



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza
Instituto de Química
Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Vetores

NATHÁLIA FARO DE BRITO

DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA A EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE
PROTEÍNAS: CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO CODIFICANTE DE
PROTEÍNA LIGADORA DE ODOR DE ANTENA DE *Rhodnius prolixus*

Rio de Janeiro

2013

Nathália Faro de Brito

DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA A EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE
PROTEÍNAS: CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO CODIFICANTE DE
PROTEÍNA LIGADORA DE ODOR DE ANTENA DE *Rhodnius prolixus*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
curso de Química com Atribuições Tecnológicas do
Instituto de Química como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel.

Orientadora: Prof^a. Ana Claudia do Amaral Melo

Co-Orientador: Prof. Anderson de Sá Pinheiro

Rio de Janeiro

2013

FICHA CARTALOGRÁFICA

B862

Brito, Nathália Faro.

Desenvolvimento de protocolo para a expressão heteróloga de proteínas: Clonagem e sequenciamento da região codificante de proteína ligadora de odor de antena de *Rhodnius prolixus* / Nathália Faro de Brito. – Rio de Janeiro : UFRJ/IQ, 2013.

Trabalho de Conclusão de Curso (Química com Atribuições Tecnológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 2013.

Orientadores: Ana Claudia do Amaral Melo e Anderson de Sá Pinheiro.

1. *Rhodnius prolixus*. 2. OBP. 3. Doença de Chagas. 4. Antenas. I. Melo, Ana Claudia do Amaral, (Orient.) II. Pinheiro, Anderson de Sá, (orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Desenvolvimento de protocolo para a expressão heteróloga de proteínas: Clonagem e sequenciamento da região codificante de proteína ligadoras de odor de antena de *Rhodnius prolixus*

CDD: 540

Nathália Faro de Brito

DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA A EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE
PROTEÍNAS: CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO CODIFICANTE DE
PROTEÍNA LIGADORA DE ODOR DE ANTENA DE *Rhodnius prolixus*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
curso de Química com Atribuições Tecnológicas do
Instituto de Química como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel.

Aprovado em: 12 de dezembro de 2013.

Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia do Amaral Melo, Orientadora

(Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ)

Prof. Dr. Anderson de Sá Pinheiro, Co-orientador

(Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ)

Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Soares da Silva, Banca Examinadora

(Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ)

Prof.^a Dr.^a Viviane Gomes Teixeira, Banca Examinadora

(Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ)

Dedico este trabalho à vovó Yara (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Ao concluir esse trabalho, percebo quase que com surpresa o que aconteceu: mais uma etapa chega ao fim. Ainda me lembro do início, há seis anos, quando ingressei na universidade e comecei a pensar de verdade no que seria do meu futuro. Gosto de pensar que trilhei esse caminho da melhor maneira, tirando conhecimento de todas as experiências vividas. Dedico o espaço a seguir para me reportar às pessoas essenciais, sem as quais a escrita dessa monografia não seria possível.

Aos meus pais, pela capacidade de acreditar e investir em mim. Mãe, obrigada pelo apoio incondicional em tudo que eu já tentei fazer nessa vida. Minha dívida com você é eterna e eu espero poder pagar um pouquinho dela te trazendo algum orgulho da filha que você criou. Pai, você é responsável pela minha formação. Obrigada por me mostrar desde cedo a importância dos estudos e da honestidade, me indicando sempre a direção certa a seguir. Nada disso seria possível sem o seu incentivo.

Ao Bruno, por estar sempre do meu lado, me ajudando em todos os momentos mais difíceis. Perdi as contas de quantas vezes você me puxou para fora de uma crise “monográfica”! E de várias outras crises, aliás. Obrigada pelo seu apoio e carinho, por tornar meus dias mais alegres e me mostrar os sentimentos mais bonitos e sinceros! Essa monografia nunca teria saído sem você.

Às minhas avós (*in memoriam*). Minha avó Ana, cuja história de vida sempre me fez refletir e agradecer pelas oportunidades que eu tive, foi uma grande inspiração para mim. Minha avó Yara, minha segunda mãe, que infelizmente precisou partir antes mesmo de eu iniciar essa jornada, mas sem a qual eu nunca teria chegado até aqui.

À professora e orientadora Ana Cláudia, por me dar a oportunidade de realizar esse trabalho e confiar na minha capacidade. Ana, obrigada pela paciência na orientação e pelos conhecimentos transmitidos, que me ajudaram na conclusão desse projeto.

Ao professor Anderson e a professora Mônica, cuja ajuda foi essencial na conclusão desse projeto, sempre dispostos a me socorrer em momentos de crises de dúvidas!

Às professoras Márcia e Viviane, que gentilmente cederam uma parte de seu tempo para contribuir com o meu trabalho. Obrigada por aceitarem fazer parte da minha banca examinadora.

A todos os colegas do LABBMOVE pelo apoio nessa jornada um tanto conturbada! Thiago, obrigada por me receber no laboratório e me transmitir os primeiros ensinamentos. Sheilinha, esgotei sua paciência com meus dramas de clonagem, mas finalmente deu certo. Muchas gracias!!! Dani, obrigada por sempre segurar as pontas quando eu precisei me ausentar, sua ajuda foi imensa e eu só tenho a agradecer.

Às amigas queridas de graduação, Juliana e Vanessa, que viveram comigo as angústias das provas e as risadas das conversas nos corredores. Meninas, vocês fizeram o meu curso muito

mais divertido! E também à grande amiga de infância: Ju, você me ajudou a sobreviver ao ensino fundamental, logo no comecinho da jornada. Obrigada pela sua amizade!

A todos os colegas de curso, pela oportunidade de convívio com as mais diferentes figuras, de diferentes lugares, cada um com suas peculiaridades! Sem dúvida, a convivência com outras pessoas é essencial para a construção do caráter. Obrigada por também terem escolhido esse curso de maluco e dividido essa experiência comigo!

Por fim, agradeço a todos os professores do curso de Química com Atribuições Tecnológicas, que contribuíram muito para a minha formação.

É nessa conclusão que se inicia uma nova etapa, a subida de mais um degrau.

A todos vocês, os meus mais sinceros agradecimentos.

Até a próxima!

“Eu não quero acreditar, eu quero saber.”

– Carl Sagan

RESUMO

PROJETO DE CURSO

TÍTULO: DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA A EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS: CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO CODIFICANTE DE PROTEÍNA LIGADORA DE ODOR DE ANTENA DE *Rhodnius prolixus*.

ALUNO: Nathália Faro de Brito

ORIENTADOR(ES): Ana Cláudia do Amaral Melo e Anderson de Sá Pinheiro, DBQ – Instituto de Química, UFRJ.

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma infecção crônica e debilitante, frequentemente fatal, que afeta atualmente milhões de pessoas da América Latina. Causado pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, o mal de Chagas é transmitido principalmente por insetos da subfamília Triatominae, conhecidos popularmente como barbeiros. A olfação é uma das modalidades sensoriais que permite aos insetos interpretar o meio ambiente. Diversas proteínas participam desse processo, dentre as quais as mais importantes são as proteínas ligadoras de odor, denominadas *OBPs*. O objetivo deste estudo foi estabelecer um protocolo inicial para a expressão heteróloga de proteínas ligadoras de odor (*OBPs*) de antena de *Rhodnius prolixus*. Com o auxílio de ferramentas de bioinformática, foram selecionadas algumas *OBPs* no transcriptoma do *R. prolixus*, cujas sequências de nucleotídeos foram utilizadas como base para desenhar oligossacarídeos iniciadores necessários para as reações de amplificação. Inicialmente, o RNA total foi extraído de 50 pares de antenas, tratado com RNase e usado para sintetizar cDNA. A amplificação das regiões de interesse do cDNA foi feita por reação em cadeia da polimerase, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores desenhados especificamente para cada *OBP*, com posterior análise e purificação dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose 1%. Essa região foi ligada em vetor de clonagem pGEM T Easy e inserida por meio de transformação química em células de *Escherichia coli*. O DNA plasmidial foi purificado e, após sequenciamento, foi confirmada a presença de um inserto cuja sequência apresentou um alto grau (99%) de similaridade com a proteína ligadora de odor estudada. O entendimento de características de proteínas envolvidas no sistema olfativo de *R. prolixus* é de grande importância no desenvolvimento de novas formas de controle vetorial que sejam específicas para esse inseto, na tentativa de minimizar qualquer tipo de agressão a outras espécies ou ao meio ambiente.

PALAVRAS-CHAVE: *Rhodnius prolixus*; proteína ligadora de odor (*OBP*); doença de Chagas; clonagem.

ABSTRACT

BRITO, Nathália Faro. **Desenvolvimento de protocolo para a expressão heteróloga de proteínas: Clonagem e sequenciamento da região codificante de proteína ligadora de odor de antena de *Rhodnius prolixus***. Rio de Janeiro, 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Química com Atribuições Tecnológicas) – Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is a chronic and debilitating, often fatal, infection that affects millions of people in Latin America today. Caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, this illness is mainly transmitted by a Triatominae insect, popularly known as “kissing bug”. Olfaction is one of the sensory modalities responsible for allowing insects perceive the environment around them. Several proteins play a role in this process, among which the odorant binding protein (OBP) is highlighted as one of the most important in the olfactory system. The main goal of this study was to develop an initial protocol for heterologous expression of OBPs from antennae of *Rhodnius prolixus*. With the help of bioinformatics tools, a few OBPs were selected from the transcriptome of *R. prolixus*, whose nucleotide sequences were used to design primers required for the amplification reaction. Initially, the total RNA was extracted from 50 pairs of antennae, treated with RNase and used to synthesize the complementary DNA. The amplification of cDNA target regions was carried out by polymerase chain reaction, using primers specifically designed for each OBP, with subsequent analysis and purification of PCR products by electrophoresis in 1% agarose gel. This region was joined to a pGEM T Easy cloning vector through a ligation reaction and then inserted into *Escherichia coli* cells by chemical transformation. Plasmid DNA was purified and after sequencing confirmed the presence of an insert whose sequence had a high degree (99%) of similarity with the studied odorant binding protein. Understanding characteristics of proteins involved in the olfactory system of *R. prolixus* is of great importance in the development of new forms of vector control that are specific to this insect, in an attempt to minimize any kind of aggression to other species or the environment.

KEY WORDS: *Rhodnius prolixus*, odorant binding protein (OBP); Chagas disease; cloning.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Zonas endêmicas da doença de Chagas.	18
Figura 2 - (a) Chagoma na superfície dorsal da mão esquerda de uma paciente de 42 anos, 21 dias após contaminação acidental; (b) Complexo oftalmoganglionar (“Sinal de Romana”); (c) Corte sagital de coração de paciente chagásico que faleceu com insuficiência cardíaca congestiva, mostrando dilatação das cavidades ventriculares, afilamento da ponta do ventrículo esquerdo e do ventrículo direito, com trombose.	20
Figura 3 – Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> (simplificado).	22
Figura 4 – Intercâmbio entre os ciclos doméstico, peridoméstico e silvestre.	23
Figura 5 – Fases do ciclo de desenvolvimento de <i>R. prolixus</i> . Ovo; ninfas de 1 ^ª a 5 ^ª estágio e adultos.	27
Figura 6 – Ligação do vetor com o inserto para formar a molécula de DNA recombinante.	33
Figura 7 – Transformação de uma célula bacteriana com uma construção de DNA recombinante.	34
Figura 8 – Mapa e pontos de referência de sequências do vetor pGEM-T Easy.	36
Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose do RNA total.	50
Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR constitutivo do gene R18S.	50
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR purificados.	51
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de colônia para os clones das OBPs Rp-11280 e Rp-10034.	52
Figura 13 – Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos clones e geração da sequência consenso.	54
Figura 14 – Comparação entre a sequência de aminoácidos do clone e a prevista no transcripoma.	54
Figura 15 – Sítios de restrição para as enzimas <i>NdeI</i> e <i>XhoI</i> nas extremidades da sequência de nucleotídeos.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências das OBPs selecionadas para esse trabalho. Peptídeo sinal marcado em vermelho.	44
Tabela 2 – Sequências e características dos oligonucleotídeos iniciadores.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar

Da – Dalton

DEPC – dietilpirocarbonato

DNA – ácido desoxirribonucléico

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

kb - kilobase

mRNA – ácido ribonucléico mensageiro

µg - microgramas

µL - microlitros

OBP (*odorant binding protein*) - proteína ligadora de odor

pb – pares de bases

PCR – reação em cadeia da polimerase

RNA – ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos Específicos.....	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1. A doença de Chagas	18
3.2. Mecanismos de transmissão	20
3.3. Ciclos do <i>Trypanosoma cruzi</i> em hospedeiros	21
3.4. Ciclos da doença de Chagas.....	22
3.5. Controle do vetor.....	24
3.6. Triatomíneos.....	26
3.7. <i>Rhodnius prolixus</i>	26
3.8. Comportamento e olfação de insetos	27
3.9. Técnicas em Biologia Molecular	30
3.9.1 Reação em cadeia da polimerase.....	30
3.9.2 Eletroforese em gel de agarose.....	32
3.9.3 Clonagem em vetor plasmidial.....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Manutenção da colônia de <i>Rhodnius prolixus</i>	35
4.2. Descrição do mapa proteômico da antena e análise do genoma não anotado de <i>Rhodnius prolixus</i>	35
4.3. Seleção das OBPs.....	36
4.4. Escolha do vetor plasmidial pGEM T Easy	36
4.5. Escolha da bactéria hospedeira <i>Escherichia coli</i>	36
4.6. Desenho dos oligossacarídeos iniciadores.....	37
4.7. Extração do RNA total.....	37
4.8. Tratamento do RNA com RNase.....	38
4.9. Síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA).....	38
4.10. Amplificação do RNA de interesse por PCR	38
4.11. Análise por eletroforese em gel de agarose e purificação dos produtos de PCR.....	39

4.12.	Clonagem dos fragmentos de cDNA	40
4.12.1.	Ligação no vetor pGEM T Easy	40
4.12.2.	Transformação de células competentes de E. Coli	40
4.12.2.1.	Obtenção de células cálcio-competentes.....	40
4.12.2.2.	Transformação das bactérias competentes	41
4.13.	Seleção dos clones recombinantes por PCR de colônia.....	42
4.14.	Extração do DNA plasmidial.....	42
4.15.	Sequenciamento	43
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1.	Descrição do mapa proteômico da antena e identificação de OBPs no genoma não anotado de <i>Rhodnius prolixus</i>	43
5.2.	Seleção das OBPs.....	44
5.3.	Desenho dos <i>primers</i>	47
5.4.	Análise da extração de RNA total.....	49
5.5.	Análise da síntese de cDNA por PCR em gel de agarose	49
5.6.	Análise por eletroforese em gel de agarose e purificação dos produtos de PCR.....	49
5.7.	Análise do PCR de colônia.....	51
5.8.	Análise dos clones da OBP Rp-11280	53
6.	CONCLUSÕES	56
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	57
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma infecção crônica e debilitante, frequentemente fatal, que afeta atualmente milhões de pessoas na América Latina. Causado pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, o mal de Chagas é transmitido principalmente por insetos da subfamília Triatominae, conhecidos popularmente como barbeiros.

O *Rhodnius prolixus* é um inseto conhecido por ser o segundo maior transmissor da doença de Chagas, funcionando como hospedeiro intermediário de tripanossomatídeos. Este inseto é considerado um vetor importante em regiões como a América Central e alguns países da América do Sul, sendo apontado como principal vetor da doença em países como Venezuela e Colômbia. Embora tenha importância secundária como vetor no Brasil, visto que *Triatoma infestans* e *Triatoma brasiliensis* são apontados como os principais veiculadores da doença no país, o *R. prolixus* tornou-se um inseto modelo para o estudo de fisiologia e de bioquímica de insetos graças ao seu uso pelo Dr. Vincent Wigglesworth nos anos 1940 e subsequentes.

Como não há vacina para a doença de Chagas, atualmente o controle populacional dos barbeiros é a melhor forma de prevenir a doença, através de medidas que tornem menos propício o convívio deste com os seres humanos, como a construção de melhores habitações, pois este inseto vive nas frestas das casas de pau-a-pique, além de não permitir a construção de casas ou abrigos de animais domésticos próximos a ninhos de pássaros, tocas de animais, casca de troncos e sob pedras.

O controle das populações de triatomíneos em zonas endêmicas é feito utilizando o inseticida DDT, entretanto, este inseticida possui propriedades altamente tóxicas. Neste sentido, nos últimos anos a Organização Mundial de Saúde tem incentivado pesquisas científicas que desenvolvam metodologias que não agridam o meio ambiente e a saúde humana no controle de insetos vetores.

O sucesso reprodutivo e, por conseguinte, a longevidade de um inseto se resume a uma interpretação correta das moléculas químicas presentes no meio ambiente. O inseto percebe o ambiente ao seu redor através da olfação, modalidade sensorial responsável pela transdução do sinal olfativo. Os insetos captam odores (moléculas químicas) por meio de células sensoriais localizadas principalmente em suas antenas e essa captação é usada para procurar

comida, localizar lugares para oviposição e propiciar o encontro do parceiro sexual para reprodução. As proteínas ligadoras de odor ou de feromônio (OBPs/PBPs) são pequenas proteínas solúveis que, junto com outras proteínas, participam de forma coordenada na apresentação de moléculas de odor ao receptor olfativo na membrana dos neurônios olfativos presentes nas antenas do inseto. A ligação odor-receptor gera um comportamento que irá depender da interpretação das moléculas químicas presentes no meio ambiente.

Neste âmbito, o estudo de proteínas envolvidas no processo de olfação pode servir de base para o desenvolvimento de formas de controle populacional de insetos que não sejam tóxicas para o meio ambiente, assim como para outras espécies. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de expressão heteróloga de proteínas ligadoras de odor de *R. prolixus*, visando apresentar resultados que sejam úteis para estudos posteriores que tenham como objetivo avaliar mais profundamente a participação dessas proteínas na ligação ao odor, assim como caracterizá-las por diferentes métodos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Dentro da proposta de investigar abordagens alternativas para o desenvolvimento de novas formas de controle do vetor da doença de Chagas, o presente trabalho propôs estabelecer a primeira etapa no desenvolvimento de um protocolo para expressão heteróloga de proteínas ligadoras de odor da antena de *R. prolixus*, com o objetivo de avaliar a ação dessas proteínas, assim como caracterizá-las por diferentes métodos.

2.2. Objetivos Específicos

- Extrair o RNA total de antenas de *R. prolixus*;
- Sintetizar cDNA de antena de *R. prolixus* a partir do RNA total;
- Desenhar oligonucleotídeos iniciadores específicos para as OBPs estudadas;
- Amplificar a região codificante dos genes das OBPs utilizando amostras de cDNA de antena de *R. prolixus*;
- Analisar e purificar os produtos de amplificação;
- Escolher vetor de clonagem e célula hospedeira apropriados;

- Clonar da região codificante do gene de OBPs em vetor de clonagem;
- Sequenciar os clones selecionados contendo a região codificante do gene de OBPs;
- Analisar a sequência obtida através de bioinformática e comparar com a prevista no transcriptoma.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A doença de Chagas

A doença de Chagas, descrita pela primeira vez pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1909, ainda é considerada um desafio na área de epidemiologia mais de cem anos após sua descoberta. É estimado que na América Latina, onde a doença é endêmica, cerca de 14 milhões de pessoas estejam infectadas e outras 90 milhões estejam expostas à infecção (WHO, 2013) (**Figura 1**).



Figura 1 – Zonas endêmicas da doença de Chagas.

Fonte: Wikipedia, the free encyclopedia.

Também conhecida como tripanossomíase americana, a doença de Chagas consiste em uma condição clínica associada com infecção parasitária causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, principalmente transmitido por insetos da subfamília Triatominae conhecidos como barbeiros. Embora menos frequente, a infecção também pode ocorrer via transfusão sanguínea, transmissão vertical ou doação de órgãos.

Em seu início, a doença de Chagas pode ser assintomática. Nos primeiros dias após a picada, em geral de 4 a 10 dias, podendo variar até a algumas semanas, a pessoa pode apresentar um quadro de febre, mal-estar, falta de apetite, uma leve inflamação no local da picada, infartamento de gânglios, aumento do baço e do fígado e distúrbios cardíacos. Os sinais mais característicos da fase aguda são o chagoma de inoculação (inchaço na região da picada, **Figura 2(a)**) e o sinal de Romaña (**Figura 2(b)**), inchaço das pálpebras, que ficam quase totalmente fechadas. Nesta fase da doença, o tratamento ainda é possível, mas em geral a mesma passa despercebida e a pessoa não sente mais do que o leve incômodo da picada. A doença só vai se manifestar mesmo muitos anos depois, na fase crônica, quando o coração já está gravemente comprometido (**Figura 2(c)**). Os tripanossomas multiplicam-se no eixo maior do músculo, formando uma grande massa, lesionando o miocárdio e, menos intensamente, também o pericárdio, o endocárdio e as arteríolas coronárias. O indivíduo infectado pode apresentar diversas manifestações clínicas, como falta de ar, tonturas, taquicardia, braquicardia e inchaço nas pernas. Além disso, o parasito também pode causar lesões no fígado e nos sistemas nervoso e linfático. Nessa fase, já não é mais possível tratar a doença e não há ainda soro ou vacina contra a mesma.

O impacto econômico causado pela doença é grande, além do custo social altíssimo. Um grande número de pessoas em idade produtiva morre prematuramente. O custo de pacientes crônicos também atinge cifras alarmantes. Não existe tratamento efetivo para a doença, as drogas disponíveis apenas matam os parasitos extracelulares. É importante ressaltar que os danos causados pelo parasito são irreversíveis, deixando sequelas que muitas vezes impossibilitam o homem de exercer suas funções.

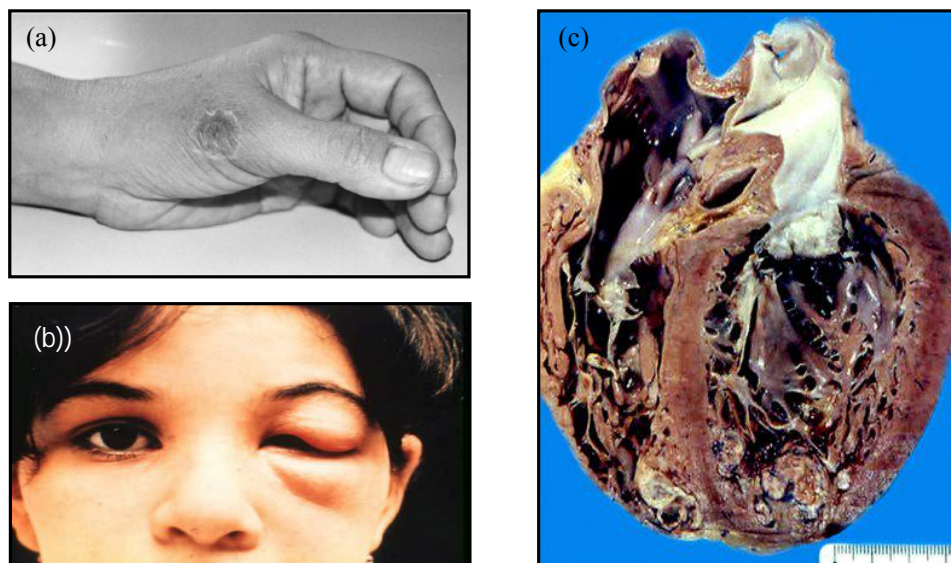


Figura 2 – (a) Chagoma na superfície dorsal da mão esquerda de uma paciente de 42 anos, 21 dias após contaminação acidental; (b) Complexo oftalmoganglionar (“Sinal de Romã”); (c) Corte sagital de coração de paciente chagásico que faleceu com insuficiência cardíaca congestiva, mostrando dilatação das cavidades ventriculares, afilamento da ponta do ventrículo esquerdo e do ventrículo direito, com trombose. **Fontes:** (a) KINOSHITA-YANAGA, A. T. *et al.*, 2009; (b) ROSSI, M. A. *et al.*, 2003; (c) HIGUCHI, 2007.

3.2. Mecanismos de Transmissão

Os mecanismos de transmissão da doença de Chagas podem ser divididos em dois grandes grupos: os mecanismos principais e os secundários. Entre os mecanismos principais estão aqueles ligados diretamente ao vetor, à transfusão de sangue, à via congênita e, mais recentemente, os que ocorrem via oral, pela ingestão de alimentos contaminados. Os mecanismos secundários e menos comuns envolvem acidentes de laboratório, manejo de animais infectados, transplante de órgãos, através do leite materno e, hipoteticamente, por contaminação proposital criminosa de alimentos com o parasita. Uma via teoricamente possível, mas extremamente rara, é a transmissão sexual, podendo ocorrer também pelo contato com espermatozoides ou fluido menstrual contaminado com *T. cruzi*.

Atualmente, a transmissão por transfusão de sangue pode ocorrer em 20% dos casos em lugares onde não existe controle sobre bancos de sangue, como na Bolívia. Já a transmissão através de vetores ainda pode chegar a ser responsável por 70% dos casos em países onde não há programas de controle.

Os barbeiros geralmente saem de seus esconderijos à noite e se alimentam enquanto as pessoas estão dormindo. A picada é pouco dolorosa e provoca uma leve ardência ou coceira no local afetado. O parasita responsável pela infecção pode entrar no corpo de mamíferos através de membranas mucosas ou cortes na pele. Quando a pessoa se coça, o protozoário eliminado nas fezes do inseto, que defeca após se alimentar, acaba por ser introduzido no organismo humano através de pequenos arranhões ou sendo inoculado dentro da ferida da picada. Além disso, animais e humanos também podem ser infectados por ingestão do próprio inseto ou de alimentos contaminados com as fezes do inseto que não foram cozidos.

3.3. Ciclos do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros

O *T. cruzi* é um parasita obrigatoriamente intracelular, sendo destruído após algumas horas de exposição direta à luz solar ou outros ambientes severos. Ele é vulnerável a vários desinfetantes, incluindo hipoclorito de sódio, etanol, soluções de iodeto/álcool, glutaraldeído e formaldeído, e pode ser inativado por calor úmido (121°C por um período mínimo de 15 minutos) ou por calor seco (170°C por, no mínimo, uma hora). Esse parasita, após entrar na corrente circulatória, somente terá viabilidade se conseguir invadir uma célula. No entanto, após alguns ciclos intracelulares, eles eventualmente caem na circulação e acabam infectando o miocárdio e células ganglionares do sistema nervoso autônomo que inerva os plexos de Meissner e Auerbach nas paredes do esôfago e do intestino. O resultado é uma miocardite crônica com destruição de miócitos e dos plexos de condução elétrica do coração ou megaesôfago ou megacólon ou ambos.

Quando eliminado pelas fezes do barbeiro, o *T. cruzi* encontra-se na forma não replicativa e infectante chamada tripomastigota metacíclica, que consiste em uma célula alongada com um flagelo que facilita o movimento. Após a entrada no organismo do hospedeiro vertebrado, ocorre a infecção de células próximas ao local da picada e, dentro da célula, os tripomastigotas assumem uma forma ovoide e sem flagelo, amastigota, que se multiplica rapidamente. O grande número de parasitos provoca o rompimento celular e os tripanossomídeos entram na corrente sanguínea e no sistema linfático, reassumindo a forma flagelada e espalhando-se pelo organismo, infectando mais células em novos ciclos (BELLINI *et al.*, 2011).

Nos hospedeiros invertebrados, o ciclo (**Figura 3**) começa com a ingestão dos tripomastigotas pela sucção de sangue contaminado. Após isto, o tripomastigota passa para a forma esferomastigota, arredondada com o flagelo circundando o corpo, no estômago. Este, então, passa para a forma epimastigota, recorrente em insetos, no intestino, onde se multiplica por divisão binária. Finalmente, no reto, se transforma no tripomastigota metacíclico que é eliminado pelas fezes.

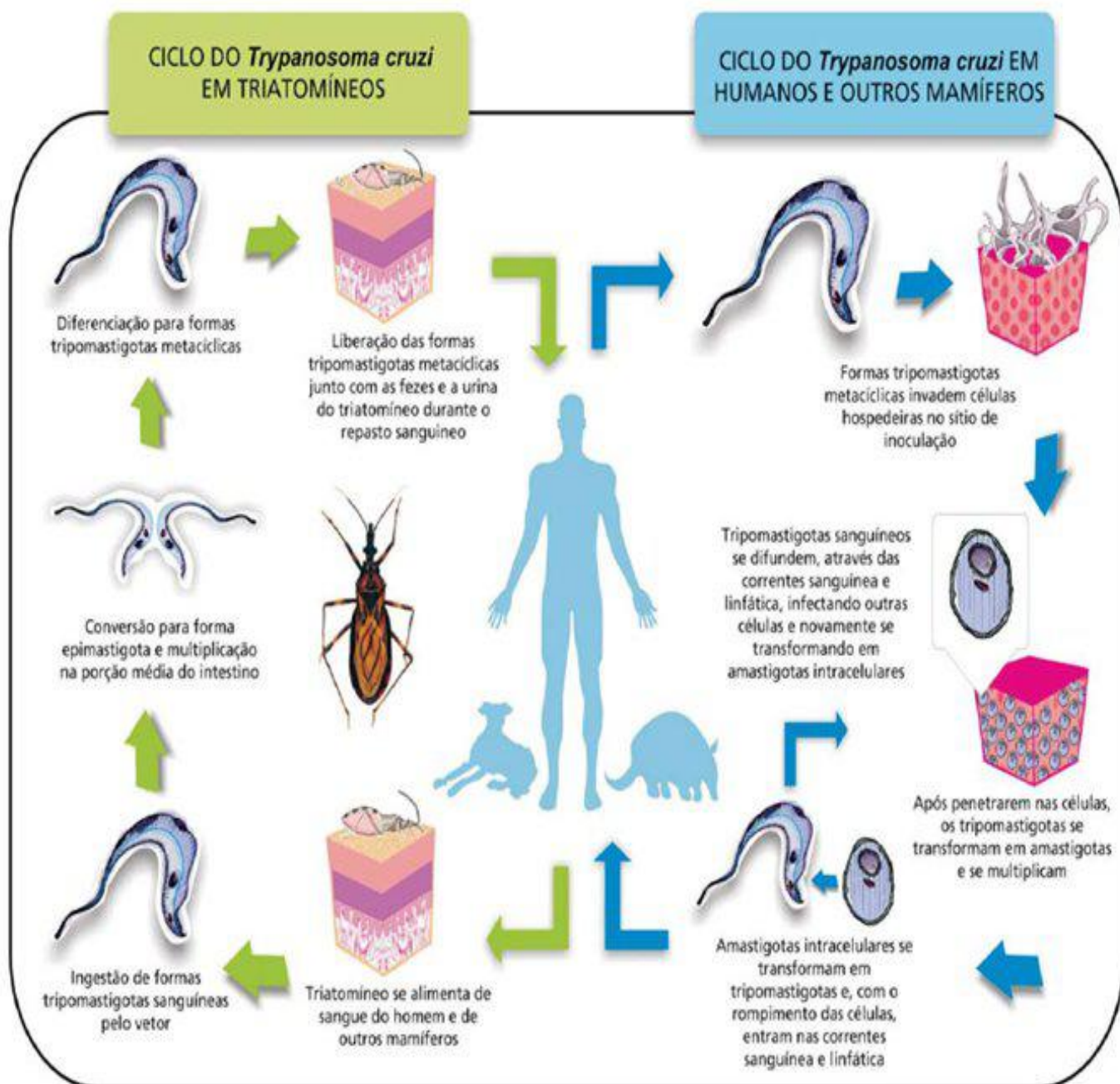


Figura 3 – Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* (simplificado). **Fonte:** Doença de Chagas, Fiocruz (<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm>).

3.4. Ciclos da doença de chagas

O parasita geralmente mantém seu ciclo de vida alternando entre um inseto e um mamífero que viva próximo ao inseto, o que inclui animais silvestres, domésticos e humanos. Na natureza, existem três ciclos básicos de transmissão do *T. Cruzi* (**Figura 4**). No ciclo silvestre, esse protozoário circula entre animais e insetos triatomíneos que vivem na natureza. Humanos e animais domésticos podem ser infectados ocasionalmente quando eles entram em contato com esses insetos em ambientes silvestres. Em alguns casos, os insetos podem invadir casas próximas de áreas rurais, atraídos por luz, calor ou algum odor, podendo contaminar alimentos, além de também ser possível que eles sejam transportados acidentalmente para dentro das casas. No ciclo doméstico de transmissão, os insetos vetores acabam por colonizar "casas de pau-a-pique", resultando na transmissão entre humanos e insetos. Espécies importantes no ciclo doméstico incluem o *Triatoma infestans*, *T. dimidiata* e o *R. prolixus*. Transmissões entre insetos e animais domésticos formam o ciclo peridoméstico e também oferecem risco de contaminação de humanos.

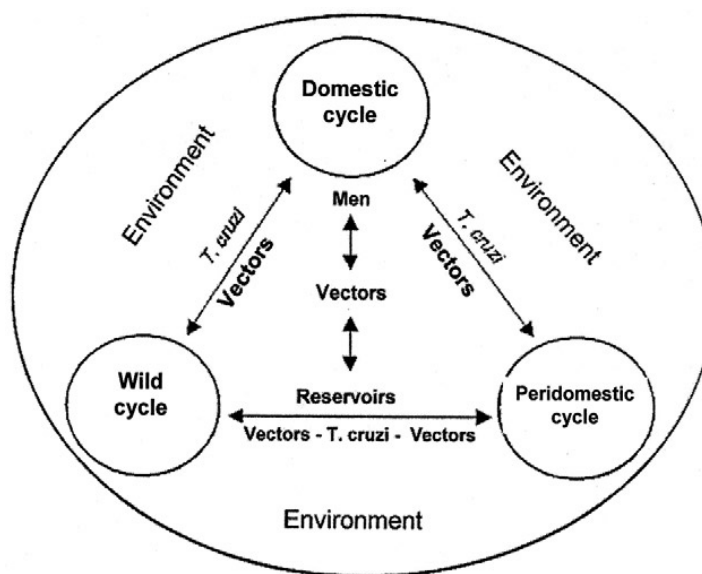


Figura 4 – Intercâmbio entre os ciclos doméstico, peridoméstico e silvestre. Fonte: COURA, 2009.

O ciclo silvestre da doença de Chagas existe na natureza há milhões de anos e, embora seja responsável por alguns casos de infecção, estas são acidentais, não apresentando perigo real para humanos. Embora os triatomíneos sejam conhecidos desde o século XVI, sua adaptação a habitações humanas começou com o desenvolvimento da agricultura e foi

intensificada pelo crescimento das atividades pecuárias, através do desmatamento e remoção de animais silvestres que eram fonte de alimento para esses insetos. Para sobreviver, eles gradualmente se adaptaram a áreas próximas de habitações humanas ou até mesmo em seu interior.

Quando triatomíneos silvestres se adaptam a locais perto ou dentro de habitações humanas e a infecção começa a se alternar entre animais domésticos e humanos, como é no caso das zonas endêmicas clássicas, a situação é classificada como uma zoonose. A doença de Chagas pode ser classificada como uma antropozoonose, o que significa que ela é transmitida de humanos para animais domésticos e destes para animais silvestres. Dessa forma, a doença evoluiu de uma infecção enzoótica, recorrente apenas entre animais silvestres, para uma antropozoonose, a partir do momento em que humanos invadiram ambientes silvestres e foram infectados, entrando no ciclo de transmissão (AGUILAR *et al.*, 2007; COURA *et al.*, 2007; COURA 2008).

3.5. Controle do Vetor

Apesar dos recursos gastos em pesquisa e controle, a presença de triatomíneos vetores em casas da maioria das áreas endêmicas ainda pode ser observada e o risco de transmissão dentro da população humana ainda permanece. A luta contra algumas espécies vetores mais importantes, como o *T. infestans*, tem sido incansável, o que praticamente levou à sua erradicação em grandes áreas dos países do Cone Sul. Entretanto, na maioria dos casos, espécies de vetores anteriormente considerados secundários ocuparam o seu lugar mantendo a população em risco.

Atualmente não existe vacina para a doença de Chagas, nem a perspectiva de um processo de imunização em larga escala num futuro próximo. Quanto ao tratamento, também não existem drogas curativas. Os mesmos remédios estão em uso há mais de 30 anos, sendo sua prescrição limitada, pois somente alcançam a cura nos casos agudos e ainda assim produzem vários efeitos colaterais indesejáveis. Sendo assim, o controle vetorial ainda é a ferramenta mais importante para evitar a transmissão e disseminação da doença.

Muitos tipos de agentes controladores de insetos foram investigados, mas os resultados nem sempre deram uma indicação clara de que eles poderiam ser utilizados nas campanhas de controle. Como exemplo, podem ser mencionados os análogos do hormônio juvenil, a maioria

sintetizada no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (NPPN-UFRJ), que causam graves alterações no ciclo de vida, induzindo o aparecimento de adultóides juvenilizados estéreis, mas isto não previne a transmissão do *T. cruzi* pelos insetos da geração que recebeu o tratamento. Uma vantagem é a de que esse método é extremamente seguro para mamíferos, enquanto as desvantagens são representadas pelo fato de agirem somente em partes do ciclo de vida, geralmente serem compostos quimicamente instáveis e de ação lenta (PINCHIN, 1978; OLIVEIRA FILHO, 1980; JURBERG, 1982). O controle biológico através do uso de insetos que parasitam ovos de triatomíneos também já provou ser ineficiente em condições de campo. Patógenos de insetos sofrem grandes limitações no seu uso devido às condições ambientais necessárias para sua sobrevivência e propagação (BARRET, 1975). Construção ou renovação de moradias, tais como revestimento de paredes e substituição de tetos de palha por telhas são, até certo ponto, eficazes. Porém, se não houver simultaneamente uma melhoria das condições socioeconômicas da população, estas medidas não terão resultado duradouro. Isto acontece porque os moradores logo começam a adicionar novos cômodos ou abrigos de animais, construídos de maneira precária, resultando em frestas nas paredes e tetos que logo são colonizadas pelos vetores presentes nas redondezas. Para ser eficaz e persistente, o melhoramento das moradias deve ser preferencialmente feito pelos próprios moradores, através da melhoria das condições de vida. Educação para a saúde também deve surgir como resultado do desejo de participação de uma comunidade em esquemas de vigilância buscando evitar o ressurgimento das infestações. No momento, as áreas infestadas são geralmente muito pobres e tudo indica que estas modificações ainda vão levar bastante tempo.

Considerando as informações apresentadas, torna-se fácil perceber que a única ferramenta de uso prático que as autoridades de saúde têm à disposição para reduzir a transmissão nas áreas afetadas é o uso de inseticidas. Eles fornecem uma rápida resposta na redução da população de barbeiros e, conseqüentemente, na redução da transmissão, constituindo um método razoavelmente barato e de fácil execução quando comparado aos demais mencionados.

Em relação aos estudos pioneiros que utilizavam clorados (*BHC*, *Dieldrin*, *Lindhane*) ou fosforados (*Malathion*), diversos avanços ocorreram: atualmente, o combate químico do vetor é feito através de piretróides sintéticos. Esses produtos químicos possuem efeito residual de 3 a 9 meses em ambientes domésticos e são bastante eficientes contra diversos artrópodes nocivos. Em geral, os piretróides não encontram resistência dos triatomíneos, entretanto, nos

últimos anos um laboratório de monitoramento e controle vetorial em Buenos Aires tem detectado populações focais de *T. infestans* (Bolívia e Argentina) e *R. prolixus* (Venezuela) com fortes evidências de resistência aos piretróides comuns, o que está demandando cuidados extras por parte das autoridades sanitárias. Além disso, esses compostos geram efeitos indesejados como irritação da pele e mucosas, além de serem altamente tóxicos para peixes e, por isso, não podem ser descartados em locais de abastecimento de água natural, o que dificulta até mesmo a lavagem das bombas utilizadas em sua aplicação (COURA e DIAS, 2009).

A humanidade cresce a cada dia mais dependente de produtos químicos sintéticos para a sua sobrevivência. Neste contexto, os inseticidas ocupam um lugar proeminente na proteção da saúde humana, diretamente pela eliminação de vetores de doenças ou indiretamente como consequência do controle de pragas que atacam plantas, animais e seus produtos. Este assunto é frequentemente tratado de forma polêmica devido aos vários acidentes que ocorreram em diversas partes do mundo, levando muitas vezes a mudanças irreversíveis na natureza, gerando a necessidade do desenvolvimento de metodologias para controle de insetos vetores que não agridam o meio ambiente.

3.6. Triatomíneos

O estudo dos triatomíneos foi impulsionado com a descoberta da tripanossomíase americana por Carlos Chagas em 1909. Desde então, ficou evidente que uma nova e intrigante área de investigação se descortinava e que hoje se alinha com o desenvolvimento da ciência, abraçando as mais modernas técnicas e metodologias de pesquisa que agregam colaborações e parcerias no Brasil e também no exterior.

Os triatomíneos são insetos pertencentes à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Todos os membros desta subfamília são hematófagos, que é considerada uma característica recente em termos evolutivos (TARTAROTTI, AZEREDO-OLIVEIRA e CERON, 2006). Das 137 espécies de triatomíneos, 105 ocorrem nas Américas e, dos 14 gêneros, 12 são encontrados exclusivamente nessa área: *Alberprosenia*, *Belminus*, *Bolbodera*, *Cavernicola*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Microtriatoma*, *Panstrongylus*, *Parabelmintos*, *Paratriatoma*, *Psammolestes* e *Rhodnius*.

Os insetos adultos, machos e fêmeas, se acasalam. A fêmea, após se alimentar de sangue, põe seus ovos que irão eclodir, nascendo assim as ninfas de primeiro estágio. Aos poucos dias de nascidas, essas ninfas se alimentam de sangue e passam pelo processo de "muda" ou "ecdise", atingindo o estágio seguinte. E assim fazem por mais quatro vezes, quando atingem o estágio adulto. Machos e fêmeas podem ser diferenciados através da presença do ovopositor nas fêmeas, estrutura pela qual saem os ovos.

3.7. *Rhodnius prolixus*

O *R. prolixus* não tem hospedeiro preferencial, alimentando-se em qualquer vertebrado de sangue quente, e é apontado como principal vetor da doença de Chagas no norte da América do Sul e América Central.

Esse inseto é um hemimetábolo, apresentando metamorfose incompleta, passando por cinco estágios de ninfa até atingir a fase adulta, quando apresenta um par de asas e está pronto para a reprodução (**Figura 5**).



Figura 5 – Fases do ciclo de desenvolvimento de *R. prolixus*. Ovo; ninfas de 1ª a 5ª estágio e adultos. **Fonte:** Foto cedida por Roberto Eizemberg.

Por ser um hematófago restrito, é necessário que haja um repasto de sangue para a mudança de um estágio de ninfa para outro, ou de ninfa para adulto. O *R. prolixus* pode ingerir até 10 vezes o seu peso em sangue (OLIVEIRA *et al.*, 1995). A qualidade e a

quantidade de sangue ingerido interferem diretamente no desenvolvimento e na produção de ovos pelas fêmeas de *R. prolixus*. Após a alimentação, estes insetos podem permanecer por um longo período em jejum, podendo chegar a várias semanas. Em média, 3 dias após a alimentação os ovários das fêmeas *R. prolixus* já se encontram repletos de ovócitos, e por volta do 5º dia inicia-se a postura. A embriogênese tem duração de 15 dias, período após o qual eclode a ninfa de 1º estágio. Adultos, machos e fêmeas, alimentam-se de sangue e, a partir daí, os ciclos alimentares sincronizam os ciclos reprodutivos das fêmeas.

3.8. Comportamento e olfação de insetos

Os insetos, como os outros animais, necessitam perceber e interpretar as informações do meio ambiente obtidas por meio dos órgãos sensoriais. Os triatomíneos, como todos os animais com capacidade de se movimentar, possuem um repertório de comportamento variado, que está relacionado com a obtenção de recursos importantes para a sua vida, tais como: alimento, abrigo, parceiro sexual e até proteção contra predadores. De acordo com o site “Doença de Chagas”, da Fundação Oswaldo Cruz (www.fiocruz.br/chagas), existem numerosos trabalhos, publicados por pesquisadores de diversos países, que têm analisado alguns aspectos do comportamento desses insetos, principalmente de *T. infestans* e *R. prolixus*, que são os dois principais transmissores da doença de Chagas. Entretanto, para o restante das mais de 130 espécies que também podem transmitir a doença, muito pouco tem sido estudado.

A procura de alimento é uma parte central do comportamento do animal, já que a falta desse recurso afeta seriamente a sua capacidade de reprodução e, em casos extremos, a sua própria sobrevivência. Os triatomíneos são insetos hematófagos, isto é, se alimentam de sangue. Estes insetos procuram obter seu alimento preferencialmente de animais de sangue quente, como mamíferos e aves, mas eventualmente podem se alimentar de sangue de répteis e anfíbios e, ainda, de hemolinfa de insetos (fluido presente em invertebrados com funções semelhantes as do sangue). Além disso, as fêmeas de triatomíneos precisam se alimentar de sangue, fonte de proteínas e demais nutrientes, para que possam produzir ovos (NÚÑEZ, 1982). Os estágios imaturos precisam dele para poder se desenvolver. Para encontrar os animais que atuam como fontes de sangue, que são chamados de hospedeiros, os triatomíneos procuram “pistas” da sua presença no ambiente, tais como o calor, o CO₂, os odores e a umidade que seus corpos emitem e, talvez, outras pistas ainda desconhecidas pela ciência

(BARROZO & LAZZARI, 2004). Alguns destes sinais, como, por exemplo, certos odores, podem atraí-los a vários metros de distância. Outros, como o calor, somente serão percebidos se os triatomíneos estiverem próximos ao hospedeiro. É possível que os adultos, que possuem asas e são capazes de voar, possam se orientar a distâncias bem maiores mediante o uso de odores do hospedeiro transportados por correntes de ar (MANRIQUE *et al.*, 2006).

Quando os triatomíneos chegam ao estágio adulto, outro fator além da alimentação se torna prioritário. Nesta fase da vida, a maioria dos animais mostra uma série de comportamentos inatos, instintivos, que levarão a buscarem o acasalamento. Isto é fundamental para que eles possam deixar descendência, objetivo único da reprodução sexual. O comportamento sexual dos machos e fêmeas de triatomíneos difere significativamente. Os machos mostram um comportamento ativo através do qual tentam copular “saltando” em cima de outros insetos da espécie que passam na sua frente. Enquanto isso, as fêmeas não demonstram nenhum comportamento específico de procura. No entanto, elas são capazes de aceitar ou rejeitar a tentativa do macho que, em muitos casos, poderá simplesmente ir embora sem conseguir o seu objetivo (MANRIQUE & LAZZARI, 1995). Ainda não se sabe ao certo o que faz o macho ser aceito ou rejeitado, mas é provável que as fêmeas avaliem informações químicas relacionadas com a qualidade dos machos e, portanto, possam estimar quão bons serão os descendentes que o casal irá produzir. Nesta interação, os insetos parecem usar odores para se encontrar e reconhecer se o parceiro é da mesma espécie, mas esse é um aspecto muito pouco conhecido (MANRIQUE & LAZZARI, 1995).

O sistema nervoso central recebe informações do sistema sensorial e as utiliza para gerar uma representação cerebral do mundo exterior. Dentre os sentidos, a olfação é provavelmente o de maior importância nos insetos. O sistema olfativo é um sistema sensorial que possui uma notável capacidade de captar e interpretar uma ampla variedade de moléculas de odor, que são emanados por diferentes fontes ambientais. Moléculas de odor de todas as formas e tamanhos são detectadas pelo sistema olfativo (WICHER *et al.*, 2008).

É visível a importância do olfato nos insetos, estes apresentam estruturas complexas como as antenas, com funções equivalentes ao do nariz humano. As antenas são órgãos dedicados, fundamentalmente, à detecção de estímulos olfativos, mecânicos, térmicos ou hídricos. Além das antenas, os insetos podem detectar odores mediante sensilas presentes nos palpos maxilares ou labiais (SCHNEIDER, 1964; HANSSON & STENSMYR, 2011).

Nesse contexto, as proteínas ligadoras de odor, (OBP, do inglês *odorant binding protein*) desempenham um importante papel na percepção do ambiente pelos insetos. Estas são responsáveis pelo transporte de pequenas moléculas hidrofóbicas, como moléculas de odor, pela linfa sensilar até os receptores olfativos embebidos nas membranas dos neurônios sensoriais olfativos. As OBPs são pequenas proteínas solúveis de 13-17 kDa, contendo de 120 a 150 aminoácidos. Estas proteínas são expressas com um peptídeo sinal que é removido durante o processamento e não é mais encontrado na proteína madura. Em sua maioria, as OBPs possuem em sua estrutura primária seis resíduos de cisteína em um padrão assimétrico que as caracteriza estruturalmente (BRIAND *et al.*, 2001; LEAL *et al.*, 1999). Recentemente, verificou-se que as cisteínas formam pontes dissulfeto que estabilizam a estrutura tridimensional destas proteínas garantindo, em parte, sua função (BRIAND *et al.*, 2001; LEAL *et al.*, 1999). As OBPs não são exclusivas das antenas, estão presentes em outras regiões do corpo do inseto e funcionam no transporte de moléculas (LEAL, NIKONOVA e PENG, 1999; BRIAND *et al.*, 2001; FANG *et al.*, 2011).

A descoberta da função das OBPs no transporte de moléculas químicas nas antenas de insetos foi descrita pela primeira vez nas antenas de machos de *Antheraea polyphemus* (uma borboleta) no início dos anos 80 (VOGT & RIDDIFORD, 1981). Ainda na década de 80, foi demonstrado que moléculas de feromônio na presença desta proteína eram facilmente solubilizadas. Assim, foi sugerido que ocorreria uma ligação entre a molécula de feromônio e a proteína purificada da antena de *A. polyphemus*. Esta OBP, por se ligar a feromônio, foi denominada de proteína ligadora de feromônio (PBP, do inglês *pheromone binding protein*) uma variação do nome proteína ligadora de odor (KANAUJIA e KAISLING, 1985).

Em 1998, foi evidenciada a participação de OBPs na apresentação de odores a partir de mutantes de *D. melanogaster* (KIM *et al.*, 1998). Neste estudo, os autores observaram que moscas mutantes para o gene OBP-lush não conseguiam responder ao etanol. Três anos antes, já havia sido demonstrado que a resposta eletrofisiológica de células gustativas era totalmente bloqueada na presença de anticorpo anti-OBP em *Phormia regina* (OZAKI *et al.*, 1995). Estes resultados reforçaram, mais uma vez, que as OBPs estariam envolvidas no fenômeno de apresentação do estímulo odorífero aos receptores olfativos nos neurônios. Estes resultados fortaleceram a hipótese que a participação de OBPs era essencial para a resposta correta de estímulos olfativos e gustativos nos insetos.

Sendo assim, as proteínas ligadoras de odor constituem uma classe de moléculas de interesse para pesquisas que buscam métodos alternativos para controle vetorial. O estudo de proteínas envolvidas no processo de olfação pode servir de base para o desenvolvimento de formas de controle populacional de insetos através da interferência na interpretação correta do meio ambiente, que não seriam tóxicas para o meio ambiente e para outras espécies.

3.9. Técnicas em biologia molecular

3.9.1. Reação em cadeia da polimerase

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) foi desenvolvida e nomeada por Kary Mullis e colaboradores da Cetus Corporation, em 1985. Rapidamente, esta técnica tornou-se um procedimento de rotina em todos os laboratórios de biologia molecular para a identificação e manipulação de material genético, de clonagem, sequenciamento, mutagênese, diagnóstico e análises genéticas (MULLIS, 1990).

A reação de PCR é uma das mais importantes técnicas da biologia molecular, a qual permite a amplificação *in vitro* de moléculas de DNA ou cDNA de forma extremamente rápida. Os reagentes principais são a molécula de DNA molde, oligonucleotídeos iniciadores ou *primers*, desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTP), DNA polimerase, íon magnésio (Mg^{2+}) cofator da enzima e tampão de reação. Este é um processo que ocorre em três passos: desnaturação, anelamento e extensão, que em conjunto designam um ciclo da PCR e que se repetem em um número específico de vezes (UHLMAN *et al.*, 1998).

A amplificação por PCR requer uma quantidade muito pequena de DNA. Este DNA molde é desnaturado e a solução contendo os *primers* é adicionada a ele e, pelo pareamento específico (A-T/C-G) por ligações de hidrogênio, estes *primers* anelam-se às sequências de DNA que lhe são complementares. Na presença de uma DNA polimerase termoestável e de precursores de DNA (os quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatados: dATP, dCTP, dGTP e dTTP), sob condições ideais de pH, salinidade e o cofator da enzima (íons magnésio bivalentes Mg^{2+}), a síntese de novas fitas de DNA se inicia, as quais serão complementares a cada uma das fitas do DNA molde. O volume total da reação pode variar dependendo do objetivo a ser atingido. Em geral, é realizada em volumes de 10 a 50 μ L.

Os ciclos repetitivos de 3 etapas da reação de PCR são realizados em termocicladores, equipamentos que automaticamente controlam e alternam as temperaturas durante períodos programados de tempo para o número apropriado de ciclos de PCR. Na primeira etapa, as moléculas de DNA de fita dupla separam-se completamente (desnaturação), formando duas fitas simples que serão usadas como moldes para os *primers* e para a DNA polimerase. Normalmente, a fita de DNA é desnaturada por 1-2 min a 94 °C. As duas cadeias de DNA são mantidas unidas por ligações de hidrogênio que, por serem relativamente fracas, quebram-se a altas temperaturas, ao passo que as ligações entre as moléculas de fosfato e desoxirribose, por serem ligações covalentes mais fortes, permanecem intactas (UHLMAN *et al.*, 1998).

Na segunda etapa, a temperatura é diminuída para permitir a hibridização ou ligação dos *primers* (anelamento) às sequências complementares na molécula de DNA. A temperatura de anelamento, entre 50 a 65 °C, dependendo da temperatura média de desnaturação (T_m , do inglês *melting temperature*) dos *primers*, é a variável mais importante para determinar a especificidade da PCR, de forma que as temperaturas e os tempos de anelamento variam de acordo com a sequência a ser amplificada. *Primers* exclusivos para cada extremidade da sequência alvo são necessários para amplificar somente a sequência de interesse. O comprimento do *primer* é geralmente de 15-30 nucleotídeos (KIM *et al.*, 2002).

Na terceira etapa (extensão ou polimerização), ocorre a síntese de uma segunda fita complementar de DNA que ocorre pela adição de dNTP por uma enzima DNA polimerase na região de anelamento de cada *primer*, numa temperatura de aproximadamente 72 °C. A extensão deve ocorrer na temperatura recomendada para atividade da enzima utilizada por um período de 30 s a 5 min, dependendo do tamanho da sequência-alvo a ser amplificada.

Após esse período, a temperatura é elevada mais uma vez a aproximadamente 95 °C, para que se separem as fitas duplas de curta extensão do DNA. As fitas simples tornam-se moldes para outro ciclo de síntese de DNA. Assim, o ciclo de desnaturação, anelamento e extensão é repetido por 25 a 35 vezes, produzindo-se de 100 ng a mais de 1 µg de DNA. É aconselhável executar o número mínimo de ciclos necessários para produzir uma quantidade viável de DNA para o uso pretendido, minimizando o número de erros e obtendo-se assim o produto específico desejado (ECKERT & KUNKEL, 1991).

O resultado do PCR é geralmente analisado por eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida.

3.9.2. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose é usada como método analítico e preparativo, pois, uma vez resolvidas, isto é, separadas as moléculas de DNA, um fragmento de tamanho específico pode ser cortado do gel e purificado para posteriormente ser usado em uma gama de procedimentos utilizando técnicas de manipulação genética.

Esta técnica constitui um método simples e eficiente que permite separação, identificação e purificação de moléculas de DNA.

Em razão da presença de grupamentos fosfato, a molécula de DNA possui carga negativa em pH neutro ou alcalino. Conseqüentemente, quando aplicada a um gel e submetida a um campo elétrico, essa macromolécula migrará em direção ao anodo, ou seja, polo positivo. Sendo assim, as moléculas são separadas através da migração de partículas no gel, com a aplicação de uma diferença de potencial elétrico, onde as moléculas de menor massa migram mais rápido.

O protocolo padrão de gel de agarose permite separar fragmentos de DNA entre 0,5 a 25 kb. A eletroforese também pode ser utilizada para separar proteínas e moléculas de RNA. A agarose utilizada no gel é um polissacarídeo que forma uma rede e permite regular a velocidade da migração das moléculas durante a separação. Para a visualização das bandas e a interpretação dos resultados, são necessárias a incorporação de um agente intercalante de DNA e a utilização de marcadores de massa molecular apropriados, de maneira que migrem em paralelo às amostras de interesse.

3.9.3. Clonagem em vetor plasmidial

A origem do termo clonagem vem da genética bacteriana, que considera uma colônia de bactérias como um clone porque todos os indivíduos são geneticamente idênticos à bactéria inicial. A técnica consiste na difusão de moléculas de DNA idênticas e baseia-se na propagação natural de células ou indivíduos geneticamente idênticos ao inicial.

O experimento de clonagem gênica consiste em introduzir o gene dentro de células bacterianas e isolá-las em colônias e é composta de pelo menos dois estágios importantes. Na primeira etapa, faz-se a ligação entre um fragmento de DNA, chamado inserto, contendo o

gene de interesse, com outra molécula de DNA, o vetor, para formar uma molécula de DNA recombinante (**Figura 6**).



Figura 6 – Ligação do vetor com o inserto para formar a molécula de DNA recombinante. **Fonte:** LIMA, 2008.

Na segunda etapa, a molécula de DNA recombinante é transportada para dentro de uma célula hospedeira, em geral uma bactéria, ocorrendo o processo de transformação. A célula que recebeu o DNA recombinante é chamada de célula transformada ou transformante. Um único transformante, em condições ideais, sofre muitos ciclos de divisão celular, produzindo uma colônia que contém milhares de cópias do DNA recombinante (**Figura 7**).

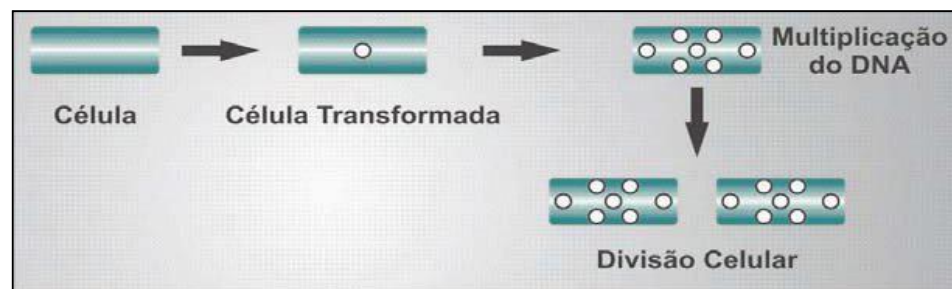


Figura 7 – Transformação de uma célula bacteriana com uma construção de DNA recombinante. **Fonte:** LIMA, 2008.

Existem diversos tipos de vetores para clonagem molecular, entre eles plasmídeos, fagos e cosmídeos. Plasmídeos são pequenas moléculas de DNA dupla fita, contendo os elementos necessários para a sua replicação e pelo menos um gene que confere resistência a antibiótico. Estes elementos genéticos extra cromossomais variam de 5 a 400 kb e comumente estão presentes em duas ou mais cópias por célula. Os plasmídeos presentes num grande número de cópias são usados como veículos de clonagem desde que capacitem a amplificação do segmento do DNA neles clonado.

Para ser um bom vetor de clonagem, um plasmídeo deve conter as seguintes propriedades:

- Possuir uma origem de replicação (O), ou seja, uma sequência de DNA que permita que o vetor seja replicado na célula hospedeira;
- Apresentar dois ou mais sítios únicos de clivagem para endonucleases de restrição. O conjunto destes sítios, denominado de Múltiplos Sítios de Clonagem (MSC), é o local onde o inserto é incorporado ao vetor de clonagem;
- Possuir um gene que codifica um produto que distingue a célula transformada da célula não transformada. Por exemplo, muitos vetores de clonagem carregam o gene que confere resistência à ampicilina (Amp^R). As células transformadas com tais vetores são capazes de crescer num meio contendo o antibiótico, enquanto que as células não transformadas acabam morrendo.

Uma vez que o DNA foi ligado ao plasmídeo, esta molécula híbrida deverá ser introduzida numa célula hospedeira, geralmente uma bactéria. A bactéria transformada será facilmente reconhecida pela aquisição de um novo fenótipo dado pelo plasmídeo, ou seja, capacidade de crescer em meios contendo antibiótico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Manutenção da colônia de *Rhodnius prolixus*

Os insetos *R. prolixus* foram obtidos a partir do insetário do Laboratório de Bioquímica de Insetos do Instituto de Bioquímica Médica (Universidade Federal do Rio de Janeiro), criados e mantidos à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ com umidade relativa entre 80 e 90 %. A alimentação sanguínea foi realizada com sangue de coelhos em intervalos regulares de 21 dias e os insetos foram criados de acordo com o protocolo de bioética N°. IBqM-001.

4.2. Descrição do mapa proteômico da antena e análise do genoma não anotado de *Rhodnius prolixus*

Esta etapa foi desenvolvida no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Vetores em um trabalho de iniciação científica da aluna Daniela Oliveira, através de uma abordagem proteômica.

A busca por OBPs no genoma não anotado de *Rhodnius* incluiu a utilização de diversas ferramentas de bioinformática como: BioEdit (HALL, 1999), Blast (ALTSCHUL e LIPMAN, 1990; ALTSCHUL et al., 1997), VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecsreen/>), Translate Tool da ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>), ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Os arquivos de sequenciamento foram obtidos no sítio TRACE ARCHIVES do NCBI.

4.3. Seleção das OBPs

Após sua identificação, as proteínas foram classificadas de acordo com a função que provavelmente desempenham no organismo do barbeiro através de comparação com proteínas de outros insetos, visto que as OBPs apresentam grau de identidade entre 60-80% entre diferentes espécies. As proteínas estudadas nesse trabalho foram selecionadas dentre as candidatas à OBPs previstas no genoma não anotado de *R. prolixus* que foram encontradas no proteoma da antena.

4.4. Escolha do vetor plasmidial p-GEM T Easy

O p-GEM T Easy (Promega) (**Figura 8**) é um vetor largamente utilizado em clonagem. O plasmídeo possui uma timina ligada a cada uma das extremidades 3', o que impede a recircularização do plasmídeo e melhora a eficiência de ligação de produtos de PCR, pois algumas polimerases termoestáveis, como a *Taq*, adicionam uma adenina nas extremidades 3' do fragmento amplificado. Esse vetor possui 3,0 kb e apresenta o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção, origem de replicação (*ori*), parte do gene *lac Z* que codifica o fragmento amino terminal da enzima β -galactosidase, sítio múltiplo de clonagem e os promotores T7 e SP6 flanqueando a região de clonagem.

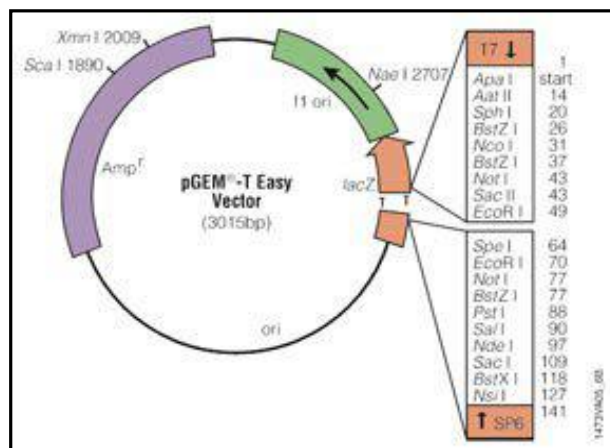


Figura 8 – Mapa e pontos de referência de sequências do vetor pGEM-T Easy. Fonte: Promega.

4.5. Escolha da bactéria hospedeira *Escherichia coli*

Dentre os vários sistemas de clonagem disponíveis para produção de proteínas heterólogas, a bactéria Gram-negativa *E. Coli* é um dos mais utilizados e atrativos. Este fato se deve à sua capacidade de crescer rapidamente, com altas concentrações celulares e em substratos baratos, além de sua genética ser bem conhecida e haver disponibilidade de muitos vetores de clonagem e cepas mutantes (BANEYX, 1999).

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram as cepas de *E. Coli* One Shot® TOP10 (Invitrogen Life Sciences), já adquirida na forma quimicamente competente, e DH5 α (Invitrogen Life Sciences), tornada cálcio competente no laboratório.

4.6. Desenho dos oligossacarídeos iniciadores

Os oligossacarídeos iniciadores (*primers*) foram desenhados com base nas sequências das OBPs escolhidas encontradas no transcriptoma de *R. prolixus*, após a retirada da sequência correspondente ao peptídeo sinal. Foram inseridos sítios de restrição nas regiões terminais da sequência, além de 6-7 nucleotídeos adicionais necessários para que a clivagem por enzimas de restrição seja mais eficiente. Para realizar esta etapa, fez-se necessária a utilização das seguintes ferramentas de bioinformática: SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>), NEB Cutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) e Oligo Analyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>).

4.7. Extração do RNA Total

O RNA total utilizado para síntese de cDNA foi purificado a partir de 50 pares de antenas de adultos e ninfas de 5º estágio de *R. prolixus*. A extração foi feita por homogeneização em 500 µL de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, EUA) em tubos de polipropileno autoclavados. A cada amostra homogeneizada, foram adicionados 100 µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) seguido por agitação em vórtex por 20 s e incubação a temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 min a 4 °C. Ao final foram coletados aproximadamente 300 µL da fase aquosa do sobrenadante e transferidos para um novo tubo, onde foram adicionados 250 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich). O tubo foi invertido 5 vezes (leve agitação) e incubado em temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, o tubo foi centrifugado a 12000 x g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado foram adicionados 500 µL de etanol 75 % gelado e realizou-se nova centrifugação a 12000 x g por 5 min a 4 °C, descartando o sobrenadante. O precipitado (RNA) foi deixado para secar a temperatura ambiente por 30 min e reconstituído em 25 µL de água tratada com dietilpirocarbonato 0,01% (DEPEC). Finalmente, o RNA foi quantificado por espectrometria a 260 nm e sua integridade avaliada por eletroforese em gel de agarose 1 %.

4.8. Tratamento do RNA com DNase

Com o objetivo de remover possíveis contaminações com DNA genômico, o RNA total extraído foi tratado com a enzima DNase I livre de RNase (Fermentas Life Sciences, Portugal). Foram adicionados a reação 1µg de RNA, 1 µL de tampão da DNase I (10 x), 1 µL da enzima DNase I e H₂O DEPEC suficiente para completar o volume final até 10 µL. As reações foram incubadas a 37 °C por 30 min. Após este período, a enzima foi inativada pela adição de 1 µL de EDTA 25 mM, com incubação a 65 °C por 10 min. As amostras foram estocadas a -80 °C até sua utilização.

4.9. Síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA)

A primeira fita de cDNA foi sintetizada através do kit Revert Aid™ H minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas Life Sciences). Ao tubo contendo 1µg de RNA tratado com DNase I foi adicionado 1µL de random primer. A mistura foi homogeneizada gentilmente e incubada a 65 °C por 5 min. Adicionou-se, em seguida, 4 µL de tampão de reação (5 x), 1 µL

de inibidor de RNase, 2 μL de dNTP (10 mM) e 1 μL da enzima transcriptase reversa. A reação de síntese foi incubada a 25 °C por 5 min, seguida por 1 h a 42 °C e finalizada a 70 °C por 5 min. As amostras foram estocadas a -20 °C até sua utilização.

4.10. Amplificação do RNA de interesse por PCR

As reações em cadeia da polimerase foram realizadas através o kit GoTaq®Green Master Mix (Promega), utilizando as amostras de cDNA descritas anteriormente como molde. Para uma reação de volume total igual a 10 μL , foram adicionados 2 μL da solução tampão fornecida pelo kit (concentrada 5 vezes), 0,2 μL de dNTP (10 mM), 0,25 μL da enzima taq polimerase, 0,4 μL de cada um dos iniciadores senso e anti-senso (10 μM) desenhados especificamente para cada OBP, como descrito, e 6,75 μL de água milli-Q autoclavada, para completar o volume.

Como gene de referência, para verificar a integridade do cDNA, foi utilizado o gene da proteína ribossomal R18S com os seguintes iniciadores: RproR18S F1 (senso) – 5'-TCGGCCAACAAAAGTACACA-3' e RproR18S R1 (anti-senso) – 5'-TGTCGGGTGTAAGTGGCATGT-3', que codificam um fragmento de 104 bp.

As condições para as reações de PCR estão descritas a seguir, com 25 ciclos para PCR constitutivo e 35 ciclos para outras reações.

Reagentes	Volume Total de Reação		
	10 μL	25 μL	50 μL
Buffer s/ MgCl ₂	1,00	2,50	5,00
MgCl ₂ (25 mM)	0,60	1,50	3,00
dNTP (10 mM)	0,20	0,50	1,00
Primer F1	0,40	1,00	2,00
Primer R1	0,40	1,00	2,00
H ₂ O Milli-Q	5,90	16,25	33,50
Taq Polimerase	0,50	1,25	2,50
Total:	9,00	24,00	49,00
+ cDNA (amostra)	1,00	1,00	1,00

Condições do termociclador:

Temperatura	Tempo	
94° C	3 min	
94°C	30 seg	
Tm °C	30 seg	25 – 35 ciclos
72°C	1 min e 30 seg	
72°C	10 min	
4°C	∞	

4.11. Análise por eletroforese em gel de agarose e purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 % corado com GelRed™ Nucleic Acid Stain 10.000 X in DMSO (Biotium, Hayward, CA, USA) em tampão TAE pH 8 (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM). Ao final da eletroforese as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta em transiluminador UV e os géis foram fotografados em fotococumentador DNR MiniBIS Pro Bio-Imaging Systems (Bio America Inc. Texas, EUA). As imagens foram digitalizadas e tratadas em Adobe Photoshop.

Para eliminação de contaminação com iniciadores, nucleotídeos, polimerase e sais, os produtos de PCR foram purificados com o kit QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen). Neste procedimento, um volume do gel recortado foi tratado com três volumes de solução QG e incubado por 10 min a 50 °C. Em seguida foi adicionado um volume de isopropanol. Essa mistura foi transferida para a coluna QIAquick spin, que foi centrifugada a 12000 x g por 45 s. O filtrado foi descartado e a coluna foi lavada com 750 µL do tampão PE. A coluna foi novamente centrifugada e o filtrado descartado. A coluna foi colocada em um novo tubo autoclavado do tipo eppendorf e o cDNA eluído da coluna por adição de 20 µL de água Milli-Q autoclavada, seguida por centrifugação a 12000 x g por 2 min.

4.12. Clonagem dos fragmentos de cDNA

A clonagem no vetor foi feita adaptando as instruções do fabricante, presentes no manual de instrução do vetor pGEM-T Easy® (Promega).

4.12.1. Ligação no vetor pGEM T Easy

A ligação do fragmento de interesse no vetor de transferência foi feita utilizando a enzima T4 DNA ligase durante 16 h a 4 °C, através do seguinte protocolo: em um tubo de

polipropileno, adicionou-se 5 µL de tampão de ligação (2x rapid ligation buffer), 1 µL do vetor pGEM-T Easy® (Promega), 3 µL do inserto (produto de PCR purificado) e 1 µL da enzima T4 DNA ligase. A mistura foi então deixada na geladeira de um dia para o outro.

4.12.2. Transformação de células competentes de *E. Coli*

4.12.2.1. Obtenção de células cálcio-competentes

A cepa de One Shot® TOP10 (Invitrogen Life Sciences) já foi adquirida na forma quimiocompetente, pronta para ser transformada. Já a cepa DH5 α (Invitrogen Life Sciences) foi tornada quimicamente competente pelo método do cloreto de cálcio, da seguinte forma: a cepa foi pré-inoculada em 5 mL de meio LB (triptona 1%, extrato de levedura 1%, NaCl 1%) sem antibiótico e mantida sob agitação durante aproximadamente 16 h a 37 °C e 200 rpm. O pré-inóculo foi diluído em 100 mL de meio LB sem antibiótico e mantido nas mesmas condições acima descrito até atingir a densidade ótica (DO) em 600 nm de 0,4-0,6 unidades de absorvância. Em seguida a cultura foi centrifugada durante 7 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 35 mL de CaCl₂ gelado e estéril. As células foram mantidas em banho de gelo por 20 min e centrifugadas novamente por 7 min a 3500 rpm e 4 °C. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado. Esse processo foi repetido para os volumes 8 mL e finalmente 2 mL quando o precipitado foi ressuscitado em CaCl₂ e glicerol 50 % gelado e estéril. Por fim alíquotas de 200 µL das células foram armazenadas a -80 °C.

4.12.2.2. Transformação das bactérias competentes

Para a realização da transformação, foram utilizadas as bactérias hospedeiras *E. coli* DH5 α e Top 10, quimicamente competentes. Adicionou-se 1 µL de ligação vetor + inserto à 5 µL de células bacterianas, previamente descongeladas, mantendo a mistura em gelo por 30 min. Em sequência, foi realizado um choque térmico a 42 °C por 45 s, seguido por banho de gelo durante 1,5 min. Após o choque térmico, acrescentou-se 200 µL de meio de cultura SOC (triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl 10 mM, glicose 20 mM e água) em cada tubo. Os mesmos foram incubados a 37 °C sob agitação de 120 rpm por 1 h. Após esse período, 200 µL das bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido (triptona 1%, extrato de levedura 1%, NaCl 1%, agar bacteriológico 1,5% e água)

contendo 100 µg/mL de ampicilina, e incubadas a 37 °C por 12 h. Todas as etapas foram realizadas em ambiente estéril.

4.13. Seleção dos clones recombinantes por PCR de colônia

A avaliação das colônias transformadas que continham o inserto foi realizada por PCR de colônia. O inóculo da colônia foi adicionado à reação de PCR, com auxílio de uma ponteira estéril, juntamente com os oligonucleotídeos específicos para cada OBP. As colônias que se apresentaram positivas para a presença de inserto através de PCR foram colocadas para crescer em tubo contendo 3 mL de meio LB e 3 µL de ampicilina 200 µg/mL, incubado em *shaker* a 37°C sob agitação vigorosa por 24 h.

4.14. Extração do DNA plasmidial

Para as colônias que apresentaram o inserto foi realizada a purificação do DNA plasmidial utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep (Quiagen), seguindo as especificações do fabricante com algumas modificações. Os 3 mL da suspensão bacteriana crescida foram precipitados e concentrados por centrifugação a 13.000 rpm por 2 min, sendo em seguida utilizados para a extração do DNA plasmidial.

Resumidamente, o precipitado de células foi ressuspenso em 250 µL de tampão P1 e o conteúdo transferido para um tubo de microcentrífuga. Adicionou-se então 250 µL de tampão P2 e o tubo foi agitado por inversão 4-6 vezes, sem seguida, foram adicionados 350 µL de tampão N3 e a mistura foi agitada imediatamente, sendo levada à centrifuga por 10 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para uma coluna QIAprep spin e centrifugado à 13.000 rpm por 1 min, lavado com 500 µL de tampão PB e, sem seguida, com 750 µL de tampão PE. O DNA plasmidial foi eluído da coluna para um microtubo limpo com água Milli-Q.

A eficiência da extração do DNA plasmidial foi verificada em gel de agarose e os plasmídeos foram armazenados a -20 °C, com uma alíquota enviada para sequenciamento.

4.15. Sequenciamento

Os clones selecionados foram enviados ao Laboratório Sonda-UFRJ, localizado no Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ, CCS, para sequenciamento. A análise foi realizada com o equipamento *ABI 3130 Genetic Analyzer*[®] (Applied Biosystems), através do método de Sanger.

O resultado do seqüenciamento foi analisado com o auxílio de ferramentas de bioinformática, como: Blast (ALTSCHUL e LIPMAN, 1990; ALTSCHUL et al., 1997), VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>), Translate Tool da ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>), Reverse Complement (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) e MultiAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Descrição do mapa proteômico da antena e identificação de OBPs no genoma não anotado de *Rhodnius prolixus*

O sequenciamento do genoma de *R. prolixus* foi iniciado em 2005 com a aprovação do projeto submetido ao Human Genome Research Institute do Instituto Nacional de Saúde Americano (NHI). O centro de sequenciamento genômico da Escola de Medicina da Universidade de Washington (EUA) ficou responsável pelo sequenciamento em larga escala. Conforme o sequenciamento avançava, os dados eram depositados no NCBI no formato TRACE ARCHIVES. Este sítio armazena automaticamente dados de sequenciamento gerados a partir de gel ou plataformas capilares obtidos pelo sequenciador *Applied Biosystems ABI 3730*[®]. Neste sítio estão depositadas 6.982.547 sequências de *R. prolixus*. Cada sequência possui, cerca de 500 bp de tamanho, incluindo o vetor de clonagem.

Diversos grupos do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM) participam deste projeto. Para obter informações sobre genes que codificam proteínas deste organismo, foram sequenciadas bibliotecas de transcritos de aparelho digestivo, ovários, corpo gorduroso, testículos, túbulos de Malphigi e corpo inteiro de ninfas e adultos. Nesta etapa, foram sequenciados quase 5 bilhões de pares de bases de DNA, disponibilizados na página do VectorBase (www.vectorbase.org).

Para a descrição do mapa proteômico da antena, as proteínas foram extraídas e analisadas por eletroforese em gel unidimensional e bidimensional. Cada *spot* do gel, que representa uma proteína diferente, foi tratado e digerido com tripsina a fim de produzir peptídeos menores cujas massas foram medidas por MALDI-TOF-MS no Analisador Proteomics 5800 (Applied Biosystems).

A próxima etapa consistiu na montagem de um banco de dados local a partir da importação de arquivos disponibilizados com dados de sequenciamento de genoma e transcriptoma de *R. prolixus*. As listas de pico fornecidas pela espectrometria de massas foram analisadas por banco de dados de pesquisa para identificação de íons por MS/MS com auxílio do programa Mascot (<http://www.matrixscience.com>), que foi configurado para realizar a busca pelos peptídeos identificados no banco de dados local montado especificamente para o *R. prolixus*.

O genoma não anotado do *Rhodnius prolixus* prevê 46 candidatas a OBPs, caracterizadas pela presença de seis resíduos de cisteína. O proteoma indentificou que 22 delas eram expressas funcionalmente nas antenas.

5.2. Seleção das OBPs

Das 22 OBPs identificadas no proteoma, 7 foram selecionadas para este estudo. Como um dos objetivos deste trabalho era realizar uma etapa de amplificação de transcritos de OBPs presentes nas antenas, o desenho dos iniciadores foi feita a partir das sequencias obtidas no transcriptoma. Sendo assim, foram desenhando iniciadores para as 7 proteínas selecionadas.

As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos correspondentes às proteínas ligadoras de odor selecionadas para este trabalho estão descritas na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Sequências das OBPs selecionadas para esse trabalho. Peptídeo sinal marcado em vermelho.

Proteína	Sequências	
Rp – 12496	Sequência de Nucleotídeos	
	cagagtgaat ccactacaac agaagaacca gaaacaacac aagacaatga taagtccaca actgcaggag ccagcacagt ttccaagact ccggaagaaa taaggcaaaa aataaaggaa caagtagagg ctttgacaga ggcattgcaag acgcaaacca aactcacgcc agatcaaacc aaaattgccca ccaatatggc agtaccacaaa actgaaccag aaaagtgtctt cttagaatgt atttacaatg gaatcggcct gacaaaagat ggagcgttta atgagcaagg agcaagagtt cttgctcagc aaagatttac tgggtgtcca gacgatcttg ccaagctaa cactatgatt gaagcttgca ctaagaagt tggtgtaaaa gatgcaaatg aaaagtgcgg actaggtcga ttagtaagag aatgttttgt gaaaaatgga gtcaagatca atttcttccc taaaccttaa	
	Sequência de Aminoácidos	
	Q S E S T T T E E P E T T Q D N D K S T T A G A S T V S K T P E E I R Q K I K E Q V E A L T E A C K T Q T K L T P D Q T K I A T N M A V P K T E P E K C F L E C I Y N G I G L T K D G A F N E Q G A R V L A Q Q R F T G A P D D L A K A N T M I E A C T K E V V V K D A N E K C G L G R L V R E C F V K N G V K I N F F P K P -	
	Rp - 10034	Sequência de Nucleotídeos
		atgtttctct acgctatctt gcttgcacc tgtactgttc tttgtaccta tgcagctcta

Proteína	Sequências
	<p>gatttgaagg gaatgactaa aactaaacta gcaaagctgg aggcaaaaaa aatgtcagaa tgtttaaaaa agtctggtgt aaatataact acgctttctg gatatttaaa cgaaaaaagt aataatacta caaaagaatt caggtgtgta ctcggtgct ttactgaaga aatgggttat ggtaaagata acaaacctct gtgggacatt atggaaaaag tacataaaat tgaatacggg gctaaagaat ataaagaaa agctttgaaa attgtggaaa cttgtaaaac tattgttccc aaagaaactg aagattcttg tgaacttggg ttcgcgatgc attcatgtaa tacggcacia acaaaaaagt tagtctgac attggagtag</p> <p style="text-align: center;">Sequência de Aminoácidos</p> <p>M F L Y A V L L V T C T V L C T Y A A L D L K G M T K T K L A E L E A K K M S E C L K K F G V N I T T L S G Y L N E E S N N T T K E F K C V L G C F T E E M G Y G K D N K P L W D I M E E V H K I E Y E T K E D K E K A L K I V E T C K T I V P E E A E D S C E L G F A M H S C Y T A Q A R K L G L T L E -</p>
Rp - 93146	<p style="text-align: center;">Sequência de Nucleotídeos</p> <p>atggcacatt ttaaaaaagt aatctgcact ttgacagttc tgttccttgc attgggtgca ggctacaagg aagaattaag agcaactatg aaaagctgca aaaatggcca agacgttact gatgctgaaa ttgaggaatt catgaaacca ttgatcccca aaacggatga agaaaagtgt ctaattggcat gtgtattcaa agccttcaac gtgattgata atggccatta cगतccaaaa attgctctag ctgttgettc agacctgatg aaaaacgagc ctgaaaaact tcaaaaaatt aaaaacatca tagaccattg tggatgatg gtacctagga agatggataa tgaatgcgaa cttgcttctg aaataatgca atgtgttgc aaatatgaac gtgaggtcgg aattgcttga</p> <p style="text-align: center;">Sequência de Aminoácidos</p> <p>M A H F K K V I C T L T V L F L A L V S G Y K E E L R A T M K S C K N G Q D V T D A E I E E F M K P L I P K T D E E K C L M A C V F K A F N V I D N G H Y D P K I A L A V A S D L M K N E P E K L Q K I K N I I D H C G D D V P R K M D N E C E L A S E I M Q C V V K Y E R E V G I A -</p>
Rp - 15959	<p style="text-align: center;">Sequência de Nucleotídeos</p> <p>gcagtggaat tatcagatga tatgaaagaa atggcaaaga tgctgcatga tcaatgtata gatgaaactg gtgtaaatgg agctttgatt gaaccttctg ctaaaggaga cttttccgaa gatgaaatt tgaaatgtta ttttaaatgt atcttcgcaa atatgggcgc gctctccgat gatggtgaat tagatgctga agcttttgaa tcaattttgc cacctgattt acacgatcca ctatcaaaaa tgatcaacag ctgcaaagat gccaaagggcg ctaatgcttg tgaagtggca</p>

Proteína	Sequências
	<p>ttcaacttca ataaatgtct ttataacgca gatcctgagc actttttggt gatctag</p> <p style="text-align: center;">Sequência de Aminoácidos</p> <p>A V E L S D D M K E M A K M L H D Q C I D E S G V N G A L I E P C A K G D F S E D G N L K C Y F K C I F A N M G A L S D D G E L D A E A F E S I L P P D L H D P L S K M I N S C K D A K G A N A C E V A F N F N K C L Y N A D P E H F L V I -</p>
Rp-11280	<p style="text-align: center;">Sequência de Nucleotídeos</p> <p>atgaaaacca tagctgtgat tgctatcgtg tgctacctat ttgtagctac cgaatctttt ccttcacact ctccggaact tgacacatgc agcactaagc accatttatac aaaagatagg gcacgccaat tagctatcca cagtgtacag gccaccgatg ataatgagaa atgcttctcg agctgctatt tgaagaagg ggaatatctc gttgatggga gagtagattt tgacaaactc ttagaaaatc ataagaaatt ccaaccaaca ctttttgaag aattgaagaa gacatttgac gaatgtaaaa agaatatgga ttataatggc aagaacgagt gcgaagtggc gtaccaagcg tacagttgtg ctttcaccag accctaa</p> <p style="text-align: center;">Sequência de Aminoácidos</p> <p>M K T I A V I A I V C Y L F V A T E S F P S H S P E L D T C S T K H H L S K D R A R Q L A I H S V Q A T D D N E K C F L S C Y L K E G E Y L V D G R V D F D K L L E N H K K F Q P T L F E E L K K T F D E C K K N M D Y N G K N E C E V A Y Q A Y S C A F T R P -</p>
Rp - 90547	<p style="text-align: center;">Sequência de Nucleotídeos</p> <p>atgggtccat ctaggacaat tgtgctagt actacattta cacttactac tctgctacta atcaccaata caaatggggc catgtctgaa gcacaaatga aacaggcgat gaaaacatta agaggcatgt gcctcgggaa atccgggtgc actacagaaa ctttagacaa aatgcaagaa ggagtcttca atgatgatga cagaaattta aagtgtact taggctgtat tatgggcatg ttgcaggtyg taaaaataa taaaatcagc ttgaagatgg taaaatctca ggtagccaaa atgttgagc cagatatggg taaaagatta atagctgctt ttgaaggttg caaagatact gttggtgaag ataactgtga tttggcctat aaatttgcaa aatgcatata tgtagccgat tcgagtgctt ttattgtacc atga</p> <p style="text-align: center;">Sequência de Aminoácidos</p> <p>M G P S R T I V L V T T F T L T T L L L I T N T N G A M S E A Q M K Q A M K T L R G M C L G K S G V T T E T L D K M Q E G V F N D D D R N L K C Y L G C I M G M</p>

Proteína	Sequências
	L Q V V K N N K I S L K M V K S Q V A K M L E P D M G K R L I A A F E G C K D T V G E D N C D L A Y K F A K C I Y V A D S S A F I V P -
Rp - 3723	Sequência de Nucleotídeos
	atgtcaaat ttaatttctg tttagtntta ttgtcagcat tttacattgc acaatccat agcgtgcaaa gaagagaagt ccaaaatgaa aaggttgtgt taagcaactt gacaccaaaag caattggatg atcttgagag gaaagtctat gaagaatgtg ctgttaaatt aaatggtgac aaaggttatg ttgaaaagta tttcagaaac gataccggag taccagatga tgttggattc aaaaaatta ctggctgtta tggagaaaa atgggatatg tctcgggaac aaaaccaaat tgggagaggt taagagaaag ctacgaagta tattacaaag ataacaagga agatcttgaa acagctttaa aaattgtgga tgaatgccag aaaattcttc ttgataactt ggatggaaac gaagtcaatt atactctagc gaagtgtact aaagaaggat acctaaagtc tggcctagaa Tggtaa
	Sequência de Aminoácidos
	M S K F N F C L V L L S A F Y I A Q S H S V Q R R E V Q N E K V V L S N L T P K Q L D D L E R K V Y E E C A V K L N V D K G Y V E K Y F R N D T G V P D D V G F K K I T G C Y G E K M G Y V S G T K P N W E R L R E S Y E V Y Y K D N K E D L E T A L K I V D E C Q K I P L D N L D G N E V N Y T L A K C T K E G Y L K S G L E W -

5.3. Desenho dos primers

A construção dos oligossacarídeos iniciadores foi realizada visando obter algumas características desejadas em um *primer*, tais como: Tm em torno de 60 °C, terminar em C ou G, possuir em média 30 pares de base e % GC próxima a 50%.

Para facilitar a transferência das sequências de interesse do vetor de propagação para um futuro vetor de expressão, inseriu-se nos oligonucleotídeos sítios para as enzimas de restrição *NdeI* no iniciador 5' e *XhoI* no iniciador 3' do códon de terminação em cada uma das sequências codificantes, como se pode observar nos desenhos obtidos, apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Sequências e características dos oligonucleotídeos iniciadores.

Proteína	Nome	Direção	Enzima de Restrição	Sequência 5' → 3'	Características	Legenda de Cores
Rp – 10034	Rp - 10034 F	Senso	NdeI	CAC CCG CAT ATG GCT CTA GAT TTG AAA GG	Tm = 60,8 °C Tamanho: 29 pb % GC = 48,3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nucleotídeos aleatórios 5' ao sítio de restrição ▪ Sítio de restrição NdeI (CATATG) ▪ Sítio de restrição XhoI (CTCGAG) ▪ Stop códon ▪ Overlap com o gene de interesse
	Rp - 10034 R	Antisenso	XhoI	GTT CTC GAG TCA CTC CAA TGT CAG ACC	Tm = 61,6 °C Tamanho: 30 pb % GC = 50,0	
Rp – 12496	Rp - 12496 F	Senso	NdeI	CAC CCA CAT ATG CAG AGT GAA TCC ACT AC	Tm = 60,3 °C Tamanho: 29 pb % GC = 48,3	
	Rp - 12496 R	Antisenso	XhoI	CTA GTC CTC GAG TCA AGG TTT AGG GAA	Tm = 59,4 °C Tamanho: 28 pb % GC = 50,0	
Rp – 93146	Rp - 93146 F	Senso	NdeI	CAC CCG CAT ATG TAC AAG GAA GAA TTA AG	Tm = 57,5 °C Tamanho: 29 pb % GC = 41,4	
	Rp - 93146 R	Antisenso	XhoI	TAA ATT CTC GAG TCA AGC AAT TCC GAC C	Tm = 58,8 °C Tamanho: 28 pb % GC = 42,9	
Rp – 15959	Rp - 15959 F	Senso	NdeI	CAC CCA CAT ATG GCA GTG GAA TTA TCA	Tm = 59,2 °C Tamanho: 28 pb % GC = 46,4	
	Rp - 15959 R	Antisenso	XhoI	CAG ATT CTC GAG TCA GAT CAC CAA AAA GTG	Tm = 58,9 °C Tamanho: 30 pb % GC = 43,3	
Rp – 11280	Rp - 11280 F	Senso	NdeI	CAC CCA CAT ATG TTT CCT TCA CAC TCT CC	Tm = 60,5 °C Tamanho: 29 pb % GC = 48,3	
	Rp - 11280 R	Antisenso	XhoI	TAA ATT CTC GAG TCA GGG TCT GGT GAA AGC	Tm = 61,3 °C Tamanho: 30 pb % GC = 46,7	
Rp – 90547	Rp - 90547 F	Senso	NdeI	CAC CCA CAT ATG GCC ATG TCT GAA GCA C	Tm = 63,0 °C Tamanho: 28 pb % GC = 53,6	
	Rp - 90547 R	Antisenso	XhoI	CCA GTG CTC GAG TCA TGG TAC AAT AAA AGC AC	Tm = 62,0 °C Tamanho: 32 pb % GC = 46,9	
Rp – 3723	Rp - 3723 F	Senso	NdeI	CAC CCA CAT ATG CAT AGC GTG CAA AGA AG	Tm = 61,5 °C Tamanho: 29 pb % GC = 48,3	
	Rp - 3723 R	Antisenso	XhoI	CAA ATT CTC GAG TCA CCA TTC TAG GCC AGA C	Tm = 61,6 °C Tamanho: 31 pb % GC = 48,4	

5.4. Análise da extração de RNA total

A qualidade e integridade do RNA extraído foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1%. Nessas condições, é possível conseguir alguma separação do RNA e sua integridade pode ser deduzida pela visualização das bandas de RNA ribossomal. A **Figura 9** apresenta o perfil de migração do RNA submetido à eletroforese, onde é possível observar o padrão esperado com a presença de duas bandas referentes ao rRNA: 18S e 28S. A banda 28S rRNA aparece mais abundante que a banda 18S rRNA, indicando assim que pouca ou nenhuma degradação do RNA ocorreu durante a extração. Além disso, a “nuvem” visualizada entre as bandas corresponde ao RNA mensageiro. Desta maneira o protocolo de extração de RNAt das antenas pelo método do TRIzol mostrou-se eficaz.

5.5. Análise da síntese de cDNA por PCR em gel de agarose

Para verificar a integridade do cDNA sintetizado, foi utilizado como referência o gene ribossomal 18S - RproR18S, com os seguintes iniciadores específicos senso (5'-TCGGCCAACAAAAGTACACA-3') e anti-senso (5'-TGTCGGTGTAAGTGGCATGT-3') que codificam um fragmento de 104 pb, como mostra a **Figura 10**. Todas as amostras apresentaram o mesmo padrão revelando que a síntese de cDNA a partir de RNAt das antenas pelo protocolo da transcriptase reversa estava de acordo com o proposto para este estudo.

5.6. Análise por eletroforese em gel de agarose e purificação dos produtos de PCR

As sequências de DNA correspondentes as proteínas ligadoras de odor estudadas foram amplificadas por meio da reação em cadeia da polimerase, utilizando primers específicos, e visualizadas em um transluminador após eletroforese em gel de agarose onde, após purificação, foi possível visualizar as bandas correspondentes aos tamanhos esperados, conforme é mostrado na **Figura 11**.

Inicialmente, as OBPs Rp-10034 e Rp-11280 foram selecionadas para testar o procedimento de clonagem, visto que suas bandas apareceram de forma bastante intensa no gel, indicando uma maior quantidade de produto de PCR.

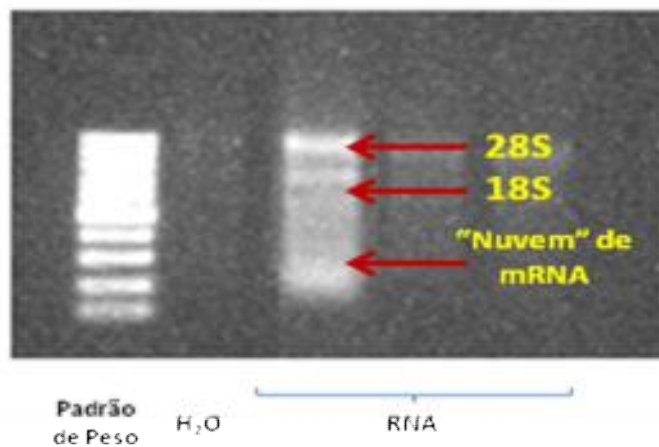


Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose do RNA total. O primeiro padrão de migração corresponde ao padrão de peso molecular, o segundo é o branco, onde nenhuma banda é visualizada, como esperado. Os três últimos apresentam as bandas do RNA, onde se pode visualizar as bandas do rRNA e da nuvem de mRNA.

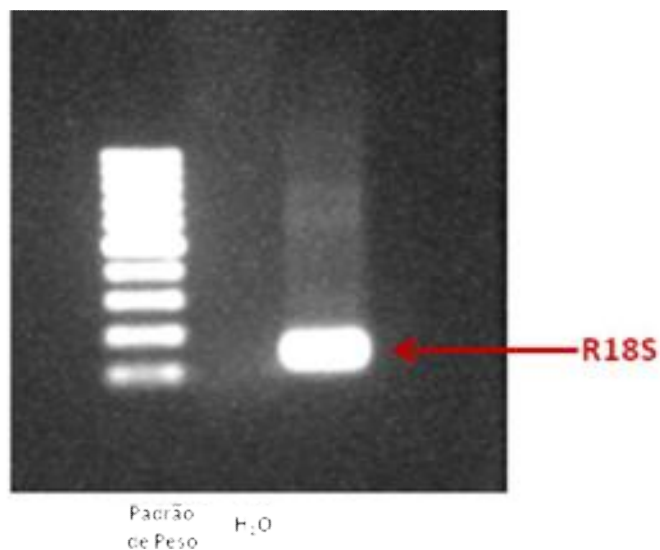


Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR constitutivo do gene R18S. A análise do padrão de migração revela uma banda próxima a 100 pb, que determina a integridade do cDNA sintetizado.

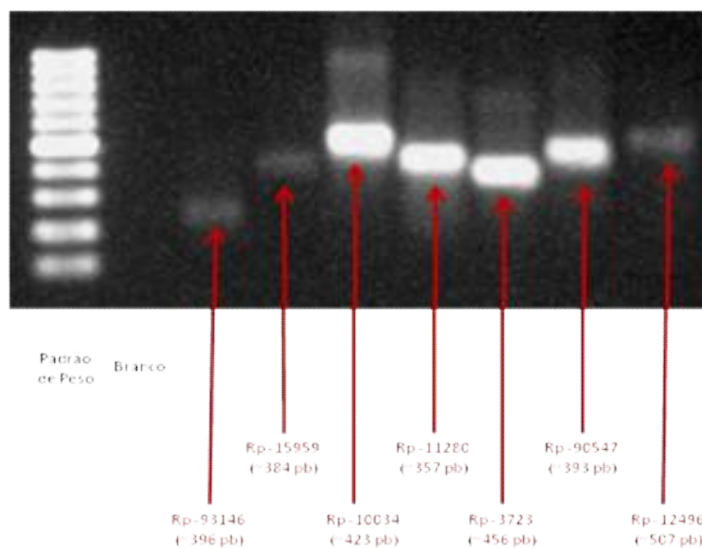


Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR purificados.

5.7. Análise do PCR de colônia

Para a confirmação da clonagem, alguns clones transformantes das OBPs Rp-10034 e Rp-11280 foram submetidos a PCR a partir de colônia utilizando iniciadores específicos para cada OBP, cujas sequências já foram apresentadas anteriormente.

Dessa forma, a eficiência da transformação pôde ser confirmada por eletroforese em gel de agarose dos produtos do PCR de colônia para as OBPs Rp-11280, apresentado na **Figura 12**, onde é possível visualizar a banda específica para esta OBP (~357 pb). Também é possível observar a ausência de bandas correspondentes a Rp-10034, observando-se apenas bandas inferiores a 100 pb, que provavelmente correspondem a dímeros de primer, indicando que a clonagem desta proteína não ocorreu de forma correta.

É válido ressaltar que as ligações com as OBPs Rp-11280 foram transformadas em células da cepa DH5 α , tornada competente em laboratório, enquanto o plasmídeo ligado a Rp-10034 foi transformado em células da cepa One Shot® TOP10 (Invitrogen Life Sciences), já adquirida na forma competente. Visto que a clonagem com a primeira OBP foi bem sucedida, enquanto houve falha na última, é possível que a explicação esteja relacionada com a qualidade da célula hospedeira. Acredita-se que as células já adquiridas na forma quimicamente competente, por terem sido submetidas a condições não controladas em seu transporte até o laboratório, possam ter perdido suas propriedades ou até mesmo morrido.

Esse fato leva a sugerir que, levando em consideração o preço elevado desse tipo de produto, mesmo que seja necessário um tempo maior para realizar o procedimento que torna as células quimiocompetentes ao invés de comprá-las de um fornecedor, torna-se mais vantajoso realizar o procedimento em laboratório, onde todas as condições são controladas

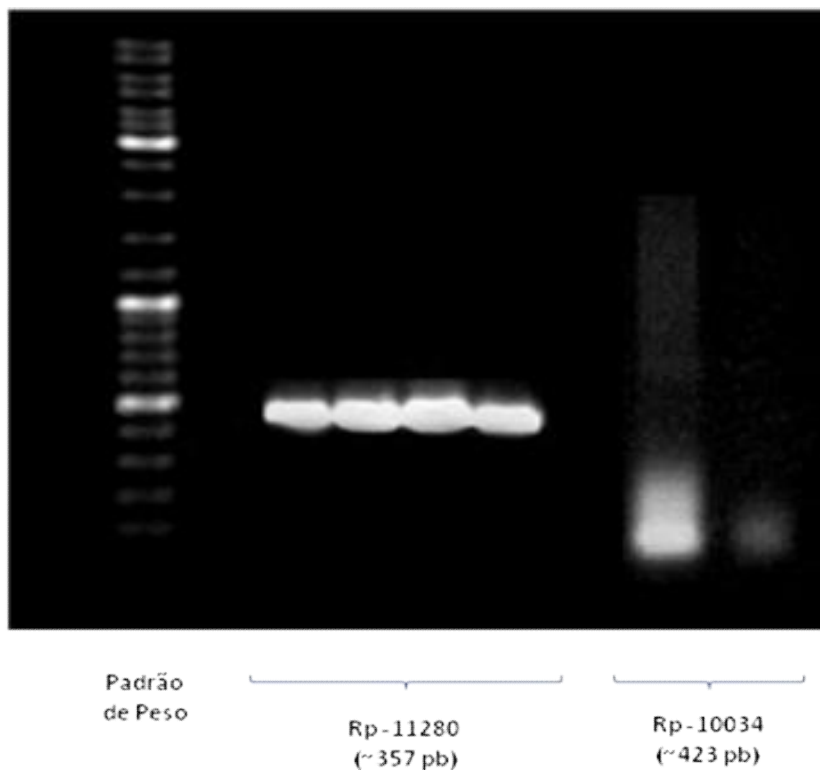


Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de colônia para os clones das OBPs Rp-11280 e Rp-10034. A primeira apresenta bandas na região esperada. O último padrão de migração mostra que a clonagem da RP-10034 não foi bem sucedida.

5.8. Análise dos clones da OBP Rp 11280

O alinhamento das sequências obtidas para cada clone dá origem à uma sequência consenso, apresentada na **Figura 13**.

Realizando-se a comparação entre a tradução da sequência consenso de nucleotídeos para aminoácidos e a sequência prevista no transcriptoma, foi possível confirmar a região codificante com grau de similaridade igual a 99% em relação à proteína ligadora de odor Rp – 11280, como é mostrado na **Figura 14**.

Há duas possíveis explicações para os três aminoácidos divergentes visualizados no alinhamento das duas sequências: um erro na anotação do transcriptoma ou um erro da *Taq polymerase* durante a amplificação dos fragmentos de DNA por PCR. Por não ter sido utilizada uma enzima de alta fidelidade, visto o alto custo desse tipo de produto, é possível que ocorram algumas alterações no momento da amplificação, em que a *Taq* troca o nucleotídeo correto por outro qualquer, gerando pequenas mutações pouco relevantes na verificação da homologia entre a sequência clonada e a prevista no transcriptoma.

Os aminoácidos encontrados nas extremidades dos clones correspondem aos sítios de restrição e aos nucleotídeos extras que foram inseridos por PCR através dos oligonucleotídeos iniciadores projetados para este trabalho. Uma análise mais aprofundada confirma a existência dos sítios para as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* nos locais adequados, como é apresentado na **Figura 15**.

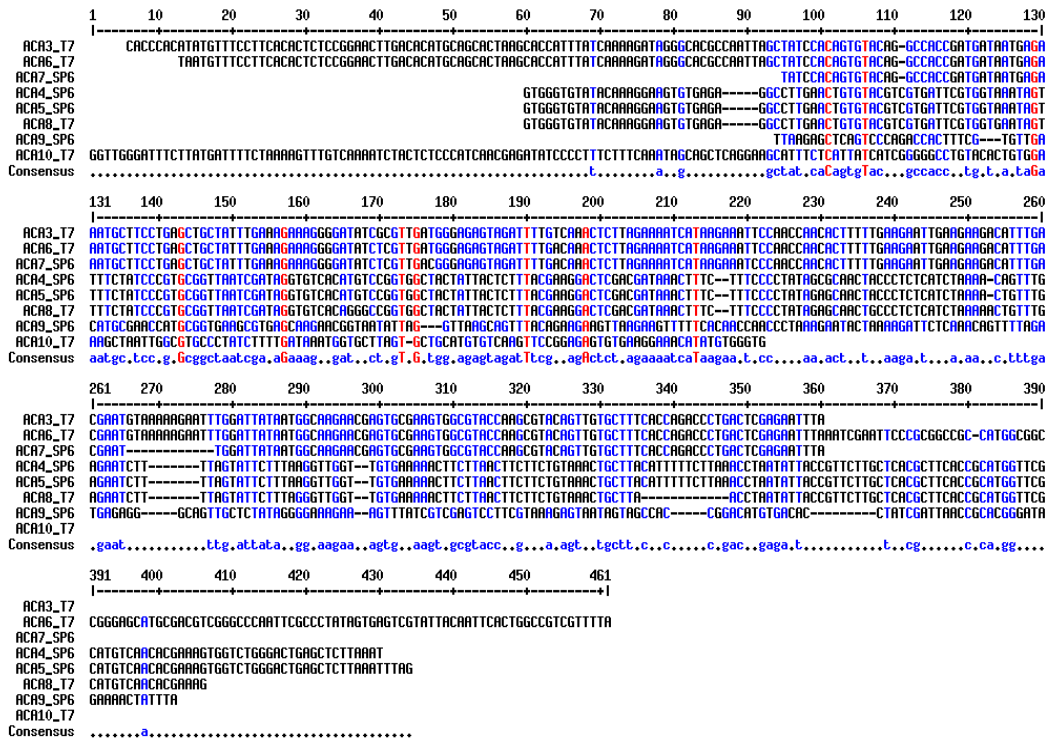


Figura 13 – Alinhamento das seqüências de nucleotídeos dos clones e geração da seqüência consenso.

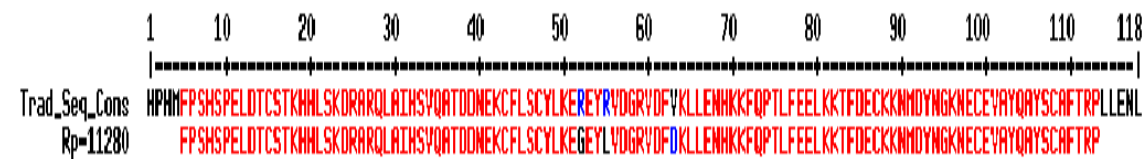


Figura 14 – Comparação entre a seqüência de aminoácidos do clone e a prevista no transcripoma.

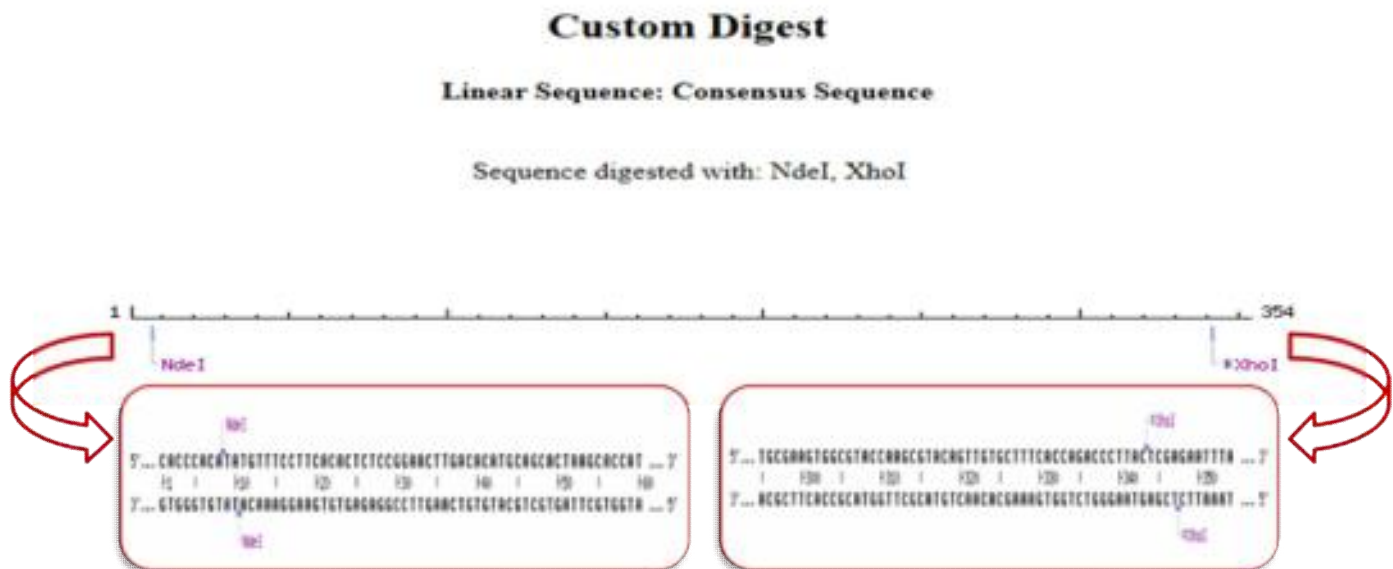


Figura 15 – Sítios de restrição para as enzimas NdeI e XhoI nas extremidades da sequência de nucleotídeos.

6. CONCLUSÕES

A partir do protocolo estabelecido no presente estudo, genes de diferentes proteínas ligadoras de odor de *Rhodnius prolixus* foram amplificados a partir do cDNA de antena, com posterior clonagem em vetor p-GEM T Easy e sequenciamento do plasmídeo recombinante.

Os iniciadores sintetizados para a amplificação das regiões que codificam OBPs foram eficientes para amplificação dos genes, possibilitando a verificação da presença dessas proteínas no RNA de antena de *Rhodnius prolixus* através de resolução por eletroforese em gel de agarose.

A transformação de células quimicamente competentes de *E. Coli* com o DNA recombinante (ligação plasmídeo + inserto) foi realizada com sucesso através de choque térmico. Com a experiência obtida através desses estudos, chegou-se a conclusão de que é mais aconselhável a utilização de células tornadas competentes no próprio laboratório, ao invés de já adquiri-las nessa condição de um fornecedor. Essa observação surge do fato de que, ao prepará-las no laboratório, todas as condições a que as células serão submetidas podem ser controladas, evitando perda de qualidade no processo de transporte.

O sequenciamento dos fragmentos dos genes obtidos após clonagem dos mesmos no vetor pGEM-T Easy confirmou a presença de um inserto cuja sequência codificante apresentou elevado grau de similaridade (99%) com a proteína ligadora de odor Rp-11280.

O entendimento de características de proteínas envolvidas no sistema olfativo de *Rhodnius prolixus* é de grande importância no desenvolvimento de novas formas de controle vetorial que sejam específicas para esse inseto, na tentativa de minimizar qualquer tipo de agressão a outras espécies ou ao meio ambiente.

Embora o estudo apresentado neste trabalho ainda seja considerado preliminar, os resultados obtidos servirão de base para a implantação do protocolo de expressão heteróloga de OBPs no laboratório. Sendo assim, o objetivo de funcionar como uma etapa inicial de determinação de protocolos para obtenção de clones da região codificante de OBPs foi atingido com sucesso, desde a extração do RNA total da antena de *R. prolixus* para a síntese de cDNA, até a ligação do gene amplificado e purificado em vetor de clonagem, posteriormente transformado em células hospedeiras de *E. coli* quimicamente competentes.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Além de realizar a etapa de clonagem com o restante das OBPs selecionadas, este trabalho tem como perspectiva a realização de uma subclonagem em vetor de expressão, seguida por expressão de proteínas recombinantes, de modo que seja possível purificá-las e desenvolver estudos de sua caracterização bioquímica e biológica.

REFERÊNCIAS

- AGUILLAR, H. M. *et al.* **Chagas disease in the Amazon Region.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v 102 (Suppl. I), p. 47-55, 2007.
- ALTSCHUL, S. F.; LIPMAN, D. J. **Protein database searches for multiple alignments.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 87, n. 14, p. 5509-13, 1990.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res*, v. 25, n. 17, p. 3389-402, Sep 1 1997.
- ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil.** Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio, 2008.
- BANEYX, F. **Recombinant protein expression in *Escherichia coli*.** *Current Opinion in Biotechnology*, v. 10, p. 411-421, 1999.
- BARRET, T.V. **Parasites and predators of Triatominae.** In New Approaches in American Tripanosomiasis Research. *PAHO Sci. Publ.* v. 318, p. 24-30, 1975.
- BARROZO, R & LAZZARI, C.R. **The Response of the Blood-sucking Bug *Triatoma infestans* to Carbon Dioxide and other Host Odours.** *Chem. Senses*, v 29, p. 319–329, 2004.
- BELLINI, M. F *et al.* **Biologic and Genetics Aspects of Chagas Disease at Endemic Areas.** *Journal of Tropical Medicine*, v. 2012, 11 pp.
- BRIAND, L. *et al.* **Disulfide pairing and secondary structure of ASP1, an olfactory-binding protein from honeybee (*Apis mellifera* L).** *J Pept Res*, v. 58, n. 6, p. 540-5, Dec 2001.
- CAREY, A. F.; CARLSON, J. R. **Insect olfaction from model systems to disease control.** *PNAS*, v.108, n 32, 2011.
- COURA, J. R. *et al.* **Uma visão sistêmica da endemia chagásica.** In AC Silveira, *La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral*, Org Panam Salud y Fundación Mundo Sano, Buenos Aires, p. 23-35, 2007.
- COURA, J. R. **Doença de Chagas.** In: JR Coura (ed), *Síntese das doenças infecciosas e parasitárias*, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 12-18, 2008.

- COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. **Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its Discovery.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v 104(Suppl. I), p. 47-55, 2009.
- DAHANUKAR, A.; HALLEM, E.; CARLSON, J. **Insect chemoreception.** *Current Opinion in Neurobiology*, v. 14, p. 423-430, 2005.
- ECKERT, K. A.; KUNKEL, T. A. **DNA Polymerase Fidelity and the Polymerase Chain Reaction.** *Cold Spring Harbor laboratory Press*, v. 1, p. 17-24, 1991.
- FANG, Y. *et al.* **Differential antennal proteome comparison of adult honeybee drone, worker and queen (*Apis mellifera L.*).** *J Proteomics*, v. 75, n. 3, p. 756-73, Jan 4 2011.
- FRANCO, T. A. **Caracterização do co-receptor olfativo (OrCo) em *Rhodnius prolixus*.** *Dissertação de mestrado – Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ*, 2013.
- HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HANSSON, B. S. & STENSMYR, M. C. **Evolution of insect olfaction.** *Neuron*, v. 72, n. 5, p. 698-711, Dec 8 2011.
- HIGUCHI M.L. *et al.* **Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8+ T cells at heart lesions of human chronic Chagas disease cardiomyopathy.** *Scand J Immunol*, v. 66(2-3), p. 362-371, 2007.
- HOY, M.A. **Some Basic Tools: How to Cut, Paste, Copy, Measure, Visualize and Clone DNA.** In: *Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications*, Academic Press, 2012.
- JURBERG, J. *et al.* **Alterações morfológicas provocadas pela aplicação de precoceno II em *Panstrongylus megistus*.** *Rev. Bras. Biol.*, v. 42, n 3, p. 527-538, 1982.
- KANAUJIA, S.; KAISLING, K. E. **Interactions of Pheromone with Moth Antennae - Adsorption, Desorption and Transport.** *Journal of Insect Physiology*, v. 31, n. 1, p. 71-81, 1985.
- KIM, B. *et al.* **Molecular characterization of a novel *Drosophila* gene which is expressed in the central nervous system.** *Mol Cells*, v. 8, n. 6, p. 750-7, 1998.
- KIM, Y.; FLYNN, T. R.; DONOFF, R. B.; WONG, D. T. W.; TODD, R. **The Gene: The Polymerase Chain Reaction and Its Clinical Application.** *J Oral Maxillofac Surg*, v. 60, p. 808-815, 2002.

- KINOSHITA-YANAGA, A. T. *et al.* **Infecção acidental pelo *Trypanosoma cruzi* acompanhada pela reação em cadeia da polimerase: relato de caso.** *Rev. Inst. Med. Trop.*, v. 51, n. 5, 2009.
- LEAL, W. S.; NIKONOVA, L.; PENG, G. **Disulfide structure of the pheromone binding protein from the silkworm moth, *Bombyx mori*.** *FEBS Lett*, v. 464, n. 1-2, p. 85-90, 1999.
- LEAL, W. S. **Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes.** *Annu Rev Entomol*, v. 58, p. 373-91, 2012.
- LIMA, L. M. **Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular.** Campina Grande: EMBRAPA, 2008.
- LORENZO, M. G.; MELO, A. C. A. **Olfação e Comportamento.** In: MOLECULAR, I. N.D. C.E.T E.E. (Ed.). *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular.* Rio de Janeiro, v.1, 2012.
- MANRIQUE, G. *et al.* **Chemical Communication in Chagas Disease Vectors. Source, Identity, and Potential Function of Volatiles Released by the Metasternal and Brindley's Glands of *Triatoma infestans* Adults.** *J Chem Ecol.*, v. 32, p. 2035–2052, 2006.
- MANRIQUE, G. & LAZZARI, C.R. **Existence of a sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): I – Behavioural evidence.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 90, p. 645-648, 1995.
- MULLIS, K. **The unusual origin of the polymerase chain reaction.** *Scientific American*, v. 262, n. 4, p. 56-65, 1990.
- NÚÑEZ, J.A. **Food source orientation and activity in *Rhodnius prolixus*.** *Bull. Ent. Res.*, v. 72, p. 252–262, 1982.
- OLIVEIRA FILHO, A.M. **Effects of juvenile hormone analogues, precocenes and insecticides in *Panstrongylus megistus* and possibilities of application in the control of Chagas' disease vectors.** *Rev. Brasil. Genética*, v. 3 p. 346-348, 1980.
- OLIVEIRA, D. S. **Caracterização de proteínas solúveis envolvidas na olfação de *Rhodnius prolixus*.** *Relatório final de Iniciação Científica FAPERJ.* Instituto de Química, UFRJ, 2012.
- OLIVEIRA, P.L. *et al.* **A heme-binding protein from hemolymph and oocytes of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. Isolation and characterization.** *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 10897-10901, 1995.

- OZAKI, M. *et al.* **A putative lipophilic stimulant carrier protein commonly found in the taste and olfactory systems. A unique member of the pheromone-binding protein superfamily.** *Eur J Biochem*, v. 230, n. 1, p. 298-308, 1995.
- PINCHIN, R. *et al.* **Slow - release juvenile hormone formulations for triatomine control.** *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 72, p. 322-323, 1978.
- SAMBROOK & RUSSEL. **Molecular Cloning: A laboratory guide.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- ROSSI, M. A. *et al.* **Chagas' heart disease: clinical-pathological correlation.** *Frontiers in Bioscience*, v. 8, p. 94-109, 2003.
- SCHNEIDER, D. **Insect Antennae.** *Annual Review of Entomology*, v. 9, p. 103-&, 1964.
- STELLWAGEN, N. C. **Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution.** *Electrophoresis*, v. 30 (Suppl I), p. 188-195, 2009.
- TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; CERON, C. R. **Phylogenetic approach to the study of triatomines (Triatominae, Heteroptera).** *Braz J Biol*, v. 66, n. 2A, p. 703-708, 2006.
- UHLMANN, V.; SILVA, I.; LUTTICH, K.; PICTON, S.; O'LEARY, J. J. **In cell amplification.** *J Clin Pathol: Mol Pathol*, v. 51, p. 119-130, 1998.
- VOGT, R. G.; RIDDIFORD, L. M.; PRESTWICH, G. D. **Kinetic properties of a sex pheromone-degrading enzyme: the sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 82, n. 24, p. 8827-31, Dec 1985.
- WICHER, D. *et al.* **Drosophila odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels.** *Nature*, v. 452, n. 7190, p. 1007-1011, 2008.
- WHO, 2013. **Chagas disease (American trypanosomiasis) - fact sheet (revised in March 2013).** *Wkly Epidemiol Rec*, 340.