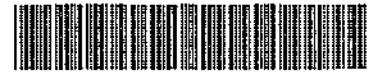




República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0305598-1 A**

(22) Data de Depósito: 02/09/2003
(43) Data de Publicação: 01/11/2005
(RPI 1817)



(51) Int. Cl.⁷:
C12N 15/56
C12N 15/73
C12N 15/63
C12N 5/10
A01N 63/00

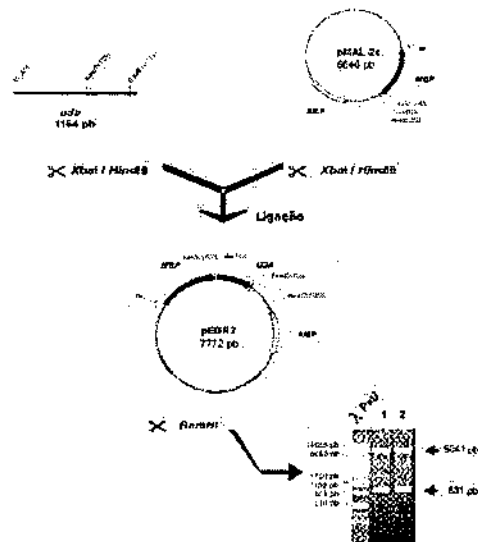
(54) Título: **CONSTRUÇÃO QUIMÉRICA DE DNA, COMPOSIÇÃO E PROCESSO PARA PROVOCAR LISE CELULAR E/OU INTERAGIR COM A SUPERFÍCIE CELULAR DE PROTOZOÁRIOS**

(57) Resumo: "CONSTRUÇÃO QUIMÉRICA DE DNA, COMPOSIÇÃO, E PROCESSO PARA PROVOCAR LISE CELULAR E/OU INTERAGIR COM A SUPERFÍCIE CELULAR DE PROTOZOÁRIOS". A presente invenção trata de uma proteína quimérica, de um DNA codificante desta proteína, mais especificamente quitinasas de origem vegetal, capazes de provocar lise celular e/ou interagir com protozoários causadores de doenças, especialmente fitopatogenias; também são descritas novas composições contendo estas quitinasas e de um processo capaz de interagir e provocar lise celular destes parasitas.

(71) Depositante(s): Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ (BR/RJ)

(72) Inventor(es): Márcio Alves Ferreira, Graça Celeste Gomes Rocha, Marcia Maria A. N. Pinheiro Margis

(74) Procurador: Alves, Vieira, Lopes & Atem Advogados



Relatório Descritivo

CONSTRUÇÃO QUIMÉRICA DE DNA, COMPOSIÇÃO, E PROCESSO PARA PROVOCAR LISE CELULAR E/OU INTERAGIR COM A SUPERFÍCIE CELULAR DE PROTOZOÁRIOS

5

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere ao uso de quitinases, mais especificamente
10 ao uso de quitinases oriundas de plantas. Tais quitinases são capazes de
provocar lise celular e/ou interagir com a superfície celular de protozoários, os
quais são capazes de produzir patogenias. Mais especificamente a presente
invenção se refere ao uso de quitinases em composições contendo as referidas
quitinases e a processos de controle de patogenias, mais especificamente em
15 plantas cujo cultivo é voltado para colheita.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Pragas e pestes afetam a produção de cultivares e podem causar perda
total da colheita quando a planta atacada não apresenta mecanismos de defesa
20 eficientes. Em plantas resistentes a determinadas pragas e patógenos, inúmeros
processos celulares capacitam estas a resistir à invasão e previnem contra o
desenvolvimento de doenças.

Entre os diversos microrganismos que atacam plantas os protozoários do
gênero *Phytomonas* pertencem a um grupo pouco estudado quanto ao seu modo
25 de ação. Diversas doenças em plantas são causadas por estes protozoários.
Quatro podem ser destacadas por causarem prejuízos a culturas de interesse
econômico em países da América Latina e África, dentre eles o Brasil: o
"chocamento" das raízes do aipim ou mandioca (*Manihot esculenta*), causada
pela *Phytomonas françai*; a necrose do floema do café (*Coffea liberica*), a
30 "marchitez sorpressiva" do dendezeiro (*Elaeis guineensis*) e a murcha fatal ou
"hartrot" do coqueiro (*Cocos nucifera*), causadas pela espécie *Phytomonas staheli*
(Agrios, G. N. (1997). Plant Diseases Caused By Flagellate Protozoa. In: Plant

Pathology. 4 Ed. 16: 599-606; Kitajima, E.W., Vainstein, M.H. and Silveira, J.S.M. (1986) Flagellate protozoan associated with poor development of the root system of cassava in the Espírito Santo State, Brazil. *Phytopathol.* 76, 638-642).

O controle dessas doenças, limitado somente à eliminação dos espécimes doentes e controle do vetor, é feito principalmente com o uso de organoclorados que, em longo prazo, provocam efeitos cumulativos e perigosos, pois se concentra ao longo das cadeias alimentares. Portanto, é necessário o desenvolvimento de novos métodos de controle que não apresentem tantos danos ao ambiente.

A quitina é um importante componente estrutural da parede celular de fungos e do exoesqueleto de vários invertebrados, como insetos e nematódeos. Mais recentemente a quitina foi identificada como componente estrutural da membrana celular de *Phytomonas françai*, espécie de um gênero de protozoários que está envolvida com o desenvolvimento de uma série de doenças em cultivos de importância econômica. Além do gênero *Phytomonas*, a quitina também foi identificada como componente estrutural da membrana celular em outros protozoários, tais como: *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas foetus* (Kneipp, L.F., Andrade, A.F.B., de Souza, W., Angluster, J., Alviano, C.S. and Travassos, L.R. (1998) *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*: Expression of Chitin at the Cell Surface. *Exp Parasitol.* 89, 195-204) e *Entamoeba sp.* (Arroyo-Begovich, A. and Carabez-Trejo, A. (1982) Location of chitin in the cyst wall of *Entamoeba invadens* with colloidal gold tracers. *J. Parasitol.* 68, 253-258). No trabalho de indentificação de quitina em *Phytomonas françai* foi observado que quitinases de origem fúngica (*S. griseus*) são capazes não só de interagir como também de provocar lise celular no protozoário (Nakamura, C.V., Esteves, M.J.G., Andrade, A.F.B., Alviano, C.S., Souza, W. and Angluster, J. (1993) Chitin: a cell-surface component of *Phytomonas françai*. *Parasitol. Res.* 79, 523-526). A quitina pode ser importante na manutenção da integridade celular, provendo proteção do estresse ambiental mecânico ou químico.

Por ser um componente presente em vários microrganismos fitopatogênicos, a quitina se mostrou um interessante alvo no desenvolvimento de métodos de controle desses microrganismos, e diversos estudos mostram a

busca feita por diferentes quitinases (Brunner *et al.* (1998). Substrate Specificities Of Tobacco Chitinases. The Plant Journal, 14 (2): 225-234).

A identificação da quitina como componente estrutural de protozoários fitopatogênicos abriu a uma nova possibilidade para o controle destas pragas. O fato destes tipos de patógenos não serem agentes causadores de doenças em plantas de importância econômica no hemisfério norte resultou na ausência de pesquisas relacionadas a utilização de quitinases contra estes fitopatógenos. Patentes que declaram a utilização de quitinase e outros peptídeos líticos não abordam a sua utilização contra protozoários fitopatogênicos. A patente americana US 5,866,788 revela o uso de quitinases no controle de pestes. O objeto desta patente é uma planta que expresse um gene cujo produto é uma quitinase destinada a atuar dentro do inseto, sendo necessária a ingestão da planta pelo inseto. O documento europeu EP 639 642 relata o uso de peptídeos líticos, dentre estes peptídeos estão incluídas as quitinases, para serem usadas em uma série de composições contra fitopatógenos. Porém, restringe seu uso a patógenos com maior importância econômica no hemisfério norte, sem considerar protozoários fitopatogênicos.

Apesar dos avanços feitos nesse campo, até o momento não foram encontrados relatos do uso de quitinases de origem vegetal, como a UDA e a ATCHIA4, em composições capazes de interagir ou inibir o crescimento de protozoários possuidores de quitina em sua membrana celular, como a *Phytomonas francai*. Neste contexto, a título de exemplo, podemos citar como anterioridades mais próximas os documentos WO 02/090492 e WO 99/58650, que revelam composições farmacêuticas contendo quitinases como princípios ativos. As composições dos referidos documentos são destinadas a infecções fúngicas, sendo o termo "composições farmacêuticas" relativo a composições com um ou mais ingredientes ativos descritos acima, juntamente com carreadores e excipientes fisiológicos, tendo como propósito a administração de um composto a um organismo. Rotas adequadas para administração podem incluir tanto vias sistêmicas, dentre elas administração enteral e/ou parenteral, quanto vias tópicas, por meio de pomadas, loções, cremes, soluções, emulsões ou como componente ativo de defensivos agrícolas, dentre outros.

Por outro lado, não foram encontrados relatos de processos destinados à proteção da infecção por protozoários baseados na lise celular e/ou interação dos referidos parasitas por quitinases de origem vegetal. Neste contexto, é até então desconhecida a estratégia de proteção de uma planta do ataque de protozoários pelo uso de quitinases de origem vegetal, tanto pela aplicação exógena da quitinase, através da administração da quitinase em uma composição, farmacêutica ou não, quanto pelo uso endógeno da quitinases de origem vegetal, baseado na introdução, no organismo ser protegido do ataque de protozoários, de um gene que, quando expressado, é capaz direcionar a produção de quitinases oriundas de plantas, atuando de maneira profilática e/ou preventiva nas infecções causadas por protozoários, em especial fitopatogênicas.

Existem duas vantagens na utilização de quitinases de origem vegetal para controle de fitopatogênicas. Uma das estratégias atuais para obtenção de proteção a pragas e patógenos é a utilização de técnicas em biotecnologia para transformação genética de plantas com genes de outras espécies ou a modificação do padrão de expressão de genes endógenos. Devido a diferentes características encontradas entre plantas e organismos de outros reinos, principalmente no que concerne a procariontes, existe uma dificuldade intrínseca na expressão de genes derivados de organismos distantes filogeneticamente em plantas. Isso é bem ilustrado no caso de obtenção de plantas expressando o gene *cry* do *Bacillus thuringiensis*, onde em várias situações foi necessário modificar quase que completamente a seqüência codificadora do gene *cry* para que este fosse expresso em níveis substanciais (Perlak F.J., Funchs R.L., Dean D.A., McPherson S.L., Fischhoff D.A., Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88 (1991) 3324–3328; Gleave A.P., Mitra D.S., Markwick N.P., Morris B.A.M., Beuning L.L., Enhanced expression of the *Bacillus thuringiensis cry 9Aa 2* gene in transgenic plants by nucleotide sequence modification confers resistance to potato tuber moth, Mol. Breed 4 (1998) 459–472). Portanto, se usada uma estratégia envolvendo a utilização de plantas transgênicas expressando em maior quantidade quitinases para proteção contra protozoários fitopatogênicos a melhor alternativa seria a utilização de quitinase de origem vegetal, como ATCH14 e UDA,

descritas mais detalhadamente abaixo. Atualmente plantas também tem sido utilizadas como veículo para obtenção de proteínas de interesse para o homem em grande quantidade, o que vem sendo chamada agricultura molecular (Giddings, G.. Transgenic plants as protein factories. Current Opinion in
5 Biotechnology 12(5): (2001)450-454). Essa estratégia é baseada no baixo custo de obtenção destas proteínas considerando-se que não são necessários estruturas sofisticadas como bioreatores ou fermentadores. Pelo mesmo motivo citado acima, a utilização de quitinases de origem vegetal apresenta uma vantagem quando comparadas a quitinases de outros organismos que não
10 plantas. A obtenção de plantas super expressando tais quitinases seria sem dúvida mais fácil por estas apresentarem as características de estrutura e composição do DNA e da respectiva proteína ideais para expressão em vegetais.

As quitinases vegetais formam um grupo diverso de enzimas, compreendendo proteínas com peso molecular entre 20 e 40KDa, que diferem em
15 suas propriedades físicas, atividades enzimáticas e localização em compartimentos celulares. O primeiro sistema de classificação das quitinases, cujos critérios baseiam-se na estrutura primária das proteínas e nos domínios existentes, foi proposto por Collinge e colaboradores em 1993(Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K.Plant ChitinasesPlant J.
20 1993 Jan;3(1):31-40). As proteínas de classe I, II e IV apresentam um domínio catalítico homólogo e um peptídeo sinal de direcionamento para o retículo endoplasmático, presente em todas as quitinases. As proteínas de classe I são básicas, em sua maioria vacuolares (Neuhaus JM, Sticher L, Meins F Jr, Boller T. A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of
25 chitinases to the plant vacuole.Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Nov 15;88(22):10362-6) e apresentam um domínio rico em cisteína na região N-terminal que está envolvido na ligação à quitina. As proteínas de classe II são ácidas, extracelulares e não possuem o domínio rico em cisteína (Shinshi H, Mohen D, Meins F 1990 Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that
30 different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain Plant Mol. Bio. 14:357-368). As proteínas de classe IV, que podem ser ácidas ou básicas, também são extracelulares, possuem um domínio

rico em cisteína e apresentam 2 deleções características no domínio catalítico. A classe III de Quitinases inclui enzimas bifuncionais com atividade de lisozima e quitinase (Jekel P A, Hatmann J B, Beintema J J 1991 The primary structure of hevamine na enzyme with lysozime/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex
5 *Eur. J. Biochem* 200:123-130) que não apresentam similaridade de seqüência com as quitinases de outras classes. A classe V sendo representada pela lectina de urtiga (*Urtica dioica*) UDAI, a qual apresenta dois domínios de ligação à quitina e um domínio catalítico de quitinase separados por uma região de espaçamento. A classe VI compreende as endoquitinases descritas em tabaco, que
10 compartilham alguma similaridade com exoquitinases bacterianas (Meins Jr F, Fritig B, Linthorst H J M, Mikkelsen J D, Neuhaus J M, Ryals J .1994Plant Chitinase genes *Plant Mol. Biol. Repórter* 12: S22-S28).

Em 1996 uma nova classificação para as quitinases vegetais (Neuhaus JM, Friti B, Linthrst H j, Meins jr F, Mikkelsen J D, Ryals J 1996 A revised
15 nomenclature for chitinase genes. *Plant Mol. Biol. Repórter* 14: 102-104) foi aprovada pela Comissão de Nomenclatura de Gene de Planta. De acordo com o novo sistema, existem atualmente 4 famílias de quitinases “Chia” “Chib” “Chic” e “Chid”. A família gênica *Chia* engloba as antigas classes I, II, IV e V, que receberam a denominação de *Chia1*, *Chia2*, *Chia4* e *Chia5* respectivamente, e
20 uma nova classe denominada *Chia6*, que além de possuir o peptídeo sinal, apresenta um domínio truncado de ligação à quitina, uma região de espaçamento longa rica em prolina e um domínio catalítico de quitinase. As antigas classes III e VI fazem parte das novas famílias gênicas *Chib1* e *Chic1*, respectivamente. A família *Chid* inclui as quitinases que não possuem homologia com as famílias
25 descritas anteriormente, sendo divididas em função da presença ou não de um domínio rico em cisteína, em *Chid1* e *Chid2* respectivamente.

O isolamento e a caracterização do gene *AtChia4*, o qual codifica uma quitinase *Chia4* de *Arabidopsis thaliana* (Gerhardt, L.B. de A., Sachetto-Martins, G., Contarini, M.G., Sandroni, M., Ferreira, R.P., Lima, V.M., Cordeiro, M.C.,
30 Oliveira, D.E. and Margis-Pinheiro, M. (1997) *Arabidopsis thaliana* class IV chitinase is early induced during the interaction with *Xanthomonas campestris*. FEBS Lett. 419, 69-75), revelaram que esta quitinase é expressa rapidamente nas

folhas das plantas em resposta à infecção pela bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* bem como a diferentes formas de estresses abióticos. Recentemente, o padrão de expressão da quitinase *AtEP3* isolada de *Arabidopsis* utilizando o cDNA da quitinase de cenoura *EP3* como sonda foi também descrito.

5 Análises das seqüências revelaram que *AtEP3* e *ATCHIA4* correspondem ao mesmo gene. Estudos de expressão gênica demonstraram que *ATCHIA4/AtEP3* é expressa nas células que envolvem o embrião durante a embriogênese somática (Passarinho, P.A., Van Hengel, A.J., Fransz, P.F. and de Vries S.C. (2001) Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana* *AtEP3/AtchitIV* endochitinase gene.

10 *Planta* 212:556-567). Em plantas adultas, a expressão de *ATCHIA4/AtEP3* foi detectada em grãos de pólen e no tubo polínico em crescimento. A expressão desse gene foi também detectada em hidatódios, estípulas, epiderme das raízes e nos pêlos radiculares (Passarinho, P.A., Van Hengel, A.J., Fransz, P.F. and de Vries S.C. (2001) Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana* *AtEP3/AtchitIV*

15 endochitinase gene. *Planta* 212:556-567;.; GERHARDT, L. B. de A. Isolamento e caracterização de um gene que codifica uma quitinase Chia4 de *Arabidopsis thaliana*.. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Genética)) – UFRJ ,1999).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

20 É objeto da invenção proporcionar o uso de pelo menos uma proteína quimérica de origem vegetal capaz de provocar lise celular e/ou interagir com protozoários.

Outro objeto da invenção é proporcionar uma construção quimérica de DNA para uso na expressão das referidas proteínas quiméricas.

25 Um adicional objeto da presente invenção é proporcionar composições contendo pelo menos uma quitinase de origem vegetal destinadas à proteção contra o ataque de protozoários. As referidas composições são destinadas ao tratamento e/ou prevenção de condições patológicas provocadas por esses microrganismos. As composições da presente invenção podem ser administradas

30 ao indivíduo ou organismo em questão de diversas formas, incluindo tanto vias sistêmicas, dentre elas administração enteral e/ou parenteral, quanto vias tópicas,

por meio de pomadas, loções, cremes, soluções, emulsões ou como componente ativo de defensivos agrícolas, dentre outros.

As quitinases de origem vegetal da presente invenção podem ser administradas na forma descrita acima ou de outras formas, constituindo diferentes processos para tratamento e/ou prevenção da infecção por protozoários. É portanto um adicional objeto da presente invenção fornecer um processo de controle e/ou prevenção da infecção por parasitas baseado na interação de quitinases de origem vegetal com a membrana dos protozoários, causando lise celular.

Os versados na arte apreciarão que o referido processo poderá ser conduzido mediante diferentes estratégias, incluindo a administração de quitinases de origem vegetal conforme as composições da presente invenção, ou ainda da síntese de quitinases de origem vegetal pelos organismos que se pretende proteger das referidas infecções por protozoários. Para tanto, os versados na arte apreciarão que qualquer maneira disponível para possibilitar a síntese de pelo menos uma quitinase de origem vegetal nos organismos em que a infecção por protozoários é indesejada pode ser utilizada. Dentre as maneiras conhecidas na arte estão incluídas diversas técnicas modificação genética que possibilitem a expressão transiente ou não do gene codificante da quitinase vegetal em questão.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra a representação esquemática da estratégia de clonagem do gene *uda* no vetor pMAL-2c. Os sítios de reconhecimento para enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III estão indicados com sua localização em pares de bases (pb) entre parênteses. A confirmação da clonagem foi realizada através da análise dos clones obtidos em gel de agarose 0,8% após digestão com a enzima *Bam*HI. Os clones positivos apresentaram um fragmento de 831 pb. **MBP** – proteína de ligação à maltose; **UDA** – *Urtica dioica* agglutinin; **AMP** – gene de resistência ao antibiótico ampicilina; tac (r→) – promotor tac.

A Figura 2A mostra a representação esquemática da estratégia de clonagem do gene *AtchitIV* no vetor pMAL-2c. Os sítios de reconhecimento para

enzimas de restrição *Xba*I e *Pst*III estão indicados com sua localização em pares de bases (pb) entre parênteses. A confirmação da clonagem foi realizada através da análise dos clones obtidos em gel de agarose 0,8% após digestão com a enzima *Bam*HI. Os clones positivos apresentaram um fragmento de 636 pb. **MBP** – proteína de ligação à maltose; *Atchit*IV – quitinase *Chia*4 de *Arabidopsis thaliana*; **AMP** – gene de resistência ao antibiótico ampicilina; tac (↗) – promotor tac.

A Figura 3A mostra a análise da cinética de expressão da proteína *MBP-UDA*. As proteínas foram separadas em SDS-PAGE 7,5% e coradas com Coomassie-blue. Os extratos protéicos de portadoras da construção pEGR2 foram obtidos imediatamente antes da indução (NI) e nos tempos indicados após adição de 0,3 mM IPTG. Os extratos protéicos de bactérias contendo o plasmídeo pMAL-2c vazio foram obtidos antes da indução (NI) e após 4h de indução com 0,3 mM IPTG também são mostrados. **M** – marcador de peso molecular. Os pesos moleculares estão indicados na figura em kiloDaltons (kDa). A figura 3B mostra a seqüência de aminoácidos de fusão *MBP-UDA* superexpressa. A seqüência correspondente a *UDA* está sublinhada.

A Figura 4A mostra a análise da cinética de expressão da proteína *MBP-Atchit*IV. As proteínas foram separadas em SDS-PAGE 7,5% e coradas com Coomassie-blue. Os extratos protéicos de portadoras da construção pEGR5 foram obtidos imediatamente antes da indução (NI) e nos tempos indicados após adição de 0,3 mM IPTG. **M** – marcador de peso molecular. Os pesos moleculares estão indicados na figura em kiloDaltons (kDa). A figura 4B mostra a seqüência de aminoácidos de fusão *MBP-ATCHIA*4 superexpressa. A seqüência correspondente a *ATCHIA*4 está sublinhada.

A Figura 5 mostra a análise de solubilidade da proteína *MBP-UDA*. As proteínas foram separadas em SDS-PAGE e coradas com Coomassie-blue. **NI** – extrato protéico de bactérias cultivadas na ausência de IPTG; **I** – extrato protéico total de bactérias cultivadas em presença de 0,3 mM IPTG; **P** – fração insolúvel da lise celular (precipitado bacteriano); **S** – fração solúvel da lise celular; **M** –



marcador de peso molecular. Os pesos moleculares estão indicados na figura em kiloDaltons (kDa).

- (A) Bactérias portadoras da construção pEGR2 foram coletadas antes (NI) e 4 horas após a adição de 0,3 mM IPTG (I).
- 5 (B) Extrato protéico de bactérias induzidas lisadas com lisozima e ciclos de congelamento e descongelamento.
- (C) Extrato protéico de bactérias induzidas, lisadas com lisozima, sarcosil e ciclos de congelamento e descongelamento.

A Figura 6 mostra a análise de solubilidade da proteína *MBP-AtchitIV*. As proteínas foram separadas em SDS-PAGE e coradas com Coomassie-blue. NI – extrato protéico de bactérias cultivadas na ausência de IPTG; I – extrato protéico total de bactérias cultivadas em presença de 0,3 mM IPTG; P – fração insolúvel da lise celular (precipitado bacteriano); S – fração solúvel da lise celular; M – marcador de peso molecular. Os pesos moleculares estão indicados na figura em

10

15 kiloDaltons (kDa).

- (A) Bactérias portadoras da construção pEGR5 foram coletadas antes (NI) e 4 horas após a adição de 0,3 mM IPTG (I). As bactérias induzidas foram lisadas por ciclos de congelamento e descongelamento após a adição de lisozima.
- 20 (B) O extrato protéico das bactérias induzidas foi lisado pela adição de lisozima e diferentes concentrações de sarcosil (%), seguido de ciclos de congelamento e descongelamento.

A Figura 7 mostra a análise por FACS da intensidade de fluorescência emitida pelas células de *P.françai* marcadas com a proteína WGA conjugada à fluoresceína após incubação com diferentes proteínas. A intensidade de fluorescência captada pelo FACS foi plotada contra o número relativo de células analisadas (número de eventos). Os resultados da análise de células incubadas previamente com a quitinase de *S.griseus* e com as proteínas *MBP*, *MBP-ATCHIA4*, *MBP-UDA* e *UDA*.

25

- 30 (a) Fluorescência de células de *P.françai* que foram incubadas apenas em tampão por 48h antes do uso da WGA conjugada à fluoresceína;

(b) Fluorescência de células que foram incubadas com tampão e com WGA conjugada à fluoresceína por 48h antes do uso da WGA conjugada à fluoresceína; e

(c) Fluorescência de células que foram incubadas com as respectivas proteínas por 48h antes do uso da WGA conjugada à fluoresceína.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Para efeitos desta invenção, entende-se por "composição" a incorporação de pelo menos um peptídeo com atividade quitinásica e/ou uma parte funcional de uma proteína quimérica em um veículo aceitável, sendo tal veículo capaz de proporcionar a administração da dita proteína quimérica, na forma tópica ou injetável, por exemplo.

A presente invenção pode ser realizada de inúmeras maneiras. Os exemplos listados a seguir são apenas ilustrativos, não devendo ser compreendidos como limitantes do escopo da presente invenção.

Exemplo 1

Clonagem dos cDNAs dos Genes *uda* e *ATCHIA4* em Vetores de Expressão Bacterianos

Após obtenção e purificação dos cDNAs correspondentes a quitinase de *Urtica dioica* (*UDA*) e quitinase *Chia4* de *Arabidopsis thaliana* (*ATCHIA4*) foram feitas reações de ligação destas seqüências aos vetores de expressão. A seqüência do cDNA da quitinase de *UDA* foi previamente caracterizado por Lerner e Raikhel ((1992). The Gene For Stinging Nettle Lectin (*Urtica dioica* Agglutinin) Encodes Both A Lectin And A Chitinase. Journal Of Biological Chemistry, 267: 11085-11091). O cDNA do gene *ATCHIA4* utilizado para construções de super expressão de proteínas foi caracterizado previamente no laboratório dos titulares do pedido de patente (Gerhardt *et al.* (1997). *Arabidopsis Thaliana* Class IV Chitinase Is Early Induced During The Interaction With *Xanthomonas campestris*. Febs Letters, 419:69-75.). O vetor de expressão pMAL-2c linearizado com as enzimas de restrição *XbaI* e *HindIII* foi utilizado na reação de ligação com o cDNA de *UDA* (1151 pb), linearizado com as enzimas de restrição *XbaI* e *PstI* e foi utilizado na

reação de ligação com o cDNA de *ATCHIA4* (950 pb). O vetor de expressão pMAL-2p foi linearizado com as enzimas de restrição *XbaI* e *HindIII* e utilizado na reação de ligação com os cDNAs referentes a *UDA*. Devido à presença do gene *malE* de *E.coli*, que codifica a proteína *MBP*, a montante dos sítios de inserção das seqüências codificantes dos genes de interesse resultou na obtenção destas seqüências fusionada à seqüência do gene *malE*. O produto das reações de ligação foi utilizado em reações independentes de transformação de bactérias *E.coli* XL1, pelo método de eletroporação.

Para identificar a presença dos clones contendo as construções de interesse, colônias de bactérias crescidas em meio seletivo foram selecionadas, ao acaso, para serem submetidas ao procedimento de extração de DNA plasmidial. O DNA plasmidial obtido foi submetido à digestão com a enzima de restrição *BamHI* para verificar a presença dos insertos (figuras 1 e 2). As seqüências dos cDNAs do gene *UDA* e do *ATCHIA* estão listados no anexo.

Exemplo 2

Determinação da Produção e Acúmulo das Proteínas Recombinantes Expressas em *E.coli*

Uma colônia de bactérias *E.coli* BL21 contendo o clone pEGR2 e pEGR5 foi selecionada, inoculada em meio líquido seletivo e induzida com o objetivo de se acompanhar a cinética da expressão das proteínas *MBP-UDA* e *MBP-ATCHIA4*. Foram coletadas amostras a cada hora nas primeiras 6 horas e outra após 24 horas de indução. Através de análise dos extratos totais em SDS-PAGE, foi observado para as proteínas *MBP-UDA* um aumento gradativo na quantidade de proteína expressa no decorrer do tempo, tendo seu pico de indução em 4 horas, podendo ainda ser observada após 24 horas de indução (figura 3). Para a proteína *MBP-ATCHIA4* também foi observado um aumento gradativo na quantidade de proteína expressa no decorrer do tempo, porém seu pico de indução ocorreu em 3 horas, e permaneceu estável até 24 horas de indução (figura 4). A seqüência de aminoácidos das proteínas de fusão *MBP-UDA* e *MBP-ATCHIA4* obtidas estão listadas no anexo de seqüências.

Exemplo 3

Solubilização das Proteínas Recombinantes Expressas em *E.coli* BL21

Após 4h de indução amostras das bactérias portadoras das construções de interesse foram lisadas pelo tratamento com lisozima seguido por ciclos de congelamento e descongelamento. Aliquotas das frações correspondentes ao sobrenadante e ao sedimento provenientes da lise foram analisadas em SDS-PAGE.

Os SDS-PAGE referentes às proteínas MBP permitiram verificar que estas proteínas se encontravam na fração solúvel do extrato bacteriano. Já os SDS-PAGE referentes às proteínas MBP-UDA e MBP-ATCHIA4 mostraram que estas se encontravam na fração insolúvel do extrato bacteriano (figuras 5B e 6A). Na tentativa de solubilizar as proteínas foi feito novo processo de lise bacteriana, só que desta vez utilizando o detergente N-laurilsarcosine nas concentrações finais de 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2% (Frangioni, J. V. e Neel, B. N. (1993). Solubilization And Purification Of Enzymatically Active Glutathione S-Transferase (Pgex) Fusion Proteins. Analytical Biochemistry, 210: 179-187). Este processo resultou na passagem das proteínas de fusão para a fração solúvel a partir da menor concentração de sarcosil adicionada a suspensão bacteriana (figura 5C e 6B). A seguir, o detergente Triton X-100 foi testado nas concentrações de 0,75% e 1,5% para sequestrar o sarcosil e permitir que as proteínas de fusão solubilizadas se ligassem à coluna de amilose.

Exemplo 4

Purificação e Quantificação das Proteínas Recombinantes Superexpressas em *E.coli*

Após a superexpressão das proteínas nas bactérias portadoras das construções de interesse, os extratos bacterianos totais foram lisados, as proteínas foram solubilizadas e os sobrenadantes foram aplicados em colunas contendo resina de amilose. Ao passar o extrato proteico pela coluna, a proteína de fusão se ligou aos resíduos de maltose da resina através da MBP. A seguir, foi

utilizada uma solução de maltose a 10mM que, por competição com a resina, acaba por eluir a proteína de fusão.

A eficiência da purificação foi verificada através de SDS-PAGE. Em cada um dos géis foi possível observar a presença de bandas com o peso molecular compatível com o estimado para as proteínas super expressas (figura 14A). Porém, algumas vezes foram observadas também pequenas bandas com o tamanho inferior ao esperado (figura 7). A seguir, as proteínas purificadas foram quantificadas pelo método BCA e quando necessário, foram concentradas em concentrador a vácuo (SPEED VAC®, SAVANT).

10

Exemplo 5

Phytomonas francai

Phytomonas francai foi mantido por transferência semanal. Para os experimentos, as células foram cultivadas no meio complexo de Warren (37 g/L de infusão cardio-cerebral, 10 mg/mL de ácido fólico e 10 mg/mL de Hemina). Após 96 horas de incubação, as células foram colhidas por centrifugação (2,000 g) por 10 min a 4 °C e foram lavadas três vezes em salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M.

15

20

Exemplo 6

Ensaio de Quitinase

Para as análises quantitativas, medições da atividade da quitinase foram executadas usando-se quitina (Sigma) como substrato conforme descrito (Boller, T., Gehri, A., Mauch, F. and Vögeli, U. (1983) Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* 157, 22-31; Reissig, J.L., Strominger, J.L. and Leloir, I.F. (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.* 217, 959-966.). Para as análises qualitativas, a atividade da quitinase foi detectada usando-se SDS-PAGE em combinação com quitina-glicol como substrato (Trudel, J. and Asselin, A. (1989) Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 178, 352-366).

25

30

O ensaio colorimétrico usando-se dimetilaminobenzaldeído (DMAB) e quitina como substratos demonstrou que MBP-UDA e MBP-ATCHIA4 quiméricas possuem atividade quitinásica. A atividade da quitinases MBP-UDA e MBP-ATCHIA4 foram aproximadamente de 10 a 15 vezes menores quando comparadas com a quitinase de *S. griseus*. Para obter 1mU de atividade quitinásica são necessários 2,5 µg, 25,8 µg e 37,7 µg de quitinase de *S. griseus*, MBP-UDA e MBP-ATCHIA4, respectivamente. Usando-se SDS-PAGE em combinação com quitina-glicol 0,01%, observou-se que o excesso de UDA sem MBP também mostra atividade quitinásica.

Exemplo 7

Ensaio de ligação com proteínas fusionadas e *P. françai*.

Imunoensaios foram realizados para determinar a capacidade das proteínas quiméricas de se ligarem à superfície celular de *P. françai*.

Para os experimentos, as lâminas foram pré-incubadas em PBS com BSA 1% por uma hora e depois incubada por uma hora a 4 °C em uma câmara úmida de PBS com; 220 µg/ ml de proteínas MBP-UDA, MBP-ATCHIA4 ou MBP.

Em seguida, 25 µL de PBS contendo 1×10^7 protozoários/mL foram colocados em uma lâmina de vidro, secada ao ar e fixada em metanol por 10 minutos à temperatura ambiente.

Como controle para proteínas, as células foram incubadas com volumes iguais de PBS.

Depois de incubadas com as proteínas quiméricas, as células foram incubadas com anticorpos anti-MBP. Esses anticorpos foram obtidos de coelhos através de inoculação de MBP.

As lâminas foram lavadas três vezes com PBS, incubadas primeiro com 25 µL de anticorpos anti-MBP por uma hora, e então com PBS contendo 1% BSA por uma hora.

As células foram finalmente incubadas com anticorpos anti-IgG de coelho (Sigma) marcados com fluoresceína-isotiocianato (FITC) e foram observadas por microscopia por fluorescência.

As lâminas foram incubadas com 20 μ L de anticorpos anti-IgG de coelho (Sigma) marcados com FITC em concentração de 100 μ g/mL por uma hora à temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas em PBS e examinadas por microscopia por fluorescência (Zeiss Axioplan equipado com epifluorescência).

Somente as células incubadas com as proteínas MBP-UDA e MBP-ATCHIA4 foram observadas. Nenhuma fluorescência foi observada quando as células foram incubadas com MBP, indicando a específica interação entre UDA, ATCHIA4 e a superfície celular da *P. françai*, conforme mostra a tabela 1 a seguir.

10

Tabela 1: Ensaio de Imunofluorescência indireta com *P. françai*

Proteína Utilizada	Fluorescência
MBP-UDA	+
MBP-ATCHIA4	+
MBP	-

Exemplo 8

15 Verificação da Atividade Quitinásica de ATCHIA4 e UDA Sobre Fitomonas

Para verificar a atividade quitinásica das proteínas foram feitos dois testes: um qualitativo (teste em lâminas), e um quantitativo (F.A.C.S - "fluorescence-activated cell sorting"). No teste qualitativo, lâminas contendo fitomonas fixadas foram incubadas em presença de diferentes concentrações de cada proteína (5, 10 e 20 μ g/mL) por diferentes tempos (12, 24, 36 e 48 horas) e a seguir, incubadas com a proteína WGA conjugada à fluoresceína. Após a incubação as lâminas foram observadas em microscopia de fluorescência e as células foram analisadas quanto a intensidade de fluorescência. Quanto maior a fluorescência apresentada pelas fitomonas menor o grau de atividade quitinásica das proteínas. A partir de 24-36 horas de incubação com as proteínas UDA, MBP-UDA e MBP-ATCHIA4 foi possível observar uma perda gradativa de fluorescência apresentada

25

pelas células. O mesmo padrão de perda de fluorescência foi observado quando as fitomonas foram incubadas com 5µg/mL da quitinase de *S.griseus*. Nenhuma modificação na intensidade de fluorescência foi observada quando foi utilizada a proteína MBP (dados não apresentados).

5 Para confirmar estes dados, foi feita uma análise populacional utilizando o F.A.C.S., um separador de células ativadas por fluorescência, que permite contar e identificar células individuais.

As células dentro da população de fitomonas foram primariamente tratadas com as proteínas de interesse e, a seguir, marcadas pelo tratamento com a
10 proteína WGA conjugada à fluoresceína por uma hora. Como a WGA conjugada à fluoresceína se liga a resíduos de N-acetilglucosamina, a marcação das células é dependente da integridade de sua membrana. Após lavadas, a mistura de células foi colocada no F.A.C.S. (Coulter EPICS® Elite), onde as células foram conduzidas através de um bocal formando uma corrente unicelular que passa por
15 um feixe de laser e tubos de fotomultiplicação detectam se a célula está ou não fluorescente. Foram analisadas 10.000 células em cada teste e a análise dos resultados foi feita no programa Win-MDI. Os resultados desta citometria de fluxo foram expostos sob a forma de histogramas da intensidade de fluorescência *versus* número de células.

20 Como controles negativos do experimento, as células foram incubadas apenas com PBS ou com as proteínas de interesse, mas não com a WGA marcada com fluoresceína e como controle positivo foi feita incubação das células com PBS (48 e 72 horas) e a seguir com WGA marcada com fluoresceína. O nível de fluorescência obtido é mostrado na figura 24. A seguir, partimos para
25 análise do efeito das proteínas de interesse.

Para descartar um possível efeito da proteína MBP sobre as células, foram feitas incubações por 48 e 72 horas com esta proteína. Como mostrado na figura 7, seu efeito é praticamente nulo. O padrão utilizado para comparação dos efeitos das proteínas foi a quitinase comercial de *S.griseus* (figura 7). As proteínas MBP-
30 ATCHIA4 e UDA apresentaram os efeitos mais pronunciados sobre as fitomonas

(figura 7). Já a proteína MBP-UDA foi a que apresentou menor atividade sobre as células. A figura 7 mostra uma comparação dos feitos das diferentes proteínas, após 48 horas e 72 horas de incubação, respectivamente.

Para checar se as proteínas quiméricas foram capazes de diminuir a quitina presente na superfície de *P. françai*, células deste protozoário foram incubadas com MBP-UDA e MBP-ATCHIA4, e depois com aglutinina do germe de trigo (WGA) marcada com FITC. O carboidrato específico de WGA inclui um ácido siálico terminal, assim como N-acetil-D-glucosamina e seus β -1,4 oligômeros.

As lâminas foram preparadas conforme ensaio anterior, e foram incubadas em uma câmara úmida com as seguintes proteínas dissolvidas em PBS com a concentração final de: 5 μ g de quitinase de *S. griseus* (5 mU – Sigma); 5 μ g, 10 μ g, e 20 μ g para cada uma das proteínas MBP-UDA, MBP-ATCHIA4, UDA e MBP por 12 h, 24 h, 36 h, e 48 h a 4 °C.

Células de controle foram incubadas com volumes iguais de PBS por períodos similares.

As lâminas foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com 15 μ L de aglutinina de germe de trigo marcada com FITC (WGA; Sigma) a uma concentração de 0,1 μ g/ mL por uma hora a temperatura ambiente.

As lâminas foram então lavadas em PBS, e examinadas por microscopia por fluorescência (Zeiss Axioplan equipado com epifluorescência).

Após 36-48 horas de incubação com MBP-UDA e ATCHIA4, a fluorescência na superfície celular da *Phytomonas* foi dramaticamente reduzida quando comparada com controles, indicando uma atividade potencial da quitinase contra *P. françai*,

Listagem de Sequências

Dados do requerente:

(a) Nome: UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

5

(b) Endereço: UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av.

Brigadeiro Trompowski, s/nº; Cidade Universitária, Rio de Janeiro – RJ.

Título da Invenção: CONSTRUÇÃO QUIMÉRICA DE DNA,
10 COMPOSIÇÃO, E PROCESSO PARA PROVOCAR LISE CELULAR E/OU
INTERAGIR COM A SUPERFÍCIE CELULAR DE PROTOZOÁRIOS

Número de sequências constantes do pedido: 4

Seq. nº 1

Tamanho: 825 pares de base

Tipo: cDNA

Nome do gene: AtCHIA4

5 Função: quitinase

atg ttg act ccc acc att tct aaa tcc atc tct tta gta acc att cta 48
 Met-Leu-Thr-Pro-Thr-Ile-Ser-Lys-Ser-Ile-Ser-Leu-Val-Thr-Ile-Leu-
 tta gtt cta caa gct ttc tct aac aca aca aag gct caa aat tgc ggt 96
 10 Leu-Val-Leu-Gln-Ala-Phe-Ser-Asn-Thr-Thr-Arg-Ala-Gln-Asn-Cys-Gly-
 tgt tcg tca gag cta tgt tgt agt cag ttt ggc ttt tgc ggt aac act 144
 Cys-Cys-Ser-Glu-Leu-Cys-Cys-Ser-Gln-Phe-Gly-Phe-Cys-Gly-Asn-Thr-
 tca gac tat tgt ggt gta ggt tgc caa caa gga cct tgt ttt gct cct 192
 Ser-Asp-Tyr-Cys-Gly-Val-Gly-Cys-Gln-Gln-Gly-Pro-Cys-Phe-Ala-Pro-
 15 ccc cct gca aat ggt gtc tct gtg gct gag att gta acg caa gaa ttc 240
 Pro-Pro-Ala-Asn-Gly-Val-Ser-Val-Ala-Glu-Ile-Val-Thr-Gln-Glu-Phe-
 ttc aat gga atc atc agt caa gcc gcg tct agt tgc gcc ggc aat aga 288
 Phe-Asn-Gly-Ile-Ile-Ser-Gln-Ala-Ala-Ser-Ser-Cys-Ala-Gly-Asn-Arg-
 ttt tac agt cgg gga gct ttt ctt gag gcc tta gac tca tat tct cgt 336
 20 Phe-Tyr-Ser-Arg-Gly-Ala-Phe-Leu-Glu-Ala-Leu-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-
 ttc ggt aga gtt gga tcg acc gac gac tct agg cgt gag att gca gcg 384
 Phe-Gly-Arg-Val-Gly-Ser-Thr-Asp-Asp-Ser-Arg-Arg-Glu-Ile-Ala-Ala-
 ttc ttt gct cat gtc aca cat gaa aca gga cgt aat ttc tgc tac ata 432
 Phe-Phe-Ala-His-Val-Thr-His-Glu-Thr-Gly-Arg-Asn-Phe-Cys-Tyr-Ile-
 25 gaa gag ata gac gga gcc tca aag gat tac tgc gac gag aat gca aca 480
 Glu-Glu-Ile-Asp-Gly-Ala-Ser-Lys-Asp-Tyr-Cys-Asp-Glu-Asn-Ala-Thr-
 caa tat cca tgc aat cct aac aaa ggc tac tac ggc cgc gga ccg atc 528
 Gln-Tyr-Pro-Cys-Asn-Pro-Asn-Lys-Gly-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Gly-Pro-Ile-
 caa ctc tct tgg aat ttc aac tac ggg cca gcc ggg aca gca att ggt 576
 30 Gln-Leu-Ser-Trp-Asn-Phe-Asn-Tyr-Gly-Pro-Ala-Gly-Thr-Ala-Ile-Gly-
 ttc gac ggc ctg aat gca ccg gaa aca gta gcc acg gat cca gtc ata 624
 Phe-Asp-Gly-Leu-Asn-Ala-Pro-Glu-Thr-Val-Ala-Thr-Asp-Pro-Val-Ile-
 tcc ttc aaa acc gcc ttg tgg tac tgg acc aat agg gtt cag cct gtt 672
 Ser-Phe-Lys-Thr-Ala-Leu-Trp-Tyr-Trp-Thr-Asn-Arg-Val-Gln-Pro-Val-
 35 atc tct caa ggt ttt ggt gca aca atc cgt gcc att aac ggt gct ttg 720
 Ile-Ser-Gln-Gly-Phe-Gly-Ala-Thr-Ile-Arg-Ala-Ile-Asn-Gly-Ala-Leu-
 gag tgt gac ggg gcc aac aca gcc acc gtt caa gct aga gtt cgt tac 768
 Glu-Cys-Asp-Gly-Ala-Asn-Thr-Ala-Thr-Val-Gln-Ala-Arg-Val-Arg-Tyr-
 40 tac acg gat tat tgt cgt caa ctt ggc gtt gat cct gga aac aac ctc 816
 Tyr-Thr-Asp-Tyr-Cys-Arg-Gln-Leu-Gly-Val-Asp-Pro-Gly-Asn-Asn-Leu-
 act tgc taa 825
 Thr-Cys Stop

Seq. n° 2

Tamanho: 1119 pares de base

Tipo: cDNA

Nome do gene: UDA

5 Função: quitinase

atg atg atg agg ttt tta gct gcc gta gtg atc atg tcc tcc gct atg 48
 Met-Met-Met-Arg-Phe-Leu-Ala-Ala-Val-Val-Ile-Met-Ser-Ser-Ala-Met-
 10 gcg gtg ggt cta gtg tcg gca cag agg tgc gga agc caa ggc ggc ggg 96
 Ala-Val-Gly-Leu-Val-Ser-Ala-Gln-Arg-Cys-Gly-Ser-Gln-Gly-Gly-Gly-
 ggt acg tgt ccc gcc ttg tgg tgc tgc agc atc tgg ggc tgg tgc ggc 144
 Gly-Thr-Cys-Pro-Ala-Leu-Trp-Cys-Cys-Ser-Ile-Trp-Gly-Trp-Cys-Gly-
 gac tcg gag ccc tac tgc ggc cgc acc tgc gag aac aag tgc tgg agc 192
 Asp-Ser-Glu-Pro-Tyr-Cys-Gly-Arg-Thr-Cys-Glu-Asn-Lys-Cys-Trp-Ser-
 15 ggc gag cgg tcg gac cac cgc tgc ggc gcc gct gta gga aac cct ccg 240
 Gly-Glu-Arg-Ser-Asp-His-Arg-Cys-Gly-Ala-Ala-Val-Gly-Asn-Pro-Pro-
 tgc ggc cag gac cgg tgc tgc agc gtc cac ggg tgg tgc ggt ggc ggc 288
 Cys-Gly-Gln-Asp-Arg-Cys-Cys-Ser-Val-His-Gly-Trp-Cys-Gly-Gly-Gly-
 20 aac gac tac tgc tcc ggg agc aaa tgc cag tac cgc tgc tcc tcc tcc 336
 Asn-Asp-Tyr-Cys-Ser-Gly-Ser-Lys-Cys-Gln-Tyr-Arg-Cys-Ser-Ser-Ser-
 gtc cgt gga ccc cgc gtc gct ctc agc ggc aat tcc acc gcc aac tcc 384
 Val-Arg-Gly-Pro-Arg-Val-Ala-Leu-Ser-Gly-Asn-Ser-Thr-Ala-Asn-Ser-
 atc ggc aac gtc gtc gtc acc gag ccg ctg ttc gac cag atg ttc tcc 432
 Ile-Gly-Asn-Val-Val-Val-Thr-Glu-Pro-Leu-Phe-Asp-Gln-Met-Phe-Ser-
 25 cac cgc aag gac tgt ccg agc cag ggc ttc tac agc tac cac tcc ttc 480
 His-Arg-Lys-Asp-Cys-Pro-Ser-Gln-Gly-Phe-Tyr-Ser-Tyr-His-Ser-Phe-
 ctc gta gcc gcc gag tcc ttc cca gct ttc ggg acc atc gga gat gtt 528
 Leu-Val-Ala-Ala-Glu-Ser-Phe-Pro-Ala-Phe-Gly-Thr-Ile-Gly-Asp-Val-
 30 gcg aca cgc aag aga gag gtc gca gcg ttc ctc gcc cat atc tcc caa 576
 Ala-Thr-Arg-Lys-Arg-Glu-Val-Ala-Ala-Phe-Leu-Ala-His-Ile-Ser-Gln-
 gca aca tca ggg gaa agg tct gac gtg gaa aac cct cat gca tgg ggg 624
 Ala-Thr-Ser-Gly-Glu-Arg-Ser-Asp-Val-Glu-Asn-Pro-His-Ala-Trp-Gly-
 ctt tgt cat atc aat aca act act gtg act gag aat gac ttc tgt acc 672
 Leu-Cys-His-Ile-Asn-Thr-Thr-Thr-Val-Thr-Glu-Asn-Asp-Phe-Cys-Thr-
 35 tcc tcc gac tgg cct tgc gct gcc ggc aaa aaa tac agc cct cga gga 720
 Ser-Ser-Asp-Trp-Pro-Cys-Ala-Ala-Gly-Lys-Lys-Tyr-Ser-Pro-Arg-Gly-
 ccc atc cag ctc acc cac aac ttc aac tac gga ctt gcc ggc caa gcc 768
 Pro-Ile-Gln-Leu-Thr-His-Asn-Phe-Asn-Tyr-Gly-Leu-Ala-Gly-Gln-Ala-
 40 att gga gag gac ctg att cag aac cct gac ttg gta gaa aag gat cca 816
 Ile-Gly-Glu-Asp-Leu-Ile-Gln-Asn-Pro-Asp-Leu-Val-Glu-Lys-Asp-Pro-
 atc ata tca ttc aag acg gcc ttg tgg ttc tgg atg tcc cag cac gac 864
 Ile-Ile-Ser-Phe-Lys-Thr-Ala-Leu-Trp-Phe-Trp-Met-Ser-Gln-His-Asp-
 aac aaa cct tca tgc cat gac att gtc ctc aat gcc aac tcc gcc gcg 912

Asn-Lys-Pro-Ser-Cys-His-Asp-Ile-Val-Leu-Asn-Ala-Asn-Ser-Ala-Arg-
aac aga atc cca aac aaa ggt gtg atc ggc aac att att agc cgc gct 960
Asn-Arg-Ile-Pro-Asn-Lys-Gly-Val-Ile-Gly-Asn-Ile-Ile-Ser-Arg-Ala-
5 ttt ggg cac gac gac ttt gcc gtt aga tct tca agc atc gga ttt tac 1008
Phe-Gly-His-Asp-Asp-Phe-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Ile-Gly-Phe-Tyr-
aag agg tac tgc gac atg ctg gga gtg agc tac gga cat gac ttg aag 1056
Lys-Arg-Tyr-Cys-Asp-Met-Leu-Gly-Val-Ser-Tyr-Gly-His-Asp-Leu-Lys-
tac tgg ttc gat aac act cca tca tgc gag ttc caa cgc atc caa atg 1104
Tyr-Trp-Phe-Asp-Asn-Thr-Pro-Ser-Ser-Glu-Phe-Gln-Arg-Ile-Gln-Met-
10 cgt gtt gcg gcg taa 1119
Arg-Val-Ala-Ala-Stop

Seq. nº 3

Tamanho: 665 aminoácidos

Tipo: peptídeo

Nome do peptídeo: MBP-ATCHIA4

5 Função: quitinase

Met-Lys-Ile-Glu-Glu-Gly-Lys-Leu-Val-Ile-Trp-Ile-Asn-Gly-Asp-Lys-
 Gly-Tyr-Asn-Gly-Leu-Ala-Glu-Val-Gly-Lys-Lys-Phe-Glu-Lys-Asp-Thr-
 Gly-Ile-Lys-Val-Thr-Val-Glu-His-Pro-Asp-Lys-Leu-Glu-Glu-Lys-Phe-
 10 Pro-Gln-Val-Ala-Ala-Thr-Gly-Asp-Gly-Pro-Asp-Ile-Ile-Phe-Trp-Ala-
 His-Asp-Arg-Phe-Gly-Gly-Tyr-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Leu-Ala-Glu-Ile-
 Thr-Pro-Asp-Lys-Ala-Phe-Gln-Asp-Lys-Leu-Tyr-Pro-Phe-Thr-Trp-Asp-
 Ala-Val-Arg-Tyr-Asn-Gly-Lys-Leu-Ile-Ala-Tyr-Pro-Ile-Ala-Val-Glu-
 Ala-Leu-Ser-Leu-Ile-Tyr-Asn-Lys-Asp-Leu-Leu-Pro-Asn-Pro-Pro-Lys-
 15 Thr-Trp-Glu-Glu-Ile-Pro-Ala-Leu-Asp-Lys-Glu-Leu-Lys-Ala-Lys-Gly-
 Lys-Ser-Ala-Leu-Met-Phe-Asn-Leu-Gln-Glu-Pro-Tyr-Phe-Thr-Trp-Pro-
 Leu-Ile-Ala-Ala-Asp-Gly-Gly-Tyr-Ala-Phe-Lys-Tyr-Glu-Asn-Gly-Lys-
 Tyr-Asp-Ile-Lys-Asp-Val-Gly-Val-Asp-Asn-Ala-Gly-Ala-Lys-Ala-Gly-
 20 Thr-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Glu-Ala-Ala-Phe-Asn-Lys-Gly-Glu-Thr-Ala-
 Met-Thr-Ile-Asn-Gly-Pro-Trp-Ala-Trp-Ser-Asn-Ile-Asp-Thr-Asn-Lys-
 Val-Asn-Tyr-Gly-Val-Thr-Val-Leu-Pro-Thr-Phe-Lys-Gly-Gln-Pro-Ser-
 Lys-Pro-Phe-Val-Gly-Val-Leu-Ser-Ala-Gly-Ile-Asn-Ala-Ala-Ser-Pro-
 Asn-Lys-Glu-Leu-Ala-Lys-Glu-Phe-Leu-Glu-Asn-Tyr-Leu-Leu-Thr-Asp-
 25 Glu-Gly-Leu-Glu-Ala-Val-Asn-Lys-Asp-Lys-Pro-Leu-Gly-Ala-Val-Ala-
 Glu-Lys-Ser-Tyr-Glu-Glu-Glu-Leu-Ala-Lys-Asp-Pro-Arg-Ile-Ala-Ala-
 Thr-Met-Glu-Asn-Ala-Gln-Lys-Gly-Glu-Ile-Met-Pro-Asn-Ile-Pro-Gln-
 Met-Ser-Ala-Phe-Trp-Tyr-Ala-Val-Arg-Thr-Ala-Val-Ile-Asn-Ala-Ala-
 Ser-Gly-Arg-Gln-Thr-Val-Asp-Glu-Ala-Leu-Lys-Asp-Ala-Gln-Thr-Asn-
 30 Ser-Ser-Ser-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Leu-Gly-Ile-
 Glu-Gly-Arg-Ile-Ser-Glu-Phe-Gly-Ser-Leu-Thr-Pro-Thr-Ile-Ser-Lys-
 Ser-Ile-Ser-Leu-Val-Thr-Ile-Leu-Leu-Val-Leu-Ala-Gln-Val-Ser-Asn-
 Thr-Thr-Lys-Ala-Gln-Asn-Cys-Gly-Cys-Ser-Ser-Glu-Leu-Cys-Cys-Ser-
 Gln-Phe-Gly-Phe-Cys-Gly-Asn-Thr-Ser-Asp-Tyr-Cys-Gly-Val-Gly-Cys-
 35 Gln-Gln-Gly-Pro-Cys-Phe-Ala-Pro-Pro-Pro-Ala-Asn-Gly-Val-Ser-Val-
 Ala-Glu-Ile-Val-Thr-Gln-Glu-Phe-Phe-Asn-Gly-Ile-Ile-Ser-Gln-Ala-
 Ala-Ser-Ser-Cys-Ala-Gly-Asn-Arg-Phe-Tyr-Ser-Arg-Gly-Ala-Phe-Leu-
 Glu-Ala-Leu-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Phe-Gly-Arg-Val-Gly-Ser-Thr-Asp-
 Asp-Ser-Arg-Arg-Glu-Ile-Ala-Ala-Phe-Phe-Ala-His-Val-Thr-His-Glu-
 40 Thr-Gly-His-Phe-Cys-Tyr-Ile-Glu-Glu-Ile-Asp-Gly-Ala-Ser-Lys-Asp-
 Tyr-Cys-Asp-Glu-Asn-Ala-Thr-Gln-Tyr-Pro-Cys-Asn-Pro-Asn-Lys-Gly-
 Tyr-Tyr-Gly-Arg-Gly-Pro-Ile-Gln-Leu-Ser-Trp-Asn-Phe-Asn-Tyr-Gly-
 Pro-Ala-Gly-Thr-Ala-Ile-Gly-Phe-Asp-Gly-Leu-Asn-Ala-Pro-Thr-Glu-
 Val-Ala-Thr-Asp-Pro-Val-Ile-Ser-Phe-Lys-Thr-Ala-Leu-Trp-Tyr-Trp-
 45 Thr-Asn-Arg-Val-Gln-Pro-Val-Ile-Ser-Gln-Gly-Phe-Gly-Ala-Thr-Ile-
 Arg-Ala-Ile-Asn-Gly-Ala-Leu-Glu-Cys-Asp-Gly-Ala-Asn-Thr-Ala-Thr-
 Val-Gln-Ala-Arg-Val-Arg-Tyr-Tyr-Thr-Asp-Tyr-Cys-Gln-Arg-Leu-Gly-
 Val-Asp-Pro-Gln-Asn-Asn-Leu-Thr-Cys-***

Seq. nº 4

Tamanho: 759 aminoácidos

Tipo: peptídeo

Nome do peptídeo: MBP-UDA

5 Função: quitinase

Met-Lys-Ile-Glu-Glu-Gly-Lys-Leu-Val-Ile-Trp-Ile-Asn-Gly-Asp-Lys-
 Gly-Tyr-Asn-Gly-Leu-Ala-Glu-Val-Gly-Lys-Lys-Phe-Glu-Lys-Asp-Thr-
 Gly-Ile-Lys-Val-Thr-Val-Glu-His-Pro-Asp-Lys-Leu-Glu-Glu-Lys-Phe-
 10 Pro-Gln-Val-Ala-Ala-Thr-Gly-Asp-Gly-Pro-Asp-Ile-Ile-Phe-Trp-Ala-
 His-Asp-Arg-Phe-Gly-Gly-Tyr-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Leu-Ala-Glu-Ile-
 Thr-Pro-Asp-Lys-Ala-Phe-Gln-Asp-Lys-Leu-Tyr-Pro-Phe-Thr-Trp-Asp-
 Ala-Val-Arg-Tyr-Asn-Gly-Lys-Leu-Ile-Ala-Tyr-Pro-Ile-Ala-Val-Glu-
 Ala-Leu-Ser-Leu-Ile-Tyr-Asn-Lys-Asp-Leu-Leu-Pro-Asn-Pro-Pro-Lys-
 15 Thr-Trp-Glu-Glu-Ile-Pro-Ala-Leu-Asp-Lys-Glu-Leu-Lys-Ala-Lys-Gly-
 Lys-Ser-Ala-Leu-Met-Phe-Asn-Leu-Gln-Glu-Pro-Tyr-Phe-Thr-Trp-Pro-
 Leu-Ile-Ala-Ala-Asp-Gly-Gly-Tyr-Ala-Phe-Lys-Tyr-Glu-Asn-Gly-Lys-
 Tyr-Asp-Ile-Lys-Asp-Val-Gly-Val-Asp-Asn-Ala-Gly-Ala-Lys-Ala-Gly-
 Leu-Thr-Phe-Leu-Val-Asp-Leu-Ile-Lys-Asn-Lys-His-Met-Asn-Ala-Asp-
 20 Thr-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Glu-Ala-Ala-Phe-Asn-Lys-Gly-Glu-Thr-Ala-
 Met-Thr-Ile-Asn-Gly-Pro-Trp-Ala-Trp-Ser-Asn-Ile-Asp-Thr-Asn-Lys-
 Val-Asn-Tyr-Gly-Val-Thr-Val-Leu-Pro-Thr-Phe-Lys-Gly-Gln-Pro-Ser-
 Lys-Pro-Phe-Val-Gly-Val-Leu-Ser-Ala-Gly-Ile-Asn-Ala-Ala-Ser-Pro-
 Asn-Lys-Glu-Leu-Ala-Lys-Glu-Phe-Leu-Glu-Asn-Tyr-Leu-Leu-Thr-Asp-
 25 Glu-Gly-Leu-Glu-Ala-Val-Asn-Lys-Asp-Lys-Pro-Leu-Gly-Ala-Val-Ala-
 Glu-Lys-Ser-Tyr-Glu-Glu-Glu-Leu-Ala-Lys-Asp-Pro-Arg-Ile-Ala-Ala-
 Thr-Met-Glu-Asn-Ala-Gln-Lys-Gly-Glu-Ile-Met-Pro-Asn-Ile-Pro-Gln-
 Met-Ser-Ala-Phe-Trp-Tyr-Ala-Val-Arg-Thr-Ala-Val-Ile-Asn-Ala-Ala-
 Ser-Gly-Arg-Gln-Thr-Val-Asp-Glu-Ala-Leu-Lys-Asp-Ala-Gln-Thr-Asn-
 30 Ser-Ser-Ser-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Leu-Gly-Ile-
 Glu-Gly-Arg-Ile-Ser-Glu-Phe-Gly-Ser-Ser-Arg-Glu-Leu-Met-Met-Met-
 Arg-Phe-Leu-Ser-Ala-Val-Val-Ile-Met-Ser-Ser-Ala-Met-Ala-Val-Gly-
 Leu-Val-Ser-Ala-Gln-Arg-Cys-Gly-Ser-Gln-Gly-Gly-Gly-Gly-Thr-Cys-
 Pro-Ala-Leu-Tyr-Cys-Cys-Ser-Ile-Trp-Gly-Trp-Cys-Gly-Asp-Ser-Glu-
 35 Pro-Tyr-Cys-Gly-Arg-Thr-Cys-Glu-Asn-Lys-Cys-Trp-Ser-Gly-Glu-Arg-
 Ser-Asp-His-Arg-Cys-Gly-Ala-Ala-Asp-Gly-Asn-Pro-Pro-Cys-Gly-Gln-
 Asp-Arg-Cys-Cys-Ser-Val-His-Gly-Trp-Cys-Gly-Gly-Gly-Asn-Asp-Tyr-
 Cys-Ser-Gly-Ser-Lys-Cys-Gln-Tyr-Arg-Cys-Ser-Ser-Ser-Val-Arg-Gly-
 Pro-Arg-Val-Ala-Leu-Ser-Gly-Asn-Ser-Pro-Ala-Asn-Ser-Ile-Gly-Asn-
 40 Val-Val-Val-Thr-Glu-Pro-Leu-Phe-Asp-Gln-Met-Phe-Ser-His-Arg-Lys-
 Asp-Cys-Pro-Ser-Gln-Gly-Phe-Tyr-Ser-Tyr-His-Ser-Phe-Leu-Val-Ala-
 Ala-Glu-Ser-Phe-Pro-Ala-Phe-Gly-Thr-Ile-Gly-Asp-Val-Ala-Thr-Arg-
 Lys-Arg-Glu-Val-Ala-Ala-Phe-Leu-Ala-His-Ile-Ser-Gln-Ala-Thr-Ser-
 Gly-Glu-Arg-Ser-Asp-Val-Glu-Asn-Pro-His-Ala-Trp-Gly-Leu-Cys-His-
 45 Ile-Asn-Thr-Thr-Thr-Val-Thr-Glu-Asn-Asp-Phe-Cys-Thr-Ser-Ser-Asp-
 Trp-Pro-Cys-Ala-Ala-Gly-Lys-Lys-Tyr-Ser-Pro-Arg-Gly-Pro-Ile-Gln-
 Leu-Thr-His-Asn-Phe-Asn-Tyr-Gly-Leu-Ala-Gly-Gln-Ala-Ile-Gly-Glu-
 Thr-Leu-Ile-Gln-Asn-Pro-Asp-Leu-Val-Glu-Lys-Asp-Pro-Ile-Ile-Ser-
 Phe-Lys-Thr-Ala-Leu-Trp-Phe-Trp-Met-Ser-Gln-His-Asp-Asn-Lys-Pro-

Ser-Cys-His-Asp-Ile-Val-Leu-Asn-Ala-Asn-Ser-Ala-Ala-Asn-Arg-Ile-
Pro-Asn-Lys-Gly-Val-Ile-Gly-Asn-Ile-Ile-Ser-Arg-Ala-Phe-Gly-His-
Asp-Asp-Phe-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Ile-Gly-Phe-Tyr-Lys-Arg-Ser-
Cys-Asp-Met-Leu-Gly-Val-Ser-Tyr-Gly-His-Asp-Leu-Lys-Tyr-Trp-Phe-
5 Asp-Asn-Thr-Pro-Ser-Ser-Glu-Phe-Gln-Arg-Ile-Gln-Met-Arg-Val-Ala-
Ala-***

Reivindicações

CONSTRUÇÃO QUIMÉRICA DE DNA, COMPOSIÇÃO, E PROCESSO PARA PROVOCAR LISE CELULAR E/OU INTERAGIR COM A SUPERFÍCIE CELULAR DE PROTOZOÁRIOS

5

1. Construção quimérica de DNA para uso na expressão, em células procarióticas ou eucarióticas, caracterizada por compreender uma região promotora funcionalmente ligada a uma seqüência codificante de um produto polipeptídico compreendendo pelo menos parte da estrutura conformacional primária de uma quitinase de origem vegetal para possibilitar a propriedade biológica de clivar quitina presente na membrana celular de protozoários.
- 10 2. Construção quimérica, conforme reivindicação 1, caracterizada pelo fato de a referida seqüência codificante ser selecionada do grupo que compreende:
 - (a) a seqüência de DNA definida nas Seq. n° 1 e/ou Seq. n° 2, ou suas seqüências complementares;
 - 20 (b) seqüências de DNA que hibridizam sob condições estringentes, às regiões codificantes das seqüências de DNA definidas em (a) ou fragmentos das mesmas;
 - (c) seqüências de DNA que, por degeneração do código genético, poderiam hibridizar com as seqüências de DNA definidas em (a) e (b);
 - 25 (d) combinações das seqüências definidas em (a), (b) e/ou (c).
3. Construção quimérica, conforme qualquer reivindicação anterior, caracterizada pelo fato de compreender a Seq. ID n° 3.
4. Construção quimérica, conforme qualquer reivindicação anterior, caracterizada pelo fato de compreender a Seq. ID n° 4.
- 30 5. Construção quimérica, conforme qualquer reivindicação anterior, caracterizada pelo fato de a referida região promotora ser selecionada do

grupo que compreende regiões promotoras procarióticas, eucarióticas ou combinações das mesmas.

- 5 6. Construção quimérica, conforme qualquer reivindicação anterior, caracterizada pelo fato de que as referidas células eucarióticas são células vegetais.
7. Construção quimérica, conforme reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que as referidas células vegetais são oriundas de plantas selecionadas do grupo que compreende as angiospermas.
- 10 8. Construção quimérica, conforme qualquer reivindicação anterior, caracterizada pelo fato de que os referidos protozoários pertencem à família *Trypanosomatidae*.
9. Construção quimérica, conforme reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que os referidos protozoários pertencem ao gênero *Phytomonas*.
- 15 10. Construção quimérica, conforme qualquer reivindicação anterior, caracterizada pelo fato de que a referida seqüência codificante de um produto polipeptídico compreendendo pelo menos parte da estrutura conformacional primária de uma quitinase ser obtida de *Urtica dióica*.
- 20 11. Construção quimérica, conforme qualquer reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que a referida seqüência codificante de um produto polipeptídico compreendendo pelo menos parte da estrutura conformacional primária de uma quitinase ser obtida de *Arabidopsis thaliana*.
- 25 12. Construção quimérica, conforme qualquer reivindicação anterior, caracterizada pelo fato de que referida seqüência codificante de um produto polipeptídico compreendendo pelo menos parte da estrutura conformacional primária de uma quitinase ser traducionalmente fusionada à seqüência codificante de outro produto polipeptídico.
- 30 13. Construção quimérica, conforme reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que o referido outro produto polipeptídeo compreende pelo menos parte da proteína MBP.
14. Composição para clivar quitina presente na membrana celular de protozoários caracterizada por compreender um carreador aceitável e pelo

menos parte da estrutura conformacional primária de uma quitinase de origem vegetal.

- 5 15. Composição, conforme reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que o carreador aceitável inclui estabilizantes e/ou preservantes e/ou adjuvantes da atividade enzimática de clivagem da quitina.
16. Composição, conforme reivindicação 14 ou 15, caracterizada pelo fato de que a referida pelo menos parte da estrutura conformacional primária de uma quitinase de origem vegetal ser codificada por seqüências selecionadas do grupo que compreende:
- 10 (a) a seqüência de DNA definida nas Seq. n° 1 e/ou Seq. n° 2, ou suas seqüências complementares;
- (b) seqüências de DNA que hibridizam sob condições estridentes, às regiões codificantes das seqüências de DNA definidas em (a) ou fragmentos das mesmas;
- 15 (c) seqüências de DNA que, por degeneração do código genético, poderiam hibridizar com as seqüências de DNA definidas em (a) e (b);
- (d) combinações das seqüências definidas em (a), (b) e/ou (c).
17. Composição, conforme reivindicações 14 a 16, caracterizada pelo fato de compreender o polipeptídeo codificado (definido) na Seq. ID n° 3.
- 20 18. Composição, conforme reivindicações 14 a 16, caracterizada pelo fato de compreender polipeptídeo codificado (definido) na Seq. ID n° 4.
19. Composição, conforme reivindicações 14 a 18, caracterizada pelo fato de que a referida pelo menos parte da estrutura conformacional primária de uma quitinase ser obtida de *Urtica dióica*.
- 25 20. Composição, conforme reivindicações 14 a 18, caracterizada pelo fato de que a referida pelo menos parte da estrutura conformacional primária de uma quitinase ser obtida obtida de *Arabidopsis thaliana*.
21. Composição, conforme reivindicações 14 a 20, caracterizada pelo fato de que a referida ser fusionada a outro produto polipeptídico.
- 30 22. Composição, conforme reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que o referido outro produto polipeptídeo compreende pelo menos parte da proteína MBP.

23. Composição, conforme reivindicações 14 a 22, caracterizada pelo fato de que os referidos protozoários pertencem à família *Trypanosomatidae*.
24. Composição, conforme reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que os referidos protozoários pertencem ao gênero *Phytomonas*.
- 5 25. Processo para provocar a lise celular e/ou interagir com a superfície celular de protozoários caracterizado por compreender introduzir, no genoma de um organismo hospedeiro no qual a presença ou ação dos referidos protozoários é indesejável, a construção quimérica definida na reivindicação 1, de forma que a referida construção quimérica tenha sua expressão no organismo hospedeiro.
- 10 26. Processo, conforme reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o referido organismo hospedeiro é eucariótico.
27. Processo, conforme reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o referido organismo hospedeiro é uma planta.
- 15 28. Processo, conforme reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a referida planta é selecionada do grupo que compreende as angiospermas
29. Processo, conforme reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a referida planta é *Manihot esculenta*.
30. Processo, conforme reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a referida planta é *Coffea liberica*.
- 20 31. Processo, conforme reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a referida planta é *Elaeis guineensis*.
32. Processo, conforme reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a referida planta é *Cocos nucifera*.

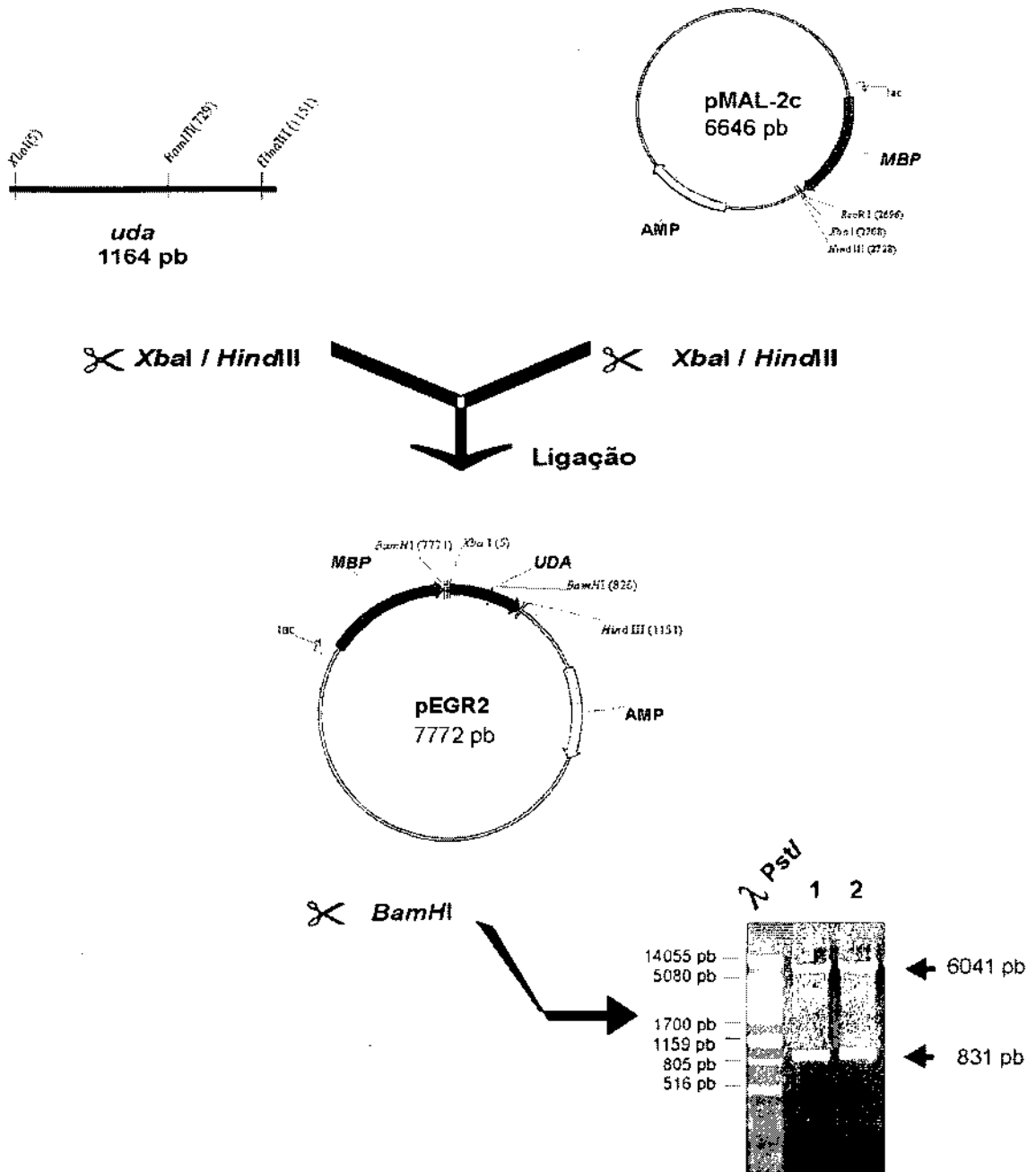


FIGURA 1

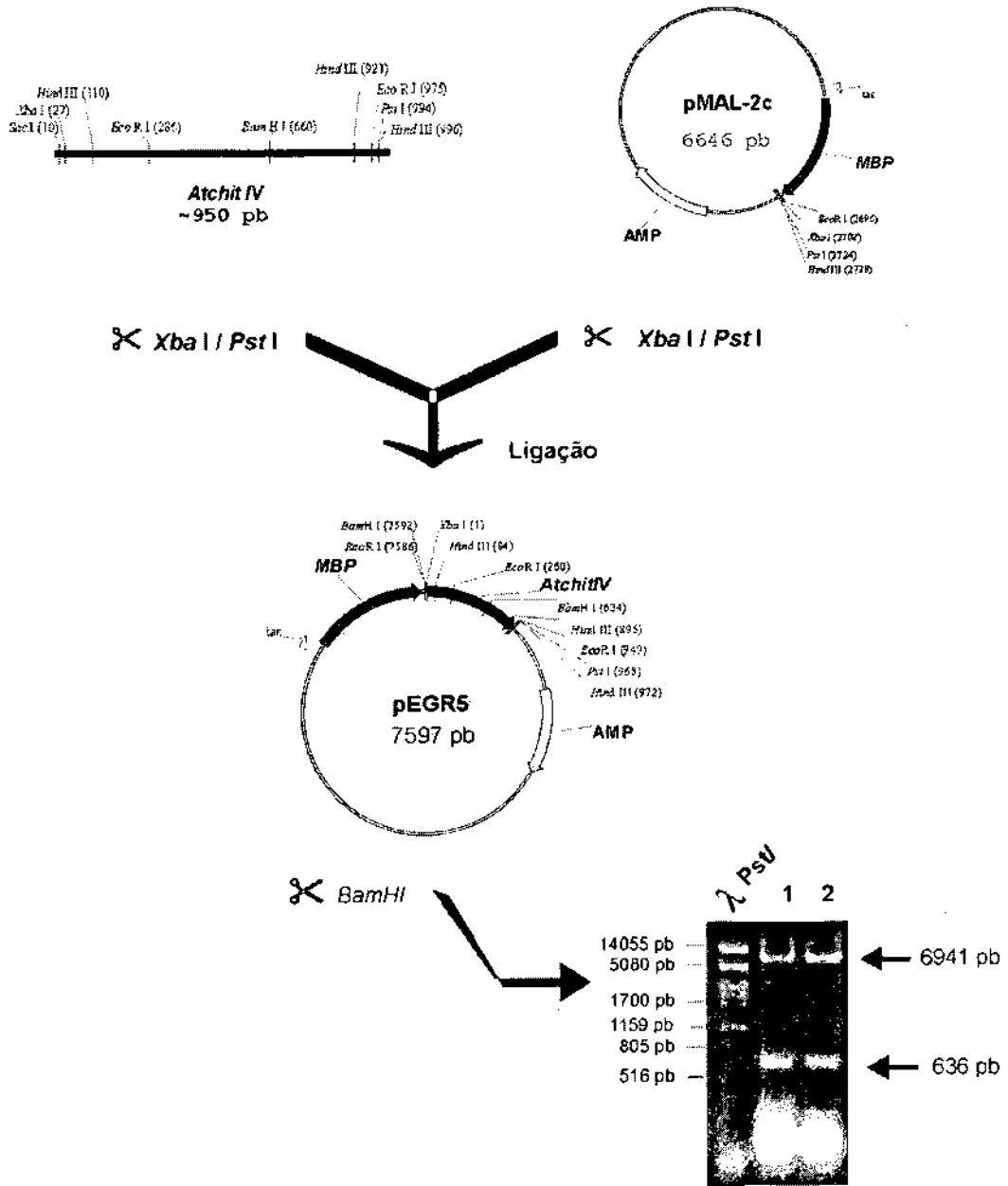
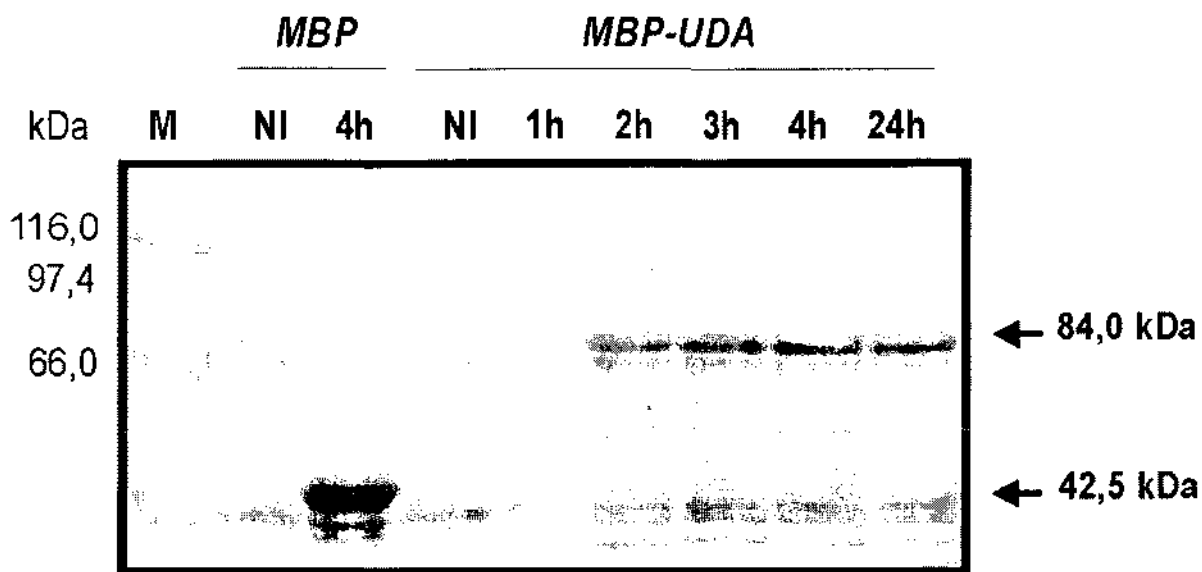
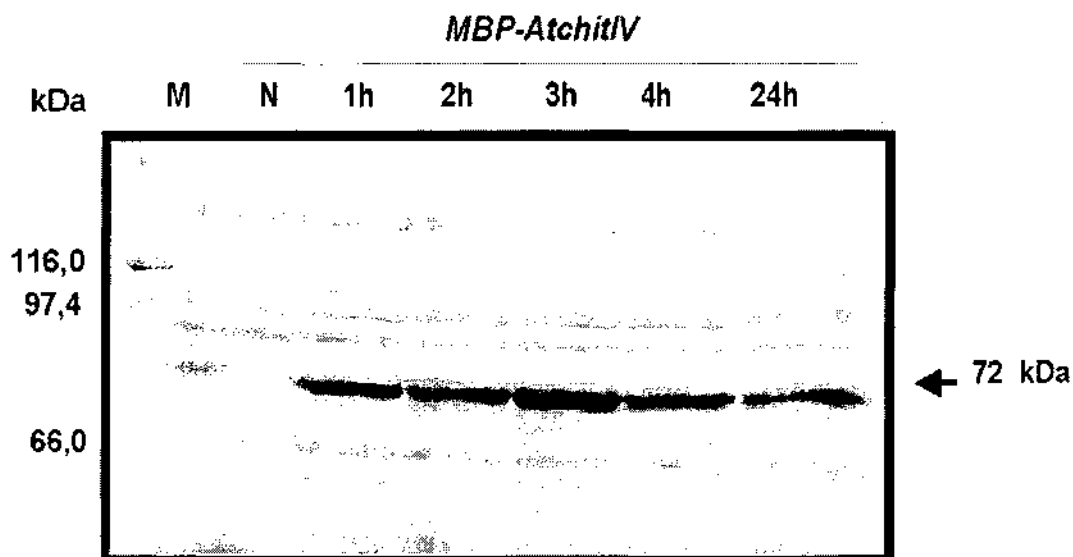


FIGURA 2



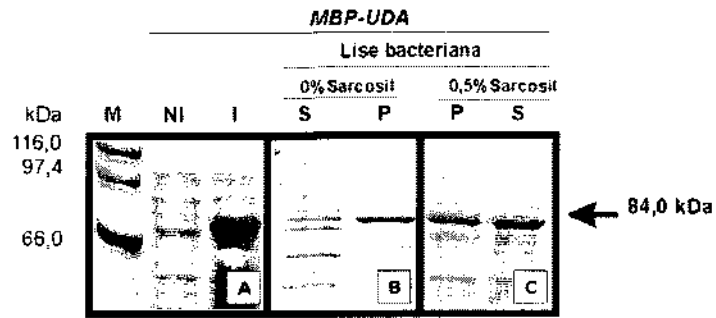
5

FIGURA 3



10

FIGURA 4



5

FIGURA 5

10

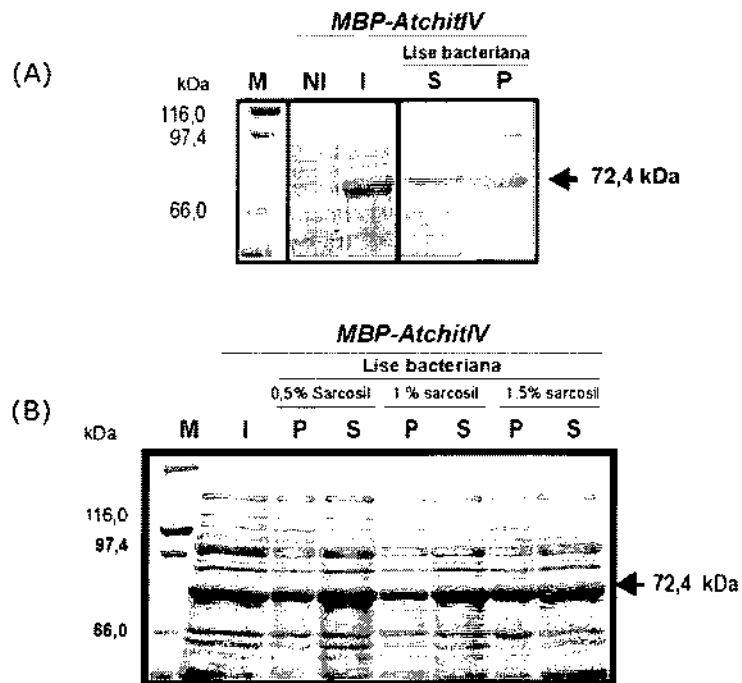
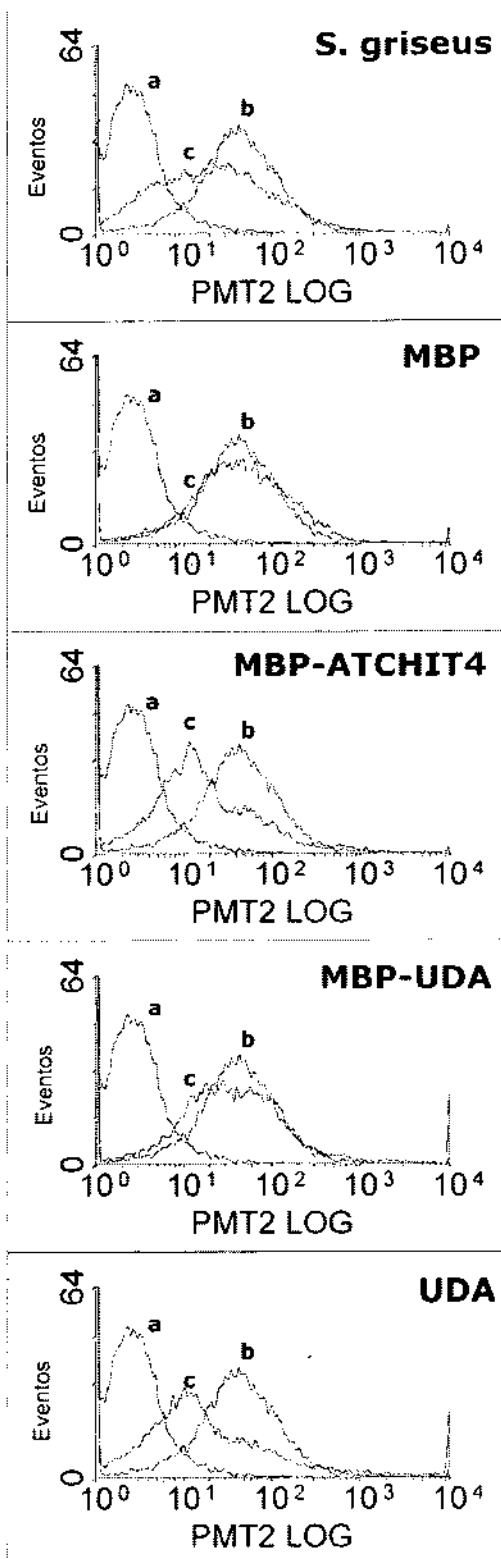


FIGURA 6

Número relativo de células



Intensidade da fluorescência

FIGURA 7

Resumo

CONSTRUÇÃO QUIMÉRICA DE DNA, COMPOSIÇÃO, E PROCESSO PARA PROVOCAR LISE CELULAR E/OU INTERAGIR COM A SUPERFÍCIE CELULAR DE PROTOZOÁRIOS

5

A presente invenção trata de uma proteína quimérica, de um DNA codificante desta proteína, mais especificamente quitinases de origem vegetal, capazes de provocar lise celular e/ou interagir com protozoários causadores de doenças, especialmente fitopatogenias; também são descritas novas composições contendo estas quitinases e de um processo capaz de interagir e provocar lise celular destes parasitas.

10