outros elementos nutricionais que o inseto encontra em ecótopos naturais de vertebrados que incentivou a associação entre vertebrados e insetos.

É conhecimento corrente que insetos alimentavam-se de excretas de animais contendo fungos, bactérias e sub-produtos orgânicos. Quantidade substancial de restos de pele, pêlos e plumas também serviam de fonte de energia para invertebrados. Assim, acredita-se que adaptações

comportamentais podem ter permitido ocasionalmente uma alimentação direta do inseto no hospedeiro animal (Lehane 1991a).

Desde épocas imemoriais tem sido constante a atração dos insetos por ecótopos naturais onde se observa, sintopicamente, colonização de ninhos e tocas do hospedeiro vertebrado por várias classes de insetos. Os elementos que favorecem essa rede trófica associando animais de várias ordens de invertebrados e vertebrados estão representados por: umidade, temperatura, e outros fatores climáticos que variam desde ambientes semi-áridos ou áridos, e abundância do alimento. Animais de diferentes Ordens: mamíferos, pássaros, anfíbios, répteis, peixes, insetos, aracnídeos e anelídeos (Hocking, 1971) podem servir como hospedeiros de insetos. Entretanto, insetos hematófagos não se alimentam com igual eficiência em todas essas fontes. Assim, insetos de diferentes gêneros ou espécies mostram comportamento diferenciado quanto à seleção da presa, surgindo daí as características de ornitofilia, antropofilia, sinantropofilia, etc.

Mosquitos da família Culicidae, do gênero *Culex* e *Aedes* e subfamília Culicinae, como do gênero *Anopheles* pertencente da subfamília Anophelinae são vetores de importantes doenças humanas como é o caso da filariose, dengue e malária, denotando clara antropofilia. O homem é o principal hospedeiro para a maioria desses mosquitos transmissores de doenças (Lehane, 1991b). Nessas famílias, somente as fêmeas alimentam-se de sangue e são as “vilãs” que transmitem os agentes das doenças citadas. Os machos adultos alimentam-se apenas em soluções açucaradas. Todavia, cada uma dessas famílias de insetos possui sua fonte alimentar preferencial: peixes, répteis, aves e mamíferos. Daí, a grande diversidade de espécies de insetos hematófagos nas diferentes áreas geográficas.

Ademais, cada espécie tem características diferentes em relação ao período em que se alimenta. *Anopheles gambiae* alimenta-se nas primeiras horas do dia; já o *Aedes aegypti* alimenta-se ao amanhecer e ao anoitecer. Em geral os anofelínos possuem hábitos alimentares noturnos, enquanto que os culicídeos possuem hábitos diurnos e noturnos.

Ainda que ao longo do texto sejam apresentadas informações sobre substâncias encontradas nas glândulas salivares pertencentes a classe

Insecta, nós não apresentaremos aqui informação adicional sobre ciclo de vida e outras características biológicas desses invertebrados. A esse respeito, as citações feitas em locais apropriados podem ser utilizadas para informação.

3.2) Hematofagia e Transmissão de Patógenos

Certamente redes tróficas foram condicionadas por longo processo de adaptação, típico para cada espécie de vetor invertebrado, mas foge ao nosso escopo discorrer sobre todos os fatores envolvidos (Teixeira e cols., 2001) nesse texto. Como dito, uma gama de atributos, tais como moradia segura e disponibilidade de alimento, teriam proporcionado as condições ótimas para a sobrevivência de insetos-vetores que praticam hematofagia. Em alguns casos o aparecimento sazonal de algumas dessas espécies, como ocorre com o *Aedes aegypti*, transmissor da dengue e da febre amarela, pode não ter sido condicionado por um único fator reconhecido por métodos aplicados na ciência prospectiva.

Na ausência de informação precisa, acredita-se que surtos epidêmicos de algumas doenças, tais como dengue e febre amarela, sejam regulados pela presença de hospedeiros susceptíveis. À medida que os hospedeiros tornam-se refratários, uma população que vivia isolada geograficamente em determinada época, tende a controlar a transmissão e isso pode levar ao desaparecimento da epidemia (Michel Foucauld, 1973). O desaparecimento repentino de um surto epidêmico gera, numa perspectiva histórica, a imagem de uma senóide onde os recrudescimentos dos casos aparecem nos pontos elevados da curva, muitos dos quais separados por cinco ou mais décadas (uma ou mais gerações de hospedeiro) dependendo dos agentes da endemia em foco. Ainda que haja tendência de creditar o desaparecimento de uma epidemia ao sucesso das campanhas de combate e ao uso de inseticidas nos dias atuais, há a possibilidade de que o mesmo tipo de perfil de desaparecimento e recrudescimento de endemias que se registrou no século passado e em várias outras ocasiões seja decorrente de fatores de

imunidade adquirida em condições naturais pelos indivíduos da população afetada.

De acordo com essa linha de raciocínio, o surto epidêmico da dengue em curso no Brasil também vai desaparecer espontaneamente, como todos os outros do passado. Ainda que os fatores associados com o recrudescimento e subsequente desaparecimento da endemia não tenham comprovação científica, existe uma lógica atrativa para a explicação desse fenômeno, mediante a possibilidade de aparecimento de uma imunidade específica adquirida coletivamente. Em favor dessa linha de raciocínio, citamos o tratado sociológico de Foucauld, (1966), onde o autor discorre sobre o tema da sazonalidade das endemias que grassaram em séculos passados, dizimando largos contingentes populacionais. Ao apresentar essas ideias com transparência impressionante, o “best seller” de Foucauld deveria ser considerado como literatura de cabeceira para os profissionais de saúde. De toda forma, o conhecimento que se adquiriu pela análise da história dessas grandes endemias levanta a possibilidade de intervenção científica eficaz à medida que se puder construir artificialmente aquilo que a natureza teria produzido mediante processo de imunidade coletivamente adquirida, subsequente à transmissão de agente infeccioso por inseto hematófago.

De certa forma, a ausência de informação tem sido um fator de imobilização de ações que poderiam levar à exploração das idéias expostas nos parágrafos acima. Aqui, nesse ponto da introdução, preferimos optar pela busca de elementos existentes na literatura científica que facilitam a compreensão da relação dos diversos elementos que participam da cadeia evolutiva dos insetos hematófagos transmissores de agentes infecciosos patogênicos.

3.3) Hemiptera: Reduviidae

A ordem Hemiptera pertence ao filo Artropoda, à classe Insecta e subclasse Pterygota (Exopterigota). A maioria dos insetos pertencentes à ordem Hemiptera são entomófagos ou “comedores de plantas”. Eles são divididos em três famílias: *Cimicidae*, *Reduviidae* e *Polyctenidae* (Lehane 1991c).

De interesse, a família *Reduviidae* é composta de insetos hematófagos, entre os quais encontram-se 155 espécies da subfamília *Triatominae* de grande interesse nosológico. Esses insetos alimentam-se do sangue de uma variedade de vertebrados pertencentes a várias classes de mamíferos, incluindo o homem. Ainda que os *Reduvidae* sejam encontrados em todos os continentes, a maioria dos insetos da subfamília *Triatominae* é encontrada no Continente Americano, onde já foram identificadas 102 espécies essencialmente hematófagas. As demais espécies foram encontradas no Sul e no Leste do Continente Asiático. (Lehane, 1991c).

Não é o escopo dessa tese a revisão completa do mapa geográfico das Américas mostrando todas as espécies de triatomíneos já conhecidas. Tampouco nos ocuparemos com as características de cada uma das espécies e seus hábitos alimentares que se associam com a presença dos insetos nos diferentes ecótopos, nos diversos ecossistemas Latino-Americanos. Nos ocuparemos aqui de apresentar informações diretamente relacionadas com as espécies de triatomíneos que se tem encontrado nos ciclos de transmissão do *T. cruzi* para o homem. Assim, nós restringiremos essa parte da introdução à revisão de algumas características daquelas espécies que assumem maior importância na transmissão do protozoário para o homem. A esse respeito, nos interessa sobretudo o *Triatoma infestans*, principal transmissor do agente da Doença de Chagas humana. Particularmente, o enfoque será dado ao *T. infestans* transmissor do *T. cruzi* em vários países da América do Sul, abrangendo extensa parte dos territórios da Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai, Peru e Uruguai.

O *T. infestans* pertence à subfamília *Triatominae*, (*Hemiptera: Reduviidae*) e gênero *Triatoma* que tem grande importância econômica e

social pelo agravo que representa para a saúde pública, como transmissor do *T. cruzi* (agente da Doença de Chagas). A maior atenção dada ao *T. infestans* é decorrente da domiciliação desses triatomíneos nas cafuas de pau-a-pique encontradas na área rural do continente. A domiciliação tornou essa espécie quase que exclusivamente antropofílica (Lehane, 1991c).

Ao contrário dos mosquitos, triatomíneos machos e fêmeas se alimentam de sangue e transmitem a infecção. Esses reduvídeos possuem hábitos noturnos, permanecendo escondidos durante o dia nas frestas das paredes sem reboco. À noite eles deixam os esconderijos e praticam o ato da predação: sua picada é quase indolor, podendo se alimentar na pele tenra e sensível da face de crianças e adultos (Lehane, 1991c). Essa preferência pela face da pessoa fez com que o triatomíneo seja conhecido popularmente como barbeiro ou chupão.

3.4) Adaptações Fisiológicas dos Insetos ao Hábito da Hematofagia

Insetos hematófagos sofreram significativas adaptações fisiológicas através de um processo evolutivo e desenvolveram componentes salivares com ações farmacológicas, que neutralizam mecanismos homeostáticos do hospedeiro facilitando a hematofagia. Agregação plaquetária, coagulação sanguínea e vasoconstrição são três mecanismos básicos da hemostasia quando ocorre a lesão através da picada do inseto (Law e cols., 1992 e Ribeiro, 1995). Segundo Ribeiro e cols., (1998) mamíferos são mais dependentes da hemostasia do que aves, havendo diferenças entre espécies de mamíferos em relação aos agonistas que influem na agregação plaquetária.

Trabalhos subseqüentes identificaram na saliva de triatomíneos várias substâncias farmacologicamente ativas com diversas funções anti-hemostáticas como vasodilatadores, anti-agregadores de plaquetas, anestésicos, anticoagulantes, fosfolipases, hemolisinas e agentes antimicrobianos.

3.4.1) Vasodilatadores.

O processo de vasodilatação é caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular e posterior liberação de histamina pelos mastócitos, causando perturbação microcirculatória e dilatação venular precedidas por lesão tecidual, cujo resultado final é uma resposta inflamatória.

Vasodilatadores presentes na secreção salivar de insetos hematófagos evitam a contração de fibras musculares da parede dos vasos, provocada pela liberação de várias substâncias originadas na lesão tecidual resultante da alimentação do inseto.

Vários fatores protéicos e não protéicos que atuam como vasodilatadores foram caracterizados em insetos hematófagos. Acredita-se que substâncias vasodilatadoras presentes na saliva desses vetores tenham um importante papel no aumento da infectividade pelo patógeno (Champagne, 1994).

Em carrapatos de diferentes gêneros foram descritas várias prostaglandinas (E_2 , $F_{2\alpha}$, I_2 , $PGF_{2\alpha}$). Essas substâncias são potentes vasodilatadores, de grande efeito na vascularização da pele. Mosquitos anofelinos secretam uma peroxidase com atividade NADPH-oxidase capaz de produzir H_2O_2 . Essa enzima nativa destrói serotonina e catecolaminas, substâncias vasoconstritoras que interferem na alimentação do inseto (Ribeiro, 1995).

Em 1998, Ribeiro e cols. identificaram atividade vasodilatadora na saliva de 27 espécies de barbeiros pertencentes a cinco diferentes gêneros, sendo mais forte nas espécies do gênero *Triatoma* da América do Norte (*T. protracta*, *T. lecticularia* e *T. picturata*). Uma das substâncias estudada foi o óxido nítrico (NO) que é capaz de interferir em vários processos fisiológicos apresentando-se como um potente vasodilatador. O óxido nítrico, por se tratar de um gás muito instável levou os insetos a encontrarem uma forma para estocar essa substância através da ligação a heme proteínas carreadoras de NO chamadas nitroforinas que são localizadas nas glândulas salivares de *R. prolixus* (Ribeiro e cols., 1993). A existência de atividade NO

sintase foi detectada nas glândulas salivares desse inseto (Ribeiro & Nussenzveig, 1993) e posteriormente a proteína recombinante foi expressa e caracterizada (Yuda e cols., 1996). A prolixina, previamente caracterizada como um anticoagulante, também mostrou ser uma hemeproteína carreadora de NO (Yuda e cols., 1997; Sun e cols., 1998a e Kaneko e cols., 1999).

Além do *R. prolixus*, *Cimex lectularius* (outro hemíptera), também usa NO como seu principal vasodilatador. Essa atividade foi inicialmente descrita por Valenzuela e cols., (1995) e posteriormente purificada e clonada (Valenzuela & Ribeiro, 1998).

Outras substâncias vasoativas foram descritas ao longo desses anos. Em *Culicoides variipennis*, vetor de viroses em animais (Perez de Leon e cols., 1997). Uma proteína formadora de eritema foi identificada por Cupp e cols., (1994) em *Simulium vittatum* e sua forma recombinante foi expressa e caracterizada (Cupp e cols., 1998). Sialoquinina I e II foram identificadas como sendo parte da família da taxicininas (Champagne & Ribeiro, 1994) e posteriormente o gene que codifica a sialoquinina I foi isolado e caracterizado (Beerntsen e cols., 1999)

3.4.2) Anestésicos

A habilidade de completar o repasto sem ser percebido pelo hospedeiro também é importante para o sucesso da alimentação dos hematófagos. A irritação produzida na pele do hospedeiro pode induzir reações físicas, resultando em lesão ou morte do inseto antes do término da sua alimentação. Existem observações de que substâncias anestésicas presentes na saliva do inseto poderiam bloquear a reação do hospedeiro à picada. Em 1996, Pereira e cols. detectaram a presença dessas substâncias na secreção salivar de *T. infestans* com atividade sobre o nervo ciático de ratos. Recentemente uma atividade inibitória em canais de sódio em nervo ciático de ratos também foi identificada por Dan e cols., (1999) onde se identificou uma diminuição do potencial de ação e da sensibilidade na região da picada do inseto.

3.4.3) Anti-agregadores de Plaquetas

A hemostasia normalmente é iniciada quando as plaquetas são expostas à matriz endotelial, onde se adere ao colágeno via receptor específico de superfície. Esta adesão é seguida pela ativação plaquetária que é acompanhada pela liberação de moléculas pré-agregatórias como tromboxano A₂ e ADP (Kroll & Sullivan, 1998).

Anti-agregadores de plaquetas são substâncias que reagem rapidamente à perda de sangue bloqueando o sangramento de pequenos vasos, mesmo na ausência de um sistema de coagulação (Law e cols., 1992). A agregação plaquetária pode ser antagonizada também por substâncias como as Prostaglandina E₂, prostaciclina e óxido nítrico (Ribeiro, 1995), que aumentam o nível dos nucleotídeos cíclicos nas plaquetas (AMP_c ou GMP_c).

Noeske-Jungblut e cols., (1994), identificaram na saliva de *Triatoma pallidipennis* a Palidipina um potente inibidor da agregação plaquetária induzida por colágeno. O recombinante foi expresso mostrando que a proteína é exportada pela glândula salivar (Haendler e cols., 1995)

Insetos hematófagos apresentam na saliva uma enzima que hidroliza ATP e ADP em AMP e fosfatos inorgânicos agindo como um anti-agregador de plaquetas. Essa atividade apirásica foi identificada em diferentes gêneros de carrapatos, moscas, mosquitos borrachudos, mosca tsé-tsé e barbeiros (Ribeiro, 1995).

Na saliva de *R. prolixus* uma proteína com atividade anti-agregadora de plaquetas da saliva foi purificada e caracterizada por Sarkis e cols., (1986), e fêmeas de *Simulium vittatum* apresentaram atividade semelhante (Cupp e cols., 1993). Nas glândulas salivares de *A. aegypti* uma proteína com atividade apirásica foi purificada, clonada e seqüenciada (Champagne e cols., 1995).

Na saliva de 24 espécies de triatomíneos encontrou-se atividade apirásica e os resultados confirmam grande variação em relação ao conteúdo salivar e a eficiência na alimentação nas diferentes espécies (Ribeiro e cols., 1998).

Uma atividade apirásica foi identificada na glândula salivar de *Cimex. lectularius* (Valenzuela. e cols., 1996) alguns anos depois a proteína foi purificada, clonada, seqüenciada e a proteína recombinante foi expressa (Valenzuela e cols., 1998). Em 1999 a apirase de *T. Infestans* foi caracterizada bioquímica e molecularmente por Lozzi, apresentando uma atividade indutora da agregação plaquetária induzida por ADP.

Um novo inibidor de agregação plaquetária foi purificado, clonado e a proteína recombinante foi expressa na saliva de *R. prolixus* envolvendo diminuição de ADP por se ligar ao nucleotídeo (Francischetti e cols., 2000). Já em (2001a), Valenzuela e cols. identificaram uma nova apirase na saliva de *Plebotomus. papatasi* que possui uma atividade Ca^{2+} dependente.

3.4.4) Anticoagulantes

Anticoagulantes são substâncias que previnem a formação de trombos nos vasos sanguíneos inibindo, entre outros, os fatores VIII, III, VII, Xa e trombina da cascata da coagulação sanguínea. A evolução possibilitou aos hematófagos mecanismos capazes de interferir na coagulação sanguínea. Nas últimas décadas identificou-se a presença de substâncias anticoagulantes no conteúdo salivar de mosquitos, mosca tsé-tsé, mosquito borrachudos e hemípteros (Stark & James, 1996). Em 1996, Capello e cols., identificaram na saliva da mosca tsé-tse (*Glossina morsitans morsitans*) um potente inibidor de trombina.

Em Mosquitos borrachudos do gênero *Simulium* identificaram-se substâncias anticoagulantes que inibem fatores da coagulação sanguínea, como trombina, fatores V, Xa (Cupp & Cupp, 1997). Recentemente, a trombostatina, um inibidor de trombina, foi purificada, clonada e expressa em células de inseto (Zang e cols., 2002). Mosquitos do gênero *Anopheles sp* e *Aedes sp* apresentaram, respectivamente, atividade antitrombina (Stark & James, 1996) e antifator Xa (Stark & James, 1995).

Em carrapatos, substâncias anticoagulantes são comuns em mais de 10 espécies (Bowman e cols., 1997a). A americanina foi isolada das

glândulas salivares do carrapato *Amblyomma americanum* e caracterizada como um específico inibidor de trombina (Zhu e cols., 1997a). Em 2002, Francischetti e cols. identificaram e expressaram a proteína recombinante de um inibidor de fator tecidual (TFPI) denominado ixolaris do carrapato *Ixodes scapularis*

Anticoagulantes em triatomíneos foram primeiramente estudados no gênero *R. prolixus* por Hellmann & Hawkins, (1964 e 1965). Uma dessas substâncias, a Prolixina-S, atua sobre o fator VII da coagulação. Em 1995a, Ribeiro e cols., purificaram e caracterizaram a Prolixina-S como uma das nitroforinas de *R. prolixus*. Em 1996, Sun e cols., clonaram o gene da prolixina e posteriormente o peptídeo recombinante foi obtido por Yuda e cols., (1997).

A triabina, um inibidor de trombina de *T. pallidipennis*, foi caracterizada, purificada, e seu recombinante expresso em 1995 por Noeske-Jungblut e cols. Uma atividade inibitória do fator V foi identificada na saliva dos triatomíneos *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans* (Ribeiro e cols., 1998). Feijó, (2001) caracterizou e expressou o gene da triatina, um inibidor de trombina da saliva de *T. infestans*

3.4.5) Fosfolipases

A família das fosfolipases A2 (PLA2) cataliza a hidrólise da ligação ester (sn-2) (Dennis, 1997 e Balsinde e cols., 1999) de fosfolipídeos liberando ácidos graxos livres (ác. araquidônico e ác. oléico) e lisofosfolipídeos. Essa enzima tem um importante papel no metabolismo lipídico e reparo de membrana, bem como formação de potentes mediadores de inflamação, tal como metabólitos do ácido araquidônico, incluindo prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTS) e fator de agregação plaquetária (PAF) (Devillier e cols., 1999).

Até o momento, no mínimo 19 tipos de enzimas com atividade fosfolipásica foram identificadas em mamíferos (Murakami & Kudo, 2002).

Essa família de enzimas divide-se em secretada, citoplasmática e cálcio independente. As sPLA₂ secretadas são em número de dez, as quais são de baixa massa molecular, dependentes de cálcio e desempenham importante papel no processo inflamatório (Oka & Arita, 1991), antibacteriano (Stephen e cols., 2002) e arterosclerótico (Tietge e cols., 2000).

A formas não secretada ou citoplasmática (cPLA₂), são importantes para a iniciação do metabolismo do ácido araquidônico e são fortemente reguladas por cálcio e fosforilação (Murakami & Kudo, 2002). As iPLA₂ podem desempenhar importante papel no remodelamento da membrana fosfolipídica (Balsinde e cols., 1995). O fato de essas enzimas serem independentes de cálcio em ensaios *in vitro* não impede que dentro da célula elas sejam também reguladas por cálcio ou fatores dependentes de cálcio segundo Atsumi e cols., (2000).

Além das funções já citadas, as fosfolipases A₂ secretadas (sPLA₂) são encontradas em venenos de cobras, abelhas e escorpiões, possuindo moléculas que, por quebrarem fosfolipídeos, possuem atividade anticoagulante (Mounier e cols., 1996), hemolítica e anti-agregadora de plaquetas (Chow e cols., 1998 e Diaz e cols., 2001). Dessa forma seria esperado que, na saliva de hematófagos, também houvesse a presença de substâncias semelhantes a fim de ajudar no processo da hematofagia. Até o momento são poucos os relatos obtidos dessa função.

Bowman e cols. (1997b) identificaram uma atividade de fosfolipase A₂ na saliva e glândula salivares do carrapato *Amblyomma americanum* (L). Recentemente Ribeiro & Francischetti, (2001) identificaram na saliva e glândulas salivares do mosquito *Culex quinquefasciatus* uma atividade fosfolipase C que hidroliza fator de agregação plaquetária (PAF).

3.4.6) Hemolisinas

É de se supor que para obtenção e digestão do alimento, invertebrados sugadores de sangue devem possuir um mecanismo de lise de

células vermelhas a fim de disponibilizar hemoglobina para o processo de digestão e obter seus nutrientes intracelulares.

Teoricamente os mecanismos de hemólise são muito variados, podendo ser causados por força mecânica, hipo-osmolaridade, agentes líticos e enzimas que degradam componentes da membrana de células vermelhas do sangue (Zhu e cols., 1997b).

Hemolisinas têm sido descritas no trato digestivo de vários artrópodes hematófagos, tais como moscas (Spates, 1981), no mosquito *A. aegypti* (L) (Geering, 1975) e triatomíneos (Azambuja e cols., 1983) e carrapatos (Ribeiro, 1988). Em 1997b, Zhu e cols., identificaram uma atividade hemolítica na saliva do carrapato estrela *A. americanum*.

3.4.7) Peptídeos Antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos são importantes componentes da resposta imune de organismos procarióticos e eucarióticos. Insetos utilizam-se desses fatores a fim de garantir sua proliferação e diversidade no meio em que vivem. Durante muitos anos esses peptídeos têm sido isolado de mais de um milhão de insetos (Bullet e cols., 1999).

A primeira linha de defesa do inseto é física, a cutícula, entretanto se essa barreira for quebrada as respostas imunes humoral e celular induzida na hemolinfa e nos tecidos são imediatamente ativadas. Ácidos graxos e algumas células sangüíneas são produzidos e acumulados na hemolinfa do inseto infectado a fim de impedir o desenvolvimento de microorganismos invasores (Bullet e cols., 1999).

Esses fatores promovem a ativação de cascatas proteolíticas induzindo a síntese de peptídeos antimicrobianos que são rapidamente liberados na hemolinfa (Hultmark, 1993; Boman, 1995; Hoffmann e cols., 1996). Em animais e plantas a resposta imune é dada por esses peptídeos contra bactéria e fungos (Boman, 1995; Ganz & Weiss, 1997; Broekaert e cols., 1995).

Os insetos respondem à invasão por bactérias através de substâncias bactericidas e bacteriostáticas (Barilas-Mury e cols., 2000). Inúmeras proteínas antibacterianas tem sido caracterizadas. A primeira delas foi a cecropina da *Hyalophora cecropia*, caracterizada por Steiner e cols., (1981), capaz de lisar e matar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Hultmark, 1993), possui também atividade contra fungos (DeLucca e cols., 1997), e parasitas, incluindo *Plasmodium* (Gwadz e cols., 1989; Boisbouvier e cols., 1998 e Possani e cols., 1998).

Cecropinas são peptídeos pequenos de aproximadamente 4 KDa contendo de 35-39 aminoácidos, que são carregadas positivamente no seu N-terminal e possuem uma região rica em peptídeos hidrofóbicos no C-terminal. O principal interesse com relação a esse peptídeo é o seu efeito contra agentes patogênicos principalmente causadores da malária e tripanossomíases. Recentemente as cecropinas foram isoladas também de mosquitos *A. Albopictus* (Sun e cols., 1998b) e *A. aegypti* (Lowenberger e cols., 1995,1999). Um peptídeo sintético foi produzido a fim de caracterizar a atividade da proteína, sendo o crescimento bacteriano naturalmente presentes no intestino do inseto afetado. Em 2000 Vizioli e cols., clonaram e analisaram o gene da cecropina de *Anopheles gambiae* e seu peptídeo foi purificado de mosquitos adultos inoculados com bactérias o qual permitiu uma limitação no crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Além de insetos as cecropinas também foram identificadas em mamíferos, intestino de suínos e na pele de anfíbios (Boman, 1994 e Kinbrell, 1991)

Desde a descoberta da cecropina, mais de 200 peptídeos e polipeptídeos antimicrobianos têm sido relatados. Peptídeos contendo cisteína (defensinas, drosomicina e tanatina), ricos em prolina e ricos em glicinas (Bulet e cols., 1999). As defensinas são peptídeos catiônicos de 3-5 KDa ricos em cisteínas. Três famílias estruturalmente distintas de defensinas têm sido descritas, incluindo α -defensinas, β -defensinas e defensinas de inseto (Ganz and Lehrer, 1994). As duas primeiras são encontradas em neutrófilos de mamíferos e têm papel importante na defesa contra bactérias, fungos e alguns vírus (Kagan e cols., 1994). Duas β -defensinas humanas foram isoladas e caracterizadas estruturalmente (Bensch e cols., 1995 e

Valore e cols., 1998). Harder e cols., (2001) isolaram e caracterizaram a β -defensina-3 humana, que demonstrou uma potente atividade antimicrobiana contra diversos tipos de micróbios patogênicos, incluindo o multi-resistente *Staphylococcus aureus* e vancomicina resistente *Enterococcus faecium*.

As defensinas de inseto possuem seis cisteínas ligadas aos pares por pontes dissulfeto promovendo uma alteração da permeabilidade da membrana plasmática de bactérias Gram-positivas, resultando numa perda de potássio citoplasmático, uma despolarização parcial da membrana com decréscimo de ATP e finalmente uma inibição da respiração (Cociancich e cols., 1993). Somente um pequeno número de Gram-negativas, fungos e leveduras são afetados por esses peptídeos (Hetru e cols., 1998). Mais de trinta defensinas têm sido descritas em insetos da ordem Diptera, Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera, Trichoptera e Odonata (Bulet e cols., 1999). Com base na estrutura, esses peptídeos são divididos em três classes: i) peptídeos lineares, desprovidos de cisteínas e formando α -hélice (cecropinas), ii) peptídeos ricos em prolinas e glicinas, iii) peptídeos cíclicos contendo resíduos de cisteínas (Lamberty e cols., 2001).

A maior parte dos peptídeos antibacterianos de insetos têm sido identificados em vetores de pouca importância no controle de doenças parasitárias. Em 1994, Chalk e cols. descreveram a sequência parcial da defensina do importante vetor *A. aegypti* e posteriormente Lowenberger e cols., (1995) demonstraram a sequência completa de três isoformas A, B e C da defensina desse inseto. Sendo o gene da defensina A clonado e caracterizado (Cho e cols., 1996, 1997).

Defensinas também têm sido isoladas e caracterizadas de *A. gambiae* (Richman e cols., 1996 e Dimopoulos e cols., 1997). Exogenamente administrados, esses peptídeos mostraram ser ativos contra vários estágios do *Plasmodium galinaceum* no mosquito. As defensinas contra oocistos são tempo-dependente tornando-os lentos e com vacuolarização interna. É sobre o esporozoítio que elas são altamente tóxicas causando a ruptura das membranas e mudança da morfologia com subsequente perda da motilidade (Shahabuddin e cols., 1998). Vizioli e cols. (2001) expressaram o DNA

recombinante da defensina de *Anopheles gambiae* e verificaram que possuía atividade contra bactérias, fungos e leveduras.

Outros peptídeos antimicrobianos têm sido descritos em insetos, como é o caso da drosomicina, isolada de *Drosophila melanogaster* (Fehlbaum e cols., 1994). A drosomicina caracteriza-se por possuir 44 resíduos de aminoácidos incluindo 8 resíduos de cisteína interligados por 4 pontes dissulfeto internas possuindo alta similaridade com defensinas de planta (Michaut e cols., 1996). Seu mecanismo de ação caracteriza-se por uma potente atividade antifúngica e nenhuma atividade contra leveduras, bactérias e nenhum efeito hemolítico em eritrócitos de bovino.

Uma atividade bacteriolítica foi também identificada na glândula salivar do mosquito *A. aegypti* (Rossignol & Lueders, 1986). Em 1996, Kang e cols. isolaram do mosquito *A. gambiae* uma seqüência genômica codante para uma lisozima. Recentemente um cDNA de glândula salivar do vetor da malária no Brasil, *Anopheles*, foi obtido e mostrou uma seqüência similar a outras lisosimas de inseto (Moreira-Ferro e cols., 1998) sugerindo uma proteção contra uma invasão bacteriana na glândula salivar do inseto. Outro peptídeo também identificado foi a tanacina, com propriedade fungicida e bactericida, isolado do hemíptera *Podisus maculiventris* (Fehlbaum e cols., 1996). Atacina, uma proteína, com atividade antibacteriana foi purificada da hemolinfa da lepidoptera *Samia cynthia ricini* e seu gene foi clonado por Kishiimoto e cols. (2002).

Dois novos peptídeos antimicrobianos denominados, termicina e espinigerina foram isolados de *Pseudacanthotermes spiniger* (cupim, Isoptera). O primeiro é um peptídeo antifúngico de 36 resíduos de aminoácidos, cuja organização de pontes dissulfeto é similar as defensinas, o segundo consiste de 25 resíduos de aminoácidos, desprovido de cisteínas, com atividade contra bactérias e fungos (Lamberty e cols., 2001). Os peptídeos antimicrobianos atacina, cecropina e defensina foram identificados em *Glossina morsitans* após infecção do inseto com parasita *Trypanosoma brucei*, sendo excelentes alvos de estudo quanto à busca de novas drogas contra o parasita (Boulanger e cols., 2002)

Em 2002, Kuhn-Nentwig e cols. identificaram uma nova família desses peptídeos isolados do veneno da aranha *Cupiennius salei*, apresentando potentes efeitos antimicrobianos, hemolítico e inseticida e sua propriedade estrutural indica uma função desestabilizadora de membrana. Tendo em vista as massivas infecções a bactérias resistentes as drogas oferecidas atualmente, esses compostos podem ser de grande utilidade no desenvolvimento de novos agentes farmacêuticos antimicrobianos.

3.4.7.1) Trialisina

Em 2002, Amino e cols. caracterizaram uma nova proteína de 22 KDa, denominada trialisina, que foi purificada da saliva do *Triatoma infestans* apresentando uma atividade lítica formadora de poros. Proteínas formadoras de poros têm sido identificadas tanto em organismos procarióticos como eucarióticos (animais e plantas) (Lehrer & Ganz, 1999; Fontes e cols., 1998 e Garcia-Olmedo e cols., 1998) fazendo parte da resposta imune contra microorganismos. Essas proteínas também inibem a função plaquetária (Ashmarina e cols., 1993), induzem apoptose em leucócitos (Korostoff e cols., 1998) e em células endoteliais (Menzies & Kourteva, 2000).

Sabe-se que peptídeos que exercem atividade lítica atuam em duas etapas: 1) ligação à superfície da célula; 2) permeabilização celular. Esses peptídeos possuem estruturas primárias e secundárias diferentes (α -hélice e estrutura- β) básicas e anfipáticas, possuindo maior seletividade para lisar bactérias do que células do hospedeiro (Matsuzaki, 2001).

Outra classe de moléculas formadoras de poros muito bem estudadas compreende toxinas bacterianas (Tveten e cols., 2001 e Welch, 2001), aerolisina (Diep e cols., 1998) e integrinas (Lally e cols., 1997). Citolisinas colesterol-dependentes são produzidas por mais de 20 espécies de bactérias Gram-positivas, formando poros maiores e uma organização monomérica em anéis de 30-50 subunidades (Olofsson e cols., 1993 e Sekiya e cols., 1993).

A partir de uma biblioteca de cDNA de glândulas salivares de *T. infestans*, a seqüência completa do gene foi obtida. A trialisina possui na sua

porção N-terminal 27 resíduos de aminoácidos com um motivo catiônico anfipático lítico, similar aos peptídeos antimicrobianos líticos, ricos em resíduos de lisina, o que sugere a formação de uma estrutura em α -hélice. Hélices anfipáticas são motivos de ligação a membrana presentes em muitas proteínas, as quais permitem que a proteína se ligue à membrana, insira-se na mesma e provoque seu rompimento, resultando na morte celular (Dathe & Wieprecht, 1999). A região adjacente a esses resíduos carregados positivamente é formada por aminoácidos hidrofóbicos.

Esta estrutura com um lado da cadeia polar e outro com resíduos hidrofóbicos, permite uma interação satisfatória com estruturas anfifílicas presentes nas membranas biológicas. Sabe-se que a maior força responsável pela ligação do peptídeo a superfície da membrana celular de mamíferos são as interações hidrofóbicas (Dathe & Wieprecht, 1999). Portanto uma hidrofobicidade baixa previne uma ligação forte a membranas eletricamente neutras, desempenhando um importante papel na seletividade celular. Essas características são similares a outros peptídeos antimicrobianos formadores de poros, tais como as magaininas de pele de sapo, que se ligam a fosfolípídeos aniônicos formando uma α -hélice (Zasloff, 1987), as cecropinas (Steiner e cols., 1981) e sarcotoxinas (Okada & Natori, 1985), encontradas na hemolinfa de insetos, cuja porção C-terminal penetra na membrana e a porção N-terminal, rica em aminoácidos básicos, interage com os fosfolípídeos ácidos presentes na mesma, causando uma perturbação na membrana e perda da mobilidade bacteriana.

A trialisina é sintetizada e estocada nas glândulas salivares na forma de um precursor com características aniônicas, capaz de neutralizar o adjacente motivo lítico catiônico que poderia lesar as glândulas salivares do inseto se sintetizada na sua forma ativa. Essa forma é semelhante, por exemplo, as defensinas de camundongos, que são ativadas pela metaloprotease matrilisina (Wilson e cols., 1999), aerolisinas secretadas por *Aeromonas hydrophila* é ativada pela endoprotease furina (Abrami e cols., 1998) e vibriolisina, uma citolisina de *Vibrio cholerae* que é clivada e ativada por uma série de proteases sendo capaz de lisar membrana de mamíferos através da formação de poros (Hall & Drasar, 1990), e a gloverina de

Trichoplusia ni, que mostrou inibir o crescimento de bactéria (Lundström e cols., 2002)

Através de um processo proteolítico Amino e cols.(2002) verificaram que trialisina é ativada quando ejetada no momento da picada, pela triapsina, uma serino protease produzida nas glândulas salivares de *T. infestans*, a qual é secretada no momento da picada do inseto. (Amino e cols., 2001). Essa protease ao ser inibida por APMSF, um inibidor de serino proteases, foi classificada como uma serino protease. Experimento semelhante foi realizado a fim de se confirmar a participação dessa protease na ativação da trialisina. Os resultados obtidos foram a perda da atividade da trialisina quando inibidor de serino protease (APMSF) foi adicionado a extrato de glândulas salivares. A triapsina é uma proteína muito lábil mantendo-se ativa por poucos minutos.

O mecanismo de ação dessa proteína foi caracterizado pela capacidade de formar poros voltagem-dependente nas camadas lipídicas e induzir lise de bactérias, hemácias, *T. cruzi* e células de mamíferos. A partir da construção de um peptídeo sintético que codifica a região lítica da proteína eles verificaram que a porção adicional da proteína a esse peptídeo aumentou a especificidade da trialisina com relação às células eucarióticas tal como as toxinas de bactérias (Amino e cols., 2002).

Com base no exposto Amino e cols. (2002) propuseram um mecanismo de ativação e formação de poros, onde a pró-trialisina é estocada numa forma inativa nas glandulas salivares. No momento da picada, é ativada por uma serino protease, separando o peptídeo aniônico da proteína madura. Neste momento o motivo catiônico se liga aos fosfolípidos de membrana negativamente carregados, inserindo a α -hélice anfipática dentro da camada lipídica, formando poros voltagem dependentes. Sabe-se que lípidos carregados negativamente e um potencial de ação negativo favorecem a ligação e entrada dos peptídeos na membrana (Dathe & Wieprecht, 1999).

Essa atividade lítica, geralmente tem sido associada com o mecanismo de digestão a partir de hemólise. Entretanto esse fato é improvável uma vez que o alimento permanece intacto durante semanas sendo digerido somente no intestino posterior do *T. infestans*.

A capacidade de a trypsinina matar microorganismos, como um peptídeo lítico, e permeabilizar células de mamíferos, como uma toxina bacteriana, vem reforçar a idéia de que essa proteína tem um duplo papel para o inseto, ajudando no repasto por interagir com as células hospedeiras como também no controle do crescimento antimicrobiano nas glândulas salivares. Uma vez que se verificou o não crescimento bacteriano nas glândulas salivares de *T. infestans* e a transmissão do *T. cruzi* ser realizada através das fezes e não pela saliva ao contrário do vetor *R. prolixus* que transmite o parasita *T. rangeli* (Stevens e cols., 1999).

3.5) Transmissão Vetorial do *Trypanosoma cruzi*

A transmissão natural da Doença de Chagas é a vetorial, que se dá através das fezes de insetos hematófagos da ordem *Hemiptera* da família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*, sendo o *T. infestans* o mais importante transmissor ao sul da linha equatorial (Dias & Coura, 1997a). O *Trypanosoma cruzi*, é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae, caracterizado pela presença de um flagelo e uma única mitocôndria, presente no sangue dos vertebrados na forma de tripomastigota e nos tecidos, como amastigota.

Nos invertebrados (insetos vetores), ocorre a transformação dos tripomastigotas sangüíneos em epimastigotas, que depois se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, formas infectantes acumuladas nas fezes do inseto. Esses, ao picar os vertebrados, em geral defecam após o repasto eliminando formas infectantes de tripomastigotas metacíclicos presentes em suas fezes e que penetram pelo orifício da picada ou por solução de continuidade deixada pelo ato de coçar (Brener, 1973).

3.6) Repasto Sangüíneo

Os triatomíneos percebem suas fontes alimentares principalmente pela ação de sensores sensíveis ao calor localizados nas antenas (Dias & Coura, 1997b). Após localizar a presa, o inseto, utilizando sua mandíbula penetra em sua pele através de movimentos rápidos até que sua maxila seja introduzida nos tecidos até após encontrar um vaso sangüíneo, geralmente capilar, ocorre a salivação. Durante a busca de vasos sangüíneos através dos movimentos maxilares o triatomíneo pode causar pequenas lesões que levam a microhemorragias. O sangue é ingerido pelo triatomíneo de forma pulsátil e armazenado no intestino anterior, também conhecido como estômago, até a saturação dos receptores que controlam a dilatação da parede abdominal (Friend & Smith, 1971).

3.7) As Glândulas Salivares dos Triatomíneos

As glândulas salivares são em número de três pares e localizam-se na cavidade torácica, contidas na parte inicial do tubo digestivo, e separadas por um sistema de ductos que se abrem em um canal alimentar (Barreto, 1922). A nomenclatura usada para as glândulas salivares de *Triatoma infestans* é D1, D2 e D3 (Lacombe, 1999). O par D1 corresponde às glândulas principais, o D2 às glândulas suplementares, possuindo uma cor leitosa ou um pouco amarelada. O par D3 corresponde às glândulas acessórias e mostra-se transparente, de maior tamanho e deslocado para a região abdominal do inseto recebendo muita oxigenação não devendo ser simplesmente considerada como reservatório de saliva. A presença de uma valvula nessa glândula exerce importante papel na formação da saliva em triatomíneos (Lacombe, 1999).

O gênero *Rhodnius* não apresenta o típico par de glândulas D3, sendo o par principal de cor cereja devido ao pigmento parahematina, encontrado na hemolinfa (Lacombe, 1999). Segundo Lacombe, (1999) em animais que não se alimentaram as glândulas ficam repletas de secreção, ocasionando a

distensão da parede celular e conseqüentemente uma modificação morfológica. Entretanto, quando alimentados às células ficam em plena atividade de síntese. Essas observações indicam que as glândulas salivares são de grande importância para os hábitos alimentares dos triatomíneos, onde a saliva facilita na localização dos vasos e apresenta efeito anti-hemostático (Ribeiro & Garcia, 1981).

3.8) A Doença de Chagas

Em várias regiões do continente americano a Doença de chagas se encontra amplamente distribuída. Os vetores da Doença estão presentes desde o Sul dos Estados Unidos até a Argentina. São mais de cem espécies responsáveis pela transmissão natural da infecção pelo flagelado *T. cruzi* atingindo mamíferos silvestres, que servem de reservatório dos protozoários. A Doença de chagas é um exemplo típico resultante das alterações produzidas pelo homem ao meio ambiente, das distorções econômicas e das injunções sociais oferecendo ao vetor vivendas rurais de péssima qualidade, sendo o homem incluído no ciclo epidemiológico da doença.

Estima-se que existam 18 milhões de pessoas infectadas na América Latina e cerca de 4 milhões no Brasil e que 5-6 milhões de pessoas irão desenvolver complicações crônicas, sendo que 27% podem desenvolver lesões cardíacas, 6% distúrbios digestivos e 3% lesões neurológicas periféricas (WHO,1997). Portanto, a morbidade e mortalidade provocada por essa doença constituem um dos maiores problemas de saúde pública da América Latina.

A transmissão do *T. cruzi* pode ocorrer por três vias. Vetorial, podendo ser classificado como silvestre, doméstico e peridoméstico, mostrando a interação entre os diversos reservatórios animais (animais silvestres, marsupiais, cães, gatos e roedores) e o homem (Barreto, 1979). A segunda e mais freqüente via de transmissão ocorre por transfusão sangüínea, via transplacentária ou congênita, constituindo um sério problema de saúde pública em áreas endêmicas (Schmunis,1999; Leiby e cols.,1999 e Altemani

e cols., 2000). A terceira via, pouco comum é através da amamentação (Jorg, 1992 e Bittencourt e cols., 1998). Os triatomíneos domiciliados ou peridomiciliados são de mais fácil acesso, podendo ser encontrados em ecótopos artificiais, principalmente habitações humanas ou focos naturais (abrigo de animais - tatu, quati, gamba, cutia, ratos, aves, morcegos, etc). Poder-se-ia estudá-lo do ponto de vista genético, com o objetivo de produzir espécies com desempenho reprodutivo muito fraco, diminuindo a população de insetos e, por consequência, sua atuação na transmissão da doença.

Outra atuação interessante seria a pesquisa e utilização de novos inseticidas no domicílio e peridomicílio, capazes de matar o vetor, sem efeitos tóxicos para o homem e animais. Enquadram-se nestes parâmetros os piretróides, biodegradáveis e menos tóxicos para o homem e os animais domésticos. Ao longo dos últimos 20 anos, a ação do Governo Federal no combate aos vetores com inseticida tem apresentado resultados satisfatórios. O fato de novas espécies de triatomíneos possam vir ocupar o intradomicílio vêm sendo uma preocupação constante (Nascimento e cols., 1997).

Nos estado de Goiás a captura das espécies *Triatoma sordida* e *Rhodnius neglectus* em habitações rurais aumentou no período de 1991/92 (Garcia, 1993). Entretanto, os triatomíneos são capazes de adquirir resistência contra inseticidas (Sivory e cols., 1997).

Na atualidade, fatos como a disseminação da Doença de Chagas para regiões onde até então casos da enfermidade eram reduzidos, como é o caso da bacia amazônica, onde se observou a presença de insetos vetores infectados assim como transmissão vetorial da Doença de Chagas (Teixeira, e cols., 2001). Assim o conhecimento de formas eficazes de prevenção da transmissão será de grande importância para o controle da Doença de Chagas. Nesse sentido, deve-se considerar a busca de novas abordagens profiláticas, eficazes na prevenção da transmissão do *T. cruzi* para o homem. Nessa linha de raciocínio, nós consideramos a possibilidade de fazer o homem um mau hospedeiro para o repasto do triatomíneo.

3.9) Tentativa de Inibição do Repasto do Inseto Hematófago

O triatomíneo é o elo mais importante na cadeia epidemiológica da doença de Chagas e, assim, as pesquisas futuras que visem à erradicação da moléstia, devem ser estruturadas no sentido de limitar, ao máximo, sua reprodução. Todavia, a atuação sobre os barbeiros silvestres é bastante difícil, em virtude da multiplicidade de espécies que existem em ambiente silvestre, pouco exigente aos habitáculos e indiferentes aos hospedeiros vertebrados, dificultando o combate por meios químicos ou biológicos (Silveira, 2000).

O desenvolvimento de uma vacina contra a Doença de Chagas dependeria da possibilidade de obtenção de um antígeno do parasita, quimicamente definido, que produzisse uma imunoproteção sólida, sem excitar as reações tóxicas ou alérgicas de hipersensibilidade. Além disso, o envolvimento de auto-imunidade na patogênese da doença limita consideravelmente a possibilidade de sucesso nessa tentativa de produção de uma vacina contra a infecção já instalada no hospedeiro mamífero. (Teixeira, 1987). Ademais, as características intrínsecas da infecção crônica chagásica sugerem que uma vacina convencional poderia agravar o curso da doença ao invés de proteger contra lesões antigas ou ainda ativas no organismo (Teixeira, 1987). Os mecanismos de invasão das células do hospedeiro pelo *T. cruzi*, poderia ser um alvo interessante de investigação. Porém, o processo de diferenciação do *T. cruzi* adiciona dúvida quanto ao sucesso do empreendimento, pois muitos fatores dificultam a seleção de antígenos eficientes para obtenção de imunoprofilaxia efetiva.

Tem sido proposto que um dano na rede imunológica supressora poderia ter papel na patogênese das lesões miocárdicas, tanto na fase aguda como na crônica (Andrade e cols., 1987 e Rossi e cols., 1995). A investigação dos mecanismos que são acionados pelo protozoário, que resultam na perturbação funcional do sistema imunológico é fundamental para a idealização de atuações contrárias, eficazes e seguras, que proporcionem a prevenção (ou cura) do indivíduo acometido (Huggins, 1993). Algumas tentativas foram realizadas para verificar a proteção da vacinação em

reservatórios domésticos, em larga escala. Entretanto, poucos estudos demonstraram a eficácia desta prática em campo.

Diante da real necessidade de uma vacina eficaz e das dificuldades encontradas nas abordagens que visam imunoprofilaxia da doença de Chagas, novas estratégias de controle têm sido propostas. Nesse sentido, a imunização com antígenos de insetos vetores tem sido considerada uma alternativa de vacinação. Essa estratégia visa interromper o ciclo evolutivo do agente infeccioso de doenças endêmicas, tais como malária, dengue e leishmaniose.

Anticorpos, produzidos em hospedeiros contra proteínas de insetos vetores têm bloqueado o desenvolvimento de agentes infecciosos. O bloqueio do desenvolvimento do *Plasmodium berghei* no interior do mosquito alimentado com sangue de camundongos imunizados com proteínas do intestino de *Anopheles stephensi* foi demonstrado por Lal e cols., em 1994.

A fecundidade de *Anopheles tessellatus* foi reduzida pela ingestão de anticorpos murinos antimosquito (Srikrishnaray e cols.,1993). Em 2001b, Valezuela e cols.caracterizaram as principais proteínas da glandula salivar de *Phlebotomus papatasi*, o vetor da leishmaniose. Uma dessas proteínas teve sua extremidade N-terminal determinada e o cDNA selecionado. Uma vacina de DNA foi capaz de proteger camundongos vacinados de parasitas proporcionando intensa resposta humoral.

Dessa forma o volume de experimentos na busca de antígenos eficazes vem aumentando a cada ano, particularmente no que diz respeito a glândulas salivares. Entende-se o interesse despertado, porque o aparelho bucal do vetor é uma das principais partes que entra em contato com o hospedeiro. Sendo assim, a inativação de proteínas salivares importantes para o sucesso do repasto, por anticorpos do hospedeiro, seria uma alternativa promissora para o controle do inseto.

Todavia, as abordagens alternativas que se tem citado na literatura remetem para a necessidade de produzir proteínas recombinantes codificadas por genes expressos com exclusividade nas glândulas salivares, pois, as propriedades farmacológicas dessas proteínas são importantes para a aquisição do repasto do inseto hematófago. Enfim, a escassez do produto

natural de origem na glândula salivar do inseto pode ser resolvida mediante emprego das técnicas modernas de biologia molecular.

3.10) Expressão de Proteínas Recombinantes

A expressão de proteínas recombinantes *in vivo* é muito importante para diversas áreas da pesquisa em biologia molecular. A escolha do sistema de expressão para a produção de altos níveis de produção de proteínas recombinantes dependem de fatores como: características do crescimento celular, níveis de expressão, expressão intracelular ou extracelular, modificações pós traducionais, atividade biológica da proteína de interesse, bem como fatores regulatórios na produção de proteínas terapêuticas (Goeddel, 1990 e Hodgson, 1993).

Sistemas procarióticos têm sido usados devido à facilidade e seu baixo custo de se cultivar *E.coli*, além de produzir proteínas em abundância. Entretanto nem todo gene pode ser expresso eficientemente neste organismo. A expressão de produtos gênicos eucarióticos em sistema procariótico pode ocasionar alguns problemas, principalmente se a proteína requer modificações pós traducionais para sua atividade, como também a produção de proteínas insolúveis dificultando a purificação da proteína ativa (Das 1990).

Tendo em vista os fatos citados, levedura, células de mamífero e células de inseto têm sido escolhidas como sistema de expressão em proteínas heterólogas, promovendo as modificações pós traducionais corretas exigidas pelo peptídeo a ser expresso.

Uma revisão detalhada sobre os vários sistemas de expressão de proteínas recombinantes foi feita na Tese de Doutorado de Gilvania Feijó (Universidade de Brasília, 2001). Neste trabalho, fizemos atualização daquela revisão e, agora, juntamente com algumas informações sobre as técnicas de bioinformática associadas com a modelagem molecular, foram colocadas como um apêndice logo após a revisão bibliográfica.

4. TRABALHO PRÉVIO

A proposta de trabalho que tomou corpo e resultou na definição dos objetivos desse trabalho de Tese está inserida numa linha de pesquisa multidisciplinar envolvendo vários projetos com muitos protagonistas, ensejando a produção de informação científica submetida e aprovada pelas agências de fomento à pesquisa. Essa parte do trabalho já realizado está sujeita a um Acordo de Confidencialidade decorrente de Convênio de Colaboração Científica assinado pela Universidade de Brasília e pelo Instituto Carlos Finlay, Havana. Não nos compete discutir o pragmatismo que se coloca adiante e acima da necessidade de informação e compartilhamento do conhecimento produzido em instituição pública. As regras são ditadas pelo novo mito chamado Mercado. De nossa parte, sabemos que temos de nos submeter às regras do jogo diante do desejo maior de levar o conhecimento produzido a etapa de sua transformação em produto de interesse comercial. Todavia, colocamos aqui um condicionante: O bem produzido deve ser de domínio público no seu único interesse.

5. PROPOSTA DE TRABALHO

Como vimos nos tópicos discorridos acima, vários artrópodes hematófagos transmitem doenças ao contaminar suas vítimas durante o repasto. No caso dos insetos da família *Reduviidae*, a transmissão do *Trypanosoma cruzi* é viabilizada por moléculas essenciais ejetadas no sítio da picada para romper as barreiras homeostáticas da presa. Assim, vimos que vasodilatadores, anti-agregadores de plaquetas, anticoagulantes, anestésicos e outras aminas bio-ativas são importantes para o repasto bem sucedido do inseto.

As proteínas já identificadas na saliva sugerem a possibilidade de uma nova estratégia de controle, diante da perspectiva de que sua inibição por

anticorpos constitua-se em alternativa de prevenção da transmissão vetorial do *T. cruzi*. Até há pouco tempo, a limitação para essa alternativa estava na quantidade diminuta desses componentes farmacologicamente ativos na glândula salivar do reduvídeo, certamente insuficiente para uso em larga escala. Todavia, a tecnologia do DNA recombinante pode ser usada para resolver o impasse.

Então a tarefa posta diante de nossa bancada foi definir qual, entre tantas moléculas de interesse biotecnológico, poderia ser selecionada como alvo para o meu trabalho de Tese de Doutorado. Então, a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula salivar do *T. infestans*, foi feito *immunoscreening* de genes codantes de proteínas identificadas por anticorpos policlonais específicos. Os clones obtidos a partir dessa biblioteca foram selecionados e aqueles confirmados num segundo e terceiro *screenings* foram identificados (Feijó, 2001).

O objeto desse trabalho de Doutorado foi a identificação, sequenciamento, determinação de sua organização genômica e estrutural mediante modelagem molecular de um dos genes com expressão exclusiva na glândula salivar, e, finalmente, a caracterização das propriedades funcionais da proteína recombinante.

Evidentemente, essa proposta de trabalho parte do pressuposto de que o estudo de componente salivar do *T. infestans* além de ser útil na compreensão da diversidade genética e da filogenia de insetos e de sua participação em processos hematológicos associados com a hematofagia, poderia também ser uma ferramenta de uso na composição de uma possível vacina recombinante. Ou seja, o trabalho desenvolvido seria apenas uma contribuição à tentativa de produzir insumo importante na avaliação da estratégia de prevenção da transmissão do *T. cruzi* mediante a inibição do repasto do inseto hematófago.

Sendo parte de um trabalho coletivo, multidisciplinar, a pesquisa receberá outras contribuições de pesquisadores sobre o mesmo tema, no Brasil e no exterior. No conjunto, a estratégia montada para tentar resolver o problema da transmissão do *T. cruzi* requer envolvimento multi-institucional e, certamente, são necessários muitos outros projetos similares para que seja

possível juntar todos os elementos e, finalmente, testar a hipótese de formulação de uma vacina polivalente para prevenir a transmissão da doença de Chagas.

6.OBJETIVOS

Diante do exposto, o objetivo geral desse trabalho consistiu em estudar aspectos da atividade farmacológica de um dos componentes da secreção salivar de *T. infestans*. Ademais, a partir da disponibilidade da proteína recombinante, nosso estudo visou à sua caracterização molecular e funcional.

Objetivos específicos

- 1) Sequenciamento de 10 clones oriundos da biblioteca de cDNA da glândula salivar do *Triatoma infestans*.

- 2) Caracterização molecular e expressão do gene da Trialisina da saliva do *Triatoma infestans*'

- 3) Caracterização funcional da proteína recombinante

- 4) Modelagem molecular e identificação do sítio ativo da molécula.

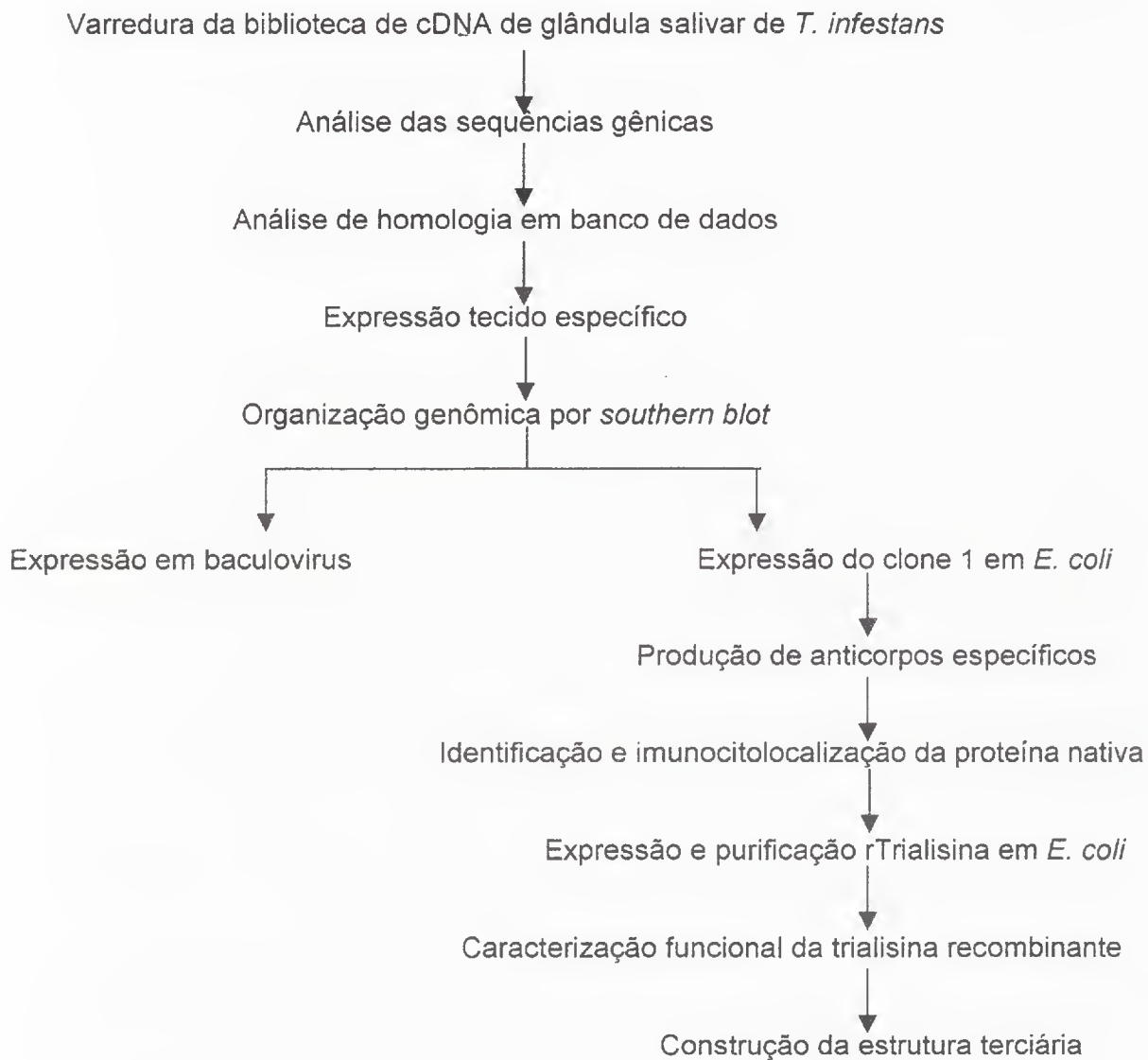
Ainda que o encaminhamento dado ao projeto que deu origem a esta Tese e que resultou na definição de seu interesse biotecnológico e na celebração de Convênio com Termo de Confidencialidade, não incluímos como nosso objetivo a produção de insumos biotecnológicos ou, mais especificamente, de vacina contra picada de inseto hematófago. Essa tarefa compete ao conjunto de pesquisadores do Laboratório Multidisciplinar de

Pesquisa em Doença de Chagas e do Instituto Carlos Finlay de Havana, mediante análise e experimentação científica que poderá tomar muitos anos de trabalho de uma equipe envolvendo mais de uma dezena de pesquisadores.

MATERIAL E MÉTODOS

7. MATERIAL E MÉTODOS

O esquema metodológico geral desse trabalho está resumido a seguir:



7.1) Criação dos Triatomíneos

Os insetos utilizados neste trabalho pertencem à espécie *Triatoma infestans*. Ovos, ninfas de 1º ao 5º estágios e adultos foram mantidos no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas da Universidade de Brasília, em frascos de polietileno e sob condições ótimas de 28 °C, umidade relativa de 70%, fotoperíodo de 12 horas. A alimentação dos insetos foi feita em *Gallus domesticus* (Silva, 1985).

7.2) Obtenção da Saliva

A indução da salivação foi feita por compressão do tórax do triatomíneo adultos de ambos os sexos. A saliva ejetada era colhida com micropipetador e estocada a -80 °C .

7.3) Extração de Tecido de *Triatoma infestans*

Os tecidos extraídos foram glândulas salivares, músculo e intestino. As glândulas salivares foram extraídas segundo Smith e cols.(1980), onde os triatomíneos foram anestesiados por resfriamento e colocados em uma lupa sobre uma lâmina em um aumento de 1,5x. Com o auxílio de uma pinça, a cabeça do inseto foi torcida num ângulo de 90° e então cuidadosamente segmentada do corpo. As glândulas salivares foram visualizadas e coletadas imediatamente. Para a extração do intestino e músculo, o inseto foi aberto com uma tesoura e os tecidos coletados com o auxílio de um pinça.

7.4) Construção da Biblioteca de cDNA

A partir do RNA mensageiro de glândulas salivares de *T. infestans* uma biblioteca de cDNA foi construída por Feijó, p. 28 (2001), utilizando-se o Kit de síntese ZAP-cDNA[®] (Stratagene) segundo informações do fabricante.

7.5) Seleção dos Clones

Os clones utilizados neste trabalho foram selecionados por Feijó, p.31 (2001), utilizando-se para a varredura anticorpos policlonais contra saliva de *T. infestans*, produzidos em coelho. A varredura por anticorpos permite a identificação de clone de interesse relacionado com o reconhecimento da proteína expressa. Após 3^a, varredura o plasmídeo contendo o gene de interesse era excisado do DNA do fago.

7.6) Northern blot

76.6.1) Extração de RNA total

RNA total foi extraído de tecido de glândulas salivares, intestino e músculo de triatomíneos nas fases de 4^o ou 5^o estágios submetidos a um período de jejum de 15 dias. O material utilizado para esse procedimento foi tratado com dietil pirocarbonato (DEPC) numa concentração de 0,1% por um período de 12 horas à temperatura ambiente. Para inativar o DEPC o material líquido foi autoclavado a 121^oC por 15 minutos e o material sólido foi lavado por várias vezes com água destilada DEPC tratada e colocada numa estufa para secar.

Os tecidos foram isolados e coletados em um tubo cônico de 1,5ml contendo reagente Trizol (Life Technologies®). O RNA foi extraído de acordo com o método descrito pelo fabricante. A concentração do RNA foi medida

com base na densidade óptica da amostra no comprimento de onda de 260nm.

7.6.2) Análise de RNA por Eletroforese em Gel de Agarose

Eletroforese de RNA foi realizada em gel de agarose 1%, formaldeído 20% v/v e tampão MOPS (Morphopropane sulfonic acid) pH 7,0 e 0,02M; acetato de sódio 8mM e EDTA pH 8,0 e 1mM, esterilizado por filtração em *Milipore* 0,2µm. As amostras contendo 10µg de RNA total de músculo, intestino e glândulas salivares foram preparadas em tampão MOPS para uma concentração final de 0,5% acrescida de 50% de formamida e 6% de formaldeído. As amostras foram incubadas por 15 minutos a 65°C, resfriadas em gelo por 2 minutos e adicionado 0,1v de tampão de amostra (50% glicerol; EDTA 1mM pH 8,0, 0,25% azul xileno cianol). A eletroforese realizou-se em tampão MOPS. O gel foi pré-corrido por 5 minutos a 5 V/cm e a 3-4 V/cm após aplicação da amostra.

A visualização do RNA foi feita pela coloração em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/ml em acetado de amônio 0,1M durante 30-40 minutos e descorados em água destilada por um período semelhante. O tamanho do RNA foi estimado com base na curva obtida pelo log₁₀ do tamanho dos fragmentos de RNA do marcador versus à distância migrada no gel.

7.6.3) Transferência do RNA para a Membrana de Nylon

Os RNAs foram separados em gel de agarose com formaldeído como descrito anteriormente. Os géis foram rinsados com água DEPC tratada três vezes por 5 minutos e então incubados em SSC 20X por 15 minutos e montados em um sistema de transferência por capilaridade. A membrana *Biodyne A*® foi umedecida em SSC 2X antes de ser adicionada ao sistema. A transferência foi realizada em solução SSC 20X por 12 horas. Após a transferência a membrana foi submetida a três pulsos de um minuto em luz UV para fixação do RNA e então se procedeu a pré-hibridação e hibridação.

7.7) Extração de DNA Plasmidial

Preparações de pequena e grande escala foram realizadas de acordo com a técnica de lise alcalina, descrita por Sambrook e cols. (Vol. 1, 1989, pág 1.25). O DNA foi mantido a -20°C .

7.8) Extração de DNA Genômico

A técnica usada foi adaptada de *Current Protocol in Molecular Biology*, vol I, p. 2.2.1, 2000. Em resumo, tecido coletado de músculo, intestino e glândulas salivares de 15 triatomíneos foi submetido a várias lavagens em tampão TE gelado. O tecido foi ressuspensão em tampão TEN (NaCl 100 mM, TrisHCl 10 mM pH 8, EDTA 25 mM pH 8) e homogenizado. Adicionou-se 300 μl de proteinase-K (20 mg/ml) com 0,5 % de SDS. Após incubação durante a noite a 50°C , foi feita extração orgânica e precipitação com acetato de amônio 7,5 M e etanol absoluto. O sedimento foi lavado com vários volumes de etanol 70% e ressuspensão em TE. O DNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

7.9) Análise de DNA por Eletroforese em Gel de Agarose

Eletroforese de DNA foi realizada em géis de agarose, em concentrações de 0,8 a 1,0% preparados com tampão TAE 1X (Tris-HCl 80 mM pH 8,3; ácido acético 0,1% v/v; EDTA 1mM) aos quais foi adicionado brometo de etídeo na concentração final de 0,5 $\mu\text{g/ml}$. As amostras foram acrescidas de tampão de amostra (na concentração final de 1X) e submetidas à eletroforese em tampão TAE 1X, aplicando-se voltagem entre 1 e 5 V/cm entre os eletrodos.

7.10) Análise de Restrição de DNA Plasmidial

As digestões enzimáticas foram realizadas com enzimas de restrição Eco RI, Xho I, Bam HI, Pvu II, Sma I e Hind III, da GIBCO-BRL ou PHARMACIA, e as reações foram feitas segundo orientação do fabricante. Para cada μg de DNA foram utilizadas 2-3 unidades da enzima. O sistema foi incubado de 2 a 12 h em banho-maria à 37°C e depois separado por eletroforese em gel de agarose.

7.11) Purificação de Fragmento de DNA

Os fragmentos de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. Esses fragmentos foram excisados do gel e purificados com auxílio de protocolo do QIAEX II sugerido por QIAGEN®, CA, segundo recomendação do fabricante.

7.12) Southern Blot de DNA Genômico

DNA genômico ($50\mu\text{g}$) digerido com as enzimas Eco RI, Hind III (GIBCO BRL®) e Sac I (PHARMACIA®) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7%. Após a separação eletroforética o gel foi corado com brometo de etídeo a $0,5\mu\text{g}/\text{ml}$ em tampão TAE 1X por aproximadamente 30 minutos e descorado com 1mM MgSO_4 . O DNA foi transferido para uma membrana de nylon *Biodyne A*® (GIBCO/BRL) através da técnica de transferência neutra segundo *Current Protocol in Molecular Biology*, Vol I, p. 2.9.1, 2000. A técnica consiste em utilizar uma solução de depuração (0,25M HCl), desnaturação (NaOH 0,5M, NaCl 1,5M) e neutralização (1,5M NaCl, TrisHCl) e o gel foi transferido em 20X SSC por 24h. Após a transferência o DNA foi fixado na membrana por pulsos de UV e guardado à temperatura ambiente até sua utilização.

7.13) Sondas Radiomarcadas

Fragmentos de DNA foram marcados com auxílio do *Random Primer Labelling System* (GIBCO-BRL), onde há inserção de [α - 32 P] dATP na sequência da fita de DNA molde-sintetizada pela atividade polimerásica da enzima *Klenow*, e pela presença de iniciadores hexaméricos aleatórios. A reação foi realizada segundo informações do fabricante.

7.14) Purificação de Sondas Radiomarcadas

As sondas foram purificadas por cromatografia em coluna de Sephadex G-50 (SAMBROK e cols., 1989, v. 1, p.11.20). A incorporação radiotativa foi confirmada através de cintilografia. As sondas foram usadas dentro do limite de concentração de um a 2×10^6 cpm/ml de solução de hibridização e as atividades específicas obtidas foram $>10^8$ cpm/ μ g de DNA.

7.15) Hibridização

As membranas foram pré hibridadas durante 6h a 65°C em solução contendo PEG 800 10%, SSPE 1,5% E SDS 7%, de acordo com a sugestão do fabricante Byodine B (GIBCO-BRL). As sondas foram desnaturadas e adicionadas a solução. No experimento de *Southern blot* a hibridização foi incubada por 48 h à 60°C . No caso do *Northern blot* a hibridização foi feita à 42°C conforme instruções do fabricante da membrana.

As lavagens foram realizadas em condições de estringência crescentes, com o objetivo de remover o que se ligou inespecificamente à membrana. Duas lavagens com SSC 2X 0,1% SDS, a 65°C durante 15 minutos, seguidas de uma lavagem com SSC 0,1X/ 0,1% SDS, à 65°C durante 15 minutos. As membranas úmidas foram revestidas em filme plástico de PVC e exposta a uma película autoradiográfica (KODAK T-MAT) durante intervalos de 12h durante uma semana.

7.16) Sequenciamento de DNA

Empregou-se o método descrito por SANGER e *co/s.*(1977), baseado em dideoxinucléotídeos terminadores de elongação da cadeia de DNA. Os clones obtidos foram sequenciados manualmente utilizando-se o kit "fmol DNA Sequencing System" da Promega® segundo instruções do fabricante, usando os primers T7 e M13 reverso. Alternativamente, alguns clones foram sequenciados de forma automática pela empresa Davis Sequencing.

7.16.1) Eletroforese do Gel de Sequenciamento

O gel foi pré-corrído em tampão TBE a 60 W por 1 hora e após a aplicação, as amostras foram submetidas a uma potência de 70 W. Após o término da corrida o gel foi retirado com o auxílio de um papel de filtro de igual tamanho. A secagem foi feita em um sistema à vácuo, 80°C por 40 minutos, e exposto à uma película autoradiográfica T-MAT-Kodak.

7.17) Revelação de Filmes Autoradiográficos

A revelação das películas autoradiográficas foi realizada em câmara escura, por imersão do filme em Dektol-76 (Kodak) por 1 minuto. A revelação foi interrompida pela imersão em água e fixada em solução fixadora (Kodak) por 1 minuto. Em seguida os filmes foram lavados exaustivamente e secos ao ar.

7.18) Ligação dos Fragmentos de DNA

As reações de ligação foram realizadas em tampão ligase 5x (GIBCO-BRL), e na presença de 200U de T4 ligase (GIBCO-BRL), em um volume final de 20 μ l. As concentrações de vetor-inserto foram calculadas respeitando as relações molares. O sistema foi incubado à 14 °C por 12 h, sendo posteriormente usado para transformar células de *E. coli* competentes.

7.19) Transformação de Células de *E. coli*

A preparação e a transformação de bactérias competentes foi executada conforme descrito por Sambrook e cols.(1989) vol. 1 p 1.63.

Quantidades variáveis de plasmídeo ou sistema de ligação foram adicionados a 100 μ l de células competentes, sendo incubados por 30 minutos no gelo sendo e submetidos por um choque térmico de 42 °C por 1 minuto. Posteriormente a reação foi transferida para o gelo novamente por 5 minutos. Após esse período foram adicionados 800 μ l de meio NZY e a cultura foi incubada por 1 hora à 37 °C

A cultura foi semeada em meio NZY contendo o antibiótico apropriado e incubados a 37 °C durante a noite.

7.20) Análise Computacional da Seqüência Gênica

As seqüências gênicas obtidas foram analisadas pelo programa DNA MAN versão 2.2 (Lynnon Biosoft, Copyrght©, 1994/1995, New York University Medical Center). Esse programa realizou traduções das sequências, procura de sítios de glicosilação e seqüências consenso de poliadenilação. A procura do peptídeo sinal nas seqüências e a predição dos sítios de localização da proteína na célula foi feita mediante comparação entre seqüências já conhecidas, com ajuda do programa PSORT versão 6.4,

7.21) Análise de Homologia em Banco de Dados

Para a busca de homologia em banco de dados utilizou-se o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que trata de um conjunto de programas de busca de similaridades (blastn, blastp, blastx, tblastn e tblastx), os quais são capazes de consultar todos os bancos de dados disponíveis de seqüências primárias de DNA (GenBank Main, GenBank HTGs, GenBank STSs, GenBank Patents, Course DNA e StackDB) e proteína (SwissProt, SP-TrEMBL, PDB, Course Protein) (Altschul e cols., 1997). A ferramenta pode introduzir espaços nas seqüências, impedindo a interrupção dos domínios das mesmas durante a pesquisa. Os *scores* apresentados na pesquisa BLAST são calculados estatisticamente representando resultados reais, distintos da similaridade randômica (background). O endereço eletrônico utilizado para as pesquisas de homologia foi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

7.22) Modelagem Molecular

A estrutura terciária neste trabalho foi obtida utilizando-se os seguintes programas:

MODELLER é um programa para modelagem de estruturas de proteínas por homologia ou por “threading”. Utiliza e arquivos de entrada: top, .ali et .pdb, (Martin-Reno e cols., 2000)

TITO (Tool for Incremental Threading Optimisation) permite a avaliação do alinhamento entre uma seqüência e uma estrutura tridimensional. A estrutura permite a transferência das coordenadas espaciais dos resíduos de aminoácidos para a seqüência de interesse. Calcula-se então, a energia de contato intrínseca. Assim quanto menor essa energia melhor é a compatibilidade de enovelamento, ou seja, mais confiável a predição do modelo. O programa TITO é particularmente útil nos casos onde a identidade entre as seqüências é pequena (de 10 à 30%). TITO gera os

arquivos de entrada para o programa MODELLER. Bancos de dados e programas utilizados pelo TITO foram: **ALIPSI**, arquivo resultante do [PSI-BLAST](#); **ALI3DP**, arquivo resultante do [3DPSSM](#); **ALIMGT**, arquivo resultante do [mGenThreader](#); **ALIGBU**, arquivo resultante do [INGBU \(HFR\)](#); **ALIHMM**, arquivo resultante do [HMMer \(SamT99\)](#).

O programa TITO recebeu como entrada os arquivos PDB (exemplo: [1xva.pdb](#)); alinhamento (exemplo: [bioc.msfb](#)); e um arquivo *inp* com as instruções de corrida. Ou ainda, foram usados os alinhamentos vindos do [Clustal W](#) em formato FASTA. O objetivo das buscas é encontrar o modelo de estrutura tridimensional que servirá de suporte para a construção do modelo. A etapa seguinte permite a validação e otimização do alinhamento das seqüências.

7.22.1) Obtenção dos Modelos

A seqüência de aminoácidos foi submetida ao programa TITO o qual é fornecido pelo servidor [METASERVER](#). Após a predição da possível estrutura feita pelo programa a construção dos modelos foi, então, iniciada.

7.22.2) Construção dos Modelos

Para a produção dos modelos tridimensionais utilizou-se o programa [MODELLER](#) que utiliza as coordenadas de um molde e transfere para a seqüência de interesse. Em seguida foram minimizados os impedimentos estéricos em 100 a 1000 passos sujeitos aos critérios *conjugate gradient* e *steepest descent*, respectivamente. As áreas de menor identidade foram construídas independentemente (regiões em alças). A construção dos Modelos mediante uso de técnicas de bioinformática foi feita por Natália Martins, Cenargen/Embrapa, DF.

7.22.3) Validação do Modelo

Os arquivos PDB dos modelos produzidos na etapa acima foram submetidos à validação que compara as coordenadas propostas com dados físico-químicos de estruturas reais e determina se o modelo é válido ou não. Para a validação foram usados os programas [PROSA II](#) e [PROCHECK](#). Esses programas avaliam a acuracidade da estrutura do modelo obtido. Após validação, as seqüências foram submetidas ao Plot de Ramachandran, a fim de selecionar a melhor estrutura.

7.23) Expressão da Proteína Recombinante

7.24) Em Sistema Baculovírus

7.24.1) Cultivo de Célula de Inseto

A célula hospedeira utilizada foi da linhagem SF21 (*Spodoptera frugiperda*) que foi mantida em placas de poliestileno e cultivada em meio TC 100 (GIBCO BRL) com 10% v/v de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina, a 28 °C sem agitação e atmosfera de CO₂ a 5%. Estas linhagens foram generosamente cedidas pelo Professor Bergmann Ribeiro, do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB.

7.24.2) Construção do Baculovírus Recombinante

As populações de baculovírus recombinantes foram produzidas através da combinação de plasmídeo de transferência e vírus selvagem.

O sistema pFASTBac permite a construção do vírus recombinante mediante a transformação da linhagem bacteriana comercial DH10Bac™ (Gibco BRL®). DH10Bac possui o genoma do *Autographa californica mononucleopoliedrovírus* (AcMNPV) modificado de forma a se comportar como bacmídeo e carrear o gene para β-galactosidase sobre o locus da poliedrina (Luckow e cols., 1993). Sendo assim, colônias contendo

populações de baculovírus recombinante puderam ser fenotipicamente selecionados pela não conversão do substrato x-gal (colônias brancas), enquanto colônias contendo população selvagem continuam capazes de converter o substrato (colônias azuis). Transformação e seleção e recombinantes foram realizadas conforme instrução do fabricante.

Já o sistema BacHis (INVITROGEN®) demanda a co-transfecção simultânea das células com este vetor de transferência e DNA do vírus BacNblue, o qual possui gene para β -galactosidase (*lacZ*) sobre o locus *polhi*, de forma que a construção das populações de vírus recombinantes ocorre por eventos de recombinação homóloga catalisadas pela própria maquinaria da célula de inseto (Wang e cols., 1991). Dessa forma o gene (clone 9) de interesse foi liberado pela digestão do vetor pBluescript® SK com Kpn I e Pst I, o inserto liberado foi purificado e introduzido no *polylinker* do plasmídeo de transferência pBlueBacHis2B (INVITROGEN®) mediante clonagem da fase aberta de leitura completa do gene. O DNA plasmidial foi extraído e co-transfectado com o DNA do vírus BacNblue, segundo instruções do fabricante.

Considerou-se que populações de vírus continham recombinantes quando placas de células infectadas apresentaram dois fenótipos: a) occ^+ (occlusion positive) para o vírus selvagem; e, b) azuis, occ^- (occlusion negative) uma vez que o plasmídeo de transferência cede simultaneamente tanto o gene de interesse quanto 5'*lacZ*, regenerando o fenótipo azul.

Normalmente, células e sobrenadante foram coletadas para ensaios após 72 horas de infecção. O isolamento do DNA e de BVs de células infectadas foi executado conforme descritos por O'Reilly e cols. (1992).

O gene da pró-forma da trypsin-like também foi submetido a esse sistema, liberando-se o fragmento gênico pela digestão do vetor pGEX com Bam HI e Xho I, o inserto liberado foi purificado e introduzido no *polylinker* do plasmídeo de transferência pBlueBacHis2B (INVITROGEN®) mediante clonagem da fase aberta de leitura completa do gene. Os demais procedimentos foram iguais aos já citados.

7.25) Em Sistema Procariótico

7.25.1) Construção dos Vetores para Expressão em *E. coli*

A seqüência gênica do clone 1 foi submetida ao sistema de expressão PET (Novagem®) com o plasmídeo PET 17B. Dessa forma o gene de interesse foi liberado pela digestão do vetor pBluescript® SK com Bam HI e Xho I (Figura 1a), sendo que o inserto liberado foi purificado e introduzido no 'polylinker' do plasmídeo mediante clonagem da fase aberta de leitura. Já a seqüência gênica do clone 30 foi submetida ao sistema de expressão pGEX (Pharmacia) com o plasmídeo pGEX5x3. A construção foi feita mediante a retirada do peptídeo sinal da seqüência gênica sendo o inserto liberado pela digestão do vetor pBlueScript SK com Pvu II e Xho I.

O inserto liberado foi purificado e introduzido no 'polylinker' do vetor entres os sítios de Sma I e Xho I através de uma ligação abrupta na extremidade 5' do fragmento gênico, mediante clonagem da fase aberta de leitura (Figura 1b). Os sistemas de ligação foram transformados em *E. coli* da linhagem DH5 α . Após estabilização desses plasmídeos nessa linhagem os mesmos foram submetidos à análise de restrição. Também foram utilizados alternativamente outros vetores de expressão, como o sistema pMAL® (New England Biolabs™) com o plasmídeo PMALp, como também o vetor PET 28 a. As clonagens nesses vetores foram realizadas utilizando-se dois sítios de restrição que permitiram a manutenção da fase de leitura dos genes.



Figura 1A. Construção do vetor para expressão do clone 1 em sistema procariótico. Em **A** clone 1 em plasmídeo pBluScrip SK obtido da biblioteca de cDNA de glândulas salivares de *T. infestans* contendo fragmento gênico de 500pb em verde que foi excisado mediante a digestão com as enzimas de restrição Bam HI e Xho I encontrados em cada extremo do inserto. Em **B**) Esquema do plasmídeo pET17B/1 contendo o fragmento gênico (verde) de 500 pb clonado sobre o *polylinker* do vetor nos sítios Bam HI e Xho encontrados em cada extremo do inserto. O esquema mostra também a seleção para ampicilina (Ap).

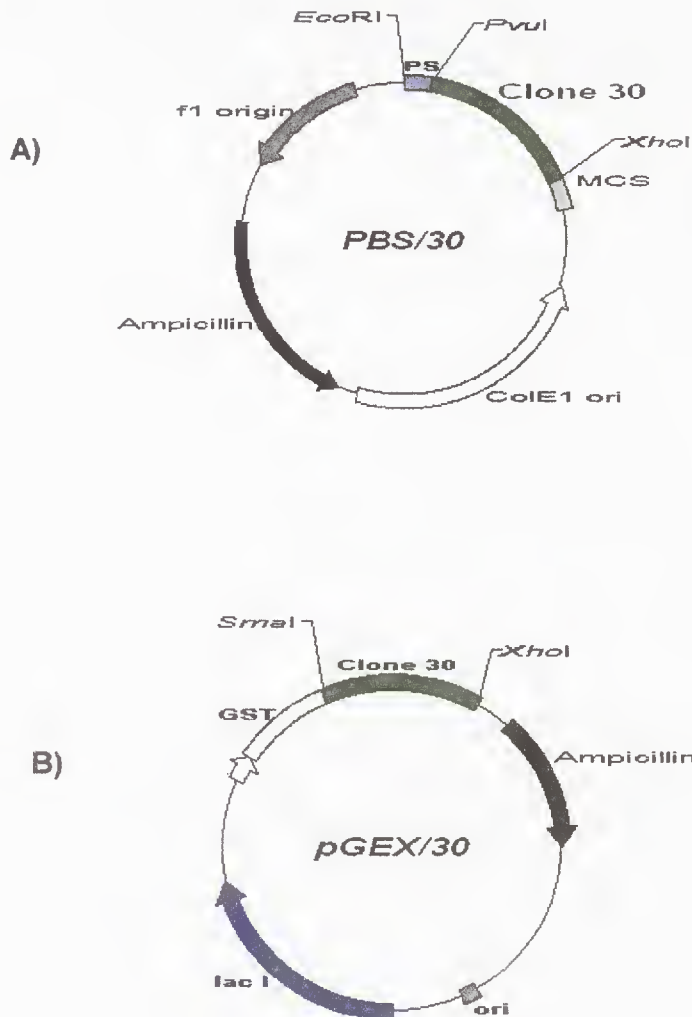


Figura 1B. Construção do vetor para expressão do clone 30 em sistema procariótico. Em **A** clone 30 em plasmídeo pBluScript SK obtido da biblioteca de cDNA de glândulas salivares de *T. infestans* contendo fragmento gênico de 800pb em verde que foi excisado mediante a digestão com as enzimas de restrição Pvu I após o peptídeo sinal mostrado em azul e Xho I no extremo do inserto. Em **B**) Esquema do plasmídeo de expressão pGEX/30 contendo o fragmento gênico (verde) de 800 pb clonado sobre o *polylinker* do vetor nos sítios Sma I e Xho I representados em cada extremo do inserto e a marca de seleção para ampicilina.

7.25.2) Expressão dos Clones 1 e 30 em *E coli*

Ambas construções obtidas conforme descrito na seção anterior foram utilizadas para transformar *E. coli* da linhagem BL 21-DE3 (clone 30) e DE3 pLys (clone1). Colônias contendo os vetores de expressão foram selecionadas em meio LB Agar contendo 100 µg/ml de ampicilina ou também foi adicionado 50 µg/ml de kanamicina no caso do vetor PET28a. No caso da cepa BL21pLys foram adicionados 34 µg/ml de cloranfenicol ao meio para a manutenção do plasmídeo pLys que codifica uma forma de lisosima, sendo por isso descrita como a cepa bacteriana de escolha para expressão heteróloga de diversos genes (Studier e cols., 1990 e Grimm & Arbutnot, 1995).

Uma vez que colônias isoladas de cada transformante foram obtidas, experimentos de expressão em pequena escala foram realizados. Para tanto a expressão das proteínas recombinantes foi verificada inoculando-se o clone de interesse em 5 ml de meio de cultura NZY contendo o antibiótico adequado e crescido a 37 °C sob agitação de 250 rpm, por aproximadamente 3 horas até que uma OD_{600nm} de 0,5 para o clone 1 e 1,2 para o clone 30, fosse atingida. Neste momento, alíquotas de 1,0 ml de cada cultura não induzida foram recolhidas, centrifugadas a 12.000 x g em microcentrifuga por 1 min, e cada sedimento ressuspense em 100 µl de tampão de amostra 1x. IPTG (Isopropil-1-tio-galactopiranosídeo) foi então adicionado na concentração final de 0,4 (clone1) e 1 mM (clone 30), ao restante da cultura, sendo o sistema novamente incubado nas mesmas condições e alíquotas foram coletadas em diferentes tempos após a indução e analisadas por SDS-PAGE. Como controle negativo foi utilizado o plasmídeo vazio (sem inserto) sob as mesmas condições.

Após a verificação da expressão da proteína recombinante foram realizados experimentos de expressão em larga escala para o clone 30, onde placas de NZY adicionadas de 1,5% de agar contendo o antibiótico adequado eram semeadas com a bactéria contendo o clone recombinante e incubadas a 37 °C durante a noite . No dia seguinte a placa foi lavada com meio o qual

foi inoculado em 100 ml de NZY contendo o antibiótico adequado. O crescimento da cultura ocorreu sob agitação a 250 rpm, 37 °C até atingir uma OD_{600nm} de 1,2 sendo então induzida com IPTG e a temperatura reduzida para 30 °C a fim de se evitar a formação de corpos de inclusão. Após 1 hora, a cultura foi centrifugada à 4.000xg por 10 min à 4 °C e cada sedimento foi congelado à -80 °C até a realização dos experimentos de purificação. Com relação ao clone 1 um volume 50 ml de cultura foram induzidos com 100µg/ml de ampicilina, após atingir uma OD_{600nm} de 0,5 com 0,4mM de IPTG. A cultura foi incubada sob agitação por 2 horas a 37 °C e centrifugada como descrito anteriormente. O sedimento foi ressuspensão em tampão de amostra (1x) e submetido a SDS-PAGE para posterior imunização de coelhos.

7.26) Eletroforese de Proteína em Gel de Poliacrilamida

Quantidades definidas de proteínas foram submetidas à eletroforese sob condições desnaturantes em géis de poliacrilamida *Sodium dodecyl sulfate – poliacrilamida gel electrophoresis* (SDS-PAGE), sob condições redutoras, conforme método originalmente descrito por Laemmli (1970). Foram utilizados os sistemas de eletroforese vertical. Os géis foram preparados segundo protocolo descrito em *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol 2, pg 10. 2A.4 a 10. 2A.9 (2000), com concentrações de 10, 12 e 15% no gel separador e 3,9% no gel concentrador.

Após a eletroforese o perfil das proteínas pode ser visualizado por meio de dois protocolos distintos de coloração: a) imersão dos géis em Comassie Brilliant Blue R-250, ou b) tratamento dos géis com solução de nitrato de prata (AgNO₃), ambos protocolos descritos no compêndio editado por Bollag e cols., (1996).

7.27) Imunização de Coelhos e Obtenção de Anticorpos Policlonais

Anticorpos policlonais contra a proteína recombinante foram produzidos em coelhos. Foram selecionados animais do sexo masculino, com 4-5 meses de idade, que foram imunizados com a banda da proteína (50 µg) produzida em PET 17B, excisada do gel SDS-PAGE 14% e homogeneizada em OMMINI MIXER 1706 (Sorvall, Inc.). A suspensão de poli-acrilamida contendo aquela quantidade de proteína foi injetada por via subcutânea em coelhos, em três ocasiões com intervalos de 15 dias. Duas semanas após a última imunização, os coelhos tiveram o sangue colhido por punctura cardíaca. O soro obtido foi testado por *Western blot* contra antígenos da proteína nativa da saliva e da proteína recombinante. Em experimento controle, esses mesmos antígenos foram testados por *Western blot* contra o soro pré-imune obtido dos mesmos animais.

7.28) *Western blot*

Os procedimentos descritos foram realizados conforme descrito no compêndio editado por Bollag e *co/s.*, (1996). Após a separação por SDS-PAGE as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose em sistema semi-seco (Biorad™) durante 1h e 20 min a uma amperagem constante de 0,8mA/cm² de gel em tampão de transferência (Tris HCL 48,4Mm, Glicina 39 mM, SDS 0,037 % e Metanol 20%). Após a transferência, as proteínas adsorvidas à membrana foram visualizadas utilizando-se do corante Ponceau-S e bloqueadas por tampão PBS contendo 5% leite desnatado durante 2 horas a temperatura ambiente ou durante a noite à 4^oC.

Soros pré-imune ou imune foram utilizados como fonte de anticorpo primário. Os soros foram diluídos em 1: 100 em tampão PBS contendo 2% de leite desnatado durante a noite, a 4 °C. Após a lavagem e tampão PBS adicionou-se o anticorpo secundário (Anti-IgG coelho conjugado com peroxidase - SIGMA) numa diluição de 1:1000, incubado por duas horas a temperatura ambiente. Após três lavagens as membranas foram reveladas

com solução de 10 mg de diaminobenzidina (DABI-Sigma) dissolvida em 30 ml de PBS, à qual adicionou-se 1% de peróxido de hidrogênio 30%. A reação foi interrompida com a lavagem das membranas em água destilada.

No experimento de identificação da proteína recombinante de fusão produzida em PET17B o anticorpo monoclonal IgG_{2b} T7. Tag® (conjugado com fosfatase alcalina-NOVAGEN®) foi utilizado na proporção de 1:1000 em PBS 2% por 2 hs. A membrana foi lavada três vezes com PBS 1x e incubada com tampão para fosfatase alcalina contendo os substratos (BCIP/NBT).

7.29) Imunocitocalização

As glândulas salivares de *T. infestans* foram extraídas como descrito anteriormente sendo os três pares separados. O material foi fixado, em paraformaldeído 2% e glutaraldeído 0,17%, em tampão de cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4, contendo 4% de sacarose, durante a noite. O tecido foi desidratado em gradiente de etanol e embebido em parafina. Secções de 0,4 µm foram cortadas e montadas em lâmina de vidro. A parafina foi então removida com xileno e o tecido reidratado em gradiente de etanol em água. As lâminas foram lavadas com tampão TBS (150 mM de NaCl, 100 mM de Tris, pH 7,5) e tratadas com glicina 100 mM em TBS por 10 minutos. Os sítios específicos foram bloqueados por 30 minutos à temperatura ambiente, com 1% de albumina sérica bovina e 1% de leite em pó desnatado, diluído em TBS. Secções de três pares de glândulas foram incubadas com soro de coelho imunizado com a proteína recombinante por uma noite. Como controle foi utilizado soro pré-imune do mesmo animal. Após três lavagens em PBS, as lâminas foram incubadas com o segundo anticorpo fluoresceinado anti-IgG de coelho (Zimed Laboratories Inc, San Francisco, CA).

7.30) Purificação da Proteína Recombinante

A proteína recombinante referente ao clone 30 (rTrialisina-like) foi purificada pelo módulo de purificação de proteínas de fusão com a GST (Glutathione S-transferase) da Pharmacia Biothech. O sistema consiste de uma cromatografia de afinidade à Glutathione Sepharose. O sedimento resultante da indução foi ressuspenso em 4 ml de PBS 1x e lisozima na concentração final de 1 mg/ml. A suspensão foi incubada por 30 minutos em gelo e então foram adicionados de 10 ml de triton 100% numa concentração final de 0,2% e 5 µg/ml de DNase e RNase. O lisado foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugado a 14.000 x g por 30 min a 4 °C.

O sobrenadante contendo a fração solúvel foi utilizado como amostra no procedimento de purificação. A matriz foi colocada em um tubo Falcon e centrifugada a 500 X g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram feitos três procedimentos de lavagem com PBS. A matriz foi equilibrada com 1 volume da PBS 1x e a amostra foi, então, adicionada. A mistura foi incubada sob agitação leve durante 30 min a temperatura ambiente e, depois, centrifugada a 500 x g por 5 min.

O sobrenadante contendo as proteínas que não se ligaram foi colhido. A matriz foi então lavada com 60 volumes da matriz com tampão PBS 1x. As proteínas ligadas foram eluídas pela adição de 1 volume de tampão de eluição (10 mM de glutathione reduzida, 50 mM de Tris HCL, PH 8,0) e incubada por 10 min sob agitação leve e, então, centrifugada da mesma forma que as anteriores. O sobrenadante contendo as três frações contendo a proteína recombinante foi obtido e guardado a 4 °C. A proteína nas frações eluídas foi separada por SDS-PAGE e corada com coomassie ou identificada pelo *Western Blot* como descrito anteriormente.

7.31) Ativação Proteolítica da rTrialisina

Após a purificação e quantificação da proteína recombinante, a saliva foi utilizada para ativar a rTrialisina uma vez que a tripsina bovina não nos deu o resultado esperado. A saliva de *T. infestans* foi colhida e estocada em forma de alíquotas a -80°C . Para a ativação da rTrialisina a saliva foi diluída e incubada com quantidades variáveis da proteína recombinante. Para confirmar se houve clivagem a proteína recombinante com e sem saliva foi analisada paralelamente em gel SDS-PAGE e por *Western blot* utilizando como primeiro anticorpo anti-trialisina. Posteriormente foi testada a atividade da proteína ativada. A especificidade da clivagem da proteína recombinante foi verificada através da incubação da mesma com tripsina bovina (SIGMA). Uma solução estoque de tripsina a uma concentração de 10 mg/ml foi diluída para 1:100 e 1:1000. A reação foi realizada incubando-se 200 ng da proteína recombinante e 2 μl (1:100 e 1:100) de tripsina, separadamente. Após intervalo de 15 e 30 minutos alíquotas foram coletadas e analisadas em gel SDS-PAGE.

7.32) Caracterização Funcional da rTrialisina

7.32.1) Atividade Microbicida

Essa atividade foi avaliada sobre os seguintes parasitas:

7.32.1.1) *Trypanossoma cruzi*

A atividade microbicida da proteína recombinante foi testada contra o estoque Berenice de *T. cruzi*. Formas tripomastigotas foram cultivadas em meio DMEM (SIGMA) contendo 5% de soro fetal bovino. Para o teste utilizou-se $1,0 \times 10^6$ formas do parasita que foram incubadas com 20 μg de rTrialisina purificada e 10 μg de saliva de *T. infestans* num volume final de 500 μl . A mistura foi incubada a 37°C , e o número de parasitas vivos

foram contados em câmara de Newbauer em intervalos de 1/3, 1, 2, 3, 4, 6, 9, 24 e 48 horas de incubação.

7.32.1.2) *Leishmania donovani*

Esse teste foi realizado com formas de *Leishmania donovani* cultivadas em meio DMEM (SIGMA) contendo 10% de soro fetal bovino. Para o teste utilizou-se $1,0 \times 10^6$ formas do parasita que foram incubadas com 20 µg da rTriaIsina purificada e 10 µg de saliva de *T. infestans* num volume final de 500 µl. A mistura foi incubada a 28 °C, e o número de parasitas vivos foram contados em câmara de Newbauer em intervalos de 1/3, 1, 2, 4, 5, 9, 24 e 48 horas.

7.32.2) Teste em Fibroblastos Murinos da Linhagem L6

A atividade da proteína recombinante e do soro imune específico contra células L6 foi avaliada *in vitro*. Cinquenta mil células foram semeadas em placas (Lab. Teck tissue slides) de 2 poços e incubadas por 24 horas até aderirem completamente à lâmina. Após 2 dias em cultivo as células formaram de monocamada e foram infectadas com tripomastigotas de *T. cruzi*-βgal (Buckner e cols., 1999) numa relação de 1:5. Após 96 horas de incubação iniciou-se o tratamento. Os experimentos foram divididos em grupos: A) controles, não-tratados; B) tratados com rTriaIsina recombinantes; C) incubados com saliva nativa; D) Incubados com mistura de soro imune + rTriaIsina; D) Incubados com rTriaIsina + soro pre-imune. As doses dos reagentes foram administradas com intervalos de 12 horas, 4, 5 e 6 dias pós-infecção. No decorrer dos experimentos, foram tomadas alíquotas do sobrenadante do meio de cultura para contagem do número de tripomastigotas móveis. Os dados referentes ao experimento de tratamento estão apresentados no Quadro 1.

Após a última administração dos reagentes, as culturas de células infectadas-tratadas foram lavadas com DMEM e com PBS e, posteriormente fixadas em glutaraldeído a 0,2%, durante 5 min. As células parasitadas

foram coradas com técnica descrita por Promega: s “Protocols and Applications Guide” p. 228, 1996, com o substrato X-GAL. Resumidamente, as células fixadas com glutaraldeído foram lavadas duas vezes com PBS 1x. Em seguida adicionou-se a solução de coloração (PBS 1x, + 1 mg/ml de X-GAL + 2 mM de cloreto de magnésio + 5 mM de cianeto de potássio) e a reação procedeu durante 2 horas até que todas as células parasitadas ficassem azuis. A reação foi interrompida com duas lavagens das células em PBS 1X.

As preparações foram cobertas com lamínulas sobre glicerina tamponada e as células azuis foram contadas em cinquenta campos microscópicos usando-se objetiva de 40X e ocular de 10X.

Quadro 1: Administração de rTrialisina em cultura de células L6 infectadas com *T. cruzi*

Grupos	Tratamento	Dia1		Dia2		Dia3	
A	Controle	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
B	rTrialisina*	2 µg	5µg	10µg	15µg	20µg	20µg
C	Saliva	1,5 µg	2,5µg	5µg	10µg	10µg	10µg
D	Soro imune	20 µl	20 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
E	rTrialisina + soro imune	2 µg + 20µl	5µg + 20µl	10 µg + 200µl	15 µg + 200µl	20 µg + 200µl	20 µg + 200µl
F	Trialisina + Soro pré- imune	2 µg + 20µl	5 µg + 20µl	10 µg + 200µl	15 µg + 200µl	20 µg + 200µl	20 µg + 200µl

- A rTrialisina foi administrada juntamente com saliva nativa na relação 2:1 (v/v), para sua ativação.

7.32.3) Teste Fosfolipase A₂

A atividade fosfolipásica da proteína recombinante foi testada utilizando-se o substrato fluorogênico NBD C₁₂-HPC [2-(12-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino) dodecanoyl-1-hexadecanoyl-sn-glycerol-3-(phosphocoline)] (Molecular Probes) e monitorada com um espectrofluorímetro (HITACHI F-2000). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram ajustados para 475 nm e 535 nm, respectivamente, sendo a absorbância de todas as amostras medida a 475nm. Para o teste utilizou-se 1µg da rTrialisina purificada ativada sob adição de 400 ng de saliva, como controle 400 ng de saliva total e 1 µg de rTrialisina não ativada. Como controle positivo 1 µg (1U) de PLA₂ de veneno de abelha (SIGMA). As reações foram pré-incubados durante 5 min e então adicionados em 2 mM Ca²⁺, 10mM TrisHcl pH 7.4, e 5µM NBD C₁₂-HPC. As reações foram iniciadas com um volume de 50 µl e incubadas por 1 hora, então foi acrescida a mistura (750 µl de tampão Tris-Hcl 10mM pH 7.4) e procedeu-se a leitura. As amostras foram feitas em triplicata.

7.32.4) Teste Hemolítico

A atividade hemolítica da proteína recombinante foi avaliada mediante coleta de amostras de sangue de um mesmo doador sadio do tipo O, fator Rh+, coletadas em 1 volume de solução de Alsever (Glicose 30 mM, Citrato de Sódio 20mM, Cloreto de Sódio 20mM, pH 6.1). Esse material foi utilizado por até duas semanas após a coleta.

Para a realização do teste uma alíquota de sangue coletado em solução Alsever foi lavada com 10 ml de solução salina (Cloreto de Sódio 150 mM) três vezes a 3000 rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado durante a lavagem. Após a última lavagem as hemácias foram ressuspensas em 10 ml de solução salina.

O teste foi padronizado para uma quantidade de hemácias suficiente para uma leitura na densidade óptica de 405 nm (leitor de placas Dynatec MR

5000) ficasse no intervalo de 0,5-0,7 para lise total, obtida com o rompimento das hemáceas com água pura (Milli Q. Milipore Corporation, USA).

Na reação de hemólise 20 µg de proteína recombinante purificada, 11 µg de saliva total de *T. infestans*, hemácia, e 100mM Tris-HCl pH 8,150mM cloreto de sódio foram incubados por 20 minutos, 1 e 2 horas, como também seus controles contendo somente saliva (11 µg), rTrialisina não ativada (20 µg) e tampão da coluna GST. A cada tempo uma alíquota foi centrifugada e o sobrenadante submetido à leitura em 405 nm como descrito anteriormente.

7.32.5) Teste Bacteriolítico

A atividade antibacteriana foi avaliada utilizando-se *E.coli* BL21-DE3 e o número de colônias formadas após a adição da proteína foi contada. Utilizou-se 20 µg da proteína recombinante ativada com 10 µg de saliva foram incubada com 1×10^6 bactérias para um volume final de 200 µl por 2 horas e então 5 µl da mistura foram diluídos em 100 µl de meio e 50 µl foram plaqueados em meio rico LB agar. As placas foram incubadas a 37° C durante a noite e então procedida a contagem das colônias. Como controle foram feitos as mesmas reações com o mesmo número de bactérias contendo só saliva (10 µg), só tampão de eluição da coluna (mesmo volume contido na recombinante) e não tratadas.

RESULTADOS

8. RESULTADOS

8.1) Varredura da livraria de cDNA da glândula salivar de *T. infestans*

A varredura de uma livraria de cDNA da glândula salivar do triatomíneo com anticorpos policlonais produzidos em coelhos foi feita conforme procedimento descrito por Feijó (2001). A identificação e seleção de clones em três *screenings* subseqüentes permitiram o isolamento daqueles fortemente positivos em vários experimentos.

8.2) Análises da Sequências Gênicas

Os 20 clones selecionados em plasmídeo pBluescript, apresentaram fragmentos gênicos de tamanhos diferentes, sendo 10 desses clones submetidos ao sequenciamento manual e seqüenciamento automático. Desses clones seis foram seqüenciados totalmente (clones, 1, 4, 9, 23, 10 e 30), e quatro o foram parcialmente (2, 6, 13 e 12). As seqüências gênicas obtidas foram analisadas revelando a presença de cauda poli A e uma fase aberta de leitura. O alinhamento dessas seqüências mostrou que esses clones encerravam o mesmo gene. Essa conclusão foi confirmada pela dedução de uma proteína putativa, cujos aminoácidos são muito parecidos como ilustra o alinhamento na Figura 2.

Então, tomamos a seqüência do clone 30 como representativa desse conjunto. Em seguida, usamos essa seqüência para identificar clones complementares entre os demais representados na mesma livraria. O *Southern blot* confirmou que a existência de uma gama de clones com

seqüências complementares identificados por sinal positivo para a sonda utilizada na hibridização, como mostra a Figura 3.

clone 4	KLPFFRI IMSKFWLLLLLVTAQFAHSYPAVEYEVDEYINDEADDYLSDEDTLGNVIQLTMSKLDNYKT	70
clone 10	0
clone 30	..SLFRITMSKFWLLLLLVAAQFAHSYPAAEYELDETTNDEVROFI.....	45
clone 23KFWLLLLLVAAQFAHSYPAAEYELDETTNDEVROFI.....	37
clone 9	0
clone 1	0
clone 4	NDKNGTINKIVAIIRDKYCGIQEDFEDDYQSDETDQKVYVYRLLQTFRKFDKANDNWAQKEDKFNVALA	140
clone 10DFEDDYQSDETDQKVYVYRLLQTFRKFDKANDNWAQKEDKFNVALA	48
clone 30	45
clone 23	37
clone 9	0
clone 1	0
clone 4	ILRKKFCVLSLSPLESDDYEDADYVGGDGYFEDEGDDGDEERFKIKPGKVFDFKGVVGVKSSKQLKKVS	210
clone 10	ILRKKFCVLSLSPLESDDYEDADYVGGDGYFEDEGDDGDEERFKIKPGKVFDFKGVVGVKSSKQLKKVS	118
clone 30GDGYFEDEGDDGDEERFKIKPGKVFDFKGVVGVKSSKQLKKVS	88
clone 23GDGYFEDEGDDGDEERFKIKPGKVLDFKGVVGVKSSKQLKKVS	80
clone 9	0
clone 1	0
clone 4	LVAKLAMKKGAAALLKMGVKISPLKCEERTKSCVTKIPTENSFCLTIRFMKTNIAIYLVVAGEINRK	280
clone 10	LVAKLAMKKGAAALLKMGVKISPLKCEERTKSCVTKIPTENSFCLTIRFMKTNIAIYLVVAGEINRK	188
clone 30	LVAKLAMKKGAAALLKMGVKISPLKCEERTKSCVTKIPTENSFCLTIRFMKTNIAIYLVVAGEINRK	158
clone 23	AVAKVAMKKGAAALLKMGVKISPLKCEERTKSCVTKIPTENSFCLTIRFMKTNIAIYLVVAGEINRK	150
clone 9KMGVKISPLKCEERTKSCVTKIPTENSFCLTIRFMKTNIAIYLVVAGEINRK	55
clone 1KSCVTKIPTENSFCLTIRFMKTNIAIYLVVAGEINRK	40
clone 4	FEEKLKLGNMPCVAVESLTKVCLGTEGHAKSSSGQAVVFCILVAEKFGVGAFLGCIANKKVR	350
clone 10	FEEKLKLGNMPCVAVESLTKVCLGTEGHAKSSSGQAVVFCILVAEKFGVGAFLGCIANKKVR	258
clone 30	FEEKLKLGNMPCVAVESLTKVCLGTEGHAKSSSGQAVVFCILVAEKFGVGAFLGCIANKKVR	228
clone 23	FEEKLKLGNMPCVAVESLTKVCLGTEGHAKSSSGQAVVFCILVAEKFGVGAFLGCIANKKVR	220
clone 9	FEEKLKLGNMPCVAVESLTKVCLGTEGHAKSSSGQAVVFCILVAEKFGVGAFLGCIANKKVR	125
clone 1	FEEKLKLGNMPCVAVESLTKVCLGTEGHAKSSSGQAVVFCILVAEKFGVGAFLGCIANKKVR	110
clone 4	IVSPQLFPGATSVDGDIVKLDNNGEDATVEVEVEID.....	388
clone 10	IVSPQLFPGATSVDGDIVKLDNNGEDATVEVEVEIDKIFYIDN	302
clone 30	IVSPQLFPGATSLDGDIVKLEDNGEDAATLDVDEVEID.....	266
clone 23	IVSPQLFPGATSLDGDIVKLDNNGEDATLDVDEVEID.....	258
clone 9	IVSPQLFPGATSLMVIIVKLDNNGECCNVGC.....	157
clone 1	IVSPQLSRRHASRW.....	125

Figura 2. Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos dos clones totalmente seqüenciados obtidos de uma biblioteca de cDNA de saliva de *T. infestans* mostrando a alta similaridade entre eles.

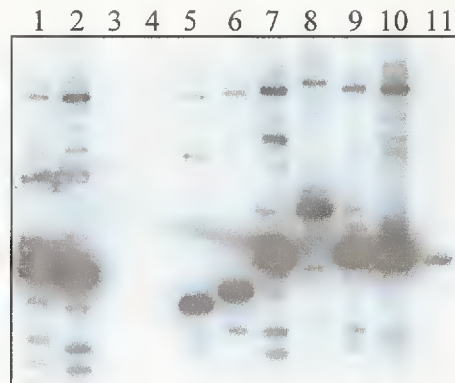


Figura 3: *Southern blot* com sonda radioativa da seqüência do clone 30 usada para identificar outros complementares oriundos da livreria de cDNA da glândula salivar do triatomíneo. Nas colunas 1, 2, 5-10 encontram sinais positivos fortes nas bandas formadas com vários clones em pBluescript digeridos com Eco RI e Xho I. Nas colunas 3 e 4 há ausência de bandas (controles negativos) com os plasmídeos pGEM e TOPO. A coluna 11 é o controle positivo, onde a sonda hibridiza com a seqüência do clone 30.

8.3) Clone30

A seqüência nucleotídica e de aminoácidos do clone 30 possui 877 nucleotídeos e a fase aberta de leitura obtida à partir da análise do programa DNA MAN de 266 aminoácidos. O programa PSORT versão 6.4 (1999) identificou um peptídeo sinal de 25 aminoácidos e uma possível proteína madura de 27007 Da. Os resultados mais significativos de localização celular foram de 0,556% de probabilidade da proteína ser secretada pela glândula, 22% de ser de membrana de retículo endoplasmático, 11,1% de ser de citoplasma e 11,1% de ser de vacúolo. O programa exclui a possibilidade da proteína ter localização nuclear. O programa PROSITE (A Bairoch; P Bucher & K Hofmann) localizou cinco sítios de fosforilação a proteína Quinase cAMP, cGMP, C, Caseino Quinase, dois sítios de sulfatação, e dois sítios de meristoilação Figura (4a). Ambos os programas não identificaram sítios de glicosilação.

Clone 30

```

1      AAGTGATCCTTATTTAGAATTACAATGTCAAAGTTTTGGCTGTTATTGCTGCTTGTAGCT
1      M S K F W L L L L L V A

61     GCATTCCAATTTGCTCATTTCATATCCAGCTGCTGAATATGAACTTGATGAAACTACTAAC
21     A F Q F A H S Y P A A E Y E L D E T T N

121    GATGAAGTCAGACAATTTATTGGCGATGGTTATTTGAAGATGAAGGAGACGATGGAGAT
41     D E V R Q F I G D G Y F E D E G D D G D

181    GAAGAACGATTTAAGATTAACCTGGAAAAGTATTTGACAAAGTTGGGAAAGTAGTTGGT
61     E E R F K I K P G K V F D K V G K V V G

241    AAAGTTCTAAAACAATTAAGAAAAGTTAGTTGGTTGCTAAGCTGGCTATGAAGAAAGGA
81     K V L K Q L K K V S L V A K L A M K K G

301    GCAGCTCTTCTTAAGAAGATGGGTGTGAAGATCAGCCCATTAAAATGCGAAGAGAAAACA
101    A A L L K K M G V K I S P L K C E E K T

361    TGCAAGAGCTGTGTCATATTCAAAATACCTACTGAAAATTCTTTTGCCTGACTATTAGA
121    C K S C V I F K I P T E N S F C L T I R

421    TTTATGAAGACAAATATAGCCACTTATTTGGTCGTTGCTGGAGAGATAAACCGAAAATCT
141    F M K T N I A T Y L V V A G E I N R K S

481    AAATTTGAAGAGAAACTCAAATTGGGAAATATGCCAGATGTGTGAACGTGGAGGGATTT
161    K F E E K L K L G N M P R C V N V E G F

541    ATAGGTAAAGTCTGTATGAAGGGCATTGAAGGACATGCAAAATCTAGTTCTGGTCAAGCT
181    I G K V C M K G I E G H A K S S S G Q A

601    AATGTCAATTTCTGCTGGGGACTCGTCGCTGAAAAATTTGGTGTGCGGCCTAAATTGTGT
201    N V N F C W G L V A E K F G V G A K L C

661    GGTATATATGCAAAATAAGAAAGTAAGGGTGAAGATCACCACAATTATTTCCAGGAGCC
221    G I Y A N K K V R V K V S P Q L F P G A

721    ACGAGTCTCGATGGTGATATTGTCAAATTTGGAGGACAATGGAGAAGATGCAGCAACGTTG
241    T S L D G D I V K L E D N G E D A A T L

781    GATGTTGATGAAGTTGAAATTTGATTAATAATTTTATCTAGATAATTGACATTATCAAATA
261    D V D E V E I D *

841    ATAAATAAATTCAACCGATAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 4a. Sequência nucleotídica e de aminoácidos do clone 30. Sítio de poliadenilação e cauda poli A aparecem em vermelho. O peptídeo sinal foi marcado em verde, os sítios de sulfatação em rosa, e os sítios de meristoilação em azul. Em amarelo estão os aminoácidos envolvidos no sítio ativo predito na estrutura terciária. Em negrito uma região rica em resíduos de lisina Sublinhados simples e duplo representam os sítios de fosforilação pela proteína Quinase C e de fosfolilação à Caseino Quinase II, respectivamente. Em caixa foi colocado o sítio de fosforilação proteína Quinase cAMP-cGMP-dependente.

8.3.1) Clone 1

A seqüência nucleotídica e de aminoácidos do clone 1 possui 476 nucleotídeos e a fase aberta de leitura obtida à partir da análise do programa DNA MAN 154 aminoácidos. O programa PSORT versão 6.4 (1999) não identificou um peptídeo sinal e identificou uma possível proteína madura de 17230 Da. Os resultados mais significativos de localização celular foram de 30,4% da proteína ser nuclear, 39,4% de ser de citoplasma, 4,3% de ser de vesícula de sistema secretório, 21,7% de ser mitocondrial e 4,3% de ser de Golgi. O programa PROSITE (A Bairoch; P Bucher and K Hofmann) localizou dois sítios de fosforilação a Quinase C e um a caseína Quinase II e três sítios de meristoilação (Figura 4b) Ambos os programas não identificaram sítios de glicosilação.

8.3.2) Clone 9

A seqüência nucleotídica e de aminoácidos do clone 9 possui 566 nucleotídeos e a fase aberta de leitura obtida à partir da análise do programa DNA MAN 181 aminoácidos. O programa PSORT versão 6.4 (1999) não identificou um peptídeo sinal e identificou uma possível proteína madura de 19871 Da. Os resultados mais significativos de localização celular foram de 52% da proteína ser nuclear, 26,1% de ser de citoplasma, 8,7% de ser de vesícula de sistema secretório, 8,7% de ser mitocondrial e 4,3% de ser de vacúolo. O programa PROSITE (A Bairoch; P Bucher and K Hofmann) localizou dois sítios de fosforilação a Quinase C e um a caseína Quinase II, dois sítios de meristoilação e um sítio ativo de cisteína aldeído desidrogenase (Figura 4c) .Ambos os programas não identificaram sítios de glicosilação.

Clone 1

```

1   CATGCAAGAGCTGTGTCATATTCAAATACCTACTGAAAATTCTTTTTGCCTGACTATTA
1   C K S C V I F K I P T E N S F C L T I

61  GATTTATGAAGACAAATATAGCCACTTATTTGGTCGTTGCTGGAGAGATAAACCGAAAAT
20  R F M K T N I A T Y L V V A G E I N R K

121 CTAAATTTGAAGAGAAACTCAAATTGGGAAATATGCCCAGATGTGTGAACGTGGAGGGAT
40  S K F E E K L K L G N M P R C V N V E G

181 TTATAGGTAAAGTCTGTATGAAGGGCATTGAAGGACATGCAAAATCTAGTTCTGGTCAAG
60  F I G K V C M K G I E G H A K S S S G Q

241 CTAATGGCAATTTCTGCTTGGGACTCGTCGCTGAAAAATTTGGTGTGGGCGCTAAATTGT
80  A N G N F C L G L V A E K F G V G A K L

301 GTGGTATATATGCAAATAAGAAAGTAAGGGTGAAAATATCACCCCAATCTATTTCCAGGC
100 C G I Y A N K K V R V K I S P Q S I S R

361 GCCACGCGTCTCGATGGTGATATTCTCAAATTAATTTGATTAAAAATTTTATCTAGATAA
120 R H A S R W * Y S Q I K L I K N F I * I

421 TTCACATTATCAAATAATAATAAATTCACCGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
140 I H I I K * * I N S T D K K K K K K K

```

Figura.4b Seqüência nucleotídica e de aminoácidos do clone 1. Sítio de poliadenilação e cauda poli A aparecem em vermelho e os sítios de meristoilação em azul. Sublinhados simples e duplo indicam os sítios de fosforilação à proteína Quinase C, e de fosfolilação à Caseína Quinase II, respectivamente.

Clone 9

```

1   AAGATGGGTGTGAAGATCAGCCCATTAAAATGCGAAGAGAAAACATGCAAGAGCTGTGTC
1   K M G V K I S P L K C E E K T C K S C V

61  ATATTCAAATACTACTGAAAATTCTTTTTGCCTGACTATTAGATTTATGAAGACAAAT
21  I F K I P T E N S F C L T I R F M K T N

121 ATAGCCACTTATTTGGTCTGTTGCTGGAGAGATAAACCGAAAATCTAAATTTGAAGAGAAA
41  I A T Y L V V A G E I N R K S K F E E K

181 CTCAAATTGGGAAATATGCCAGATGTGTCAACGTGGAGGGATTTATAGGCAAAGTCTGT
61  L K L G N M P R C V N V E G F I G K V C

241 TTGAAGGGCATTGAAGGACATGCAAATCTAGTTCTGGTCAAGCTAATGTCAATTTCTGC
81  L K G I E G H A K S S S G Q A N V N F C

301 TTGGGACTCGTCTGCTGAAAATTTGGTGTCTGGCGCTAAATTTGTGTGGTATATATGCAAAT
101 L G L V A E K F G V G A K L C G I Y A N

361 AAGAAAGTAAGGGTGAAAGTATCACCGCAATTATTTCCAGGAGCCACGAGTCTCATGGTG
121 K K V R V K V S P Q L F P G A T S L M V

421 ATTATTGTCAAATTTGGACGACAATGGAGAAGAGTGCAACAACGTTGGATGTTGATGAAGT
141 I I V K L D D N G E E C N N V G C * * S

481 TGAAATTGATTAATAATTTTATCCAGATAATTGACATTATCAAATAATAATAAATTCAC
161 * N * L K I L S R * L T L S N N K * I H

541 CGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

181 R * K K K K K K

```

Figura 4c Sequência nucleotídica e de aminoácidos do clone 9. Sítio de poliadenilação e cauda poli A aparece em vermelho e os sítios de sítios de meristoilação em azul. Sublinhados simples e duplo representam os sítios de fosforilação à proteína Quinase C e de fosfolilação à Caseína Quinase II, respectivamente. Em caixa está o sítio ativo cisteíno dehidrogenase.

8.3.3) Clone 23

A seqüência nucleotídica e de aminoácidos do clone 23 possui 847 nucleotídeos e a fase aberta de leitura obtida a partir da análise do programa DNA MAN 279 aminoácidos. O programa PSORT versão 6.4 (1999) identificou um peptídeo sinal de 17 aminoácidos e uma possível proteína madura de 28164 Da. Os resultados mais significativos de localização celular foram de 33% de probabilidade da proteína ser secretada pela glândula, 22,2% de ser de membrana de retículo endoplasmático, 22% de ser mitocondrial, 11,1% de ser de vacúolo e 11,1% de ser de Golgi. O programa exclui a possibilidade da proteína ter localização nuclear. O programa PROSITE (A Bairoch; P Bucher and K Hofmann) localizou dois sítios de fosforilação a Quinase C, cinco sítios de fosforilação a Caseino Quinase II, um sítio de fosforilação a Quinases cAMP e cGMP, dois sítios de meristoilação, uma região rica em resíduos de lisina e dois sítios de sulfatação a tirosina (Figura 4d). Ambos os programas não identificaram sítios de glicosilação.

8.3.4) Clone 4

A seqüência nucleotídica e de aminoácidos do clone 4 possui 1248 nucleotídeos e a fase aberta de leitura 411 aminoácidos. O programa PSORT (versão 6.4, 1999) identificou um peptídeo sinal de 19 aminoácidos e uma proteína madura de 43571 Da. Os resultados mais significativos de localização celular foram de 33% de chance de ser extracelular, 22,2% de ser de retículo endoplasmático, 22,2% de ser mitocondrial, 11,1% de ser de vacuolo e 11,1% de ter origem em Golgi. Não foi prevista a possibilidade de ser nuclear. O programa PROSITE (A Bairoch; P Bucher e K Hofmann) localizou dois sítios de fosforilação a Quinase C, quatro sítios de fosforilação a Caseino Quinase II, um sítio de fosforilação a Quinases cAMP e cGMP, três sítios de meristoilação, uma região rica em resíduos de lisina e quatro sítios de sulfatação a tirosina (Figura 4e).

Clone 23

```

1 AAAGTTTTGGCTGTTATTGCTGCTTGTAGCTGCATTCCAATTTGCTCATTATATCCAGC
1 K F W L L L L L V A A F Q F A H S Y P A

61 TGCTGAATATGAACTTGATGAAACTACTAACGATGAAGTCAGACAATTTATTGGCGATGG
21 A E Y E L D E T T N D E V R Q F I G D G

121 TTATTTTGAAGATGAAGGAGACGATGGAGATGAAGAACGATTTAAGATTAACCTGGAAA
41 Y F E D E G D D G D E E R F K I K P G K

181 AGTATTGGACAAATTTGGGAAAATAGTTGGTAAAGTTCTAAAACAATTAAGAAAAGTTAG
61 V L D K F G K I V G K V L K Q L K K V S

241 TGCGGTTGCTAAGGTGGCTATGAAGAAAGGAGCAGCTCTTCTTAAGAAGATGGGTGTGAA
81 A V A K V A M K K G A A L L K K M G V K

301 GATCAGCCCATTAAAATGCGAAGAGAAAACATGCAAGAGCTGTGTCATATTCAAAATACC
101 I S P L K C E E K T C K S C V I F K I P

361 TACTGAAAATTCTTTTTGCTGACTATTAGATTTATGAAGACAAATATAGCCACTTATTT
121 T E N S F C L T I R F M K T N I A T Y L

421 GGTCGTTGCTGGAGAGATAAACCGAAAATCTAAATTTGAAGAGAACTCAAATTTGGGAAA
141 V V A G E I N R K S K F E E K L K L G N

481 TATGCCCAGATGTGTGAACGTGGAGGGATTTATAGGCAAAGTCTGTTTGAAGGGCATTGA
161 M P R C V N V E G F I G K V C L K G I E

541 AGGACATGCAAAATCTAGTTCTGGTCAAGCTAATGTCAATTTCTGCTTGGGACTCGTCGC
181 G H A K S S S G Q A N V N F C L G L V A

601 TGAAAAATTTGGTGTGCGCGCTAAATTTGTGTGGTATATATGCAAATAAGAAAAGTAAGGGT
201 E K F G V G A K L C G I Y A N K K V R V

661 GAAAGTATCACCGCAATTATTTCCAGGAGCCACTAGTCTCGATGGTGATATTGTCAAATT
221 K V S P Q L F P G A T S L D G D I V K L

721 GGACGACAATGGAGAAGATGCAACAACGTTGGATGTTGATGAAGTTGAAATTGATTAATA
241 D D N G E D A T T L D V D E V E I D * K

781 ATTTTATCTAGATAAATTGACATTATCAAATAATAAATAAATTCAACCGATAAAAAAAAAA
261 F Y L D N * H Y Q I I N K F N R * K K K

841 AAAAAAA
281 K K

```

Figura 4d. Seqüência nucleotídica e de aminoácidos do clone 23. O possível peptídeo sinal e o sítio de poliadenilação aparecem em verde, a cauda poli A em vermelho, o sítio de meristoilação em azul, sítio de sulfatação a tirosina em rosa e uma região rica em resíduos de lisina. Em caixa está o sítio de fosforilação proteína Quinase cAMP-cGMP-dependente. Sublinhados simples e duplo estão os sítios de fosforilação à proteína Quinase C e à Caseino Quinase II

Clone 4

```

1   AAGTTACCATTTTTTAGAATTATCATGTCAAAGTTTTGGTTGTTATTGCTACTTGTAACT
1   M S K F W L L L L L V T
61  GCATTCCAATTTGCTCATTTCATATCCAGCTGTTGAATATGAAGTTGATGAATATATTAAC
21  A F Q F A H S Y P A V E Y E V D E Y I N
121 GATGAAGCTGATGATTACCTGAGCGATGAAGATACACTCGGCAATGTTATACAACCTAACT
41  D E A D D Y L S D E D T L G N V I Q L T
181 ATGAGCAAACCTCAAAGACAATTATAAGACAAATGACAAAAATGGAACGAACAAAATAGTA
61  M S K L K D N Y K T N D K N G T N K I V
241 GCTATTATTAGGGACAAATACTGTGGTCTACAGGAAGACTTTGAAGATGATTATCAAAGT
81  A I I R D K Y C G L Q E D F E D D Y Q S
301 GACGAAACACAAGATAAAGTCTATTACGTATACAGACTCCTTCAAACATTTAGGAAATTT
101 D E T Q D K V Y Y V Y R L L Q T E R K F
361 TATGACAAAGCTAATGATAACTGGGCACAGAAGGAAGATAAAATCAATGTAGCTCTTGCC
121 Y D K A N D N W A Q K E D K F N V A L A
421 ATACTTAGAAAATACTGTGTAGTTGAGCTCTCCGCTACTGGAAAAGTGATTACTAT
141 I L R K K K F C V S L S S P L L E S D Y Y
481 GAAGATGCTGATTATGTGGGGGGCGATGGTTATTTTGAAGATGAAGGAGACGATGGAGAT
161 E D A D Y V G G D G Y F E D E G D D G D
541 GAAGAACGATTTAAGATTAACCTGGAAAAGTATTTGACAAATTTGGGAAAAGTAGTTGGT
181 E E R F K I K P G K V F D K F G K V V G
601 AAAAGTTCTAAACAATTAAGAAAGTTAGTTTGGTTGCTAAGCTGGCTATGAAGAAAGGA
201 K S S K Q L K K V S L V A K L A M K K G
661 GCAGCTCTTCTTAAGAAGATGGGTGTGAAGATCAGCCATTAAAAATGCGAAGAGAAAAACA
221 A A L L K K M G V K I S P L K C E E K T
721 TGCAAGACTGTGTCGTATTCAAATACCTACTGAAAATCTTTTGCCTGACTATTAGA
241 C K S C V V F K I P T E N S F C L T I R
781 TTTATGAAGACAAATATAGCCACTTATTTGGTCGTTGCTGGTGAGATAAACCGAATATCT
261 F M K T N I A T Y L V V A G E I N R I S
841 AAATTTGAAGAGAACTCAAGTTGGGAAATATGCCAGATGTGTGAATGCGGGCGGATTT
281 K F E E K L K L G N M P R C V N A G G F
901 TTAGGTAAAGTCTGTTTGAAGGGCATTGAAGGACATGCAAAATCTAGTTCTGGTCAAGCT
301 L G K V C L K G I E G H A K S S S G A
961 AATGTCAATTTCTGCTGGGAGTCGTCGTTGAAAAATTTGGTGTGCGGCGGAAATCTGT
321 N V N F C L G V V A E K F G V G A K F C
1021 GGTGTATATGCAAATAAGAAAGTAAGGGTGAAAAATATCACCGCAATATTTCCAGGAGCC
341 G V Y A N K K V R V K I S P Q L F P G A
1081 ACGAGTGTGATGTTGATATTGTCAAATGGACGACAATGGAGAAGATGCAACAACGGTG
361 T S V D G D I V K L D D N G E D A T T V
1141 GAAGTTGAAGAAGTTGAAATGATTAATAAATTTATATAGATAATTGACATTATCAAATA
381 E V E E V E I D * K F Y I D N * H Y Q I
1201 ATAAATAAATTCACCAATAATAATTTACTTAAAAAAAAAAAAAAAAA
401 I N K F N Q * * F T * K K K K K

```

Figura 4e. Sequência nucleotídica e de aminoácidos do clone 4. Sítio de poliadenilação e cauda poli A ilustrados em vermelho. Em azul e em rosa aparecem os sítio de meristoilação e de sulfatação a tirosina. Região rica em resíduos de lisinas em negrito. Em caixa foi colocado o sítio de fosforilação proteína Quinase cAMP-cGMP-dependente. Sublinhados simples duplo e triplo indicam os sítios de fosforilação à proteína Quinase C, de fosforilação a Caseína Quinase II e de N-glicosilação, respectivamente.

8.3.5) Clone 10

A seqüência nucleotídica e de aminoácidos do clone 10 possui 963 nucleotídeos e a fase aberta de leitura possui 890 aminoácidos. O programa PSORT (versão 6.4, 1999) não identificou um peptídeo sinal e uma possível proteína madura de 32778 Da. Os resultados mais significativos de localização celular foram de 52% de chance da proteína ser citoplasmática, 26,1% de ser mitocondrial e 21,7 de ter localização nuclear. O programa PROSITE (A Bairoch; P Bucher and K Hofmann) localizou dois sítios de fosforilação a Quinase C, quatro sítios de fosforilação a Caseino Quinase II, um sítio de fosforilação a Quinases cAMP e cGMP, três sítios de meristoilação, uma região rica em resíduos de lisina e quatro sítios de sulfatação a tirosina (Figura 4f). Sítios de glicosilação não foram identificados.

Clone 10

```

1   AAGACTTTGAAGATGATTATCAAAGTGACGAAACACAAGATAAAGTCTATTACGTATACA
1   D F E D D Y Q S D E T Q D K V Y Y V Y

61  GACTCCTTCAAACATTTAGGAAATTTTATGACAAAGCTAATGATAACTGGGCACAGAAGG
20  R L L Q T F R K F Y D K A N D N W A Q K

121 AAGATAAATTCAATGTAGCTCTTGCCATACTTAGAAAAGAAATTCTGTGTAGTTTGAGCT
40  E D K F N V A L A I L R K K F C V S L S

181 CTCCGCTACTGGAAAGTGATTACTATGAAGATGCTGATTATGTGGGGGGCGATGGTTATT
60  S P L L E S D Y Y E D A D Y V G G D G Y

241 TTGAAGATGAAGGAGACGATGGAGATGAAGAACGATTTAAGATTAACCTGGAAAAGTAT
80  F E D E G D D G D E E R F K I K P G K V

301 TTGACAAATTTGGGAAAGTAGTTGGTAAAGTTCTAAAACAATTAAGAAAAGTTAGTTTGG
100 F D K F G K V V G K V L K Q L K K V S L

361 TTGCTAAGCTGGCTATGAAGAAAGGAGCAGCTCTTCTTAAGAAGATGGGTGTGAAGATCA
120 V A K L A M K K G A A L L K K M G V K I

421 GCCATTAAAATGCGAAGAGAAAACATGCAAGAGCTGTGTCGTATTCAAATACCTACTG
140 S P L K C E E K T C K S C V V F K I P T

481 AAAATTCTTTTTGCCTGACTATTAGATTTATGAAGACAAATATAGCCACTTATTTGGTGC
160 E N S F C L T I R F M K T N I A T Y L V

541 TTGCTGGTGAGATAAACCGAATATCTAAATTTGAAGAGAAACTCAAGTTGGGAAATATGC
180 V A G E I N R I S K F E E K L K L G N M

601 CCAGATGTGTGAATGCGGGCGGATTTTTAGGTAAAGTCTGTTTGAAGGGCATTGAAGGAC
200 P R C V N A G G F L G K V C L K G I E G

661 ATGCAAAATCTAGTTCTGGTCAAGCTAATGTCAATTTCTGCTTGGGAGTCGTCGCTGAAA
220 H A K S S S G Q A N V N F C L G V V A E

721 AATTTGGTGTGCGGCGGAAATTTCTGTGGTGTATATGCAAATAAGAAAGTAAGGGTGAAAA
240 K F G V G A K F C G V Y A N K K V R V K

781 TATCACCGCAATTATTTCCAGGAGCCACGAGTGTGATGGTGATATTGTCAAATTTGGACG
260 I S P Q L F P G A T S V D G D I V K L D

841 ACAATGGAGAAGATGCAACAACGGTGAAGTTGAAGAAGTTGAAATTGATTAATAATTTT
280 D N G E D A T T V E V E E V E I D * K F

901 ATATAGATAATTGACATTATCAAATAATAATAAATTCAACCTATAAAAAAAAAAAAAAAAA
300 Y I D N * H Y Q I I N K F N L * K K K K

961 AAA
320 K

```

Figura 4f. Seqüência nucleotídica e de aminoácidos do clone 10. Sítio de poliadenilação e cauda poli A estão em vermelho. Os sítios de meristoilação e de sulfatação da tirosina aparecem em azul e rosa, respectivamente. Região rica em resíduos de lisina em negrito. Em caixa foi colocado o sítio de fosforilação a proteína Quinase cAMP-cGMP-dependente. Sublinhados duplo e triplo mostram os sítios de fosforilação à proteína Quinase C, e de fosforilação a Caseino Quinase II, respectivamente.

8.4) Análise de Homologia em Banco de Dados

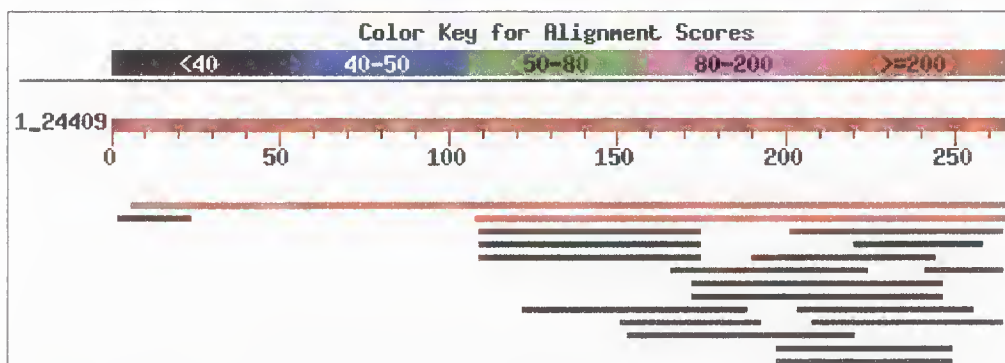
Ao longo do trabalho foram feitas inúmeras análises de homologias em bancos de dados e os resultados foram sempre negativos. Isso nos dava a indicação de que tínhamos um novo gene, cuja seqüência não tinha similaridades reconhecidas em outros genes depositados em bancos. Assim, não era possível obter informação sobre as características funcionais da (s) proteína (s) codificada (s) pelos genes com as estruturas lineares delineadas acima. Até que um dia encontramos a informação de que a estrutura primária do clone 30 apresentava 97% de similaridade com a proteína madura do gene da Trialisina de *T. infestans*, conforme mostrava a seqüência depositada por Sérgio Schenkman e colaboradores, da Escola Paulista de Medicina, conforme busca de homologia pelo programa BLAST (Amino et al., 2002), Figura 5. A perplexidade diante da realidade com que nos deparamos não nos impediu, todavia, de fazer o alinhamento entre a seqüência do nosso clone 30 (Figura 4a) com aquela da pró-trialisina. Essa comparação é ilustrada na Figura 6. As diferença encontrada de 3% provavelmente é devida a uma multiplicidade alélica dos insetos utilizados.

Outra coincidência estonteante foi àquela observada na numeração do nosso clone e do clone depositado pelos nossos colegas: ambos receberam a designação de clone 30. Se por um lado, a originalidade do nosso trabalho tinha ido para o brejo, por outro nós ganhamos o conhecimento de que o belo trabalho publicado por nossos colegas no Journal of Biological Chemistry não mostrava o produto final mais relevante, ou seja, a proteína recombinante. Isso nos levou a resolver as dificuldades inerentes a sua expressão e possibilitou o uso da recombinante para caracterização de suas propriedades funcionais. Nos próximos tópicos são apresentados os dados que mostram resultados do nosso trabalho que não aparecem na publicação citada.

Análise de homologia

BLASTP 2.2.3 [Apr-24-2002]

Database: All non-redundant GenBank CDS
translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF
1,002,979 sequences; 316,863,232 total letter



Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 18920644 gb AAL82381.1 AF427487.1 (AF427487) trialysin p...	365	e-100
gi 18920642 gb AAL82380.1 AF427486.1 (AF427486) trialysin [...	305	3e-82
gi 15640292 ref NP_229919.1 (NC_002505) galactosyl-transfe...	34	1.7
gi 20502754 gb AAM22610.1 AF390573.23 (AF390573) WbeW [Vibr...	34	1.7
gi 1929427 emb CAA69125.1 (Y07788) ORF20x4 [Vibrio cholerae]	34	1.7
gi 19075559 ref NP_588059.1 (NC_003421) dna-directed rna p...	31	15
gi 12313671 dbj BAB21076.1 (AP002819) contains ESTs C19522...	31	15
gi 15790819 ref NP_280643.1 (NC_002607) phosphoribosylamin...	31	17
gi 7290201 gb AAF45664.1 (AE003421) CG14809 gene product [...	30	32
gi 17986883 ref NP_539517.1 (NC_003317) Hypothetical Membr...	30	37
gi 15793536 ref NP_283358.1 (NC_003116) putative fatty aci...	30	38
gi 15677744 ref NP_274907.1 (NC_003112) fatty acid/phospho...	30	39
gi 15792773 ref NP_282596.1 (NC_002163) putative periplasm...	29	40
gi 18977276 ref NP_578633.1 (NC_003413) hypothetical prote...	29	44
gi 15223219 ref NP_174526.1 (NM_102983) NAD+ dependent iso...	29	44
gi 14590941 ref NP_143015.1 (NC_000961) ATP-dependent heli...	29	46
gi 18677110 dbj BAB84837.1 (AP003216) putative amino acid ...	29	51
gi 15794338 ref NP_284160.1 (NC_003116) putative bifunctio...	28	70
gi 15677126 ref NP_274278.1 (NC_003112) GTP cyclohydrolase...	28	70
gi 15594349 ref NP_212137.1 (NC_001318) B. burgdorferi pre...	28	86

ALINHAMENTOS

>[gi|18920644|gb|AAL82381.1|AF427487.1](#) (AF427487) trialysin
precursor [Triatoma infestans]
Length = 260

Score = 365 bits (936), Expect = e-100
Identities = 191/260 (73%), Positives = 193/260 (73%)
(Con't)

Query: 7

MSKFWXXXXXVAAFQFAHSYPAAEYELDETTNDEVQRQFIXXXXXXXXXXXXXXXXXXRFKIXX 66

Alinhamento do clone 30 com a pró-trialisina

```

6      LLLLVAAFQFAHSYPAAEYELDETTNDEVQRQFIGDGYFEDEGDDGDEERFKIKPGKVLDK
      ***** **
13     LLLLVAAFQFAHSYPAAEYELDETTNDEVQRQFIGDGYFEDEGDDGDEERFKIKPGKVFDK

66     FGKIVGKVLKQLKKVSAVAKVAMKKGAAALLKMGVKISPLKCEEKTKKSCVIFKIPTENS
      ** ***** ** *****
73     VGKVVGKVLKQLKKVSLVAKLAMKKGAAALLKMGVKISPLKCEEKTKKSCVIFKIPTENS

126    FCLTIREFMKTNIATYLVVAGEINRKS RFEEKLKLGNMPCVNVEGFIGKVC MKGIEGHAK
      ***** *****
133    FCLTIREFMKTNIATYLVVAGEINRKS KFEEKLKLGNMPCVNVEGFIGKVC MKGIEGHAK

186    SSSGQANVNFCLGLVAEKFGVGAKLCGIYANKKVRVKISPQLFPGATSLDGDIVKLD DNG
      ***** *****
193    SSSGQANVNF CWGLVAEKFGVGAKLCGIYANKKVRVKVSPQLFPGATSLDGDIVKLE DNG

246    EDATTL DVDEVEID
      *** *****
253    EDAATL DVDEVEID
  
```

Figura 6 : Alinhamento entre a seqüência de aminoácidos do clone 30 e da Trialisina de *T. infestans*. Em azul seqüência de aminácidos da Trialisina. Em verde seqüência de aminácidos do clone 30/LMPDC. A seta sítio de clivagem pela protease triapsina de *T. infestans*. Em vermelho diferenças encontradas nas espécies de aminoácidos nas duas seqüências.

8.5) Expressão Tecido Específico da Trialetina do *T. infestans*

A análise da expressão da proteína nativa foi realizada através do experimento de *Northern blot* onde RNA total de glândula salivar, músculo e intestino foram imobilizados em membrana de nitrocelulose. Como sonda radiomarcada usou-se o cDNA do clone 30 digerido com as enzimas de restrição Eco RI e Xba I a fim de se retirar o inserto do vetor sem a cauda poli A. O resultado da Figura 7 mostra que a expressão desse gene é tecido específica, sendo observado a marcação de duas bandas somente no RNA de glândula salivar. As massas relativas das marcações obtidas foram estimadas a partir do cálculo da equação da reta plotada com o logaritmo dos valores das massas dos marcadores padrão utilizado no gel, versus a distância migrada. A equação da reta $y = -6,0903\ln(x) + 12,209$ e $R^2 = 0,9646$ estimou um transcrito de 1296 pb e 809 pb indicando que o cDNA correspondentes ao transcrito estão completos.

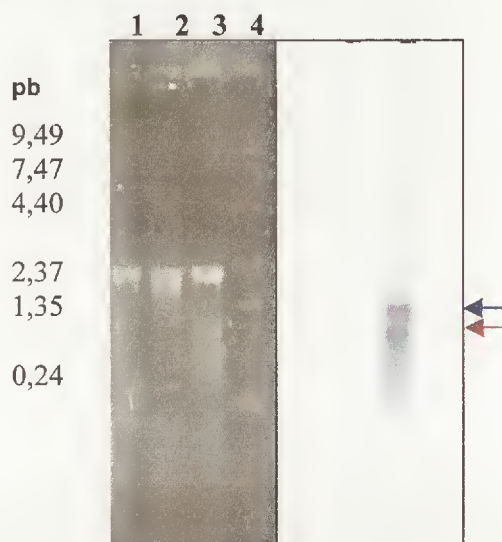


Figura 7. *Northern blot* do RNA total de tecidos do *T. infestans* e sonda do cDNA do clone 30 . Linha 1, RNA total de músculo; Linha 2, intestino; Linha 3, glândula salivar. Na linha 4, marcadores de massa molecular (RNA ladder, Gibco BRL®). A seta azul indica a banda referente ao transcrito de 1296 pb e a seta vermelha referente ao transcrito de 809 pb.

8.6) Organização Genômica da Trialisina

O fato de termos vários clones com seqüências com alta similaridade e de termos encontrado duas bandas no Northern blot sugeriu-nos a necessidade de analisar a organização genômica desse gene. Para isso foi feita a digestão de 50 μ g de DNA genômico de *T. infestans* utilizando as enzimas de restrição Eco RI, Hind III e Sac I (Gibco) separadamente. Os fragmentos da digestão do DNA foram imobilizados em uma membrana de nylon (Biodyne A). Como sonda, foi usada a mesma seqüência do clone 30 empregada no Northern blot. Observou-se a marcação de duas bandas com as enzimas Eco RI e Hind III e quatro bandas com a enzima Sac I, Essa diferença entre as duas primeiras e a terceira enzima é explicada pela presença de um sítio interno de clivagem para Sac I na seqüência usada como sonda (Figura 8). Esse resultado é supostamente devido a presença de uma família multigênica ou pelo fato da biblioteca ter sido construída por uma população heterogênica de insetos.

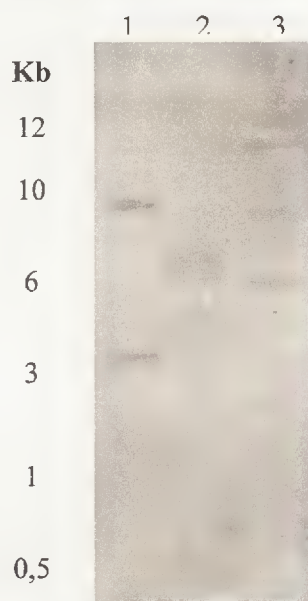


Figura 8. Trialisina: Organização genômica do clone 30 de cDNA. O DNA total do *Triatoma infestans* digerido com Eco RI (coluna 1), Hind III (coluna 2) e Sac I (coluna 3), foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,7%. As bandas transferidas para membrana de nylon hibridizaram com a sonda complementar marcada radioativamente.

8.7) Expressão da Trialisina em Baculovírus

Tendo em vista que a expressão de proteína eucarióticas em *Escherichia coli* requer laboriosos procedimentos pós traducionais do produto recombinante, optou-se pela utilização de sistemas alternativos de expressão heteróloga, a fim de obter-se a proteína recombinante ativa. Nesta abordagem, o promotor *very late* que dirige a expressão da poliedrina é utilizado para promover a expressão de proteínas heterólogas (Miller, 1988).

Portanto, foram preparadas construções baseadas na clonagem da fase aberta de leitura completa do clone 9. Esse clone foi escolhido por ter sido o primeiro a ser seqüenciado completamente e por apresentar um fase aberta de leitura. Dentre as diversas construções produzidas, apenas o trabalho realizado com os derivados de pBacNblue[™](INVITROGEN) serão relatados. A presença do fragmento gênico foi confirmada por PCR, onde foram utilizados os iniciadores FOWARD e REVERSE (Invitrogen) demonstrando um produto de amplificação compatível ao esperado (dados não mostrados).

Sendo assim, tanto extratos de células infectadas quanto seus respectivos sobrenadantes foram sistematicamente testados para verificar a presença da proteína recombinante e não foi possível observar acúmulo de um produto diferencialmente expresso em quaisquer dos extratos celulares ou sobrenadantes testados (dados não mostrados). Devemos ressaltar que o mesmo insucesso se reproduziu quanto aos outros vetores de transferência (pFastBac, por exemplo) que foram empregados.

Os resultados em relação à construção do gene do clone 30 (trialisina) ainda estão em andamento, sendo necessário aumentar o título viral, porque até o momento nenhuma proteína diferencialmente expressa foi observada.

8.8) Expressão Heteróloga do Clone 1 em Sistema Procariótico

O método de escolha empregado para expressar um polipeptídeo representativo do produto gênico foi o sistema heterólogo procariótico *E. coli*. Uma tentativa de obter a produzir proteína de fusão do clone1 foi feita mediante utilização do sistema pET de expressão (NOVAGEM). O clone 1, como visto na figura 2, corresponde a parte C-terminal do clone 30. O plasmídeo de expressão escolhido foi pET17B utilizando-se células de *E. coli*, da linhagem BL21 (DE3) pLys-S. Essa linhagem de célula é competente para expressão de proteína tóxicas porque inibe a T7 RNA polimerase até que seja adicionado IPTG (Colowickis e cols.,2000). No entanto essa célula apresenta baixa eficiência de transformação. Por isso, construímos sistema de ligação para transformação de célula DH5 α , na qual o plasmídeo estabilizado foi posteriormente transformado em BL21(DE3) pLys-S.

A Figura 9a mostra o resultado da expressão do clone 1, observando-se uma proteína diferencialmente expressa em relação ao controle de aproximadamente 22 KDa. Esse tamanho é exatamente esperado para a proteína de fusão clone1/T7tag. A expressão foi acompanhada por *Western blot* utilizando-se como primeiro anticorpo anti T7-tag (Novagem) como visto na Figura 9b. Entretanto, após a indução com IPTG a cultura parou de crescer, e a proteína apresentou nível de expressão basal (Figura 9a) impossibilitando a obtenção de maior quantidade de proteína recombinante.

8.9) Identificação e Imunocitocalização da Proteína Nativa

Uma vez obtida a proteína recombinante, relativa a construção do clone 1 em PET 17B em *E.coli*, esta foi utilizada para a imunização de coelhos, a fim de gerar anticorpos policlonais contra essa proteína para que fosse possível obter mais informações a respeito do tamanho da proteína nativa relativa à seqüência gênica. O soro obtido foi utilizado como primeiro anticorpo em experimento de *Western blot*, onde os extratos protéicos totais de expressão, bem como o conteúdo salivar, foi imobilizado em membrana de nitrocelulose.

O soro identificou proteína cujo tamanho em gel SDS-PAGE foi de 28 KDa, relativamente compatível com a proteína madura predita pelo programa PSORT conforme indicado na figura 10. Além disso, em experimento de imunocitocalização, esse anticorpo identificou a presença da proteína no primeiro par de glândulas de *T. infestans* (Figura 11).

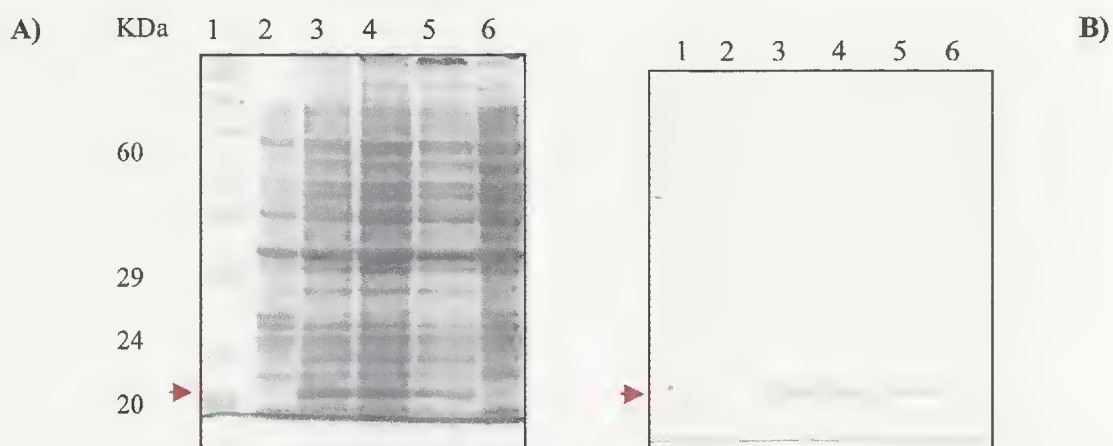


Figura 9. Expressão do clone1 em pET 17B. **A)** Gel SDS-PAGE 14%: Linha 1, marcador de peso molecular; 2, controle negativo (pET vazio), Linhas 3-5, cinética de expressão com adição de IPTG mostrando uma proteína diferencialmente expressa indicada pela seta vermelha; Linha 6, cinética de expressão sem adição de IPTG, mostrando a expressão basal da proteína de fusão. **B)** *Western blot* com anticorpo monoclonal anti T7-tag: o anticorpo reconheceu somente a proteína de fusão na faixa de 22 kDa indicado pela seta vermelha.

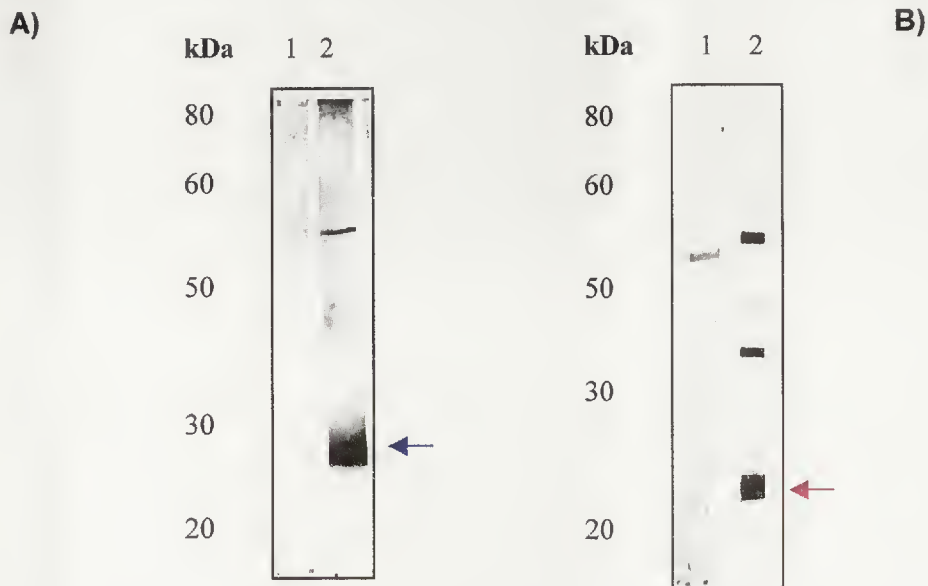


Figura 10. *Western blot* para reconhecimento da proteína nativa pelo anticorpo específico. Em 1, soro pré-imune (1:200); Na linha 2, soro imune (1:200). **A)** Saliva total: a seta azul indica a proteína nativa. **B)** Extrato bruto da proteína de fusão 1/pET 17B. A seta vermelha indica a proteína de fusão.

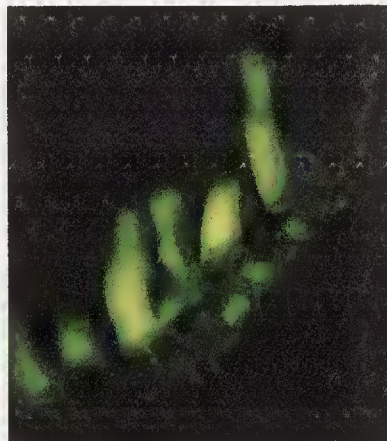


Figura 11. Imunocitocalização da proteína nativa. As células cilíndricas do primeiro par de glândulas do inseto mostram fluorescência verde-maçã positiva pela reatividade com o anticorpo produzido contra a Trialisina recombinante. Nos demais revestimentos dos demais pares glândulas salivares não houve reatividade. O soro pré-imune mostrou ausência de fluorescência em todos os cortes histológicos.

8.10) Expressão do Clone 30 em *E.coli*

Após a confirmação pelo *Western blot* do tamanho da proteína nativa, o enfoque do trabalho foi direcionado integralmente para o clone 30. Dessa forma o clone foi submetido ao vetor de expressão pGEX 5X-3 (Pharmacia®). Os plasmídeos da série pGEX são vetores de expressão de proteína de fusão com a Glutathione S-Transferase de *Shistosoma japonicum* (Smith & Johnson, 1988) e possuem o forte promotor Ptac para induzir elevada expressão das seqüências clonadas (Amann & Brosius, 1985).

A construção obtida foi utilizada para transformar *E.coli*, da linhagem BL21 (DE3) e (DE3) pLys-S pela última se tratar de uma célula de escolha para expressão de proteína tóxicas ao inibir a T7 RNA polimerase, até que seja adicionado IPTG (Colowickis e cols.,2000). Cada combinação vetor versus linhagem testada resultou igualmente na baixa expressão de um mesmo produto de 55 kDa nas culturas induzidas por IPTG.

A massa desse produto corresponde à proteína de fusão esperada, uma vez que a massa molecular da GST e da porção madura do produto do clone 30 são 29 e 27, respectivamente. O mesmo produto está ausente na amostra contendo o plasmídeo vazio induzido por IPTG (Figura 12), o qual apresenta a expressão da GST. Comparando as linhagens transformadas, os níveis de expressão do produto de fusão foram um pouco maiores na linhagem BL21 (DE3).

Na preparação do extrato bacteriano bruto, observou-se que grande parte da proteína de fusão ficou retida na forma de um sedimento insolúvel (Figura 12a, linha 4), o que sugere lise parcial ou parte da proteína de fusão se encontrava desnaturada na forma de corpos de inclusão (Chem e cols., 1991). A confirmação de que o produto de fusão de 56 KDa consiste na proteína de interesse, veio mediante constatação de que a proteína recombinante foi reconhecida pelo anticorpo policlonal produzido, através de *Western blot*, onde nenhuma proteína de massa correspondente foi identificada no extrato controle (dados não mostrados).

Devemos ressaltar também, que apesar da pouca expressão obtida esse foi o melhor produto conseguido, tendo em vista os demais testados,

como é o caso do vetor pMAL-p2(New England Biolabs®), que se baseia na clonagem do gene de interesse sob o controle do promotor forte *tac*, fusionando-o junto ao gene *malE*, codificador de um domínio de ligação à maltose (MBP) (Amann & Brosius, 1985). Nesse vetor o gene codificador da MBP (*malE*) tem sua seqüência N-terminal intacta, codificando um peptídeo sinal que direciona o produto para o periplasma bacteriano. Foram também utilizados com insucesso os vetores PET 17B e 28A.

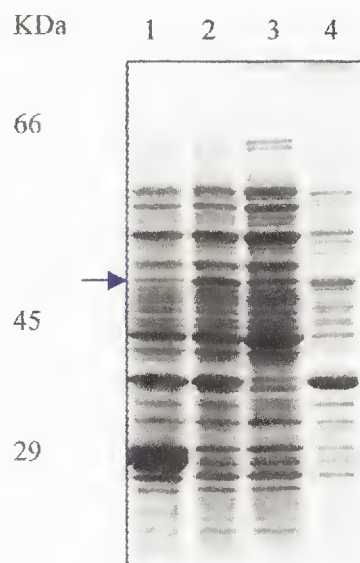


Figura 12. Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 12% de amostras das proteínas expressas do clone 30 em pGEX 5X-3 após indução com IPTG. Em 1 extrato total do vetor vazio (pGEX 5X-3); Em 2, extrato total do clone 30/pGEX5x3; Em 3, fração solúvel (30/pGex5x3); e, em 4, fração insolúvel de 30/pGex5x3.

8.11) Purificação da Proteína Recombinante

Após verificarmos que pGEX foi o melhor sistema, a proteína de fusão foi purificada em escala preparativa, através de uma cromatografia de afinidade, em Glutathiona Sepharose 4B (Pharmacia). Dessa forma, a proteína recombinante foi induzida em larga escala com IPTG durante um curto intervalo de tempo, a fim de se conseguir a maior quantidade possível da proteína na forma solúvel.

Após a lise da cultura a fração solúvel (sobrenadante) foi utilizada como amostra no procedimento de purificação (Figura 13a). Cem mililitros de uma cultura induzida foram suficientes para a obtenção de aproximadamente 80 μ g de proteína de fusão pura. O procedimento de purificação foi acompanhado por *Western blot* utilizando o anticorpo anti-trialisina (Figura 13b), onde um pool das frações obtidas foi utilizado como antígeno.

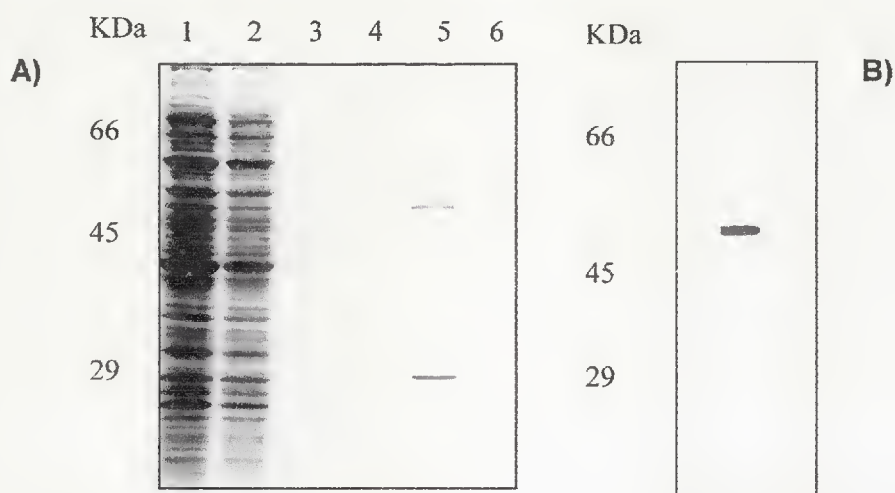


Figura 13. Purificação da Trialisina recombinante do clone 30 mediante cromatografia de afinidade à Glutathiona. **A)** Em 1, extrato protéico solúvel de células BL 21DE3 transformadas com o clone 30, após 1 hora da expressão com IPTG. Em 2, fração não ligada a coluna. Em 3, lavagem da coluna. Em 4-6, frações eluídas da coluna de afinidade. **B)** *Western blot* da proteína purificada

8.12) Ativação Enzimática da Proteína Recombinante

Como foi dito anteriormente, o clone 30 apresentou 97% de identidade com a proteína trialisina de *T. infestans* (Amino e cols., 2002). Os autores mostraram que esta proteína é sintetizada na glândula salivar do triatomíneo sob a forma de uma pró-proteína que pode ser ativada, ao ser ejetada no momento da picada, por um processo de proteólise mediado por uma tripsina-like presente na saliva do triatomíneo. Essa enzima foi denominada Triapsina, (Amino e cols., 2001).

No nosso trabalho demonstramos que a proteína recombinante, aqui denominada rTrialisina, seria uma pró-rtrialisina. Em vista desse achado, investigamos o grau de especificidade da tripsina bovina (SIGMA) na clivagem da rTrialisina. Ao invés da obtenção de bandas de proteínas com massas teoricamente calculada em 22 KDa (proteína ativa) e de 33 KDa (pró+ GST), nós obtivemos bandas com massas de 10 kDa e de ~27 e 10 kDa. Esse achado revelou que a clivagem da rTrialisina requer especificidade (Figura 14)

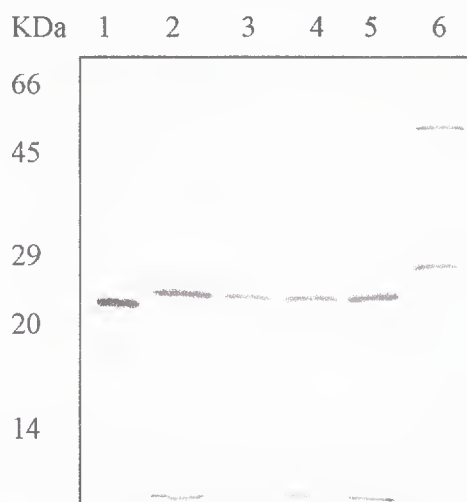


Figura 14. Verificação da especificidade da rTrialisina mediante clivagem com Tripsina bovina (SIGMA). Em 1, 100 ng de tripsina bovina com massa de 25 KDa . Em 2 e 3, clivagem de 600 ng de rTrialisina com 100 ng de tripsina durante 15 e 30 minutos. Em 4 e 5, clivagem 600ng de rTrialisina com 10 ng de tripsina por 15 e 30 minutos. Em 6, 600 ng de rTrialisina: a banda superior corresponde a proteína intacta; a inferior corresponde à GST contaminante de plasmídeos recombinantes que perderam seu inserto. SDS-Page 12% corado com prata.

Com base no resultado mostrado partiu-se então para ativação da proteína de fusão a GST pela tripsina nativa através da adição de saliva de *T. infestans* diluída, a fim de liberar a parte pró-GST da parte ativa da proteína recombinante. Observou-se então que após a incubação com a saliva a proteína de fusão transformou-se em duas bandas de tamanho esperado (Figura 15a). A proteólise da proteína recombinante foi monitorada através de gel SDS-PAGE e *Western-blot* utilizando o anticorpo produzido contra rTrialisina (Figura 15b).

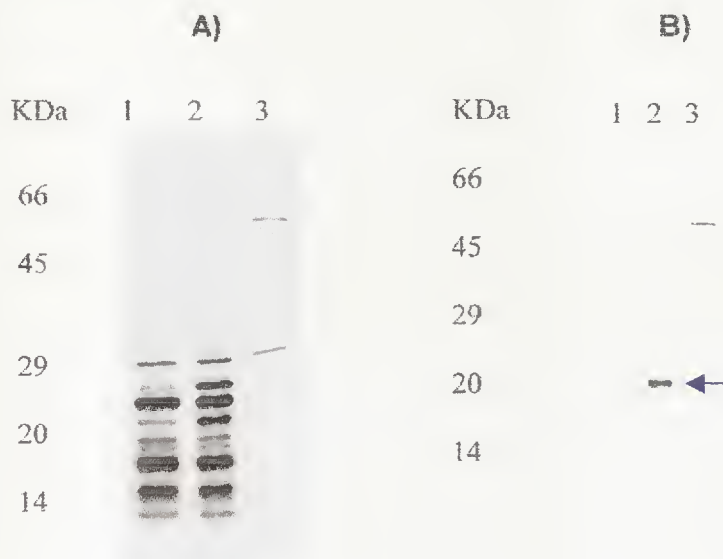


Figura 15. Perfil eletroforético da ativação proteolítica da rTrialisina (proteína de fusão) através da clivagem com tripsina da saliva de *T. infestans*. **A)** Em 1, 2 µg de saliva. Em 2, 2 µg de saliva + 0,5 µg da proteína (rTrialisina) de fusão. Em 3, 0,5 µg de rTrialisina. **B)** *Western blot* pós-clivagem da rTrialisina com tripsina. Em B1, reconhecimento da proteína nativa pelo anticorpo específico. Em 2, reconhecimento de maior quantidade de rTrialisina pelo mesmo anticorpo. Em 3, controle da rTrialisina pré-clivagem. Gel SDS-PAGE 12% corado com prata.

8.13) Caracterização Funcional da rTrialisina

8.13.1) Atividade Microbicida

A atividade microbicida da proteína foi avaliada mediante incubação de 20 μg da proteína de fusão, ativada pela tripsina da saliva de *T. infestans*, com formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Após a incubação com a rTrialisina os parasitas tiveram a sua mobilidade afetada comparado aos controles não-tratados, ou previamente incubados com saliva ou tampão. Em um período de 1 hora de incubação com a proteína, houve aproximadamente 85% de morte dos parasitas, sendo que em 9 horas de incubação 100% dos parasitas estavam mortos, como visto no gráfico da Figura 16.

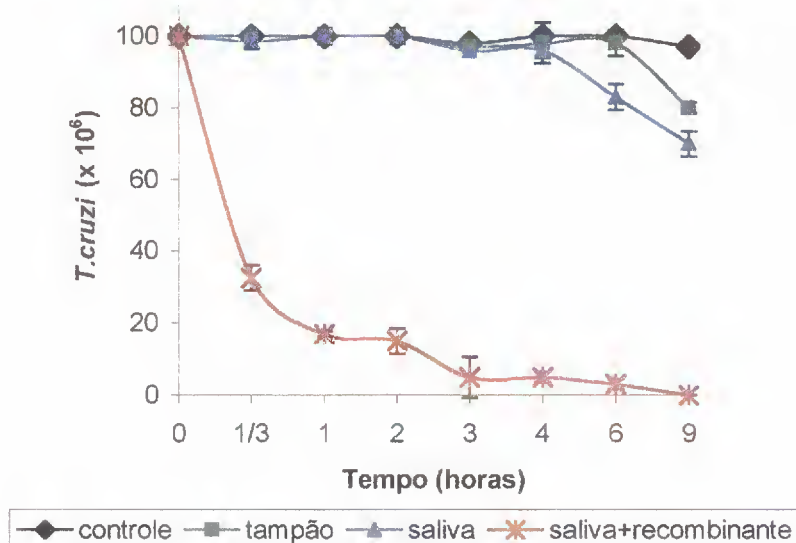


Figura 16. Atividade da rTrialisina sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi*. Em preto, parasitos não-tratados. Em verde, parasitos tratados com o tampão utilizado para eluir a rTrialisina da coluna GST-transferase. Em azul, 10 μg de saliva de *T. infestans*. Em vermelho, 10 μg de saliva de *T. infestans* e 20 μg da proteína recombinante.

Além de *T. cruzi* utilizou-se também neste ensaio o protozoário *Leishmania donovani*. O ensaio foi realizado da mesma forma que o anterior, sendo utilizado seus devidos controles. Observou-se que após 1 hora de incubação com a proteína recombinante os promastigotas começavam a ter sua mobilidade afetada até levá-los a morte ou ficarem bem lentos comparando com os controles não-tratados, ou incubados com saliva ou tampão. O número de parasitas mortos após 1 hora foi de 80% em relação ao controle, aumentando gradativamente até atingir 100% de morte com um período de 9 horas, como apresentado no gráfico da Figura 17.

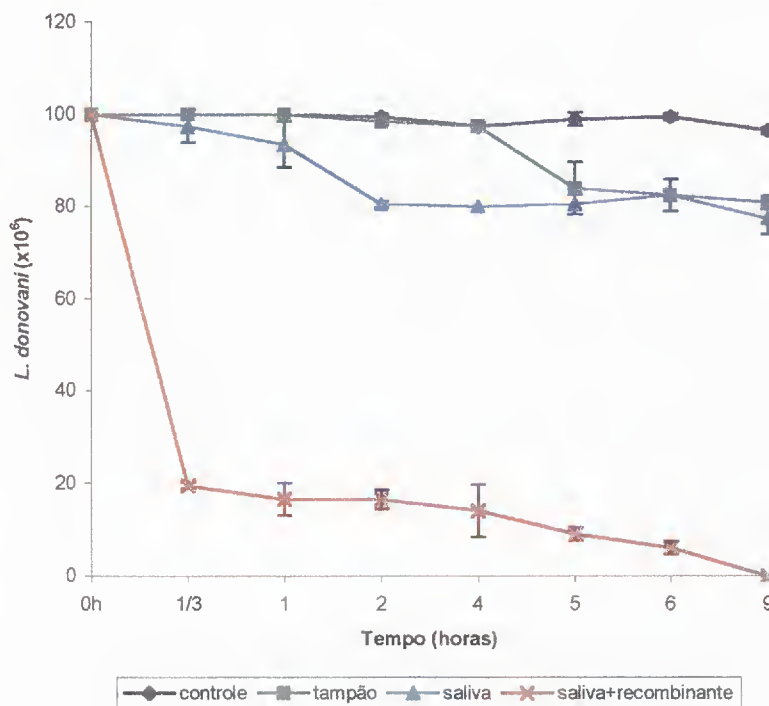


Figura 17. Atividade da rTalisina sobre *L. Donovani*. Em roxo, parasitos não-tratados. Em verde, parasitos tratados com tampão utilizado para eluir a proteína recombinante da coluna de GST-Transferase. Em azul, 10 μ g de saliva total de *T. infestans*. Em vermelho, 10 μ g de saliva total de *T. infestans* e 20 μ g da proteína recombinante. Os experimentos foram repetidos três vezes e as barras representam média e desvio padrão.

8.13.2) Atividade da rTrialisina sobre Células L6 Infectadas por *T. cruzi*

Esse experimento foi realizado com o objetivo de verificar se a proteína recombinante seria capaz de diminuir o parasitismo de células L6 infectadas com *T. cruzi in vitro*. A administração da primeira dose de rTrialisina ativada em culturas infectadas resultou na diminuição do parasitismo celular, à medida que desapareciam as formas tripomastigotas e permaneciam, mais evidentes, as formas amastigotas identificadas ao microscópio. Com a segunda dose as células L6 ainda se mantinham intactas e muitas formas amastigotas eram visíveis. A partir da quinta dose as células se tornaram nitidamente lisadas e os efeitos citotóxicos foram progressivamente aumentados pela dose subsequente. Em resumo, as culturas de células tratadas com rTrialisina sofreram lise e esse efeito citotóxico se manifestou nas formas intracelulares e extracelulares do *T. cruzi* e, também, nas células hospedeiras murinas L6.

Os experimentos dos grupos controles, as culturas não-tratadas, tratadas apenas com saliva ou com soro imune (todas igualmente parasitadas) não apresentaram os efeitos citotóxicos (Figura 18a-18b). Esses foram encontrados apenas nas culturas tratadas com rTrialisina mais saliva. (Figura 18c-18d).

A Figura 18c mostra que o número de parasitas no grupo de culturas tratadas com a proteína de fusão foi menor que nos demais grupos. No experimento teste as formas amastigotas imobilizadas permaneciam acumuladas nas células hospedeiras, mas apresentavam com sinais de citotoxicidade tais como imobilização e interrupção da multiplicação.

Nós avaliamos também o efeito do anticorpo específico na prevenção dos efeitos citotóxicos da rTrialisina. Assim, tratamos culturas de células parasitadas com rTrialisina+saliva+soro-imune. No curso dos dias verificamos que haviam muitas células mortas, mas, diferentemente do que se observou no experimento teste, também haviam células vivas, parasitadas (Figura 18e). Seguramente, havia maior número de parasitas vivos nas células

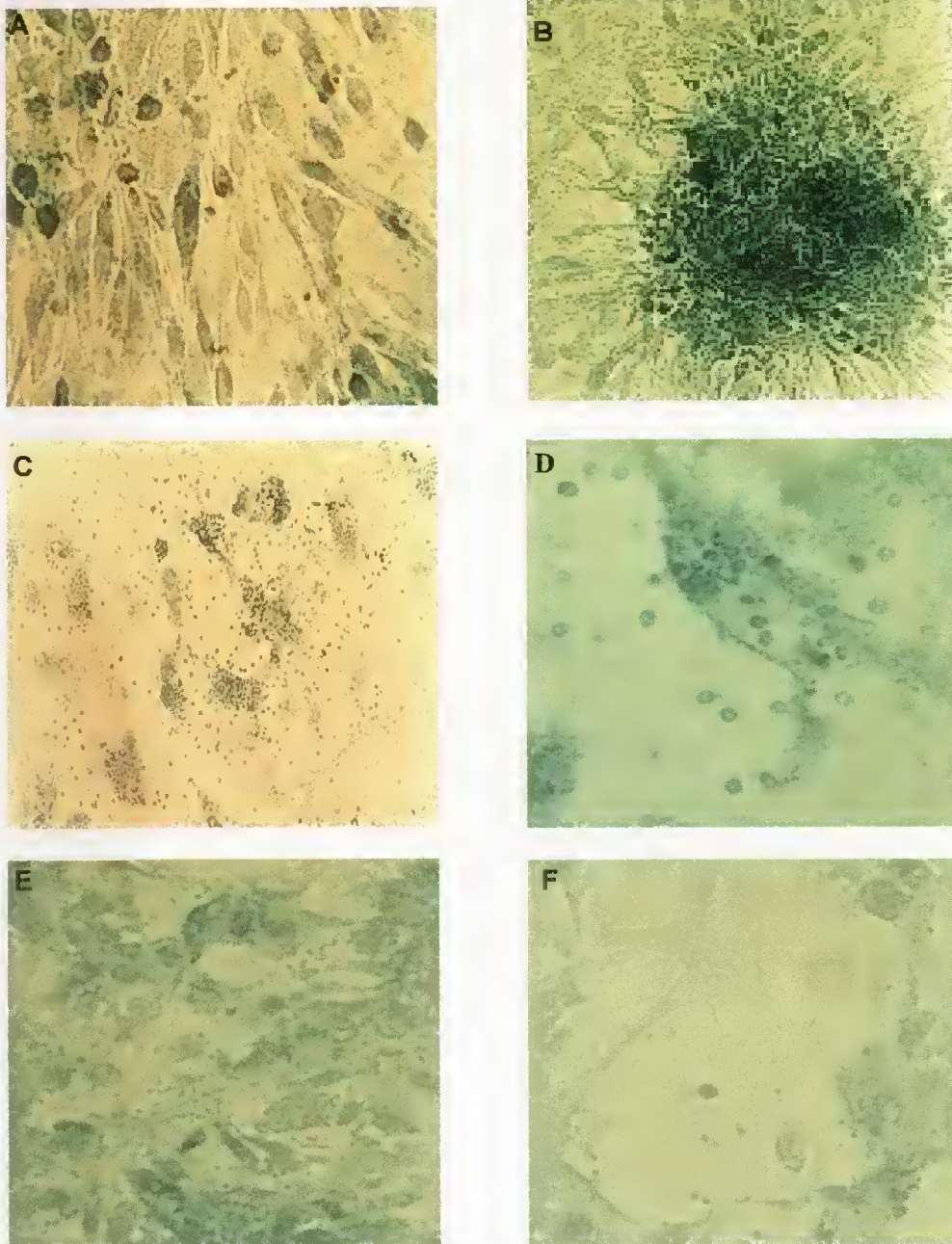


Figura 18. Efeito da rTrialisina sobre células L6 infectadas com *T. cruzi* transformado com o gene LacZ. **A-B)** Cultura tratada com saliva de *T. infestans* e com soro imune, respectivamente mostrando muitas células azuis parasitadas. **C)** Cultura tratada com rTrialisina e saliva mostrando notável efeito citotóxico e morte celular. **D)** mesmo de **C** mostrando a formação de vacúolos nos parasitas. **E)** Cultura tratada com rTrialisina e saliva mais antissoro específico mostrando notável proteção contra o efeito citotóxico. **F)** Cultura tratada com rTrialisina e saliva mais soro não-imune mostrando efeito citotóxico similar àquele do experimento **C**.

tratadas com a rTrialisina incubadas com o anticorpo específico do que no experimento teste onde o anticorpo não foi usado. A contagem das células confirmou a observação qualitativa. Finalmente, o experimento controle (rTrialisina+saliva+soro-não-imune) reconfirmou o experimento anterior, pois a quantidade de células mortas aumentou e se aproximou daquilo descrito para o grupo teste (Figura 18f). A observação qualitativa e quantitativa do efeito da rTrialisina e da inibição pelo anticorpo específico foi facilitado pela presença de células azuis, em virtude da infecção das culturas ter sido feita com *T. cruzi*-LacZ com posterior reação com X-Gal.

A contagem de tripomastigotas móveis (emergentes) no sobrenadante do meio de cultura desses experimentos gerou a informação apresentada na Figura 19. Observamos que nos grupos controles houve aumento crescente do número de parasitas no decorrer do tratamento, enquanto que nos grupos testes (tratados com rTrialisina e Triapsina) não houve aumento continuado do número de parasitas. Devemos ressaltar também que só nos experimentos testes a mobilidade e a forma dos parasitas foram alteradas.

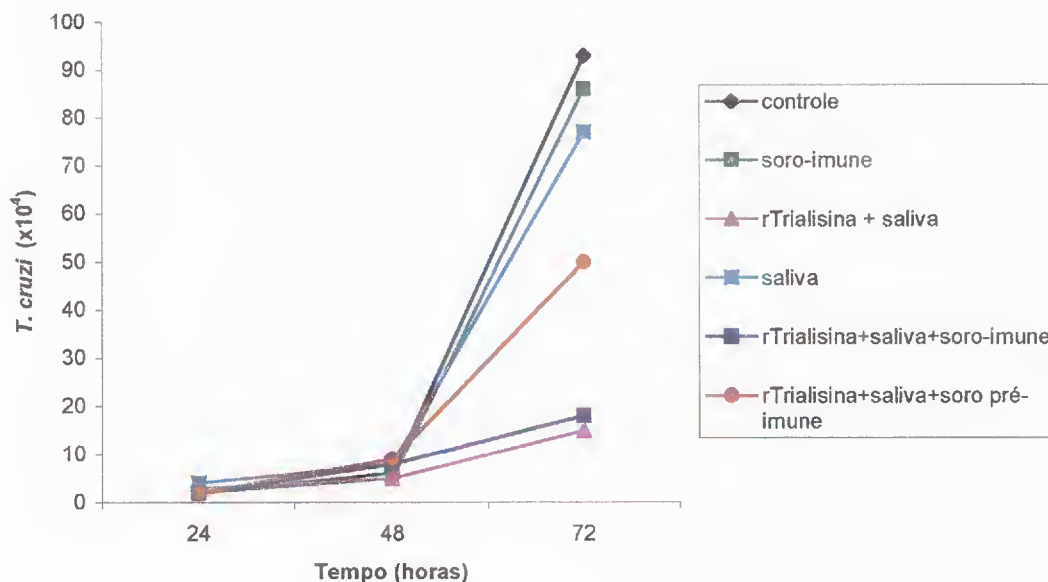


Figura 19: Avaliação do efeito da rTrialisina e soro imune sobre o número de tripomastigotas móveis de células L6 infectadas com *T. cruzi*. Em preto, células não-tratadas. Em verde, tratadas com soro imune. Em azul, tratadas com saliva total de *T. infestans*. Em vermelho, tratadas com rTrialisina + saliva + soro imune. Em azul anil, tratadas com rTrialisina + soro não-imune. Em rosa, tratadas com rTrialisina + saliva.

A viabilidade e a quantidade de células parasitadas foi avaliada. Conforme indicado na Figura 20, as células tratadas com rTrialisina + saliva (A) apresentaram um número muito pequeno de células vivas ao contrário das tratadas com somente saliva (B), cujo número de células parasitadas vivas foi muito maior. Nas tratadas com rTrialisina e saliva mais soro pré-imune (C) observamos poucas células vivas, entretanto um pouco superior as do primeiro grupo (A). Já nas células tratadas com rTrialisina e saliva mais soro imune (D) o número de células vivas foi inferior ao controle, porém, bem superior aos grupos A e C. (Figura 20).

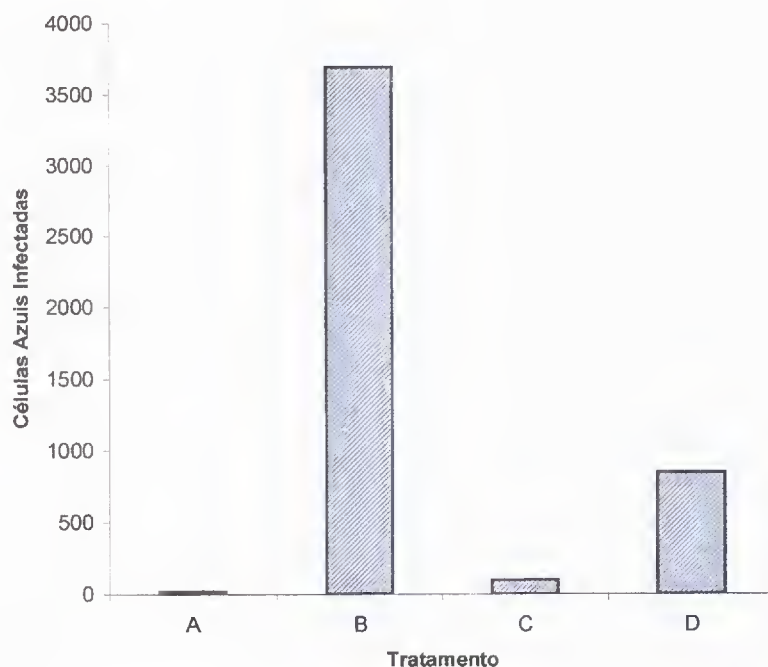


Figura 20: Avaliação do efeito do tratamento com rTrialisina e o soro imune em células L6 infectadas com *T. cruzi* β -gal. **A)** rTrialisina + saliva *T. infestans*. **B)** saliva de *T. infestans*. **C)** rTrialisina + saliva *T. infestans* + soro não-imune. **D)** rTrialisina + saliva *T. infestans* + de soro imune.

8.13.3) Atividade Fosfolipásica A₂

Devido às características da proteína nativa ter atividade hemolítica essa foi submetida a substratos fluorogênicos NBD C₁₂-HPC [2-(12-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino para fosfolipase A₂. A rTrialisina ativada por saliva mostrou uma atividade maior em relação ao seus controles (rTrialisina não-ativada e saliva) e um pouco menor em relação ao controle positivo Fosfolipase A₂ de veneno de abelha (Figura 21).

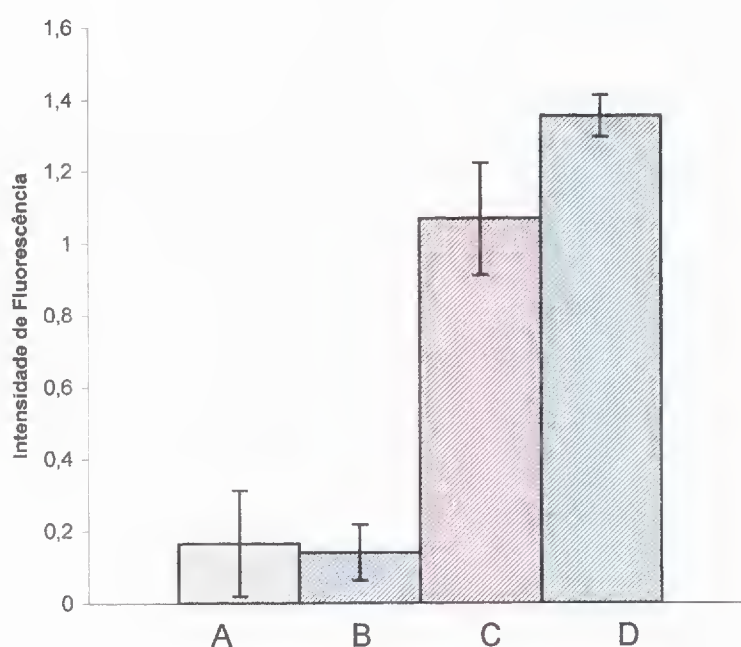


Figura 21. Atividade específica da proteína recombinante purificada sobre o substrato fluorogênico específico para Fosfolipase A₂ medida a 435 nm. **A)** em cinza, 1 µg de rTrialisina purificada não ativada. **B)** 400 ng de saliva total de *T. infestans* em azul **C)** 1 µg de rTrialisina ativada com 400 ng de saliva total em vermelho. **D)** 1 µg de PLA₂ de veneno de abelha usada como controle positivo em verde.

8.13.4) Atividade Bacteriolítica da rTrialisina

A atividade sobre bactérias da proteína recombinante foi testada em *E. coli* BI21DE3 e o número de colônias formadas após a incubação com a proteína recombinante e seus controles foi avaliada. Após a incubação de *E. coli* com rTrialisina, o crescimento de colônias nas placas que continham a proteína recombinante foi 60 vezes menor, quando comparado com a placa que continha somente saliva; 80 vezes menor em relação ao tampão; e, 90 vezes menor em relação ao branco (Figura 22).

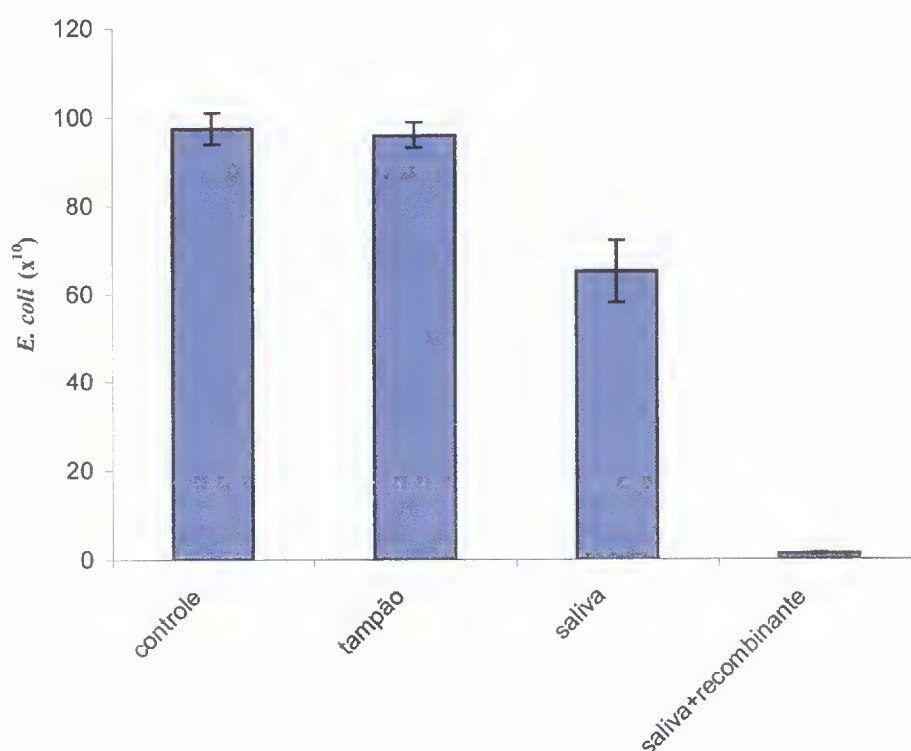


Figura 22. Atividade antibacteriana da rTrialisina. O grupo controle foi representado por células não-tratadas. O segundo controle consistiu de células tratadas com tampão utilizado na eluição da proteína recombinante em GST-Transferase. O terceiro controle foi formado por células tratadas com 10 μg de saliva de *T. infestans*. Por último o experimento teste teve células tratadas com 10 μg de saliva de *T. infestans* mais 20 μg de rTrialisina.

8.13.5) Atividade hemolítica

O teste de hemólise realizado não apresentou os resultados esperados, pois o experimento controle, (saliva) mesmo grau de hemólise do que o experimento teste (rTrialisina + saliva). Esse resultado talvez seja porque utilizamos somente hemácias humanas para o teste sendo talvez necessário testarmos com hemácias de outros vertebrados

8.14) Estrutura Terciária da Trialisina

A seqüência de aminoácidos da rTtrialisina inteira (pró-proteína) sem o peptídeo sinal foi submetida aos programas TITO E MODELLER para determinação e construção da estrutura terciária da proteína. O programa TITO apresentou três possíveis modelos. O primeiro deles denominou-se **1cza** e utilizou como molde uma hexoquinase humana (Aleshin e cols., 2000). (Figura 23a). O outro designado de **1bdg** (Figura 23b) teve como molde uma hexoquinase de *Schistosoma Mansoni* (Mulichak e cols., 1998). Finalmente, o terceiro recebeu a indicação de **1 dng** (Figura 23c) e teve como molde uma proteína ribossomal L4 (Worbs e cols., 2000).

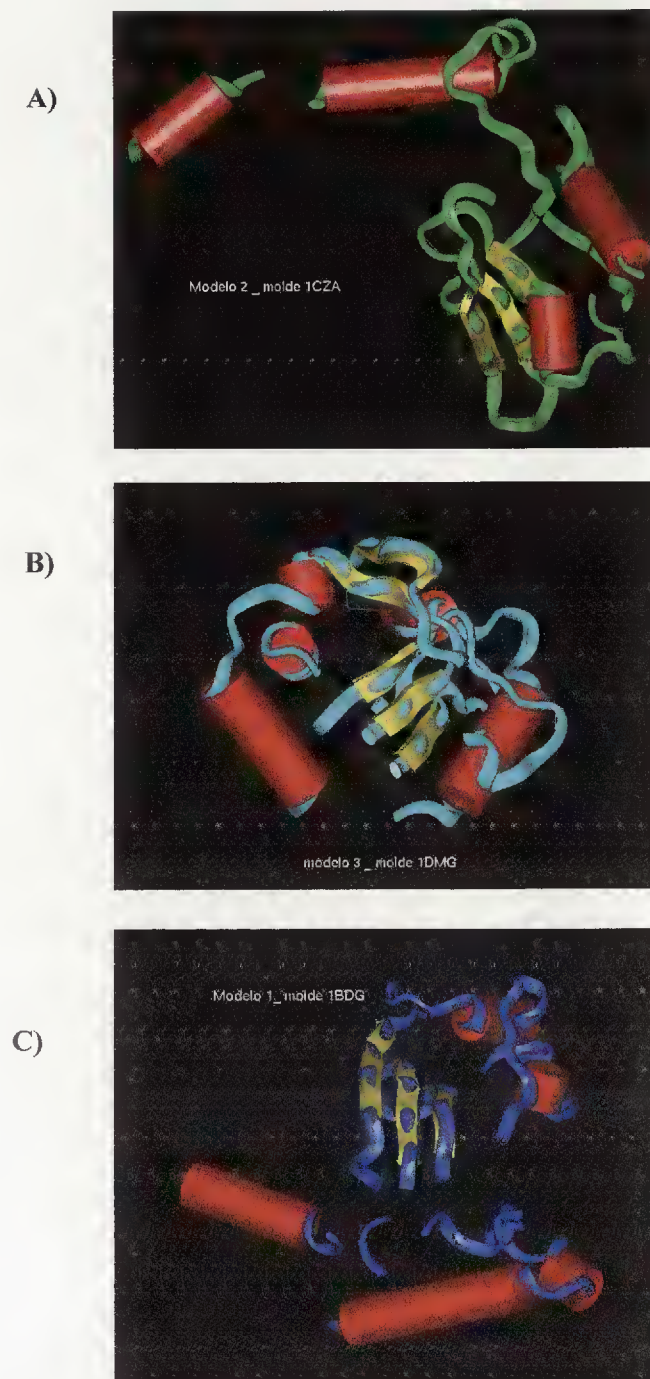


Figura 23. A) Modelo 1cza proposto para a estrutura terciária da rTrialisina. Em B) aparece o modelo 1 bdg, e em C) o modelo 1 dmg que também foi proposto como representação teórica da estrutura da rTrialisina.

Com base nos três modelos propostos nas Figura 23 A-C, o Plot de Ramachandram (Figura 24), sugeriu o **1 dmg** como melhor representação da possível estrutura da rTrialisina devido às características de seu empacotamento, maior porcentagem de hélices na estrutura e menor número de quebras em relação as demais estruturas. Dessa forma prosseguiu-se a modelagem utilizando-se somente o modelo **1 dmg**.

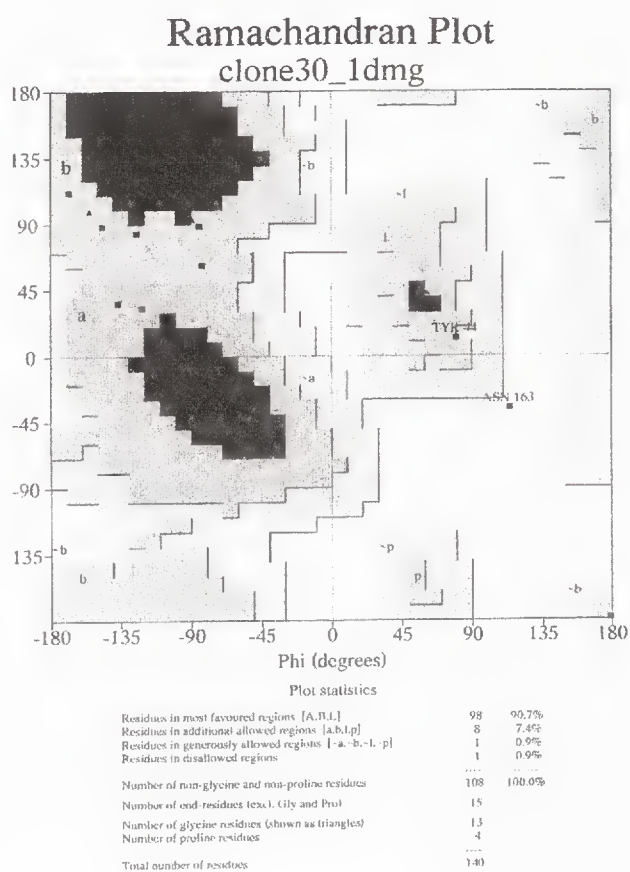


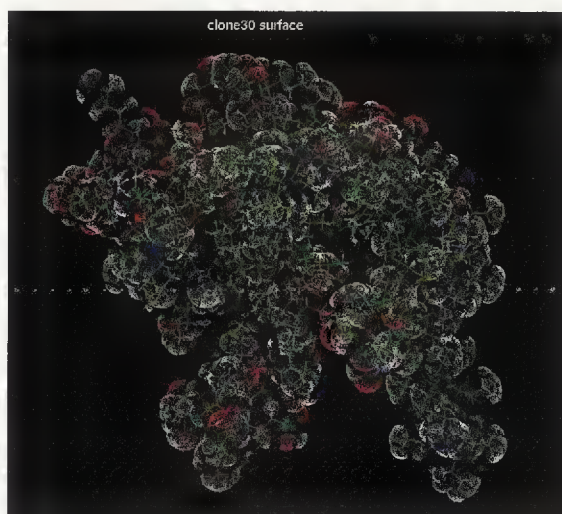
Figura 24. Determinação da melhor estrutura pelo Plot de Ramachandram

A análise do modelo **1 dmg** revela que a porção C-terminal não possui homologia com nenhuma estrutura conhecida. Assim, essa parte da seqüência não foi modelada. A estrutura da rTrialisina mostra uma organização globular pela superfície de Conolly representado na Figura 25a. A estrutura apresenta a formação de cinco α -hélices, sendo que o N-terminal começa nas cadeias β , formando uma β antiparalela que, quando clivada, libera a parte pró (Figura 25b).

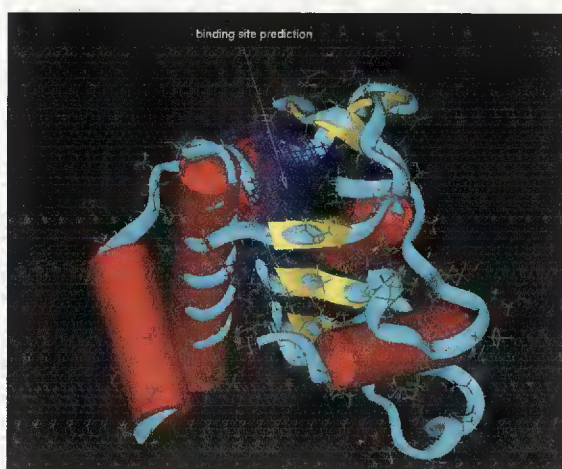
A análise da estrutura possibilitou predizer um possível sítio ativo entre F₇₂ e G₁₈₉ pelo programa Insight II binding Site (MSI corporation) que compara estruturas do PDB com outras já conhecidas, considerando-se as inflexões e organização das cadeias laterais (Figura 25b). Os aminoácidos F₇₂ e G₁₈₉ envolvidos no sítio ativo são representados na Figura 25c e Figura 4a. Alguns desses resíduos possuem características hidrofóbicas, sendo que os resíduos Ala e Leu são interligados por uma ponte de hidrogênio com acentuada hidrofobicidade.

Entre F₇₂ e G₁₈₉ o programa ScanProsite identificou uma região rica em resíduos de lisina, um sítio de fosforilação cAMP e cGMP dependentes de Cinase; nas regiões 220, 360 e 420 foram encontrados dois sítios de fosforilação a Proteína Cinase C e um sítio de fosforilação à Caseína Cinase II (Figura 4a). Esta região também foi submetida ao programa BLOCKS versão 5/21/00.1 (www.blocks.fhrc.org), mas não se identificou similaridade com seqüências já conhecidas

A)



B)



C)

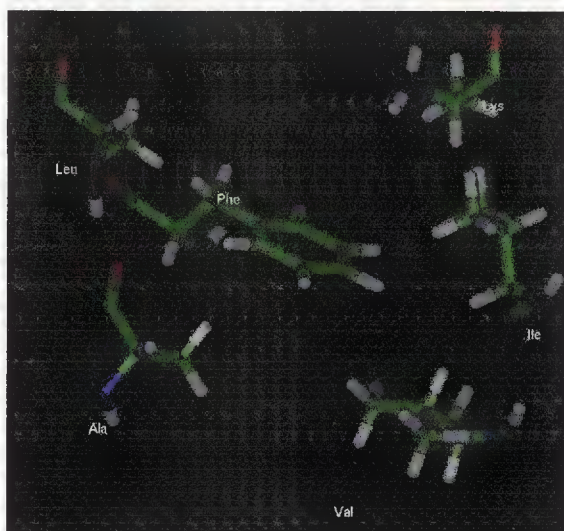


Figura 25. A) Superfície de Conolly na estrutura terciária da proteína rTrialisina. Átomos de carbono (verde), oxigênio (vermelho), hidrogênio (branco), nitrogênio (azul) e enxofre (amarelo) estão ilustrados na figura. B) Estrutura terciária com o sítio ativo da proteína rTrialisina. C) Estrutura terciária da rTrialisina mostrando os aminoácidos envolvidos no sítio ativo e presença de uma ponte de hidrogênio entre os resíduos Ala e Leu.

DISCUSSÃO

9. DISCUSSÃO

9.1. Análise das Seqüências Gênicas

As seqüências gênicas obtidas com as metodologias empregadas neste trabalho apresentaram um certo grau de similaridade. Todavia, a diversidade de seqüências encontrada nos múltiplos clones analisados a partir de uma livraria de cDNA e as informações obtidas pela análise das seqüências gênicas mediante *Southern blot* (Figura 8) e *Northern blot* podem ser explicadas de duas formas: a) uso de uma população do inseto na construção da biblioteca com grande diversidade de alelos; b) encontro de cDNAs representativo de uma família multigênica.

Em conformidade com o exposto, este trabalho avaliou 10 seqüências dentre os 20 clones selecionados pelo anticorpo. Seis desses foram totalmente e mais quatro foram parcialmente seqüenciados. Os resultados obtidos sugerem que a seqüência completa do clone 30 enfeixa toda a estrutura do gene funcional. Os demais clones não encerram todas as regiões e fases de um transcrito completo. Nesse contexto, as seqüências incompletas ou defeituosas se constituíram em pseudogenes não processados ou expressos. Esses representariam cópias resultantes de mutação deletéria que perderam a função original, mas que continuam a serem expressos em nível de RNA. Parte dessas cópias gênicas são truncadas, faltando-lhes a terminação 5' codificante da porção amino-terminal (Stracham & Read, 2002).

Famílias gênicas freqüentemente têm origem na formação de pseudogenes representados por cópia não-funcional de parte ou de todo gene. Eles têm origem ainda, em genes truncados ou em fragmentos gênicos que representam cópias não funcionais de um segmento de gene. (Stracham & Read, 2002). No caso específico dos clones 9 e 1 a possibilidade de cópia não funcional não está afastada.

Caracteristicamente, famílias com representação multigênica possuem alto nível de similaridade de cDNAs nos genomas de indivíduos da mesma população. Quando dois cDNAs de uma família multigênica exibem um alto grau de similaridade em suas seqüências, sugere-se que tenham uma origem evolutiva comum recente (Stracham & Read, 2002). Entretanto, a extensão do compartilhamento da seqüência pode variar de forma que alguns desses genes podem ser não funcionais. No que concerne genes da glândula salivar do *T. infestans* verificamos pequenas diferenças em suas seqüências, como aquelas encontradas nos clones 10 e 4. Essa observação não se aplica aos clones 9 e 1 que tiveram apenas a parte C-terminal seqüenciada, possivelmente porque são cópias truncadas ou pseudogenes.

Analisando as seqüências gênicas da parte ativa da proteína codificada pelo clone 30/LMPDC e os demais clones analisados observamos algumas diferenças conservadas entre os aminoácidos: F9I, clone 23; V12F, clones, 23, 4, 10; VL18/19SS, clone 4, V32I, clone 23; V15I, clone 23; I63V, clones 10 e 4; I96K, clones 4 e 10; VE114/115AG, clones 4 e 10; I118L, clones 4 e 10; M123L, clones 23, 4 e 9; M81L, clone 9; V82G, clone 1; W142L, clones 23, 4 e 10; V32I, clone 1; W101G, clone 9; L144V, clones 4 e 10; L155F, clones 4 e 10; I158V, clones 4 e 10; V168I, clones 4 e 10; V122I, clone 1, L180V, clones 4 e 10; A196T, clones 23, 4, 10; LD196/197VE, clones 4 e 10. Para o clone 1 do resíduo de aminoácido 116 até o último 125, a seqüência é completamente diferente do que os demais clones (figura 2). O clone 9, da mesma forma que o clone 1, também do aminoácido 145 até o último 147 possui uma seqüência não similar aos demais clones (Figura 2). No alinhamento feito entre o clone 30/LMPDC e o gene da trypsinina nativa também encontramos algumas dessas variações, como: F9I, V12F, V32I, V32I, V168I, A196T.

Os motivos conservados encontrados no clone 30/LMPDC são os mesmos encontrados para o gene da trypsinina nativa. O gene da trypsinina nativa apresenta dois sítios de sulfatação, um sítio de fosforilação a quinase cAMP e cGMP dependente, dois sítios de fosforilação a Quinase C, cinco sítios de fosforilação a Caseína Quinase II, dois sítios de metilação e uma

região rica em resíduos de Lisina. Com relação ao demais clones esses mesmos motivos são encontrados em quase todos como visto na análise das seqüências gênicas.

Os sítios de fosforilação a proteínas Quinase C, cAMP-cGMP e caseino Quinase presentes na seqüência de todos os clone, geralmene são indicativos de proteínas que participam da via de transdução de sinal e cascata de fosforilação. As proteínas Quinase C são uma família heterogênia de quinases dependentes de fosfolipídios (Buckland & Wilton, 2000).

Sítios de fosforilação da proteína Quinase cAMP- e cGMP cGMP Quinase estão presentes em proteínas formadoras de poros e são reconhecidos ativadores de canais de voltagem dependente e sensíveis à Ca^{2+} - K^+ (Alioua e cols., 1998). A Quinase cAMP representa uma família de quinases ativadas pela ligação de Ca^{2+} /CaM. Em 1991, Piomelli & Greengard, 1991) mostraram que cAMP e a proteína caseína Quinase II potencializam a atividade da Fosfolipase A_2 de cérebro de rato.

Com relação ao sítio de meristoilação, sabe-se que proteínas que contém esse motivo são freqüentemente associadas à membrana celular, mas nem sempre. O fenômeno de meristoilação é muito complexo, sendo que nem toda proteína meristoilada necessariamente se associa a membrana. Em 2000, Martin & Busconi verificaram que sitios de meristoilação são necessários para a associação de proteínas Quinases dependentes de cálcio à membrana. Outra função também avaliada foi à indução de um processo citotóxico (Boutin, 1997), como também o transporte através da membrana para o retículo endoplasmático, como no caso do vírus da hepatite B.

Os sítios de sulfatação de tirosina encontrado nos clones 4, 10, 23 e 30, são modificações pós traducionais, que permitem secreção das proteínas sulfatadas em tirosinas. A sulfatação da tirosina ocorre no complexo *trans* do Golgi, sendo o último processamento realizado antes da saída do complexo de Golgi, provoca alterações estruturais nas proteína secretadas (Huttner, 1988). Para a trialisina essa característica vem ajudar na translocação da proteína, uma vez que esse motivo é encontrado na região pró da trialisina, não exencendo nenhum papel na atividade da mesma.

Apesar desses sítios estarem representados para maior ou menor nessas sequencias, sugere-se que isso seja devido as diferenças encontradas entre os aminoácidos, como já citado, e também ao tamanho das sequencias gênicas. Vale ressaltar que essas diferenças não seriam importantes para a função dessa proteína.

Com base nos relatos ainda não podemos dizer que esses sítios de fosforilação têm a função de auxiliar a ligação da proteína com a camada lipídica da membrana promovendo a formação de poros ou ação fosfolipásica, mas sim que fazem parte da cascata de fosforilação ajudando na translocação e regulação da proteína sintetizada em uma forma inativa, a fim de proteger as glândulas salivares do inseto contra danos causados pela proteína (Amino e cols. 2002).

A região rica em resíduos de lisina predita nos clones 23, 10, 4 e 30 estão presentes na região N-terminal codante da proteína ativa rTrialisina, dando uma característica estrutural catiônica anfipática em α -hélice, encontrada em muitos peptídeos líticos (Zaslhoff, 1987; Steiner e cols., 1981 e Okada, 1985). Essa região também está presente no gene da trialisina descrito por Amino e cols, (2002)

Com relação aos clones 1 e 9, esses fragmentos gênicos não apresentam essa região rica em resíduos de lisina por não apresentarem a porção N-terminal da proteína. Entretanto o clone 9 apresenta um sítio ativo de aldeído desidrogenase que pertence a uma família de enzimas que oxidam uma grande variedade de aldeídos aromáticos e alifáticos, entretanto ainda não se sabe a função biológicas dessas enzimas (Vaziliou e cols., 2000).

9.2. Expressão e Purificação da Proteína Recombinante

A capacidade de expressão e purificação de grande quantidade de proteínas em bactérias tem um grande impacto em muitos aspectos biológicos. Atualmente diversos sistemas de expressão estão disponíveis permitindo a expressão de proteínas de fusão com peptídeos "tag" com

afinidade permitindo uma simples purificação. Esses peptídeos podem ser removidos por proteases específicas, as quais reconhecem sítios de clivagem construídos entre o "tag" de afinidade e a proteína de interesse. A presença do "tag" que conferem epítomos de anticorpos específicos proporciona uma excelente ferramenta para identificação de proteínas recombinantes.

Dessa forma, em adição ao estudo molecular, este trabalho também descreve a tentativa de produção de uma forma recombinante da trypsin cataliticamente ativa. Os experimentos de expressão foram iniciados sem saber ao certo qual seria o melhor clone a ser expresso, devido a inexistência de similaridade com seqüência conhecida e a presença de duas bandas no experimento de *Northern blot*.

A primeira seqüência gênica utilizada neste estudo foi o clone 9, o qual possui aproximadamente 600 pb e começa com um códon de iniciação. Esse clone foi submetido ao sistema de expressão em células de inseto, que provê um ambiente eucariótico de expressão, conduzindo correto desdobramentos, formação de pontes dissulfeto, oligomerização e outras possíveis modificações pós traducionais tais como, clivagem de peptídeo sinal, clivagem proteolítica, N-glicosilações, O-glicosilações, fosforilações, carboximetilações, dentre outras requeridas para a atividade de algumas proteínas. Entretanto, tentativas de expressão foram frustradas por não ter sido possível detectar, sob quaisquer condições testadas, um produto compatível com a proteína codificada. A literatura científica não é rica na descrição de insucessos, sendo, portanto, difícil avaliar a freqüência com a qual fenômenos semelhantes acontecem.

Diante das construções confirmadas transcricionalmente ativas, nós achamos que as razões que poderiam justificar a ausência do produto recombinante são escassas. Uma explicação poderia ser a existência de diversas seqüências TAAG na fase aberta de leitura do gene da trypsin. Tais seqüências formam o núcleo funcional dos promotores "very late", sendo motivos relativamente raros no genoma do AcMNPV (O'Reilly e cols., 1992).

A existência dessas seqüências no sentido senso de um gene heterólogo poderia promover transcrição por iniciação interna, formando transcritos truncados. Por outro lado, a ocorrência de seqüências como esta

na fita complementar ao sentido senso de gene poderia ocasionar a produção de transcritos anti-senso, os quais poderia interferir com a tradução do gene de interesse pela formação de RNA duplex com o transcrito primário. A literatura descreve apenas um trabalho onde a expressão de um gene em baculovírus foi prejudicada pela produção de rRNA anti-senso iniciada em sua região 5' UTR (Ooi & Miller, 1991). A seqüência gênica do clone 9 apresenta a ocorrência desse tetranucleotídeo uma vez no sentido anti-senso de sua ORF.

Entretanto, outra possibilidade pode ser devido à toxicidade da proteína recombinante impossibilitando a expressão da proteína. Sendo assim, tais achados poderiam justificar a inadequação do sistema baculovírus na expressão da seqüência gênica dos clones 9 e 30.

Os insucessos descritos acima sugeriram necessidade de utilização de outro sistema de expressão de proteínas heterólogas. O sistema escolhido foi o procariótico utilizando como célula hospedeira *E. coli*. Esse sistema tem como característica reconhecer as proteínas heterólogas como alvos de proteólise. Para amenizar esse problema, nós utilizamos linhagem de *E. coli lon* deficiente de um ou mais gene codificador de enzima proteolítica. Dessa forma a linhagem escolhida como célula hospedeira foi a BL21.

Outra preocupação em relação à proteólise em bactérias é a dificuldade de estabelecer quais mutações são suficientes para estabilizar um certo polipeptídeo. Portanto, a utilização de vetores que dirigem a síntese da proteína recombinante como forma de fusão é necessário. As fusões gênicas onde o gene de interesse é inserido na extremidade 3' do gene lacZ, têm sido amplamente utilizadas. Atualmente inúmeros vetores de expressão de proteína de fusão vinculados a sistemas comerciais de purificação são utilizados. A fusão com gene de *E. coli* gera vetor estável amplamente utilizado, pois a iniciação da transcrição e tradução passa a ser dirigida por seqüências de *E. coli* habitualmente mais fáceis de serem identificadas em SDS-PAGE.

Sendo assim em um primeiro momento o clone 1 foi submetido ao sistema de expressão pET utilizando o plasmídeo de expressão pET17B.

Esse vetor contém uma seqüência adjacente ao sítio de clonagem, que codifica peptídeo T7-Tag facilitador do processo de detecção e purificação.

O objetivo principal da produção desse peptídeo recombinante foi à produção de anticorpos. Entretanto a proteína tinha níveis de expressão basal indicando que o promotor não foi suficientemente forte. Os primeiros sinais de citotoxicidade foram detectados quando, após a indução com IPTG a cultura parou de crescer. Mesmo assim após adequarmos a indução para uma condição ótima de expressão a quantidade produzida foi pequena, mas não impossibilitou que coelhos fossem imunizados com a proteína. O anticorpo específico produzido através de uma proteína desnaturada nos permitiu identificar a proteína na sua forma nativa, em experimento de imunocitocalização.

Apesar da toxicidade da proteína a literatura apresenta trabalhos com expressão de toxinas e proteínas formadoras de poros ativas obtidas em *E. coli* (Li e cols., 2001 e Koshiba e cols., 1999). Com base nestes relatos o clone 30 foi submetido ao plasmídeo da série pGEX, que produz proteína de fusão com a Glutathione S-Transferase de *Schistosoma japonicum* (Smith & Johnson, 1988). A seqüência submetida ao vetor refere-se a pró-proteína segundo Amino e cols, (2002). As proteínas de fusão a GST são facilmente purificadas em coluna de afinidade em matriz ligada a Glutathione.

As vantagens apresentadas por esse sistema são a não interferência com reações específicas do anticorpo com a proteína de interesse, o que é particularmente importante para proteínas obtidas com objetivos imunológicos. Mesmo utilizando a forma inativa da proteína às inúmeras tentativas de se produzir grandes quantidades de proteínas não foram bem sucedidas, talvez por possíveis fatores como citotoxicidade e ataque de proteases citoplasmáticas. Clivando a proteína, transformando-a na sua forma ativa, gera a atividade principal de formar poros. Essa etapa resulta na interrupção do crescimento da cultura e lise bacteriana após a indução com IPTG.

Apesar de produzir pouca quantidade da proteína, a maior parte dela estava sob forma de partículas insolúveis, chamadas “corpos de inclusão”. Essa característica do produto recombinante pode desempenhar papel

importante no contexto de degradação proteolítica. A produção dessa forma insolúvel tem a finalidade de proteger o produto das proteases citoplasmáticas.

Nesse trabalho tentamos diminuir a formação de corpos de inclusão utilizando várias estratégias. Uma das alternativas mais comumente utilizadas foi a redução da temperatura que visa minimizar o efeito hidrofóbico, principal fator na formação do produto insolúvel (Mitraki, e cols., 1991).

A recuperação do produto recombinante a partir de corpos de inclusão apresenta a grande desvantagem da necessidade de um re-enovelamento *in vitro* do polipeptídeo. Esse processo é pouco definido teoricamente e depende de protocolos que funcionam apenas para um certo número de proteínas. Inúmeros protocolos de re-enovelamento são detalhados em Marslon (1987). Diante do exposto, decidiu-se utilizar só a parte solúvel para os experimentos de purificação e caracterização funcional.

As tentativas de expressão do clone 4, nos sistemas de expressão pGEX, PET, e pMALp foram frustradas apesar da seqüência quase idêntica àquela do clone 30 e de apresentar um peptídeo. Todavia, havia variação na região N-terminal e um número maior de aminoácido na parte pró da proteína. O clone 30 também foi submetido aos sistemas de expressão pET, e pMALp, mas sem sucesso.

Os procedimentos de purificação realizados neste trabalho utilizaram o sistema pGEX, onde a proteína de interesse é fusionada com um domínio da proteína A de *S. aureus* e Glutathione S-transferase de *S. japonicum*. GST são uma classe de enzimas que utiliza glutathione (glutamylcystenylglycine) como substrato para inativar pequeno número de moléculas via formação de ácidos mercaptúricos (Jacob & Ziegler, 1990). O DNA que codifica esta proteína de 25 KDa é ligado em fase com o gene de interesse. Esse sistema é muito utilizado uma vez que a ligação entre GST e glutathione ligada a uma matriz de Sepharose é extremamente forte.

Embora a quantidade de proteína purificada tenha sido pequena o resultado obtido com esse sistema foi satisfatório uma vez que o teor de

proteínas contaminantes foi baixo e possibilitou a continuação do trabalho para os ensaios funcionais.

9.3. Atividade Funcional da rTrialisina

A partir dos resultados obtidos pela análise de homologia em banco de dados onde o clone 30 se mostrou homólogo a proteína trialisina purificada da saliva de *T. infestans* (Amino e cols., 2002) os ensaios funcionais realizados tiveram como objetivo mostrar que a proteína recombinante, além de possuir massa molecular equivalente a nativa de 22 Kda, também é funcionalmente ativa. Para isso a proteína recombinante foi expressa na sua forma inativa (pró-forma) e subsequentemente ativada pela clivagem com triapsina da saliva de *T. infestans* (Amino e cols., 2001).

Muitas toxinas são produzidas como precursores inativos, talvez para proteger a célula de uma autodestruição. Sabe-se que ativadores pró-toxinas freqüentemente envolvem processos proteolíticos por enzimas produzidas, tanto pelo próprio organismo, quanto pelo organismo hospedeiro, por exemplo, a Aerolisina é um fator de virulência produzido por *Aeromonas hydrophila*, a qual é ativada por uma endoprotease denominada furina (Abrami e cols., 1998), como também as α -defensinas que são reguladas por uma metaloprotease (Wilson e cols., 1999).

Todos os ensaios funcionais foram feitos mediante a incubação da proteína recombinante (rTrialisina) inativa e purificada e saliva. A diluição da saliva foi feita de forma que houvesse quantidade suficiente da protease para a ativação da rTrialisina. A utilização de saliva como controle teve como objetivo mostrar que a atividade foi devido à recombinante rTrialisina e não às proteínas da saliva, principalmente a Trialisina nativa.

Os resultados da incubação de formas de cultivo de *T. cruzi* e *Leishmania donovani* com a rTrialisina ativada mostraram morte dos parasitas ou perda da mobilidade. Entretanto o efeito sobre *L. Donovanii* foi mais acentuado que pode ser devido a diferença na composição da membrana nos parasitas. O efeito da rTrialisina sobre *E. coli* consistiu em

impedimento do crescimento e desaparecimento das colônias, aspectos esses compatíveis com a lise das bactérias. Essa observação é consistente com a função predita para a estrutura primária da rTrialisina, em decorrência do motivo lítico catiônico rico em resíduos de lisina em seu N-terminal entre K₆₀ e K₁₂₀, como ocorre nos peptídeos líticos antimicrobianos (Amino e cols., 2002).

Peptídeos descritos como defensinas, drosomicinas, tanacinas, gloverinas (Bulet e cols, 1999), e cecropinas (Boman e cols, 1994) são comumente encontrados em insetos. Todos eles são considerados como componentes do sistema imune do inseto, com a função de proteção contra patógenos e parasitas. Alguns trabalhos mostram que defensinas de insetos induzem rompimento da membrana, alteração da morfologia e perda da motilidade do *Plasmodium gallinaceum* (Shahabudin e cols., 1998).

Nos observamos que rTrialisina (ativada) destruiu com células L6 infectadas com *T. cruzi*, (Figura 19C). A morte da célula hospedeira apresentou vacuolização, lise da membrana celular e morte. No entanto, a quantidade de rTrialisina necessária para a lise de células L6 foi maior do que a utilizada para matar *T. cruzi* e *L. Donovanii*, ou *E. coli*. Esse resultado enfatizou a idéia de que essa proteína tem efeito semelhante àquele da classe das proteínas bacterianas formadoras de poros. Sabe-se que muitas toxinas bacterianas têm como alvo células eucarióticas e em muitos casos interferem com seu funcionamento, devido a alterações estruturais e bioquímicas, e como consequência causa necrose celular (Korostoff e cols., 1998).

A neutralização do efeito tóxico da rTrialisina foi tentada mediante sua incubação prévia com soro anti-rTrialisina. Em um desses experimentos, observamos proteção de aproximadamente 50% das células L6 contra o efeito lítico da proteína recombinante ativada. Esse achado confirma a hipótese de que é possível produzir imunidade adquirida contra o efeito de algumas moléculas farmacologicamente ativas na saliva de insetos hematófagos. A inibição parcial desse efeito lítico, contudo, sugere que a inibição dos fatores associados à aquisição do repasto e à sobrevivência do inseto-vetor requereria anticorpos policlonais com múltipla especificidade,

Sem dúvida, afirmar ou descartar essa hipótese também requereria múltiplos experimentos com os antígenos apropriados para indução dos anticorpos específicos contra várias bioaminas ativas secretadas na glândula salivar.

A atividade de fosfolipásica A_2 observada na rTrialisina ativada ficou evidente em experimentos cujo efeito foi comparado com o controle positivo da PLA_2 de abelha. Sabe-se que fosfolipases A_2 possuem atividade antibacteriana mediada por afinidade de sua superfície catiônica pelas cargas aniônicas na membrana de células eucarióticas (Buckland, 2000 e Beers e cols., 2002), conferindo-lhe a propriedade de mecanismo de defesa contra invasão e infecção de patógenos. Entretanto, não podemos dizer que essa atividade seja específica. Nós verificamos que a rTrialisina não-ativada e a saliva nativa também apresentaram certa atividade sobre o substrato da PLA_2 . Esses resultados sugerem que outras proteínas da saliva poderiam apresentar outras atividades fosfolipásicas. Por exemplo, a realização de experimentos com inibidores de fosfolipases poderiam esclarecer essa possibilidade e confirmar a especificidade desse achado preliminar.

O excelente trabalho de Amino e cols., (2002) mostrou atividade hemolítica em experimentos em que usou a Trialisina nativa, purificada por afinidade. Nós não observamos atividade hemolítica significativa em experimentos em que a rTrialisina ativada com saliva foi incubada com hemácias humanas, pois a hemólise observada foi semelhante àquela obtida após incubação só com a saliva. Esse resultado negativo pode ser explicado por várias maneiras: a) A rTrialisina pode não produzir o efeito hemolítico, ainda que discreto, como aquele descrito por Amino e cols. para a Trialisina nativa (2002); b) Nas nossas condições experimentais a hemólise que ocorreu no teste da rTrialisina foi discreta e idêntica à observada no experimento controle. c) A hemólise observada no experimento controle poderia ser devida a atividade hemolíticas de fosfolipases da saliva.

9.4. Modelagem Molecular

Os estudos das relações estrutura-função em novas proteínas têm importância no entendimento da biologia molecular do organismo estudado. Esses estudos têm uma base teórica que parte do princípio de que uma seqüência específica de aminoácidos determina a estrutura tridimensional da proteína, com variações dependentes de múltiplos fatores circunstanciais. Dessa forma, a determinação teórica da estrutura por modelagem molecular possibilita a construção de modelos e a escolha de estruturas que sugerem desenho de fármacos e mutação sítio dirigida.

Neste estudo, porém, não foi possível utilizar a modelagem molecular por homologia porque o “score” obtido foi menor que o exigido (30%). Todavia, utilizando várias outras abordagens descritas em Métodos foi possível fazer a modelagem e gerar modelo estrutural da rTrialisina uma vez que o Plot de Ramachandran indicou que 90,7% do resíduos estão corretamente posicionados permitindo um enovelamento satisfatório das cadeias laterais. A partir desse modelo fez-se a modelagem parcial da molécula porque sua porção C. terminal não mostrou similaridade com outra estrutura já conhecida. Ainda assim, o possível sítio ativo predito entre F₇₂ e G₁₈₉ pelas características da cavidade e organização das cadeias laterais.

A presença de aminoácidos hidrofóbicos e a ponte de hidrogênio entre os resíduos Leu e Val sugeriu a estabilidade da estrutura e o posicionamento de substratos nas cadeias laterais do sítio ativo. A fosforilação de Quinases na região do sítio ativo está provavelmente relacionada com a translocação e regulação da proteína. Na proteína nativa, o N-terminal relativo à parte pró (barril β) encobre o sítio ativo; após a clivagem a proteína muda a sua conformação expondo esse sítio para seu substrato específico iniciando a atividade.

A região rica em resíduos de lisinas predita no sítio condiz com a presença de α -hélices nas estruturas de caráter anfipático. As dimensões e posicionamento das hélices são compatíveis com a estrutura de proteínas de membranas, cujo efeito lítico consiste em dois passos: I) ligação à superfície da célula e II) permeabilização da membrana. A formação de hélices de

característica anfipática promove a ligação à membrana e posteriormente rompimento da mesma, resultando em um descontrole no potencial de membrana e gradiente iônico, extravasamento do conteúdo celular e finalmente morte (Parker & Pattus, 1993).

As cinco α -hélices formam um subdomínio que provavelmente está relacionado com a translocação da proteína através da membrana. Uma grande variedade de formas de hélices é encontrada em toxinas, como o domínio formador de poros da δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* (Li e cols., 1996) e colicininas (Parker e cols., 1989) e o domínio de translocação da toxina da difteria (Choe e cols., 1992). Essas formas consistem tipicamente de hélices anfipáticas empacotadas ao redor de uma hélice hidrofóbica central, que é descoberta e inserida dentro da membrana (Parker & Pattus, 1993). Entretanto isso é um tópico importante para investigações futuras

Contudo o modelo proposto é resultado de um estudo preliminar da estrutura tridimensional, sendo necessário à construção do C-terminal e caracterização do mecanismo de ação pela estrutura, como também a relação da ligação da proteína à membrana.

CONCLUSÕES

10. CONCLUSÕES

- 1- O *Northern blot* revelou dois transcritos de 809 e 1296 pb, correspondentes aos cDNAs dos clones 30 e 4 oriundos da livraria da glândula salivar do triatomíneo;
- 2- A análise em banco de dados e a caracterização molecular dos polipeptídeos deduzidos das seqüências de cDNA sugere as possibilidades de famílias de genes, pseudogenes ou variação de alelos nessa população de insetos;
- 3- O clone 30 com 800 pb encerra as características de um gene maduro codante de uma proteína de aproximadamente 28 kDa;
- 4- O sistema procariótico em pGEX permitiu a expressão da proteína recombinante (rTrialisina) ativa referente ao clone 30.
- 5- A purificação da rTrialisina foi obtida com auxílio de cromatografia de afinidade a Glutathione S-transferase.
- 6- A produção de anticorpos policlonais específicos contra a proteína de fusão (rTrialisina) foi obtida em coelhos.
- 7- Os anticorpos contra a proteína de fusão localizaram a proteína nativa apenas no primeiro par de glândulas salivares do inseto.
- 8- A modelagem molecular mostrou a estrutura tridimensional da proteína formada por um conjunto de 5 α -hélices e uma estrutura de barril beta em seu N-terminal. Sua clivagem enzimática expõe o sítio ativo da molécula.

9- A proteína rTriaIisina induziu a lise de formas de cultivo, tripomastigotas, amastigotas de *T. cruzi*, e de formas promastigotas de *L. donovani* . Lise completa foi observada após 9 horas de incubação .

10- A proteína rTriaIisina induziu a lise células L6 infectadas com *T. cruzi*.

11- A proteína rTriaIisina teve efeito bacteriolítico em *E. coli*.

PERSPECTIVAS

11. PERSPECTIVAS

Vacinação no século XXI

Desde a criação da vacina contra a varíola por Louis Pasteur, foram desenvolvidos outros vários outros métodos de vacinação mediante uso de organismos inativados, atenuados ou toxinas bacterianas, ou ainda com vírus vivos atenuados.

Diante dos grandes avanços da ciência no século XX, a manipulação de microorganismos visando imunização genética gerou nova expectativa de produção de vacina. No caso da pesquisa visando à produção de vacina contra patógenos transmitidos por insetos hematófagos, ou contra a picada desses insetos-vetores, a quantidade diminuta do imunógeno que se obtinha era a grande limitação oposta a esse objetivo. Entretanto, a clonagem de organismos patogênicos em vetor de expressão e a produção de proteínas recombinantes em grande quantidade deram fundamento a essa expectativa de vacinação, pois abriu caminho para imunizar experimentalmente animais de laboratório e observar a ativação da resposta imune específica.

Durante a última década produzidas vacinas de DNA contra infecções virais, bacterianas e parasitárias (Tang e cols., 1992; Ulmer e cols., 1993 e Mor e cols., 1995). A vacina de DNA passou a ser, portanto, mais uma forma de apresentação de antígenos para o sistema imunológico. A habilidade de um DNA plasmidial estimular linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ com o antígeno codificado pelo gene específico sugere o potencial deste tipo de vacinação na proteção contra doenças que requerem os dois tipos de imunidade, celular e humoral. Todavia, aspectos de biosegurança e de restrições éticas são questões ainda não resolvidas quanto ao uso desse tipo de vacina para uso na medicina veterinária e humana.

Em 1999, Lowrie e cols., desenvolveram uma vacina de DNA contra o bacilo da tuberculose. Essa vacina, além de dar uma proteção maior que aquela obtida com o BCG (*Bacillus Calmette-Guerrin*), também pode ser utilizada como adjuvante no tratamento da doença com as drogas usadas em

larga escala proporcionando cura mais rápida da doença. As doenças parasitárias também tem sido alvo de investigação de novas vacinas de DNA recombinante. A vacina contra *Taenia sp*, agente causal da cisticercose, conferiu 92% de proteção a ovelhas (Lightowlers e cols., 2000).

Vacina de DNA com antígeno recombinante expresso em *E. coli* mostrou efeito protetor contra o carrapato *Boophilus microplus* (Willadsen, 1995). Os pesquisadores cubanos desenvolverem vacina recombinante em levedura *Pichia pastoralis* e a comercializaram (Heber Biotec S.A., Havana), após testes de campo que mostraram atividade protetora. Atualmente, essa vacina está sendo testada por pesquisadores brasileiros e cubanos, para avaliar o efeito protetor sobre carrapatos de bovinos em uma região do Brasil. (Canales e cols., 1997; Garcia-Garcia e cols., 2000). Em 2001, Tsuda e cols., caracterizaram o efeito protetor em coelhos vacinados com uma proteína da saliva do carrapato *Haemaphysalis longicornis* expressa em *E. coli*. Esses autores verificaram efeito protetor e sugeriram a importância de vacinação com coquetel de proteínas.

Com relação às doenças transmitidas por protozoários, em 2001b, Valenzuela, e cols., vacinaram camundongos com proteínas da saliva do inseto *Phlebotomus papatasi* vetor da *Leishmania major* e verificaram proteção significativa. Em contraste, a imunização com o Maxadilan - peptídeo da saliva desse mesmo inseto - acentuou a infecção pela *Leishmania major*. Entretanto, a vacinação contra epítomos desse mesmo peptídeo protegeu camundongos contra a infecção. (Morris e cols., 2001).

Teoricamente, vacinação com DNA recombinante ofereceria algumas vantagens em relação às vacinas com o antígeno nativo ou recombinante. Uma característica importante decorre do fato de que a síntese dos antígenos endógenos origina estruturas muito semelhantes à molécula nativa sintetizada pelo patógeno. Assim, os fragmentos protéicos são criados com uma conformação adequada para indução de uma resposta imunológica mais efetiva. Por outro lado, a imunidade adquirida por vacina de DNA persistiria por longo período de tempo, devido à constante produção do antígeno no organismo vacinado potenciando a estimulação dos linfócitos de memória imunológica. Também, a vacina de DNA poderia ser vanjatososa

economicamente pelo seu menor custo em relação a vacinas que empregam proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos (Charttergoon e cols., 1997). Essas características assumem maior importância diante do emprego de vacinas em programas de imunizações em massa, em regiões de difícil acesso. Infelizmente, ainda não se encontraram respostas para as perguntas de biosegurança e éticas.

Com base nos fatos relatados, as perspectivas desse trabalho são:

- a) Produção da proteína recombinante em larga escala pela transferência do gene para vetores de expressão com promotores eucarióticos, ou expressão da parte ativa da Trialisina de forma truncada.
- b) Construção do C-terminal e caracterização do mecanismo de ação pela estrutura obtida.
- c) Testes biológicos de imunização genética ou com a rTrialisina para caracterizar as células e outros componentes da resposta imune que são responsáveis por reatividade imune e inibição da função de cada componente da saliva.
- d) Avaliação do efeito da imunização contra a picada do triatomíneo, pela comparação de parâmetros tais como tempo de repasto, volume do repasto, tempo de crescimento até o estágio adulto, oviposição, fertilidade e longevidade, em triatomíneos alimentados em animais imunes e em controles, não-imunes.
- e) Testes com inibidores de fosfolipases e de avaliação de outras funções biológicas sugeridas pela modelagem molecular, e ainda, determinação da massa da proteína recombinante, cristalografia e outros estudos de estrutura terciária da proteína.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMI, L.; FIVAZ, M.; DECROLY, E.; SEIDAH, N.G.; JEAN, F.; THOMAS, G.; LEPPLA, S.H.; BUCKLEY, J.T.; VAN DER GOOT, F.G. The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin. **J Biol Chem**, v.273, n.49, p.32656-32661, 1998.
- ALESHIN, A.E.; KIRBY, C.; LIU, X.; BOURENKOV, G.P.; BARTUNIK, H. D.; FROMM, H.J.; HONZATKO, R.B. Crystal structures of mutant monomeric hexokinase I reveal multiple ADP binding sites and conformational changes relevant to allosteric regulation. **J.Mol.Biol**, v.296, p.1001, 2000.
- ALIOUA, A.; TANAKA, Y.; WALLNER, M.; HOFMANN, F.; RUTH, P.; MEERA, P.; TORO, L. The Large Conductance, Voltage-dependent, and Calcium-sensitive K Channel, Hslo, Is a Target of cGMP-dependent Protein Kinase Phosphorylation *in Vivo*, **J. Biol. Chem**, v.273, n.49, p. 32950–32956, 1998.
- ALTEMANI, A.M.; BITTENCOURT, A.L.; LANA, A.M. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chagas' disease: a qualitative and quantitative analysis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 62, n. 2, p. 319-324, 2000.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D. J. GAPPED BLAST AND PSI-BLAST. A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v.25, P.3389-3402, 1997.
- AMANN, E. & BROSIUS, J. ATG vectors for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 40, p. 183-190, 1985.
- AMINO, R.; TANAKA, A.S.; SHENKMAN, S.; Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae). **Insect Biochem Mol Biol**, v. 31, n.4-5, p.465-472, 2001.
- AMINO, R.; MARTINS, R.M.; PROCOPIO, J.; HIRATA, I.Y.; JULIANO, M.A.; SCHENKMAN, S. Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. : **J Biol Chem**, v.277, n.8, p.6207-6213, 2002.
- ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; SADIGURSKY, M. Enhancement of chronic trypanosoma cruzi myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. **Am J Pathol**, v.127, p. 467-73, 1987.
- ASHMARIN, I.P.; TKACHENKO, S.B.; RUD'KO, I.A.; KORNEVA, E.A.; KOKRIAKOV, V.N.; KUBATIEV, A.A. Effect of defensin on platelet functional activity. **Biull. Eksp. Biol. Med.**, v.115, n. 1, p. 23-25, 1993.

- ATSUMI, G.; MURAKAMI, M.; KOJIMA, K.; HADANO, A.; TAJIMA, M.; KUDO, I. Distinct roles of two intracellular phospholipase A₂s in fatty acid release in the cell death pathway: proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase Aca onhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of group VI Ca²⁺- independent phospholipase A₂ augments spontaneous fatty acid release. **J. Biol. Chem**, v.275, p.18248-18258, 2000
- AZAMBUJA, P.D.; GUIMARAES J.Á.; GARCIA, E.D. Haemolytic factor from the crop of *Rhodnius prolixus*: Evidence and partial characterization. **Journal of insect Physiology**, v.11, p.833-838, 1983.
- BALSINDE, J.; BIANCO, I.D.; ACKERMANN, E.J.; CONDE-FRIEBOES, K.; DENNIS, E.A. Inhibition of Ca²⁺-dependent phospholipase A₂ prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D₁ macrophages. **Proc. Natl. Acad.Sci.USA**, v. 92, p. 8527-8531, 1995.
- BALSINDE, J.; BALBOA, M.A.; INSEL, P.A.; DENNIS, E.A. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v.39, p.175-179, 1999.
- BANNAI, H.; TAMADA, Y.; MARUYAMA, O.; NAKAI, K.; MIYANO, S. Views: Fundamental Building Blocks in the Process of Knowledge Discovery. In: PROCEEDINGS OF THE 14TH INTERNATIONAL FLAIRS CONFERENCE, 2001.
- BARILAS-MURY, C.; WIZEL, B.; HAN, Y.S. Mosquito immune responses and malaria transmission: lessons from insect model systems and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 30, p.429-442, 2000.
- BARRETO, A.L.B. Notas entomológicas II. Estudo sobre anatomia do gênero *Triatoma*: aparelho salivar. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.15, n.2, p.127, 1922.
- BARRETO, J.C.; Chagas' disease. **Br. J. Anaesth.**, v. 51, n. 12, p. 1189,1979.
- BEERS, S.A., BUCKLAND, A.G., KODURI, R.S., CHO, W., GELB, M.H., WILTON, D.C. The antibacterial properties of secreted phospholipases A₂: a major physiological role for the group IIA enzyme that depends on the very high pI of the enzyme to allow penetration of the bacterial cell wall. **J. Biol. Chem**, v.277, n.3,p.1788-1793,2002.
- BEERSTSEN, B.T.; CHAMPAGNE, D.E.; COLEMAN, J.L.; CAMPOS, Y.A.; JAMES, A.A. Characterization of the Sialokinin I gene encoding the salivary vasodilator of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect. Mol. Biol.**, v8, n,4, p. 459-467, 1999.
- BENSCH, K.W.; RAIDA, M.; MAGERT, H.J.; SCHULZ-KNAPPE, P.; ANDFORSSMANN, W.G. hBD-1: a novel L-defensin from human plasma.

FEBS Lett., v.368, p.331-335, 1995.

BITTENCOURT, A.L. Vertical transmission of HTLV-I/II: a review. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 40, n. 4, p. 245-251, 1998.

BOISBOUVIER, J.; PROCHNICKA-CHALUFOUR, A.; NIETO, A.R.; TORRES, J.A.; NANARD, N.; RODRIGUEZ, M.H.; POSSANI, L.D.; DELEPIERRE M. Structural information on a cecropin-like synthetic peptide, Shiva-3 toxic to the sporogonic development of *Plasmodium berghei*. **Eur. J. Biochem.**, v.257, n.1, p.263-273, 1998.

BOLLAG, D. M.; ROZYCKI, M. D.; EDELSTEIN, S. J. **Protein Methods**. Wiley-Liss, Inc. 2 ed. 1996.

BOMAN, H.G. Cecropins: antibacterial peptides from insects and pigs. In: *Phylogenetic perspectives in immunity: the insect host defense* (Hoffman, J.A., Janeway, C.A.J., Natori, S., eds). R. G. Landes Company, Austin, TX. P 3-17, 1994.

BOMAN, H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. **Ann. Rev. Immunol**, v.13, p. 61-92, 1995.

BOULANGER, N.A.; BRUN, R.B.; EHRET-SABATIER, L.A.; KUNZ, C.B.; BULET, P. A. Immunopeptides in the defense reactions of *Glossina morsitans* to bacterial and *Trypanosoma brucei brucei* infections. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v.32, p.369-375, 2002.

BOUTIN, J.A. MYRISTOYLATION. **Cell. Signal**, v.9, n.1, p. 15-35, 1997.

BOWMAN, A.S.; COONS, L. B.; NEEDHAM, G. R.; SAUER, J. R. Tick saliva: Recent advances and implications for vector competence. **Medical and Veterinary Entomology**. 1997a.

BOWMAN, A.S.; GENGLER, C.L.; SURDICK, M.R.; ZHU, K.; ESSEMBERG, R.C.; SAUER, J.R.; DILLWITH, J. W. A novel phospholipase A₂ activity in saliva of the lone star tick, *Amblyoma americanum* (L). **Experimental Parasitology**, v. 87, p. 121-132, 1997b.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Ann. Ver. Microb**, v. 27, p. 347-382, 1973.

BROEKAERT, W.F.; TERRAS, F.R.; CAMMUE, B.P.; OSBORN, R.W. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. **Plant. Physiol.**, v.108, n.4, p.1353-1358, 1995.

- BUCKLAND, A.G., WILTON, D.C. Anionic phospholipids, interfacial binding and the regulation of cell functions, **Biochem. Biophys. Acta**, v.1483, p.199-206, 2000a.
- BUCKLAND, A.G., WILTON, D.C. The antibacterial properties of secreted phospholipases A₂. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1488, p.71-82, 2000b.
- BUGESS, S. Molecular weights of lepdopteran baculovirus DNAs: derivation by electron microscopy. **J. Gen. Virol.**, v. 37, p.501-510, 1997.
- BULET, P., HETRU, C., DIMARCQ, J.L., HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Dev. Comp. Immun.**, v. 23, p.329-344, 1999.
- CANALES, M.; ENRIQUEZ, A.; RAMOS, E.; ET AL. Large scale production in *Pichia pastoralis* of the recombinant vaccine Gavac TM against cattle tick. **Vaccine**, v.15, p.414-422, 1997.
- CAPELO, M.; BERGUM, P.W.; VLASUK, G.P.; FURMIDGE, B.A.; PRITCHARD, D. I.; AKSOY, S. Isolation and characterization of the tse-tse thrombin inhibitor: A potent antithrombotic peptide from the saliva of *Glossina morsitans morsitans*. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 54, p. 475-480, 1996.
- CHALK, R.; TOWNSON, H.; NATORI, S.; DESMOND, H.; HAM, P.J. Purification of an insect defensin gene from mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v 24, p. 402-410, 1994.
- CHAMPAGNE, D.E. The role of salivary vasodilators in blood-feeding and parasite transmission. **Parasitol. Today**, v. 10, p. 430-433, 1994
- CHAMPAGNE, D. E.; RIBEIRO, J. M. C. Sialokinin I and II: Vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 138-142, 1994.
- CHAMPAGNE, D.E.; SMART, C.T.; RIBEIRO, J.M.C.; JAMES, A.A. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p. 694-698, 1995.
- CHATTERGOON, D.E.; NUSSENZVEIG, R.H.; RIBEIRO, J.M.C. 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.**, v. 270, p. 8691-8695, 1995.
- CHEN, L.H.; BABBIT, P.C.; VASQUEZ, J.R.; WEST, B.L.; KENYON, G.L. Cloning and expression of functional rabbit muscle creatina kinase in *Escherichia coli*. Addressing the problem of microheterogeneity. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 18, p 12053-12057, 1991.

- CHO, W.; FU, T.F.; CHEN, C.C.; HO, C.M. Cloning and characterization of cDNAs encoding the antibacterial peptide, defensin A, from the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 26, p. 395-402, 1996.
- CHO, W.; FU, T.F.; CHIOU, J.Y.; CHEN, C.C. Molecular characterization of a defensin gene from the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 27, p. 351-358, 1997.
- CHOE, S.; BENNETT, M.J.; FIJJI, G.; CURMI, P.M.G.; KANTARDJIEFF, K.A.; COLLIER, R.J.; EISENBERG, D. The crystal structure of diphtheria toxin, **Nature**, v. 357, p.216-222, 1992
- CHOW, G.; SUBBURAJU, S.; KINI, R.M. Purification, characterization, and amino acid sequence determination of acanthins, potent inhibitors of platelet aggregation from *Acanthophis antarcticus* (common death adder) venom. **Arch Biochem Biophys**, v.15, n.354(2), p.232-238, 1998
- COCIANCICH, S.; GHASI, A.; HETRU, C.; HOFFMANN, J.A.; LETELLIER, L. Insect defensin, an indusible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. **J. Biol. Chem.**, v.268, p. 19239-19245, 1993.
- COLOWICKS, S.P.; KAPLAN, N.O.; BERGER, S.; KIMMEL, A.R. Methods in enzymology: **Gene expression Technology**. Academic Press Inc. New York, v. 185, 2000.
- CUBA, C.A., **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 31, p. 207-220, 1998.
- CUPP, M.S. & CUPP, E.W. Ramberg, F.B. salivary gland apyrase in black flies (*Simulium vittatum*). **J. Insect Physiol**, v.39, n.10, p.517-21, 1993.
- CUPP, M.Y.; RIBEIRO, J.M.C.; CUPP, E.W. Vasodilative activity in black fly salivary glands. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v.50, p. 241-246, 1994.
- CUPP, E.W.; CUPP, M.S. Black fly (Diptera: Simuliidae) salivary secretions: Importance in vector competence and disease. **J Med. Entomol**, v.34, p.87-94, 1997.
- CUPP, M.S.; RIBEIRO, J.M.C.; CHAMPAGNE, D.E.; CUPP, E.W. Analysis of cDNA and recombinant protein for a potent vasoactive protein in saliva of a blood-feeding black fly, *Simulium vittatum*. **J. Exp. Biol**, v.201, p.1553-1561, 1998.
- DAN, A.; PEREIRA, M.H.; PESQUERO, J.L.; DIOTAIUTI, L.; BEIRAO, P.S. Action of the saliva of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) on sodium channels. **J. Med. Entomol.**, v.36, n.6, p.875-879, 1999.
- DAS, A. Overproduction of proteins in *Escherichia coli*: Vectors, hosts and strategies. **Meth. Enzimol**, v.182, p. 93-112. 1990.

- DATHE, M. & WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1462, p.71-87, 1999.
- DELUCCA, A.J.; BLAND, J.M.; JACKS, T.J.; GRIMM, C.; CLEVELAND, T.E.; WALSH, T.J. Fungicidal activity of cecropin A. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 41, n.2, p. 481-482, 1997.
- DENNIS, E.A. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. **Trends Biochem Sci**, v.22, p.1-2, 1997.
- DEVILLIER P.; BACCARD N.; ADVENIER C. Leukotrienes, leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma: an update. Part II: clinical studies with leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma. **Pharmacol Res**, v.40, p.15-29, 1999
- DIAS, J.C.P. & COURA, J.R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas**. Rio de Janeiro, FIOCRUZ, p.486, 1997a
- DIAS J.C.P. & COURA J.R. Epidemiologia. Em :**Dias JCP,Coura JR(eds) Clínica terapêutica da doença de Chagas**. Uma abordagem prática para o clínico geral.Rio de Janeiro :FIOCRUZ Editora, p.33-66, 1997b.
- DIAZ, C.; LEON, G.; RUCAVADO, A.; ROJAS, N.; SCHROIT. A.J.; GUTIERREZ J.M. Modulation of the susceptibility of human erythrocytes to snake venom myotoxic phospholipases A(2): role of negatively charged phospholipids as potential membrane binding sites. **Arch Biochem Biophys**, v. 391, n.1, p.56-64, 2001.
- DIEP, D.B.; NELSON, K.L.; RAJA, SRIKUMAR, M.; PLESHAK, E.N.; BUCKLEY, J.T. Glycosylphosphatidylinositol anchors of membrane glycoproteins are binding determinants for the channel-forming toxin aerolysin. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 4, p. 2355-2360, 1998.
- DZUNG, B.D.; KIM, L.N.; SRIKUMAR, M.R.; ERIN, N.P.; BUCKLEY, J.T. Glycosylphosphatidylinositol anchors of membrane glycoproteins are binding determinants for the channel-forming toxin aerolysin. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 4, p. 2355-2360, 1998.
- DIMOPOULOS, G.; RICHMAN, A.; MULLER, H.M.; KAFATOS, F.C. Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to the bacteria and malaria parasite. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 94, p.11508-11513, 1997.
- FEHLBAUM, P.; BULET, P.; MICHAUT, L.; LAGUEUX, M.; BROEKAERT, W.F.; HETRU, C.; HOFFMAN, J.A. Insect immunity: septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p.33159-33163, 1994.

- FEHLBAUM, P.; BULET, P.; CHERNYSH, S.; BRIAND, J.P.; ROUSSEL, J.P.; LETELLIER, L.; HETRU, C.; HOFFMANN, J.A. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.3, p.1221-1225, 1996.
- FEIJO, G.C. **Proteínas recombinantes da saliva de *Triatoma infestans***. Brasília, 2001. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.
- FONTES, W.; CUNHA, R.B.; SOUSA, M.V.; MORHY, L.M. Improving the recovery of lysine in automated protein sequencing. **Analytical Biochemistry**, v.258, p.259 - 267, 1998.
- FOUCAULD, M. **Le mots et les choses, archéologie des sciences humaines**, gallinard, nrf, 1966.
- FOUCAULD, M. **La histoire de la médecine**, gallinard, 1973.
- FRANCISCHETTI, I.M.; RIBEIRO, J.M.; CHAMPAGNE, D.; ANDERSEN, J. Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 17, p.12639-12650, 2000.
- FRANCISCHETTI, I.M.; VALENZUELA, J.G.; ANDERSON, J.F.; MATHER, T.N.; RIBEIRO, J.M. Ixolaris, a novel recombinante from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. **Blood**, v.99, n.10, p.3602-12, 2002.
- FRIEND, W.G.; SMITH, J.J.B. Feeding in *Rhodnius prolixus*; Mouthpart activity and salivation and their correlation with changes of electrical resistance. **J. Insect Physiol**, v.17, p.233-243, 1971.
- GANZ T. & LEHRER R. I. Defensins. **Curr. Opinion Immunol**, v.6, p.584-589, 1994.
- GANZ, T.& WEISS, J. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. **Semin Hematol.**, v. 34, n.4, p. 343-354, 1997.
- GARCIA, I. S. Distribuição, densidade e domiciliação das espécies secundárias e o risco de transmissão da Doença de Chagas no estado de Goiás. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v.26, p. 4041, 1993.
- GARCIA-GARCIA, J.C.; MONTERO, C.; REDONDO, ET AL. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the

- recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v.18, p.2275–2287, 2000.
- GARCIA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; ALAMILLO, J.M.; RODRIGUEZ-PALENZUELA, P. Plant defense peptides. **Biopolymers**, v. 47, n. 6, p. 479-491, 1998.
- GEERING, K. Haemolytic activity in the blood clot of *Aedes aegypti*. **Acta tropica**, v.32, p.145-151, 1975.
- GEORGIU, G & VALAX, P.. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol**, v.7, p.190-197, 1996.
- GENNIS, R.B. **Biomembranes: Molecular Structure and Function**, Springer-Verlag, New York, p.82, 1989.
- GIEARASCH, L. Signal Sequences. **Biochem**, v.28, p.923-930, 1989.
- GOEDEL, D.V. Systems for heterologous gene expression. **Methods Enzymology**, v.185, p.3-7, 1990.
- GRIMM, E.; ARBUTHNOT, P. A rapid purification of recombinant *Taq* DNA polymerase by freezing and high temperature thawing of bacterial expression cultures. **Nucl. Acids. Res.**, v. 23, n.21, p. 4518-45-19, 1995.
- GWADZ, R.W.; KASLOW, D.; LEE, J.Y.; MALOY, W.L.; ZASLOFF, M.; MILLER, L.H. Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 9, p. 2628-2633, 1989.
- HAENDLER, B.; BECKER, A.; NOESKE-JUNGBLUT, C.; KRATZCHMAR, J.; DONNER, P.; SCHEULINING, W.D. Expression of active recombinant pallidipin, a novel platelet aggregation inhibitor, in the periplasm of *Escherichia coli*. **J. Insect Physiol**, v. 28, p.655-660, 1995.
- HALL, R.H.; DRASAR, B.S. *Vibrio cholerae* HlyA hemolysin is processed by proteolysis. **Infect. Immun.**, v. 58, n.10, p. 3375-3379, 1990.
- HARDER, J., BARTELS, J., CHRISTOPHERS, E. SCHRODER, J.M. Isolation and characterization of Human β -defensin-3, a novel Human inducible peptide antibiotic. **J. Biol. Chem.**, v.276, n.8, p.5707-5713, 2001.
- HELLMANN, K. & HAWKINS, R.I. Anticoagulant and fibrinolytic activities from *Rhodnius prolixus*. **Nature**, v.201, p.1008-1009, 1964.
- HELLMANN, K. & HAWKINS, R.I. Prolixin-S and Prolixin-G; two anticoagulants from *Rhodnius prolixus*. **Nature**, v.207, p.265-267, 1965.

- HENZE, P. P. C.; HAHN, U.; ERDMANN, V. A. ULBRICH, N. Expression of the chemically synthesized coding region for the cytotoxin α -sarcin in *Escherichia coli* using a secretion cloning vector. *Eur. J. Biochem*, v.192, p.127-131, 1990
- HETRU, C.; HOFFMANN, D.; BULET, P. Antimicrobial peptides from insects. In: Brey PT, Hultmark D, editors. **Molecular mechanisms of immune responses in insects**. Chapman & Hall, p. 40-46, 1998.
- HOCKING, B. Blood-sucking behaviour of terrestrial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 16, p. 1-26, 1971. daí
- HODGSON, J. Expression systems: a user s guide. **Bio/Technology**, v.11, p.887-893, 1993.
- HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J. M.; HETRU, C. Innate immunity in higher insects. **Curr. Opin. Immunolo**, v.8, p.8-13, 1996.
- HORTON, P. & NAKAI, K. A probabilistic classification system for predicting the cellular localization sites of proteins. **Intellig. Syst. Mol. Biol**, v.4, p.109-115, 1996.
- HORTON, P. & NAKAI, K. Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbor classifier, **Intellig. Syst. Mol. Biol**, v.5, p.147-152, 1997.
- HUGGINS, D.W. Doença de Chagas. **Rev Bras Med**, v.50, p.16-48, 1993.
- HULTMARK, D. Immune reactions in Drosophila and other insects: a model for innate immunity. **Trends Genet**. v.9, p.178-183, 1993.
- HUTTNER, W.B. Tyrosine sulfation and the secretory pathway. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 50, p. 363-376, 1988.
- JACOBY, W.B. & ZIEGLER, D.M. The enzymes of detoxication. **J. Biol. Chem**, v.265, p.20715-20718, 1990.
- JORG, M.E. The transmission of *Trypanosoma cruzi* via human milk. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 25, n. 1, p. 83, 1992.
- KAGAN, B.L.; GANZ, T.; LEHRER, R.I. Defensins: A family of antimicrobial and cytotoxic peptides. **Toxicology**, v. 87, n.1-3, p.131-149, 1994.
- KANEKO, Y.; YUDA, M.; LIO, T.; MURASE, T.; CHINZEI, Y. Kinetic analysis on nitric oxide binding of recombinant Prolixin-S, a nitric oxide transport protein from the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1431, n.2, p.492-499, 1999.

- KANG, D.; ROMANS, P.; LEE, J.Y. Analysis of a lysozyme gene from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. **Gene**, v. 174, n. 2, p. 239-244, 1996.
- KENTA, N. Protein sorting signals and prediction of subcellular localization. **Adv. Protein Chem**, v.54, p.277-344, 2000.
- KIMBRELL, D.A. Insect antibacterial proteins: not just for insects and against bacteria. **Bioessays**, v.12, p.657-663, 1991.
- KITAJIMA, E. W. Classification, identification and characterization os insect viruses. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.84, p.9-15, 1989.
- KISHIMOTO, K.; FUJIMOTO, S.; MATSUMOTO, K.; YAMANO, Y.; MORISHIMA, I. Protein purification, cDNA cloning and gene expression of attacin, an antibacterial protein, from eri-silkworm, *Samia Cynthia ricini*. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v.32, n.8, p.881-887, 2002.
- KOROSTOFF, J., WANG, J.F., KIEBA, I., MILLER, M., SHENDER, B.J., LALLY, E.T. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leucotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. **Infection and Immunity**, v.66, n.9, p.4474-4483, 1998.
- KOSHIBA, T.; RAYASHI, T.; MIWAKO, I.; KUMAGAI, I.; IKURA, T.; KAWANO, K.; NITTA, K.; KUWAJIMA, K. Expression of a synthetic gene encoding canine milke lysozyme in *Escherichia colil* and characterization of the expressed protein. **Protein Engineering**, v.12, p.429-435, 1999.
- KROLL, M.H. & SULIVAN, R. In **Thrombosis and Hemorrhage (localzo, J., and Schafer, A.L, eds)** 2nd Ed., pp. 261-291, Williams & Wilkins, Baltimore. 1998.
- KUHN-NENTWIG, L.; MULLER, J.; SCHALLER, J.; WALZ, A.; DATHE, M.; NENTWIG, W. Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). **J.Biol.Chem.**, v. 277, n. 13, p. 11208-11216, 2002.
- LACOMBE, D. Anatomia e histologia das glândulas salivares nos triatomíneos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, V. 94, P. 557-564, 1999.
- LAL, A. A.; SCHRIEFER, M. E.; SACCI, J. B.; GOLDMAN, I. F.; WILEMAN, V. L.; COLLINS, W. E. & AZAD, ^a F. Inhibition of Malaria Parasite Development in mosquitoes by anti-mosquito midgut antibodies. **Infect. Immunity**, p.316-318, 1994.
- LALLY, E.T.; KIEBA, I.R.; SATO, A.; GREEN, C.L.; ROSENBLOOM, J.; KOROSTOFF, J.; WANG, J.F.; SHENKER, B.J.; ORTLEPP, S.; ROBINSON, M.K.; BILLINGS, P.C. RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 48, p. 30463-30469, 1997.

- LOWENBERGER, C.; CHARLET, M.; VIZIOLI, J.; KAMAL, S.; RICHMAN, A.; CHRISTENSEN, B.M.; BULET, P. Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and mRNA expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti*. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.29, p.20092-20097, 1999.
- LOZZI, S.; FAUDRY, E.; KIEFFER, S.; SANTANA, J.M.; ROCHA, P.S.; ARAÚJO, C.N.; FELIX, C.A.O.; SOUZA, M.V.; TEIXEIRA, A.R.L. Oligomeric salivary apyrase of *Triatoma infestans*. (submitted).
- LUCKOW, V.A.; LEE, S.C.; BARRY, G.F.; OLINS, P.O. Efficient generation of infectious recombinant beculoviruses by sitespecific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. **J. Virol.**, v. 67, n. 8, p. 4566-4579, 1993.
- LUNDSTROM, A.; LIU, G.; KANG, D.; BERZINS, K.; STEINER, H. Trichoplusia ni gloverin, an inducible immune gene encoding an antibacterial insect protein. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, n. 7, p. 795-801, 2002.
- MAEDA, S.; KAWAI, T.; OBINATA, M.; FUJIWARA, H.; HORIUCHI, T.; DAEKE, Y.; SATO, Y.; FURUSAWA, M. Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. **Nature**, v. 315, p. 592-594, 1985.
- MARSLON, F.A.O. **The purification of eukariotic polypeptides expressed en *Escherichia coli*. In DNA cloning: A practical approach** (ed. D. M. Glover), IRL Press, Oxford, v. 3, p. 59, 1987.
- MARTIN, M.; BUSCONI, L. Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. **The Plant Journal**, v.24, p. 429,435, 2000.
- MARTI-RENOM, M.A.; STUART, A.; FISER, A.; SÁNCHEZ, R.; MELO, F.; SALI, V. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** V. 29, p. 291-325, 2000.
- MATSUZAKI, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self defence? **Biochem. Soc. Trans.**, v. 29, p. 598-601, 2001.
- MENZIES, B.E. & KOURTEVA, I. *Staphylococcus aureus* α -toxin induces apoptosis in endothelial cells. **FEMS. Immun. Med. Microbiol.**, v.29, p.39-45, 2000.
- MICHAELIS, S.; BECKIWITH, J. Mechanism of incorporation of cell envelope proteins in *Escherichia coli*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 36, p. 435-65, 1982.
- MICHAUT, L.; FEHALAUM, P.; MONIATTE, M.; DORSSELAER, A.V.; REICHHART, J.M.; BULET, P. Determination of the disulfide array of the first inducible antifungal peptide from insects: rosmicycin from *Drosophila melanogaster*. **FEBS**, V.395, P.6-10, 1996.

- MILLER, L.K. Baculoviruses as gene expression vectors. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.42, p.177-199, 1988.
- MILLER, L. K., D. MILLER & M. ADANG. An insect virus for genetic engineering: developing polyhedrin substitution vectors. In P. Lurquin & A. Kleinhofs (eds.) **Genetic engineering in eukaryotes**. New York, Plenum Press. p. 89-97, 1983.
- MISSIAKAS, D.; RAINA, S. Protein folding in the bacterial peroplasma. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 8, p. 2465-71, 1997.
- MITRAKI, A.; HASSE-PETTINGELL, C.; KING, J. in **Protein Folding**. American Chemical Society. ed. Washington, p.35-49, 1991
- MOR, G.; KLIMMAN, D.M.; SHAPIRO, S.; HAGIWARA, E.; SEGEGAH, M.; NORMAN, J.A.; HOFFMAN, S.L.; STEINBERG, A.D. Complexoty of the citokine and antibody response elicited by immunizing mice with *Plamodium yoelli* circunsporozoite protein plasmid DNA. **J. Immunol**, v.155, p.2039, 1995.
- MOREIRA-FERRO, C. K.; DAFFRE, S.; JAMES, A. A.; MARINOTTI, O. A lysosyme in the salivary glands of the malaria vector *Anopheles darlingi*. **Insect Molecular Biology** v.7, p.257-264, 1998.
- MORRIS, R.V.; SHOEMAKER, C. B.; DAVID, J.R.; LANZARO, G. C.; TITUS, R. G. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccination against it protects against *L. major* infection, **J. Immunol**, v.167, p. 5226-5230, 2001
- MULICHAK, A. M.; WILSON, J.E.; PADMANABHAN, K.; GARAVITO, R. M. The structure of mammalian hexokinase-1. **Nat. Struct. Biol.**, v.5, p. 555, 1998.
- MOUNIER, C.; FRANKEN, P.A.; VERHEIJ, H.M.; BON, C. The anticoagulant affect of the human secretory phospholipase A₂ on blood plasma and on a cell-free system is due to a phospholipd-independent mechanism of action involving the inhibition of factor Va. **Eur. J. Bichem.**, v. 273, p. 778-785, 1996.
- MURAKAMI, M. & KUDO, I. Phospholipase A₂ **J. Biochem.**, v.131, p. 285-292, 2002.
- NAKAI, K. & KANEHISA, M. A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. **Genomics**, v.14, p. 897-911, 1992.
- NASCIMENTO, C.; MARASSÁ, A. M.; CURADO, I. & PIAZZA, R. M. F. Encontro de *Panstrongylus megistus* em ecótopo artificial: domiciliação ou mera visitação?. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 30, p. 333-336, 1997.

- NOESKE-JUNGBLUTT, C.; KRATZSCHMAR, J.; HAENDLER, B.; ALAGON, A.; POSSANI, L.; VERHALLEN, P.; DONNER, P.; SCHLEUNING, W. D. An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipenis*. **J. Biol. Chem.**, v.264, p.5050-5053, 1994.
- NOESKE-JUNGBLUT, C.; HAENDLER, B.; DONNER, P.; ALAGON, A.; POSSANI, S, SCHLEUNING, W. D. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of trombin. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.28629-29634, 1995.
- NOSSAL, N.G.; HEPPEL, L.A. The release of enzyme by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase. **J. Biol. Chem.**, v. 241, n. 13, p. 3055-62,1966.
- OKA S. & ARITA H. Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A₂ in rat cultured astrocytes: two distinct pathways of the gene expression. **J. Biol. Chemistry**, v.266, p. 9956-60, 1991.
- OKADA, M. & NATORI, S. Primary structure of sarcotoxin I, an antibacterial protein induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. **J Biol Chem.**, v. 260, n. 12, p. 7174-7177, 1985.
- OLOFSSON, A.; HEBERT, H.; THELESTAM, M. The projection structure of perfringolysin O (*Clostridium perfringens* θ -toxin). **FEBS**, v. 319, n.1,2, p.125-127, 1993.
- OOI, B.G. & MILLER, L.K. The influence of antisense RNA on transcription mapping of the 5' terminus of a baculovirus RNA. **J. Gen. Virol.** , v. 72, p. 527-534, 1991.
- O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors. A laboratory manual**. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory. 1992.
- PARKER, M.W.; PATTUS, F.; TURCKER, A.D.; TSEMOGLOU, D. Structure of the membrane pore-forming fragment of Colicin-A, **Nature**, v.337, p.93-96, 1989.
- PARKER, M.W. & PATTUS, F. Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protoxins, **Trends Biochem. Sci**, v.18, p.391-395, 1993.
- PASCHOA, V.; OLIVEIRA, P.L.; DANSA-PETRETSKI, M.; SILVA, J.R.; ALVARENGA, P.H.; JACOBS-LORENA, M.; LEMOS, F. J.A. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with hemeduring blood digestion. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v.32, p. 517-523, 2002.
- PENNOCK, G.D.; SHOEMAKER, C.; MILLER, L.K. Strong and regulated expression os *Escherichia coli* β -galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. **Mol. Cell. Biol.**, v. 4, p. 399-406, 1984.

- PEREIRA, M.H.; BEIRÃO, P.S.L.; DIOTAIUTI, L. Activity of *Triatoma infestans* saliva on the sciatic nerve of the rat. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.91, p.143, 1996.
- PERES DE LEON, A.A.; RIBEIRO, J.M.C.; TABACHNICK, W.J.; VALENZUELA, J.G. Identification of a salivary vasodilator in the primary north American vector of bluetongue viruses, *Culicoides variipennis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 57, p.375-381, 1997.
- PIOMELLI, D. & GREENGARD, P. Bidirectional control of phospholipase A₂ activity by Ca²⁺/calmodulin -dependent protein kinase II, cAMP-dependent protein kinase, and casein kinase II. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.6770-6774, 1991.
- POSSANI, L.D.; ZURITA, M.; DELEPIERRE, M.; HERNANDEZ, F.H.; RODRIGUEZ, M.H. From noxiustoxin to Shiva-3, a peptide toxic to the sporogonic development of *Plasmodium berghei*. **Toxicon**, v. 36, n.11, p. 1683-1692, 1998.
- RIBEIRO, J.M.C. & GARCIA, E.S. The role of salivary glands in feeding in *Rhodnius prolixus*. **J. Exp. Biol**, v.94, p.219-230, 1981a.
- RIBEIRO, J.M.C. The midgut hemolysin of *Ixodes dammini* (Acari: Ixodae). **Journal of Parasitology**, v.74, p.532-537, 1988.
- RIBEIRO J.M.C.; HAZZARD, J.M.H.; NUSSENZVEIG, R.H.; CHAMPAGNE, D.E.; WALKER, F.A. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a blood-sucking insect. **Science**, v.260, p.539-541, 1993.
- RIBEIRO, J.M.C. & NUSSENZVEIG, R.H. Nitric oxide synthase activity from a haematophagous insect salivary gland. **FEBS**, v.330, p.165-168, 1993.
- RIBEIRO, J.M.C. & NUSSENZVEIG, R.H. The salivary catechol oxidase/oxidase activities of the mosquito *Anopheles albimanus*. **J. Exp. Biology**, v.179, p.273-287, 1993.
- RIBEIRO, J.M.C. Blood-feeding arthropods: Live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infectious Agents and Disease**, v.4, p.143-152, 1995.
- RIBEIRO, J.M.C.; SCHNEIDER, M.; GUIMARAES, J.A. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the bloodsucking bugs *Rhodnius prolixus*. **J. Biochem**, v.308, p.243-249, 1995a.
- RIBEIRO, J.M.C.; SCHNEIDER, M.; ISAIAS, T.; JURBERG, J.; GALVAO, C.; GUIMARAES, J.A. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by Triatomine bugs (Heteroptera). **J. Med. Entomol**, v.35, p.599-610, 1995

- RIBEIRO, J.M.C.; SCHNEIDER, M.; ISAIAS, T.; JURBERO, J.; GALVAO, C.; GUIMARAES, J. A. Role Of Salivary Antihemostatic Components in Blood Feeding by Triatomine Bugs (Heteroptera). **J. Med. Entomol.** v.35, p.599-610, 1998.
- RIBEIRO J.M. & FRANCISCHETTI I.M. Platelet-activating-factor-hydrolyzing phospholipase C in the salivary glands and saliva of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **J Exp Biol** , v.204, p.3887-94, 2001.
- RICHMAN AM, BULET P, HETRU C, BARILLAS-MURY C, HOFFMANN JA, KAFALOS FC. Inducible immune factors of the vector mosquito *Anopheles gambiae*: biochemical purification of a defensin antibacterial peptide and molecular cloning of preprodefensin cDNA. **Insect Mol Biol** ;v. 5, n.3, p. 203-10, 1996.
- ROSSI, M.A. & BESTETTI, R.B. Hipótese unificada sobre a patogênese da cardiopatia chagásica. Implicações terapêuticas. **Arq Bras Cardiol** v.64, p. 255-60, 1995.
- ROSSIGNOL, P.A. & LUEDERS, A.M. Bacteriolytic factor in the salivary gland of *Aedes aegypti*. **Comp Biochem Physiol**, v.83B, p.819-822, 1986.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2 ed.1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.74, p.5463-5467, 1977.
- SHAHABUDDIN, M., FIELDS, I., BULET, P., HOFFMANN, J.A., MILLER, L.H. *Plasmodium gallinaceum*: Differential killing of some mosquito stage of the parasite by insect defensin. **Exp. Parasitol**, v.89, p.103-112, 1998.
- SARKIS, J.J.F.; GUIMARAES, J. A.; RIBEIRO, J.M.C. Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*. Kinetics and purification. **J. Biochem**, v.233, p.88-91, 1986.
- SCHEIN, C. H. Production of Soluble Recombinant Protein in Bacteria. **Biotechnol**, v.7, p.1141-1147, 1989.
- SEKIYA, K.; SATOH, R.; DANBARA, H.; FUTAESAKU, Y. A ring-shaped structure with a crown formed by streptolysin O on the erythrocyte membrane. **J. Bacteriol.**, v. 175, n.18, p. 5953-5961,1993.
- SCHMUNIS, G.A. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 93-101,1999.

- SILVA, I.G. A influência da temperatura na biologia dos triatominos. I-*Tryatoma rubrovaria* (Blanchard, 1943) (Hemiptera *Reduviidae*). **Rev. Goiana Med**, v.31, p.1-37, 1985.
- SILVEIRA, C.A. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.16, n. 2, p. 35-42, 2000.
- SIVORY, J.L.; CASABIE, N.; ZERBA, E.N.; WOOD, E.J. Induction of glutathione S-transferase activity in *Triatoma infestans*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.92, p.797-802, 1997.
- SMITH J.J.B.; CORNISH, R.A.; WILKES, J. Properties of calcium-dependent apyrase in the saliva of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. **Experientia**, v.36, p.898-900, 1980.
- SMITH, G. E., M. J. FRASER M. D. SUMMERS. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. **J. Virol**, v.46, p.584-593, 1983a.
- SMITH, G.E.; FRASER, M.J.; SUMMERS, M.D. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. **Molecular and Cellular Biology**, v.3, p.2156-2165, 1983b.
- SMITH, M.C.; FURMAN, T.C.; INGOLIA, T.D.; PIDGEON, C. Chelating peptide-immobilized metal ion affinity chromatography. **J. Biol. Chem**, v.263, p.7211-7215, 1988.
- SMITH, D.B. & JOHNSON, K.S. Single step purification of polypeptide expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. **Gene**, v. 67, p. 31-40, 1988.
- SPATES, G.E. Proteolytic and haemolytic activity in the midgut of the stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.): Partial purification of the haemolysin. **Insect Biochemistry**, v.11, p.143-147, 1981.
- SRIKRISHNARAY, K.A.; RAMASAMY, R.; RAMASAMY, M.S. Fecundity of *Anopheles tessellatus* reduced by the ingestion of murine anti-mosquito antibodies. **Med. Vet. Entomol**, v.7, p.66-68, 1993.
- STARK, K.R. & JAMES, A.A. factor Xa-directed anticoagulant from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Exp. Parasitol**, v.81, p.321-331, 1995.
- STARK, K.R. & JAMES, A.A. Salivary gland anticoagulants in culicine and anopheline mosquitoes (*Diptera: Culicidae*). **J. Med. Entomol.**, v.33, n.4, p.645-650, 1996.

- STEPHEN, A. B.; BUCKLAND, A.G.; KODURIS, R.S.; CHO, W.; GELBS, M.H.; WILTON, D.C. The antibacterial properties of secreted phospholipase A₂. A major physiological role for the group IIA enzyme that depends on the very high pI of the enzyme to allow penetration of the bacteria cell wall. **J. Bio. Chem.**, v.277, p.1788-1793, 2002.
- STEVENS, J.R., TEIXEIRA MM, BINGLE LE, GIBSON WC The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli* : **Int J Parasitol** , v. 29, n. 5, p. 749-757, 1999.
- STRACHAM, T. & READ, A.P. **Genética Molecular Humana**. 2ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002. 152p.
- STUDIER, F.W.; ROSEMBERG, A.H.; DUNN, J.J.; DUBENDORFF, J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **J. Mol. Biol.**, v.189, p.113-130, 1990.
- SUMMERS, M. & ANDERSON, D. Granulosis virus deoxyribonucleic acid: a closed double-stranded molecule. **J. Virol.**, v. 9. p. 710-713, 1972.
- SUN, J.; YAMAGUCHI, M.; YUDA, M.; MIURA, K.; TAKEYA, H.; HIRAI, M.; MATSUOKA, H.; ANDO, K.; WATANABE, T.; SUZUKI, K.; CHINZEI, Y. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel anticoagulant of the intrinsic pathway, (Prolixin-S), from salivary glands of the blood sucking bug, *Rhodnius prolixus*. **Thromb. Haemost.**, v.75, p.573-577, 1996.
- SUN, J., YUDA, M., MIURA, K., CHINZEI, Y. Characterization and cDNA cloning of a hemoprotein in the salivary glands of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.28, p.191-200, 1998a
- SUN, D.; ECCLESTON, E.D.; FALLON, M. Peptide sequence of a antibiotic cecropin from the vector mosquito, *Aedes albopictus*. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 249, p.410-415, 1998b.
- TANG, D.C.; DEVIT, M.; JOHNSTON, S.A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. **Nature**, v.356, p.152-154, 1992.
- TEIXEIRA, A.R.L. **Doença de chagas e outras doenças causadas por tripanossomos**. Ed. Universidade de Brasília. (Brasília), p.161, 1987.
- TEIXEIRA, A.R.L., MONTEIRO, P.S., REBELO, J.M., ARGANARAZ, E.R., VIEIRA, D., LAURIA-PIRES, L., NASCIMENTO, R., VEXENAT, C.A., SILVA, A.R., AULT, S.K. & COSTA, J.M. Emerging Chagas Disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. **Emerg. Infect. Diseases**, v.7, n.1, p.100-112, 2001.

- TIETGE, U.J.; MAUGEAIS, C.; CAIN, W.W.; GRASS, D.; GLICK, J.M.; DE BEER, F.C.; RADER, D.J. Overexpression of secretory phospholipase A₂ causes rapid catabolism and altered tissue uptake of high density lipoprotein cholesteryl ester and apolipoprotein A-I. **J. Biol. Chem**, v.275, p.10077-10084, 2000
- TSUDA, A.; MULENGA, A.; SUGIMOTO, C.; NAKAGIMA, M.; OHASHI, K.; ONUMA, M. cDNA cloning characterization and vaccine effect analysis of *Haemaphysalis longicornis* tick saliva proteins. **Vaccine**, v. 19, n. 4287-4296, 2001.
- TWETEN, R.K.; PARKER, M.W.; JOHNSON, A.E. The cholesterol-dependent cytolysins. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 257, p. 15-33, 2001.
- ULMER, J.B.; DONELLY, J.; PARKER, S.F.; RHODES, G.H. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. **Science**, v.259, p.1745-1749, 1993
- VALENZUELA, J.G.; WALKER, F.A.; RIBEIRO, J.M.C. A salivary nitrophorin (nitric-oxide-carrying hemoprotein) in the bedbug *Cimex lectularius*. **J. Exp. Biol.**, v.198, p. 1519-1526, 1995.
- VALENZUELA, J.G.; CHUFFE, M.; RIBEIRO, J.M.C. Apyrase and anti-platelet activities from the salivary glands of the bed bug *Cimex lectularius*. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v.21, p.557-621, 1996.
- VALENZUELA, J.G.; RIBEIRO, J.M.C. Purification and cloning of the salivary nitrophorin from the Hemipterian *Cimex lectularius*. **J. Exp. Biol**, v.201, p.2659-2664, 1998.
- VALENZUELA, J. G.; BELKAID, Y.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J.M. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel *Cimex* family of apyrases. **J. Exp. Biol.** v.204, p.229-237, 2001a.
- VALENZUELA, J. G.; BELKAID, Y.; GARFIELD, M. K.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; ROWTON, E.D.; SACKS, D.L.; RIBEIRO, J. M. C. Toward a Defined Anti-*Leishmania* Vaccine Targeting Vector Antigens: Characterization of a Protective Salivary Protein. **J. Exp. Med.**, v.194, n.3, p. 331-342, 2001b.
- VALORE, E.V.; PARK, C.H.; QUAYLE, A.J.; WILES, K.R.; MCCRAY JR.; GANZ, T. Human L-defensin-1: An antimicrobial peptide of urogenital tissues. **J. Clin. Invest.**, V.101, P.1633-1642, 1998.
- VASILIOU, V.; PAPPA, A.; PETERSEN, D.R. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. **Chem Biol Interact.**, v. 129, n. 1-2, p. 1-19, 2000.

- VASILIOU, V.; PAPPA, A.; PETERSEN, D.R. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. **Chem Biol Interact.**, v. 129, n. 1-2, p. 1-19, 2000.
- VIZIOLI, J.; BULET, P.; CHARLET, M.; LOWENBERG, C.B.; MÜLLER, H.M.; DIMOPOULOS, G.; HOFFMANN, J.; KAFATOS, F.C.; RICHMAN, A. Cloning and analysis of a cecropin gene from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. **Insect. Molec. Biol.**, v.9, p. 75-84, 2000.
- VIZIOLI, J.; RICHMAN, A.M.; UTTENWEILER-JOSEPH, S.; BLASS, C.; BULET, P. The defensin peptide of the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*: antimicrobial activities and expression in adult mosquitoes. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 31, n. 3, p. 241-248, 2001.
- WANG, X.; OOI, B.G.; MILLER, L.K. Baculovirus vectors for multiple gene expression and for accluded virus production. **Gene**, v.100, p. 131-137, 1991.
- WELCH RA. RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. **Curr Top Microbiol Immunol** v. 257, n. 85, p. 85-11, 2001.
- WILSON, C.L., OUELLETTE, A.J., SATCHELL, D.P., AYABE, T., LOPEZ-BOADO, Y.S., STRATMAN, J.L., HULTGREN, S.J., MATRISIAN, M.L., PARKS, C.W., Regulation of intestinal α -defensina activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. **Science**, v.286, p.113-117. 1999.
- (WHO) World Health Organization. Chagas disease interruption of weekly epidemiological record, v. 72, p.l-5, 1997.
- WILLADSEN, P. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v.11, p.S43-S50, 1995.
- WORBS, M.; HUBER, R.; WAHL, M.C. Crystal structure of ribosomal protein L4 shows RNA-binding sites for ribosome incorporation and feedback control of the S10 operon **Embo J**, v.19, p.807, 2000.
- YUDA, M.; HIRAI, M.; MIURA, K.; MATSUMARA, H.; ANDO, K.; CHINZEI, Y. CDNA cloning, expression and characterization of nitric-oxide syntase from the salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **Eur. J. Biochem.**, v.242, p807-812, 1996.
- YUDA, M.; HIGUCHI, K.; SUN, J.; KUREISH, Y.; ITO, M.; CHINZEI, Y. Expression, reconstitution and characterization of prolixin-S as a vasodilator. A salivary gland nitric-oxide-binding hemoprotein of *Rhodnius prolixus*. **Eur J. Biochem**, v.249, p.337-342, 1997.

- ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 84, n. 15, p. 54549-5453, 1987.
- ZHU, K.; BOWMAN, A.S.; BRIGHAM, D.L.; ESSENBERG, R.C.; DILLWITH, J.W.; SAUER, J.R. Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). **Exp. Parasitol.**, v.87, n.1, p.30-38, 1997a.
- ZHU, K.; DILLWITH, J.W. BOWMAN, A.S. SAUER, J.R. Identification of hemolytic activity of the Lone Star Tick (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, p.160-166, 1997b.

APÊNDICE

13. APÊNDICE

13.1) Sistema de Expressão em *E. coli*

Entre os sistemas disponíveis para a produção de proteínas heterólogas, a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* é a célula hospedeira mais comumente usada por sua alta reprodutibilidade, baixo custo, um grande número de vetores e linhagens de células hospedeiras.

A construção de um vetor de expressão requer vários elementos cuja configuração deve ser cuidadosamente considerada para aumentar os níveis de proteínas recombinantes, contendo uma origem de replicação, marcador para seleção.

O tipo de promotor é um fator determinante e normalmente o parâmetro mais respeitado. Deve ser forte a fim de acumular de 10 a 30% ou mais do total das proteínas celulares, essenciais para proteínas tóxicas à célula hospedeira, e também exibir níveis mínimos de atividade transcricional mantendo os níveis basais de expressão até o momento da indução da expressão. Um sinal de terminação da transcrição e seqüências para controle da tradução, como por ex., um sítio de ligação ao ribossomo para a iniciação da tradução (Shine -Dalgarno) e um ATG iniciador. Um sinal de terminação da tradução (códon de terminação) também deve estar presente no vetor ou no inserto a ser clonado.

Apesar dos estudos em *E. coli* estejam muito bem difundido nem todos os genes são eficientemente expressos neste organismo, devido a fatores como, estrutura do gene a ser expresso, estabilidade e eficiência transcricional do mRNA, degradação da proteína por proteases da células hospedeira. Diferenças na composição de códons entre o gene e seu hospedeiro e a presença de potenciais iniciadores de tradução (RBS seguido de ATG), podem influenciar na velocidade da tradução, restringindo o nível de expressão (Das, 1990).

Proteínas eucarióticas muitas vezes são dificilmente expressas neste sistema por exigir modificações pós traducionais e formação de pontes

dissulfeto para recuperação de sua atividade. A formação de pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína é ineficiente no citoplasma bacteriano devido ao alto potencial redutor, que estabiliza o grupamento –SH em seu equilíbrio com a forma oxidada S-S.

No entanto sistemas que permitem a secreção dessas proteínas heterólogas para o espaço periplasmático, delimitado pela membrana plasmática e a membrana externa, tendem a amenizar esses problemas por possuir um potencial redutor muito menor favorecendo a formação de pontes dissulfeto (Missiakas & Raina, 1997) e serem livres de contaminantes intracelulares, DNA ou proteases e possuir 4% do total das proteínas celulares (Nossal & Heppel, 1966).

O transporte da proteína para o periplasma necessita de uma fusão com uma seqüência líder, que após ser reconhecida e clivada por uma endopeptidase específica durante seu transporte através da membrana gera um peptídeo maduro (Michaelis & Beckwith, 1982). Este fenômeno é encontrado em proteínas de secretadas tanto em procariontes como em eucariontes, indicando uma origem evolutiva precoce deste mecanismo. Os parâmetros necessários para a estrutura primária da seqüência líder indicam uma região básica no amino terminal precedido por resíduos de hidrofobicidade elevada, sendo as posições –1 e –3 bastante conservadas (Gierasch, 1989; Nakai & Kanehisa, 1992 e Kenta, 2000).

Diversas proteínas foram expressas com sucesso por este sistema, permitindo a expressão de enzimas como Rnases (Henze, e cols., 1990). Atualmente diversos vetores que direcionam proteínas para o periplasma estão disponíveis.

A capacidade de *E.coli* promover altos índices de expressão muitas vezes levam a formação de agregados intracelulares insolúveis da proteína expressa, chamados de corpos de inclusão (Georgiou & Valax, 1996). São agregados amorfos, facilmente visualizados microscopia de contraste constituída basicamente da proteína heteróloga desnaturada e contaminantes como cadeias de RNA polimerases, combinações de proteínas de membrana OmpA, OmpF, OmpC e DNA plasmidial (Schein, 1989). O ocorrência deste evento não é comum em *E .coli* e acontece devido as propriedades da

proteína heteróloga, tamanho, hidrofobicidade, proteínas modificadas pela adição de análogos de aminoácidos ou devido a resposta de *heat-shock* (Bernardez-Clark & Georgiou, 1990). Esses agregados insolúveis são geralmente solubilizados com desnaturantes como 6M de Guanidina ou 4-8 M de ureia e posteriormente renaturados a fim de adquirir sua conformação funcional.

Certas proteínas apesar de serem acumuladas em grandes quantidades não formam corpos de inclusão. Esse fenômeno ainda é pouco definido mas a indícios de que a ausência de prolina ou a presença de muitos resíduos ácidos previnam a formação de agregados (Schein, 1989)

13.2) Sistema de Expressão em Células de Inseto Utilizando Baculovírus como Vetor

O sistema de expressão em baculovírus é um dos sistemas de expressão em células eucarióticas mais poderoso e versátil. O baculovírus é o maior e mais estudado grupo de vírus que infectam insetos pertencendo à família *Baculoviridae* e um grupo diverso que é característico de invertebrados, sendo encontrado, na maioria dos casos em insetos e utilizados no controle biológico, como bioinseticida e principalmente como vetor de proteínas heterólogas. O DNA genômico desses vírus é dupla fita, circular, com cerca de 90-200Kb e apresenta-se empacotado com proteínas (Summers & Anderson, 1972 e Burgess, 1977).

O DNA viral é condensado em uma estrutura núcleo-proteica denominada de cerne (“core”), que é envolvido por um capsídeo polarizado, em forma de bastão. Esse conjunto cerne e capsídeo são denominados nucleocapsídeo (Kitajima, 1989). O nucleocapsídeo é formado no núcleo da célula infectada, sendo posteriormente envelopado ou através da passagem nucleocapsídeos pela membrana plasmática celular.

Os baculovirus podem ser encontrados em dois fenótipos distintos:

Budded vírus (BV): uma forma extracelular do vírus produzida por volta de 12 a 24 horas após a infecção, que é obtida pela sua passagem pela membrana plasmática celular. O BV possui, polarizadamente. Proteínas no seu envelope formando o peplômero, que está envolvido no processo de infecção viral por endocitose adsortiva. Esta forma é a responsável pela infecção das células em cultura de tecido.

Occluded Virus (OV): Forma onde o vírus se apresenta incluso em uma matriz protéica que ocorre 72 horas após infecção, contituída predominantemente pela proteína poliedrina nos nucleopoliedrovírus e granulina nos granulovírus. Essa matriz protéica pode revestir múltiplos vírus ou apenas uma partícula viral. A forma OV é a principal responsável pela disseminação e infecção de larvas.

O processo natural de infecção por baculovírus inicia com a ingestão do poliedro pelas larvas do inseto. A matriz protéica que reveste as partículas virais é solubilizada no pH alcalino do intestino médio do inseto, liberando os BVs que infectam o intestino através da fusão da membrana. A partir daí os OVs podem atingir a hemocele ou o sistema traqueolar, podendo infectar outros tecidos do animal e levar a morte e desintegrar seu tegumento liberando os Ovs no meio ambiente. Outras larvas irão ingerir os Ovs reiniciando o processo de infecção (O' Reilly, e cols., 1992).

O processo de expressão gênica em cultura de células é dividido em três fases: *inicial*, *tardia* e *mais que tardia* (Miller e cols., 1988).

A fase *inicial* inicia-se no momento em que o vírus penetra na célula atingindo até 6 horas após infecção. Nesta fase ocorre a reprogramação da célula para a replicação viral e síntese do mRNA viral. Estes genes "iniciais" codificam para DNA polimerase e fatores de transcrição que irão induzir e regular a expressão do DNA viral nas fases "*tardia*" e "*mais que tardia*". Nesta fase inicial também ocorre um rearranjo do citoesqueleto celular e a dispersão da cromatina promovendo uma hipertrofia do núcleo (O' Reilly e cols., 1992).

A fase "*tardia*" ocorre entre 6 a 24 horas após a infecção e é caracterizada por uma intensa replicação do DNA viral ocorrendo a produção dos BVs.

Na fase “*mais que tardia*” ocorre uma grande produção da proteína poliedrina e p10, que irá constituir o poliedro sendo seguido pela lise celular e liberação dos poliedros.

O nucleopoliedrovírus *Bombyx mori* (BmNPV) e o múltiplo nucleopoliedrovírus *Autografa californica* (AcMNPV) são modelos na utilização de baculovírus como vetores de expressão .

A utilização de baculovírus como vetores de expressão tem se mostrado vantajosa fornecendo um sistema versátil e confiável para a produção de proteínas recombinantes em células de inseto, através da inserção de genes heterólogos no DNA viral sob o comando dos promotores da poliedrina ou da p10 (Miller e cols., 1983 e Smith e cols., 1983 a e b).

Diversos genes eucarióticos foram expressos eficientemente em células de inseto (Miller e cols., 1983 ; Smith e cols., 1983b; Pennock e cols., 1984 e Maeda e cols., 1985). Este sistema tem sido útil em diversas áreas da ciência, desde estudos de estrutura de proteínas, interações entre antígenos e anticorpos, bem como o desenvolvimento de terapia gênica. Uma importante vantagem deste sistema é a presença de mecanismos de enovelamento, processamento e de modificações pós traducionais.

13.3) Modelagem Molecular por Homologia por *Treading*

A técnica de modelagem molecular por homologia consiste no desenvolvimento de modelos teóricos tridimensionais utilizando-se como molde uma ou mais seqüências de proteínas homólogas a proteína de interesse com uma seqüência primária conhecida de uma proteína cuja estrutura é desconhecida. A produção de modelos por essa técnica contribui para o entendimento das relações estrutura-função de uma proteína exercendo papel fundamental para o desenvolvimento de novas drogas.

Os dados experimentais disponíveis em diversos bancos de dados (PDB-Brookhaven: Protein Data Bank, PRODOM, PROSITE, e outros) são utilizados pela modelagem molecular por homologia proporcionando grande eficácia para a técnica. Os dados estruturais fornecidos nesses bancos são

motivos adotados por cadeias polipeptídicas cujas seqüências são próximas da proteína em questão. .

A seleção eficiente das proteínas molde que serão utilizadas na predição tridimensional da proteína é feita com base na confluência de informações estruturais dos domínios e das seqüências homólogas. O modelos podem ser preditos com precisão a uma seqüência com pelo menos 40% de identidade para uma estrutura já conhecida.

TREADING é essencialmente uma forma de modelagem por homologia utilizada em casos de seqüências com alinhamento difícil, genes órfãos e seqüências com baixa identidade (20-40 %) a uma estrutura tridimensional.

Para se construir um modelo essa técnica é dividida nas seguintes etapas.

1. Estabelecimento das relações na estrutura primária através do alinhamento entre a seqüência das proteínas similares com a proteína em questão.
2. Avaliação da similaridade entre as regiões conservadas que se posicionam no núcleo e na superfície da molécula.
3. Construção de regiões em alça
4. Posicionamento das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos.
5. Minimização da energia

Dentre as proteínas formadoras de poros a estrutura da família das α -hemolisina de *Staphylococcus aureus* foi determinada, apresentando uma forma oligomérica em barril beta (Menestrina e cols., 2001). A estrutura das toxinas bacterianas formadoras de poros também foram produzidas, as quais também se apresentam sob a forma de barril beta (Delcour, 2002).