

ROUNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

RENATA PORTO SAMPAIO

Identificação e caracterização de proteínas ligantes de odorantes de
Rhodnius prolixus

São Carlos
2018

RENATA PORTO SAMPAIO

Identificação e caracterização de proteínas ligantes de odorantes de
Rhodnius prolixus

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann

Versão corrigida

(Versão original disponível na unidade do programa)

São Carlos
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Sampaio, Renata Porto

Identificação e caracterização de proteínas ligantes de odorantes de *Rhodnius prolixus* / Renata Porto Sampaio; orientador Otavio Henrique Thiemann - versão corrigida -- São Carlos, 2018.

173 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2018.

1. Proteínas ligantes de odorantes. 2. *Rhodnius prolixus*. 3. Doença de Chagas. I. Thiemann, Otavio Henrique, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Á minha família que nunca deixou de me apoiar e incondicionalmente me ajudou em todas as fases da minha vida. Seja meu irmão me reafirmando como mulher cientista e como uma pessoa melhor, sempre enxergando o outro assim como ele é - amando e respeitando; ao meu pai me ensinando a meditar e me achar em mim; á minha mãe, mulher forte e exemplo de vida que me ensinou o que realmente é importante nessa vida; á tia Paula, uma mulher á frente do seu tempo com determinação, compaixão e empatia para mover montanhas e políticas públicas, além de me estimular e me provocar a perguntar e questionar; á tia Rê que com psicologia e vinho, me ajudou a tornar decisões importantes para o meu bem estar mental; e a cada um, pois a cada momento, cada momento compartilhado é aprendizado.

Ao Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann cuja orientação pautou o desenvolvimento esse trabalho num ambiente agradável e correto.

Aos meus amigos de laboratório que me ajudaram a realizar esse trabalho, direta ou indiretamente. E que contribuíram para o meu crescimento dentro e fora do laboratório. O que seria dessa jornada sem o compartilhar crescimento com a Natália Karla Bellini, que me fez mais empática, mais amorosa, mais dançante e mais mais. Sem a Ana Laura para trocar um olhar de "vamô tentar" e sair tentando coisas novas por aí, com a Camila Boralli documentando em foto. A Jéssica Bonomo, meu backup moral, cujas opiniões me são fundamentais em alguns momentos! Sem o Marco Túlio para ajudar e dividir uma cerveja. Sem o Thomas pra sair e rir. Sem a Suelen para me mostrar um jeito ser e interagir diferentes e o Evandro pra dar aquele abraço e apertão incomparável. Sem todos vocês não seria a mesma jornada.

Preciso dedicar um parágrafo para a Tatiana Watanabe porque essa mulher... além de ajudar a purificar e estudar proteínas me ajudou a ser uma pessoa melhor. Com as frases de impacto na hora do cafézinho que eu vou levar pra mim a vida toda, e com um crescimento pessoal que não teria como retribuir nessa vida.

E aos amigos que sou grata da vida por ter me dado: Antonio Barbosa de Lima Neto aprendi tanto com você, que vou levar todo esse amor para a vida inteira e sempre vou ficar feliz em lhe ver feliz, assim como eu te vejo com a pessoa especial e maravilhosa que é a Raissa, que amo por tabela, amo por ela, amo vocês. Á Natália Bernadi Videira, que eu compartilho minha vida, minhas inseguranças e alegrias, cookies e memes, obrigada por crescer comigo. A Amanda Donatti, amiga sempre amorosa e carinhosa. A Giovana Leite e ao Fer, a Leticia e ao Café, a Paulinha, a Pipis, são tantos momentos bons rindo e compartilhando essa vida com vocês que fica difícil escrever sobre todos! As todos meus amigos de kung fu, sem os quais não sei se seria tão forte mentalmente: Vinicius, Rafael, Augusto, Anas, Samuel, Fernandes, Dani, Diogo, Luisa e Glorinha, Guilherme, Leandro, Emerson... E esses que me apareceram ao acaso: Gabis da minha vida, Jussara, Marcela, Ananda, Rapher, Eduardo...

Aos técnicos Susana Andrea Sculaccio Beozzo, Humberto Pereira e Norma Bianca Saes do Grupo de Pesquisa de Biologia Estrutural e Cristalografia de Proteínas, cujo auxílio foi fundamental para a construção desse trabalho. E as técnicas do laboratório de Biologia Estrutural Andressa Alves Pinto, José Fernando de Lima e Isabel Moraes. Su, você sabe o quanto sou grata á você, não sabe?! Porque eu sou muito.

Á Dr. Patricia Suemy Kumagai que foi essencial para a realização de alguns experimentos desse trabalho, além da linha AU-CD, ASTRID2-ISA - Aarhus University, Dinamarca, na qual as medidas de dicroísmo circular foram realizadas. E além de gentil em realizar as medidas por mim, estava disposta a me ajudar a analisar os dados.

Aos funcionários do serviço de Biblioteca e Informação do IFSC-USP, pela ajuda em todos os momentos. Principalmente á Maria Cristina Cavarette Dziabas que me aturou em sua sala vários dias, me ajudando a formatar até eu me sentir a profissional da ABNT e do pacote Word Office.

Ao Instituto de Física de São Carlos e á Universidade de São Paulo pela oportunidade de realizar essa pós-graduação.

Á CAPES, CNPq e FAPESP que me concederam bolsas de apoio financeiro durante minha vida acadêmica.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Reflexão é a análise sobre um fato, um comportamento ou uma situação.
Neste momento podemos rever conceitos, hábitos e costumes.
Podemos nos transformar.

Monja Coen

RESUMO

SAMPAIO, R. P. **Identificação e caracterização de proteínas ligantes de odorantes de *Rhodnius prolixus***. 2018. 173 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Embora os insetos sejam essenciais para a vida na Terra, alguns afetam negativamente a sociedade humana atuando como vetores de doenças, como por exemplo a doença de Chagas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, no Brasil, o método mais eficaz para prevenir a propagação do agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*, é por controle vetorial. *Rhodnius prolixus* é um importante vetor de doença de Chagas no Brasil. Como outros insetos, seu comportamento depende de semioquímicos percebidos por um sistema olfativo sofisticado. As proteínas que realizam a comunicação entre ambiente externo e os receptores de odorantes são chamadas de proteínas ligadoras ao odorante (*Odorant Binding Protein*, OBPs), e são proteínas solúveis, extracelulares e pequenas (15-17 kDa). Visando aumentar o conhecimento sobre essas proteínas para possivelmente desenvolver estratégias de manipulação comportamental de *R. prolixus*, foram selecionados três genes putativos de OBPs, *RproOBP* 8, 11 e 19. Os genes foram selecionados através de ferramentas de bioinformática e foram clonados e expressos em diferentes vetores linhagens celulares de *Escherichia coli*. A proteína recombinante *RproOBP* 8 e 11 foram expressas em *E. coli* BL21(DE3). A *RproOBP* 19 obteve os melhores resultados quando expressa em *E. coli* BL21(DE3)pLysS. As proteínas recombinantes foram estudadas usando Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS), cujos resultados sugeriram melhores soluções tamponantes para trabalhar e armazenar essas proteínas. Esses tampões também foram utilizados para rastrear as condições de cristalização. Embora não tenham sido obtidos cristais para serem usados em coleta de dados de difração de raios X, algumas condições se mostraram promissoras para serem refinadas posteriormente. A *RproOBP*11 apresentou uma cor vermelha quando purificada. O espectro de UV-Visível mostra um máximo de absorção em 413 nm, o que sugere a presença de um grupo heme no estado oxidado. Os espectros obtidos por Dicroísmo Circular (CD) para a *RproOBP*11, caracterizam uma proteína rica em α - hélice devido aos picos negativos em 208 e 222 nm. Na presença de 5 possíveis ligantes: pentanol, hexanol, heptanol, octenol e octanol, os espectros de CD não mostraram mudança, podendo representar falta de interação ou interações fracas. A Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) foi realizada com os mesmos compostos, nenhum deles mostrou interação com a *RproOBP*11 em tampão 20 mM fosfato pH 7,0. Os mesmos resultados de ITC foram obtidos para o *RproOBP*19 em tampão 20 mM HEPES pH 7,0. Os resultados do CD sugerem que o *RproOBP*19 é uma proteína com regiões intrinsecamente desordenadas. Quando os espectros de CD foram obtidos na presença de TFE a *RproOBP*19 apresenta espectro mais semelhante às proteínas de α - hélice. Estes resultados representam a primeira investigação molecular de OBPs de *R. prolixus*. Testes adicionais são necessários para descobrir a estrutura e função dessas OBPs e assim, realizar uma abordagem direcionada do controle vetorial e a possibilidade de usar essas pequenas proteínas como ferramentas biotecnológicas

Palavras-chave :Proteínas ligantes de odorantes. *Rhodnius prolixus*. Doença de Chagas.

ABSTRACT

SAMPAIO, R. P. **Characterization and identification of odorant binding proteins of *Rhodnius prolixus***. 2018. 173 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Although insects are essential to life on earth, some can affect negatively human society acting as vectors of diseases. One of those is Chagas disease. According to the World Health Organization, in Brazil the most effective method to prevent the spread of the etiologic agent, *Trypanosoma cruzi*, is by vector control. *Rhodnius prolixus* is important Chagas disease vector in Brazil. It is a blood-feeding triatomine whose behavior, like other insects, originally depends of signals given by the environment as semiochemicals perceived by a sophisticated olfactory system. The proteins that perform the communication between external environment and the odorant receptors are called Odorant Binding Proteins (OBPs), and are soluble, extracellular and small proteins (15-17 kDa). Aiming to increase knowledge about these proteins to possibly develop strategies for behavioral manipulation of *R. prolixus*, three putative OBP genes, *RproOBP* 8, 11 and 19, were selected. The genes were selected using bioinformatics tools and were cloned and expressed in different vectors of *Escherichia coli* cell lines. Recombinant protein *RproOBP* 8 and 11 were expressed in *E. coli* BL21(DE3). *RproOBP* 19 obtained the best results when expressed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Recombinant proteins were studied using Dynamic Light Scattering (DLS), whose results suggested better buffering solutions for working and storing conditions. Such buffers were also used to track crystallization conditions. Although no crystals have been obtained for use in X-ray diffraction data collection, some conditions have proved promising for further refinement. *RproOBP* 11 showed a red color when purified. The UV-Visible spectrum shows a maximum absorption at 413 nm, which suggests the presence of a heme group in the oxidized state. The spectra obtained by Circular Dichroism (CD) for *RproOBP*11, characterize an α -helix rich protein due to negative peaks at 208 and 222 nm. In the presence of 5 possible ligands: pentanol, hexanol, heptanol, octenol and octanol, the CD spectra did not show change, being able to represent lack of interaction or weak interactions. Isothermal Titration Calorimetry (ITC) was performed with the same compounds, none of them showed interaction with *RproOBP* 11 in 20 mM phosphate buffer pH 7.0. The same ITC results were obtained for *RproOBP*19 in 20 mM HEPES buffer pH 7.0. CD results suggest that *RproOBP*19 is a protein with intrinsically disordered regions. When CD spectra were obtained in the presence of TFE *RproOBP*19 presents a spectrum more similar to the α -helix proteins. These results represent the first molecular investigation of OBPs of *R. prolixus*. Further tests are needed to uncover the structure of these OBPs and provide insight into the function allowing a more targeted approach of vector control and the possibility to use such small proteins as biotechnological tools.

Keywords: Odorant binding protein. *Rhodnius prolixus*. Chagas's disease.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sintomas da Doença de Chagas: A) Sinal de Romana, B) Cardiomiopatia na qual o tamanho do coração aumenta, e C) Radiografia e biópsia de um mega-esôfago chagásico. 29
- Figura 2- 1)Um triatomíneo infectado se alimenta de sangue humano e libera tripomastigotas nas fezes perto do local da picada. Esses parasitas penetram no hospedeiro através do ferimento da picada ou em membranas mucosas. 2) No hospedeiro, tripomastigotas invadem células perto do sítio de inoculação, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares. 3)Amastigotas se multiplicam por fusão binária, e se diferenciam em tripomastigotas, sendo liberadas para a circulação como tripomastigotas sanguíneas.4)Tripomastigotas podem infectar células de diferentes tecidos. 5) O inseto é infectado quando se alimenta de sangue humano ou animal que contém parasitas circulantes. 6) Os tripomastigotas ingeridos se transformam em epimastigotas no intestino médio do vetor. 7). Os parasitas se multiplicam e diferenciam 8) em Tripomastigotas metacíclicas infecciosos no intestino posterior. 31
- Figura 3 - *Rhodnius prolixus* durante repasto sanguíneo, mostrando deposição de fezes contaminadas. 35
- Figura 4 - Estágios ninfais até o vetor adulto de *Rhodnius prolixus*. 36
- Figura 5 -Vista ventral por micrografia eletrônica de varredura da antena de um espécime adulto fêmea de *Rhodnius prolixus*. Segmentos da antena: pedicelo (P), segmento flagelar (F1 e F2) As inserções mostram os quatro tipos de sensila: tricoides de paredes finas (TH), tricoides de paredes grossas (TK), basicônicas (BA) e *bristles* (BR). 38
- Figura 6- Esquema do mecanismo de ligação, liberação e degradação de semioquímicos. 1) odorantes atingem a linfa sensilar através dos poros da cutícula 2) e se ligam a OBPs. 3) Esse complexo é transportado através da linfa sensilar até atingir os ORs, 4) nesse exemplo é mostrado o modelo observado em *D. melanogaster*, no qual semioquímico e OBP ativam juntos o OR; mas existem modelos descrevendo que apenas o odorante é capaz de acionar o OR. Os receptores são heterodímero de estequiometria não conhecida com uma subunidade de ligação (A) e uma subunidade bem conservada do correceptor ORCo (B). 5) Semioquímicos dispersos são inativados. Para esse processo existem duas hipóteses: 6) uma armadilha molecular até então desconhecida e/ou 7) a ação rápida de enzimas degradantes de odorantes. *estequiometria não conhecida. 41
- Figura 7 - Alinhamento de 9 sequências de OBPs de diferentes espécies de coleópteros, incluindo: *CjapOBP1* e *CjapOBP2* de *Cybister japonicus*, *LoryOBP2* e *LoryOBP14* de *Lissorhoptrus oryzophilus*; *TmolOBP4* de *Tenebrio molitor*; *TcasOBP10* de *Tribolium castaneum*; *AcorOBP10* de *Anomala corpulenta*; *HparOBP10* de *Holotrichia parallela*; *DponOBP13* de *Dendroctonus ponderosae*, destacando a posição das seis cisteínas que são conservadas nessa

- família de proteínas. A proteína *CjapOBP2* e a *LoryOBP2* são OBPs C-menos com apenas 4 cisteínas. Os asteriscos representam outros resíduos conservados. 45
- Figura 8 - Modelo da Estrutura 3D da OBP *CjapOBP1* de *Cybister japonicus* evidenciando as predominância de α -hélices ($\alpha 1$ a $\alpha 6$) na estrutura dessas proteínas, que concomitante com as ligações dissulfeto, são responsáveis pela estrutura compacta e grande estabilidade dessas proteínas. Os resíduos I79, I73, A115, F72, F67, M84, Y119 e Y122 são provavelmente os responsáveis pela ligação ao semioquímico. 46
- Figura 9 - Organograma dos experimentos realizados com as *Rpro*OBPs. 55
- Figura 10 - Representação Esquemática da Reação de amplificação dos genes das OBPs selecionadas. 59
- Figura 11- Esquema do vetor pGEM®-T Easy da empresa PROMEGA. Esse vetor já vem linearizado com 3'-T overhangs no site de inserção para fornecer uma complementaridade compatível para produtos de PCR. 60
- Figura 12 - Esquema do sistema de clonagem LIC. Amplificação do gene de interesse com primers contendo overhangs específicos e complementares ao vetor pETTrx_1a/LIC. Geração de fragmentos definidos de DNA simples fita nas extremidades desses produtos de PCR através da atividade 3'-5' da polimerase que irá remover nucleotídeos das extremidades 3' até encontrar a primeira adenosina, que está presente em solução como dATP. O vetor é preparado através de uma digestão com *Bsa* I, seguida da remoção de bases até o primeiro resíduo de tiamina ser encontrado pela polimerase. São misturados 1 μ L de vetor com 2 μ L de inserto tratado, esses são incubados por 5 min. à 22°C; depois é adicionado 1 μ L de EDTA (25 mM) e são incubados por mais 5 min. 65
- Figura 13 - Representação da curva se desenovelamento de uma proteína relacionada a intensidade da fluorescência. O fluoróforo, na presença de uma proteína globular, apresenta fluorescência no comprimento de onda de 492 nm, com o aumento de temperatura a proteína começa a se desenovelar, e regiões hidrofóbicas (representadas em cinza) são expostas e se ligam com o fluoróforos que emitem forte fluorescência á 610 nm. O pico de intensidade então começa a decair, pois proteínas são removidas da solução através da agregação e precipitação, interagindo entre si ao invés de com o fluoróforo. 77
- Figura 14 - Decomposição do feixe de luz em duas componentes circulares polarizadas á esquerda (E) e á direita (D), a) antes e b) depois de passar por uma amostra opticamente ativa. 80
- Figura 15 - Ângulos torcionais , phi (φ) e psi (ψ) são responsáveis pela curvatura da estrutura das proteína. O ângulo torcional φ (phi) representa o grau de liberdade de torção entre o $C\alpha$ e o N, do NH_2 , e o ângulo ψ (psi) o grau de liberdade de torção entre o $C\alpha$ e o C, do $COOH$. Sendo $n \rightarrow p^*$ centrado em toro de 220 nm e $p \rightarrow p^*$ centrado em torno de 190 nm. 81

- Figura 16 - Espectro de Dicroísmo Circular no UV distante. a) Espectro de estruturas secundárias de uma α -hélice, uma folha- β antiparalela e uma estrutura irregular. b) Espectro de uma α -hélice, cuja transição $\pi \rightarrow \pi^*$ leva aos valores: positivo ($\pi > \pi^*$) perpendicular á 192 nm, negativo ($\pi > \pi^*$) paralelo á 209 nm e negativo ($n > \pi^*$) á 222 nm. . c) Espectro de uma folha- β : positivo ($\pi > \pi^*$) á 218nm, e negativo ($n > \pi^*$) á 196 nm. d) Espectro de uma estrutura desordenada: positivo ($\pi > \pi^*$) á 212nm, e negativo ($n > \pi^*$) á 195 nm. 82
- Figura 17-Método de Difusão por vapor: a) gota pendurada e b) gota apoiada. 85
- Figura 18 - Resultado obtido pelo programa SignalP 4.0 para *RproOBP 8* , mostrando os valores do *C-score* que deve ser apenas significativamente alto no local de clivagem. O *S-score* relacionado ao comprimento do peptídeo sinal previsto. E o *Y-score* que é uma previsão melhor do local de clivagem derivado do *C-score* combinado com o *S-score*. Esse resultado indica que a *RproOBP 8* não possui um peptídeo sinal. 88
- Figura 19 - Resultado obtido pelo programa SignalP 4.0 para *RproOBP 11* e *19*, mostrando os valores do *C-score* que deve ser apenas significativamente alto no local de clivagem. O *S-score* relacionado ao comprimento do peptídeo sinal previsto. E o *Y-score* que é uma previsão melhor do local de clivagem derivado do *C-score* combinado com o *S-score*. Esse resultado indica que a *RproOBP 11* possui um peptídeo sinal nos primeiros 23 aminoácidos, e que a *RproOBP 19* possui um peptídeo sinal nos primeiros 21 aminoácidos. 89
- Figura 20 - Resultado do BLASTp obtido para a *RproOBP 8*, evidenciando que essa proteína faz parte da superfamília PBP_GOBP. 89
- Figura 21 - Esquema das ligações dissulfeto previstas para as *RproOBP 8*, *11* e *19* utilizando o programa DISULFIND. Abreviações: AA) sequência de aminoácidos; DB_state) predição do estado de ligação dissulfeto (1 = há ligação dissulfeto, 0 = não há ligação dissulfeto); DB_conf confiança da predição do estado de ligação dissulfeto (0=baixo a 9=alto). 91
- Figura 22 - Predição da Estrutura secundárias das OBPs *8*, *11* e *19* pelo programa PSIPRED. 93
- Figura 23 - Mapa da estrutura secundária das OBPs *8*, *11* e *19* pelo servidor GOR4. São dois gráficos para cada proteína. O primeiro é para visualizar melhor a predição. E o segundo, representa as curvas de *score* para cada estado predito. 94
- Figura 24 - Resultado obtido para a *RproOBP 19* gerado pelo programa RONN. 95
- Figura 25 - Predição pelo programa I-TASSER da Estrutura secundária e acessibilidade do solvente para a *RproOBP 8*. 97
- Figura 26 -Fator-B da *RproOBP 8*. Esse fator indica a extensão da mobilidade termal inerente dos resíduos/átomos da proteína. 98
- Figura 27 - Predição da Estrutura Terciária da *RproOBP 8* pelo programa I-TASSER, modelo 1 *C-score*=0.19. Imagem obtida pelo programa Pymol, destacando se as ligações dissulfeto (S-S) e as α -hélices, de 1 a 6. 98

- Figura 28 - Estrutura da proteína ligadora de odorante 20 de *A. gambiae* ligada com polietileno glicol. PDB 3V2L. 99
- Figura 29 - Predição pelo programa I-TASSER da Estrutura secundária e acessibilidade do solvente para a *RproOBP* 11. 100
- Figura 30 - Fator-B da *RproOBP* 11. Esse fator indica a extensão da mobilidade termal inerente dos resíduos/átomos da proteína. 100
- Figura 31 - Predição da Estrutura Terciária da *RproOBP* 11 pelo programa I-TASSER, modelo 1C-score=0.24. Imagem obtida pelo programa Pymol, destacando se as ligações dissulfeto (S-S) e as α -hélices, de 1 a 6. 101
- Figura 32 - Proteína ligadora de ácidos graxos do disco oral de *P. regina*, OBP56a. PDB 5DIC. 101
- Figura 33 - Predição pelo programa I-TASSER da Estrutura secundária e acessibilidade do solvente para a *RproOBP* 19. 102
- Figura 34 - Fator-B da *RproOBP* 19. Esse fator indica a extensão da mobilidade termal inerente dos resíduos/átomos da proteína. 102
- Figura 35 - Predição da Estrutura Terciária da *RproOBP* 19 pelo programa I-TASSER, modelo 1C-score=0.24. Imagem obtida pelo programa Pymol, destacando se as ligações dissulfeto (S-S) e as α -hélices, de 1 a 6. 103
- Figura 36 - Proteína ligadora de odorantes 5, OBP 5, de *A. mellifera*. PDB 3R72. 103
- Figura 37 - Predição da Estrutura Terciária das *RproOBPs* 8, 11 e 19 pelo programa I-TASSER. Imagem obtida pelo programa Pymol, destacando se as ligações dissulfeto (S-S) e as α -hélices, de 1 a 6. 104
- Figura 38 - Amplificação dos fragmentos das *RproOBPs*. M, representa o marcador de peso molecular, *GeneRuler1kb.Ladder Plus* (Fermentas Life Science). Os experimentos com a OBP 9, que aparece nesse gel, não foram continuados. 106
- Figura 39 - PCR de confirmação da clonagem das *RproOBPs* 8, 9, 11 e 19 no pGEM T easy. M, representa o marcador de peso molecular, *GeneRuler1kb.Ladder Plus* (Fermentas Life Science). As denominações 8.1 e 8.2 discriminam entre diferentes colônias da *RproOBP* 8. Idem para as demais. 107
- Figura 40- Digestão do pGEM com os insertos, com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI*. M, representa o marcador de peso molecular, *GeneRuler1kb.Ladder Plus* (Fermentas Life Science). As denominações 8.1, 8.2 e 8.3 discriminam entre diferentes colônias da *RproOBP* 8. Idem para as demais. O vetor pGEM está ao lado da banda de 3000 pb, e seu tamanho é de 3015 pb. Os experimentos com a OBP 9, que aparece nesse gel, não foram continuados. 107
- Figura 41 - Digestão do pET22b+ e do pGEM com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI*. M, representa o marcador de peso molecular. pET22 representa o vetor não digerido. As denominações 8.1 e 8.2 discriminam entre diferentes clones do

vetor pGEM de colônias da *RproOBP* 8, idem para as demais, que foram obtidas por Miniprep da na cepa de propagação *E. coli* DH5 α . 108

Figura 42 - PCR para confirmar a clonagem no pET22b(+) dos insertos dos genes da OBP 8 e 9, e mais duas colônias que estavam na placa controle (N.1 e N.2), na qual não havia DNA dos insertos. Apenas as colônias 8.2 e 9.3 apresentaram um resultado positivo, mas demais não houve uma clonagem com sucesso (exceto pela 9.2, na qual houve algum problema na PCR). M representa o marcador de peso molecular. 109

Figura 43 - PCR para confirmar a clonagem no pET22b(+) dos insertos dos genes da *RproOBP* 11 e 19. As colônias de 11.1 á 11.7 e a 11.10 se mostram positivas para inserção do gene da OBP 11, e as colônias 19.1 e 19.3 á 19.5. M representa o marcador de peso molecular. 110

Figura 44 - PCR com gradiente de temperatura entre 40 - 55°C. Os produtos de PCR observados constituem se dos genes das OBPs 8, 11 e 19 com *overhangs* específicos para anelamento no vetor pETTrx_1a/LIC. O DNA molde utilizado para essa amplificação proveio de plasmídeos de propagação pGEM que já tinham a sequência das OBPs confirmadas por sequenciamento, mas como controle, também foi utilizado o gene adquirido pela empresa IDT, anotado como T nessa imagem. 111

Figura 45 - Resultado da digestão do vetor pETTrx_1a/LIC com a enzima de restrição *Bsa*I. M representa o marcador de peso molecular, pET LIC o vetor integro e pET LIC do vetor digerido. 112

Figura 46 - PCR de confirmação de clonagem das OBPs no vetor pETTrx_1a/LIC. Foi utilizado um gradiente de temperatura de 40 - 50 °C. M representa o peso molecular. As bandas da OBPs se encontram entre os pesos moleculares de 700 e 1000pb, o que é esperado para esse vetor, pois a proteína será expressa com a adição de uma cauda de tioredoxina e com uma cauda de histidina. 112

Figura 47 - PCR para verificar a clonagem no pET22b(+) e no pET28a na linhagem de expressão BL21(DE3). utilizando um primer FORWARD do inserto e um primer REVERSE do vetor. Como um dos primers é do vetor para cada uma das combinações, os fragmentos esperados são um pouco maiores que os genes de cada OBP; mas todas as OBPs estão dentro do esperado. 113

Figura 48 - SDS-PAGE 15% mostrando o resultado um teste de expressão da *RproOBP* 8 em pET 22 na cepa de expressão códon plus. A numeração 8.1, 8.2 e 8.3 representam diferentes colônias da OBP 8. As amostras denominadas C, representam um controle da linhagem de expressão códon-plus clonada com o pET22b(+) sem inserto. M representa o marcador de peso molecular *Standards Low Range* (Bio-Rad), e M2 representa o marcador de peso mole *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Scientific). 114

Figura 49 - Teste da expressão das *RproOBP*8, 11 e 19 em meio LB, induzidas com 0,5 mM de IPTG em duas linhagens: BL21(DE3)pLysS e Rosetta-gami 2. M - Marcador de massa molecular. 116

- Figura 50 - Gel de Tricina com o resultado de testes de purificação utilizando o periplasma da expressão da OBP 8 em linhagens de *E. coli* BL21(DE3), com três tipos diferentes de coluna Sepharose: ANX FF, Q FF e Q XL. As siglas Ent. representam todo o periplasma das células e o aplicado na coluna; FT significa Flowthrough, e representa a porção de proteínas que não interagiu com a coluna; L representa a lavagem apenas com o tampão, o mesmo que foi utilizado na lise, nesse caso 5 mM MgSO₄; e E₁ e E₂ que representam a eluição das proteínas que se ligaram a coluna com a adição de 0,5 M de NaCl ao tampão. A OBP 8 pode ser a banda em torno de 17 kDa. 122
- Figura 51 - Cromatograma da purificação de troca iônica na resina DEAE, da *Rpro*OBP 8 obtida no periplasma dos clones da linhagem BL21(DE3) com o plasmídeo pET22b(+). A concentração do tampão B variou de 0 à 100%, com *steps* a cada 10% no início da purificação. As flechas vermelhas representam as frações que podem ser observados no Gel de SDS 123
- Figura 52 - Cromatograma da Afinidade realizada na resina TALON com a porção solúvel da *Rpro*OBP 11 expressa na linhagem Rosetta-gami 2 com a construção no pET Trx LIC. A linha verde representa a concentração do tampão B, cuja variação foi de 0 à 100% em 1,5 volumes de coluna, e cuja composição é o tampão de lise acrescido de 300 mM de imidazol. As flechas vermelhas representam as frações que podem ser observadas no Gel de SDS-PAGE. M representa o marcador de peso molecular *Standards Low Range* (Bio-Rad). T₀ representa o cultivo no momento da indução e T₁ depois de uma hora. Sol representa o citoplasma solúvel no tampão dessa proteína que é 100 mM fosfato pH 7,5 e Ins. a fração de proteínas que permanece insolúvel. Ent é a amostra antes de entrar na coluna e as demais amostras são as frações do cromatograma acima que foram selecionadas. 124
- Figura 53 -Foto das alíquotas recolhidas pelo Äkta, da OBP 11 na primeira cromatografia de afinidade realizada com essa proteína em maior escala (1L) numa resina de Colbalto. 125
- Figura 54 - Cromatograma da segunda cromatografia de afinidade realizada com a *Rpro*OBP 11. A linha azul representa a absorvância em mAU em um comprimento de onda de 280 nm, e as linhas vermelha e rosa representam um λ de 260 e 242 nm respectivamente. A linha verde representa o gradiente do tampão B, que tem 300 mM de imidazol para eluir as proteínas com cauda de histidina da coluna. SDS-PAGE com frações dessa segunda cromatografia. Ent representa a amostra que foi aplicada na coluna e os números, as frações purificadas que foram aplicadas no gel. 126
- Figura 55 - Cromatografia de Exclusão Molecular da *Rpro*OBP 80 pico de eluição se encontra em 8,5 mL. 128
- Figura 56- Cromatografia de Exclusão Molecular da *Rpro*OBP 11. O pico de eluição se encontra em 14,8 mL. 128
- Figura 57 - Cromatografia de Exclusão Molecular da *Rpro*OBP 19 já purificada. O pico de eluição se encontra em 14,6 mL. Isso mostra que embora seja aplicada a proteína pura na coluna, aparecem diferentes picos na cromatografia. 129

- Figura 58 - SDS-PAGE com frações da cromatografia de exclusão molecular realizada com a OBP 19 já purificada. M representa o marcador de peso molecular e os números, as frações do cromatograma da Figura 59. Isso mostra que embora seja aplicada a proteína pura na coluna, aparecem diferentes picos na cromatografia, mas todas representam a *Rpro*OBP 19, com o mesmo peso molecular. 129
- Figura 59 - SDS-page e membrana de transferência corada com 0,2 % *Ponceau* com amostras dos dois primeiros passos de purificação das OBPs. M representa o marcador de peso molecular. Sol, a fração solúvel dessas proteínas, CA1_E fração eluída na primeira cromatografia de afinidade; CA2_{FT} frações da segunda cromatografia de afinidade que não interagiram com a coluna e CA2_E e que interagiram. 130
- Figura 60 - Imagem adquirida pelo software *Image Studio*TM a partir da membrana da Figura 61. 131
- Figura 61 - Resultado obtido pelo DLS para a *Rpro*OBP 19 em tampão HEPES. 133
- Figura 62 - Amostra da *Rpro*OBP 11 concentrada á 2 mg/mL (~135 mM). 134
- Figura 63 - SpeKWin32 Espectro de absorbância da *Rpro*OBP 11 á 18 mM entre 300 e 500 nm, com medidas a cada 1nm. Os picos de intensidade se encontram em 357 e 413 nm como indicado pelas setas azuis. Imagem obtida com o programa SpeKWin32(130). 134
- Figura 64 - Espectros UV-Vis de uma proteína heme nos estados oxidados (linha azul) e reduzidos (linha vermelha), ambos em ressonância com a linha laser 413 nm. 135
- Figura 65- Curva de Unidade de Fluorescência Relativa (RFU) em função da temperatura, obtida pelo DSF. 136
- Figura 66 - Eletroforese em Gel Nativo. M são as proteínas padrão descritas na Tabela 8. No primeiro gel, tem uma amostra da fração 11 do cromatograma da *Rpro*OBP 11 e as frações 14 e 17 da purificação da OBP 19. O segundo gel contém os picos 11, 14 e 19 da *Rpro*OBP 19. 138
- Figura 67 - A) Curva de calibração para as Massas Moleculares (MW) a partir da eletroforese em gel nativo e B) Curva de calibração para Raio hidrodinâmico a partir da eletroforese em gel nativo. Da menor para a maior distância de migração, os pontos representam os padrões: Tiroglobulina bovina, Ferritina equina, Catalase, Aldorase e BSA. 138
- Figura 68 -Foto do gel de Focalização Isoelétrica, com amostras da *Rpro*OBP 11 e 19.M representa o marcador das proteínas de diferentes pontos isoelétricos, que estão anotados ao lado da figura. 139
- Figura 69 - Curva de Calibração para a resina Superdex 75 10/30 para a estimativa da massa molecular. 141
- Figura 70 - Espectro de Dicroísmo Circular (CD) no UV distante da *Rpro*OBP 11, em diferentes pHs. 142

- Figura 71 - Espectro SR da *RproOBP* 19 medido a 20°C e a cada 10 °C até atingir a temperatura de 90°C. Depois de atingir essa temperatura, a amostra foi resfriada á 20°C e uma nova medida foi realizada. 144
- Figura 72 - Deconvolução do espectro da *RproOBP* 19 utilizando o programa BeStSel. 146
- Figura 73 - Espectro da *OBP* 19 medido a 20°C em solução 20 mM de fosfato de sódio, pH 6,8e desidratada na presença de 50% de trifluoroetano (TFE). 147
- Figura 74 - Resultado do experimento de ITC para a *RproOBP* 11, com os possíveis ligantes pentanol e hexanol. 148
- Figura 75 - Resultado do experimento de ITC para a *RproOBP* 11, com os possíveis ligantes octanol e octenol. 149
- Figura 76 - A e B) Cristal amorfo da *OBP* 11 em 0,2 M sulfato de amônio, 0,1M bis-tris pH 5,5 e 25% PEG 3350, Kit Classic II suite(QIAGEN). C) Precipitado da *OBP* 11 em 0,2 M sulfato de amônio, 0,1M HEPES pH 7,5 e 20% PEG 3350, Kit Classic II Suite (QIAGEN). D) Quase cristal da *OBP* 11 em 0,2 M cloreto de cálcio, 0,1M acetato de sódio pH 4,6 e 20% isopropanol, Kit Classic Suite (QIAGEN). E) Quase Cristal da *OBP* 11 em 0.2 M acetato de magnésio tetrahidratado, 0.1 M cacodilato de sódio pH 6.5 e 20 % w/v PEG 8000, SG1 Screen HT (Molecular Dynamics). F) Possível cristal da *OBP* 19 em 0.2 M Acetato de Potássio, 0.1 M HEPES pH 6.5 e 6 % w/v Polivinilpirrolidona, Kit MIDAS (Molecular Dynamics). G) Possível cristal da *OBP* 11 em 2,0 M de sulfato de amônio, 0,1 M HEPES pH 7,5 e 30% v/v PEG 400, Kit SG1 Screen HT (Molecular Dynamics). H) Agulha da *OBP* 19 em 3,5 M de formato de sódio, 0,1 M HEPES pH 7,5 e 30 % v/v PEG 400, SG1 Screen HT (Molecular Dynamics). 151
- Figura 80 - Pesquisa de OBPs de *Rhodnius prolixus* no VectorBase 168
- Figura 81 - Predição da estrutura secundária da *RproOBP* 8 utilizando o servidor PSIPRED. 169
- Figura 82 - Predição da estrutura secundária da *RproOBP* 11 utilizando o servidor PSIPRED. 171
- Figura 83 - Predição da estrutura secundária da *RproOBP* 19 utilizando o servidor PSIPRED. 173

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados nas clonagens das <i>RproOBPs</i>	58
Tabela 2 - Condições da reação para amplificação dos genes	58
Tabela 3 - Digestão Dupla do vetor de propagação com os genes de interesse, utilizando as enzimas <i>XhoI</i> e <i>NcoI</i> da empresa ThermoScientific.	62
Tabela 4 - Construções, Vetores e Linhagens de Expressão. As siglas correspondem a: pelB)peptídeo sinal para potencial endereçamento ao periplasma; TEV), sítio de reconhecimento de clivagem de TEV protease; His) cauda de seis histidinas para auxiliar na purificação por cromatografia de afinidade; Trx) cauda de fusão para aumentar a solubilidade da proteína; e Ent) sítio de reconhecimento de clivagem de enteroquinase	66
Tabela 5 - Número de Aminoácidos, Massa Molecular, Ponto isoelétrico e Porcentagem de aminoácidos nas estruturas primárias das <i>RproOBP</i> 8, 11 e 19. Os valores dessa Tabela se referem a construção resultante utilizando o pET-Trx LIC.....	90
Tabela 6 - Sequência das <i>RproOBPs</i> 8, 11 e 19. As sequências reconhecidas pelas enzimas de restrição <i>Nco I</i> (cCATGG) e <i>Xho I</i> (Ctcgag) estão destacadas em negrito	105
Tabela 7 - Resultado das combinações de diferentes construções, linhagens, concentração de IPTG, temperatura e de soluções de lise para a solubilidade da proteína.	117
Tabela 8 - Padrões para determinação da massa molecular e raio hidrodinâmico a partir da Eletroforese em Gel Nativo e respectivas distâncias de migração.	137
Tabela 9 - Padrões para a calibração da Superdex TM 75 10/30 (GE Healthcare) e respectivos volumes de eluição obtidos.	140

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CSPs	Proteínas quimiosensoras
dATPs	DesoxiAdenosina Trifosfatada
DNDi	Iniciativa para Drogas para Doenças Negligenciadas
DO ₆₀₀	Densidade óptica á 600 nanômetros
DSF	Fluorimetria diferencial de varredura
dTTPs	Desoxi Tirosina Trifosfatada
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GFP	Proteína Fluorescente verde
GOBPs	Proteínas ligadoras de odorantes em geral
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactoside
IRs	Receptores ionotrópicos
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica
LB	Meio de Cultura Lisogênico (do inglês, <i>Lysogeny broth</i>)
LIC	Clonagem Independente de Ligase
NMR	Espectroscopia por ressonância magnética nuclear
OBP	Proteína Ligante de Odorantes
ODEs	Enzimas degradantes dos odorantes
ORCo	Correceptor olfativo
ORs	Receptores de Odorantes
PB	Pares de base
PBP	Proteína ligadora de feromônio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>RproOBP</i>	Proteína ligadora de odorante de <i>Rhodnius prolixus</i>

SNMPs Proteínas da membrana do neurônio sensorial

SUS Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	Doença de Chagas	27
1.2	Aspectos clínicos e Tratamento da Doença de Chagas.....	29
1.3	Vetor <i>Rhodnius prolixus</i>	34
1.4	Sistema Olfativo	38
1.5	Proteínas Ligantes de Odorantes (OBPs)	41
1.6	Aplicações biotecnológicas de OBPs.....	50
2	OBJETIVOS	53
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.1	Busca e Análise das <i>Rpro</i> OBPs através de programas de Bioinformática	56
3.1.1	Análise da composição de aminoácidos e ligação dissulfeto	56
3.1.2	Predição de Estrutura Secundária e Terciária	57
3.2	Obtenção de <i>Rpro</i> OBPs recombinantes	57
3.2.1	Obtenção das construções gênicas em vetores de propagação	57
3.2.2	Clonagem e Transformação de linhagens de propagação de <i>Escherichia coli</i> por choque térmico	60
3.2.3	Clonagem dos genes em vetores expressão	63
3.2.4	Transformação de linhagens de expressão de <i>Escherichia coli</i> por eletroporação	67
3.2.5	Expressão de proteínas ligadoras de odorante recombinantes de <i>Rhodnius prolixus</i> (<i>Rpro</i> OBPs)	67
3.2.6	Purificação das <i>Rpro</i> OBPs recombinantes	69
3.3	Western Blot	74
3.4	Caracterização Biofísica das proteínas recombinantes	75
3.4.1	Espalhamento dinâmico de Luz (DLS)	75
3.4.2	Espectrofotometria UV-Visível	76
3.4.3	Fluorimetria diferencial de varredura (DSF).....	76
3.4.4	Eletroforese em gel Nativo.....	78
3.4.5	Eletroforese de Focalização Isoelétrica	78
3.4.6	Estimativa de massa molecular por Cromatografia de Exclusão Molecular	79
3.4.7	Espectroscopia de Dicroísmo Circular	79
3.4.8	Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....	83
3.4.9	Ensaio de Cristalização.....	84

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
4.1	Busca e Análise das <i>Rpro</i> OBPs através de programas de Bioinformática.....	87
4.1.1	Análise da composição de aminoácidos e ligação dissulfeto	90
4.1.2	Predição de Estrutura Secundária e Terciária	92
4.2	Obtenção de <i>Rpro</i> OBPs recombinantes.....	105
4.2.1	Obtenção das construções gênicas em vetores de propagação	105
4.2.2	Transformação de linhagens de propagação de <i>Escherichia coli</i> por choque térmico	106
4.2.3	Clonagem dos genes em vetores expressão.....	108
4.2.4	Transformação de linhagens de expressão de <i>Escherichia coli</i> por eletroporação.....	113
4.2.5	Expressão de proteínas ligadoras de odorante recombinantes de <i>Rhodnius prolixus</i> (<i>Rpro</i> OBPs).....	114
4.2.6	Purificação das <i>Rpro</i> OBPs recombinantes.....	121
4.3	Western Blot.....	130
4.4	Caracterização Biofísica das proteínas recombinantes	131
4.4.1	Espalhamento dinâmico de Luz (DLS).....	131
4.4.2	Espectrofotômetro de UV-Visível	133
4.4.3	Fluorimetria diferencial de varredura (DSF).....	135
4.4.4	Eletroforese em gel Nativo	136
4.4.5	Eletroforese de Focalização Isoelétrica	139
4.4.6	Estimativa de massa molecular por Cromatografia de Exclusão Molecular	140
4.4.7	Espectroscopia de Dicroísmo Circular	142
4.4.8	Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....	148
4.4.9	Ensaio de Cristalização	150
5	CONCLUSÃO.....	153
6	PERSPECTIVAS.....	155
	REFERÊNCIAS	157
	ANEXO A - Pesquisa de OBPs de <i>Rhodnius prolixus</i> no VectorBase	167
	ANEXO B - Análise da estrutura secundária com PSIPRED	169

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A estimativa de pessoas contaminadas com a Doença de Chagas é de 5,7 milhões, sendo que outras setenta milhões estão em risco de adquirir a doença nas Américas. É a doença parasitária que mais mata na América Latina. (1-2) E está entre as vinte enfermidades negligenciadas listadas pela Organização Mundial de Saúde em 2017 (*World Health Organization, WHO*). (3)

A Doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, foi descrita por Carlos Chagas em 1909. É causada pelo protozoário *Trypanossoma cruzi*, que parasita diferentes tecidos de humanos e várias espécies animais. Existem, na natureza, mais de 100 espécies que são reservatórios para o parasita incluindo primatas, marsupiais, morcegos, roedores, carnívoros, tatus e lagomorfos (coelhos e lebres). (4) A forma majoritária de transmissão da doença é através de triatomíneos, porém pode acontecer a transmissão através de alimentos contaminados, transfusões de sangue, congênita, por transplante de órgãos e por acidentes de laboratório. (4-5) A transmissão mediada por um vetor invertebrado pode ser veiculada através de 150 espécies de triatomíneos pertencentes à família Reduviidae; sendo que os principais vetores para os humanos são conhecidos popularmente como barbeiro ou chupão. Os três gêneros mais importantes são *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*. (1,6)

Como citado por Dias em 1986 (7), a principal forma de transmissão se dá pela interação homem-triatomíneo, que apresenta condicionantes múltiplos, principalmente as circunstâncias sócio-econômicas e culturais. Essa multifatorialidade da doença humana é observada pela influência que os elementos bioecológicos sofrem do contexto social. As populações majoritariamente afetadas possuem um padrão social de maior vulnerabilidade, menor cobertura com intervenções preventivas, maior probabilidade de adoecimento, menor acesso à rede de serviços de saúde, menor probabilidade de receber tratamentos essenciais, maior probabilidade de desenvolvimento de formas graves da doença e maior risco de evolução para óbito. (7-8) Sem reconhecimento de tais determinantes, a criação de planos de controle da endemia chagásica não teriam sido possíveis em 1983 e não serão possíveis na atualidade.

Historicamente, o parasita estava restrito à mamíferos silvestres, porém a invasão desses ecótopos pelo homem o incluiu no ciclo epidemiológico, oferecendo ao triatomíneo moradias rurais precárias ideais para o abrigo e alimentação daqueles que se tornariam o mecanismo primário de difusão da doença. (9)

Em 1979, pesquisadores brasileiros, escreveram uma carta ao então Ministro da Saúde, Dr. Mário Augusto de Castro Lima, descrevendo a situação da Doença de Chagas no Brasil como uma "endemia urbano-rural " e "um dos problemas mais sérios e urgentes do país" destacando-a pelo "elevado custo social incidente sobre a imensa parcela da força de trabalho dedicada à produção agrícola". (9)

O custo médico-social da endemia também foi destacado no documento. Segundo Dias, o preço corrente na época de 25.000 marca-passos estimados para chagásicos, 15.000 cirurgias para correção de megasôfagos e 10.000 para megacólons, poderia ser suficiente à construção de 165 000 casas rurais higiênicas ou à desinsetização completa da área endêmica de Bolívia, Argentina e Brasil. (7) Mas foi apenas em 1983 que os recursos financeiros foram destinados à desinsetização domiciliar de toda área que se reconheceu endêmica. (9)

Ainda que as atividades de desinsetização não tenham sido exemplares desde 1983, em 2006 o Brasil recebeu a certificação pela Organização Pan-americana da Saúde (10) de interrupção da transmissão da doença pelo *T. infestans*, considerado até então o mecanismo majoritário de transmissão da doença. Mas outros vetores, principalmente a espécie *R. prolixus*, ainda são de importância epidemiológica. E os demais mecanismos de transmissão, até então considerados minoritários, passaram a ter importância na saúde pública. (1,9-10) É importante destacar que fatores socioeconômicos impossibilitam o acesso de algumas pessoas infectadas ao diagnóstico e ao tratamento adequado, mantendo a infecção pelo parasita *T. cruzi* na população. Atualmente, ocorrem casos e surtos da doença na Amazônia Legal por transmissão oral e vetorial extradomiciliar sem colonização. Essa alteração do quadro epidemiológico muda estratégias e ações de vigilância, prevenção e controle, demonstrando que a solução definitiva do problema depende de características sociais, políticas e econômicas. (1)

1.2 Aspectos clínicos e Tratamento da Doença de Chagas

Clinicamente a Doença de Chagas apresenta uma fase aguda e uma fase crônica. A primeira ocorre de 5 a 14 dias após a transmissão pelo vetor e 30 a 40 dias para as infecções por transfusão sanguínea, e pode durar algumas semanas ou meses. Nela, os parasitas podem ser encontrados circulando no sangue e apenas aparecem sintomas atenuados, sendo que nem todos os indivíduos apresentam sintomas, podendo manter um quadro assintomático. A sintomatologia da fase aguda pode ser descrita por: chagoma (reação inflamatória no local da penetração do parasita na pele), sinal de Romaña (pálpebra de um olho inchada e roxeada, Figura 1 A), febre, cefaléia, aumento das glândula linfáticas, palidez, dor muscular, tosse, dificuldade em respirar, aumento do fígado, inchaço generalizado do corpo, diarreia, raramente inflamação cardíaca (com dor no peito e até insuficiência cardíaca) e menos frequentemente, meningoencefalite (com convulsões e até paralisia). (1,11) Depois da fase aguda segue se a fase crônica, que na maioria dos pacientes é clinicamente assintomática, chamada de fase crônica indeterminada; e muitas pessoas continuam assintomáticas por toda a vida.

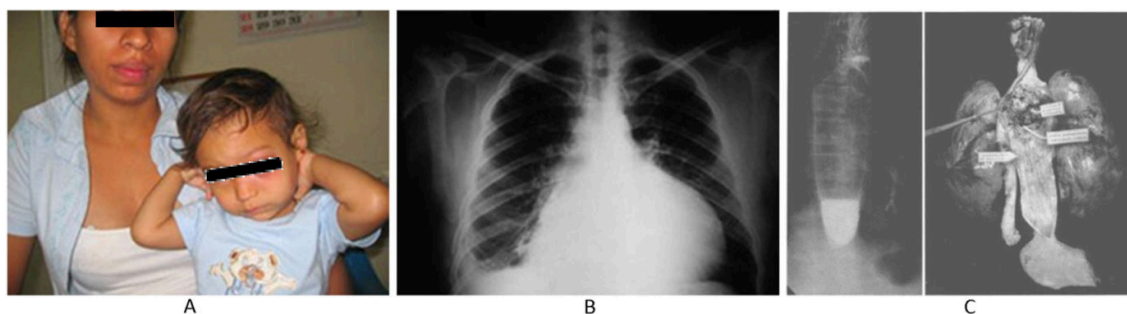


Figura 1- Sintomas da Doença de Chagas: A) Sinal de Romaña, B) Cardiomiopatia na qual o tamanho do coração aumenta, e C) Radiografia e biópsia de um mega-esôfago chagásico.

Fonte: A, B) WHO (11); C) CAMARA-LOPES (12)

Outros indivíduos desenvolvem uma fase crônica sintomática, com duração de 20 à 40 anos depois da infecção original, na qual os parasitas estão alojados principalmente no coração e no músculo digestivo, mas podem ser encontrados em outros tecidos, como o tecido adiposo. (13–15) Quando a forma crônica da doença é clinicamente aparente, ela é dividida nas formas: cardíaca, gastrointestinal ou combinada. Entre 20-30% de todos os indivíduos

infectados desenvolvem problemas médicos debilitantes ou fatais. (13-14) Aproximadamente 33% dos infectados sintomáticos na fase crônica desenvolvem a forma cardíaca da doença cuja causa da morte é, por ordem de frequência, morte súbita causada por arritmias, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral, ainda podendo sofrer distúrbios musculares e embolia cardíaca (na Figura 1 B, pode ser observada uma radiografia de uma cardiomiopatia). Parte dos pacientes também sofre da forma digestiva, com aumento do esôfago e/ou cólon (Figura 1 C). Aproximadamente 15% dos pacientes sofre uma forma mista que afeta o coração, o sistema digestivo e o sistema nervoso autônomo. (1,11)

Recentemente novos quadros clínicos têm sido relacionados com a doença de Chagas. Um estudo da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) confirmou que o próprio parasita *T. cruzi*, deflagra um quadro depressivo resultado de uma desordem imunológica e neuroquímica que interfere no sistema nervoso central. (16) Além disso, outras questões médicas estão sendo avaliadas, por exemplo, em pessoas cujo sistema imunológico está suprimido os parasitas podem ser reativados e encontrados no sangue, o que é potencialmente grave. (11)

Os sintomas da doença estão relacionados com o ciclo do parasita dentro do hospedeiro humano (Figura 2), e com as células de cada tecido que os parasitas invadem; incluindo: tecido muscular liso e estriado nas paredes do tubo digestivo, esôfago, intestino delgado, cólon, apêndice cecal, vesícula biliar, bexiga, útero, testículo, pâncreas, tecido adiposo, amígdala (musculatura circunvizinha), língua (musculatura circunvizinha) e rins (entre as células tubulares epiteliais). (14,17)

No Brasil, estima-se que havia de 2 a 3 milhões de indivíduos infectados em 2013, e desses, 600.000 apresentam complicações cardíacas ou gastrointestinais. Segundo o Sistema Nacional de Informações sobre Mortalidade (SIM), a doença também é responsável por aproximadamente 6.000 óbitos por ano, equivalente à 0,6% de todas as mortes que ocorrem no país. (18) Além disso, a carga econômica da doença de Chagas também é um fator importante a ser considerado. Lee *et al* 2003 (19), calculou o valor anual de um indivíduo para o sistema de saúde, em torno de US\$ 383 (US\$ 207–636) na América Latina, e o custo anual para a sociedade (incluindo os custos de saúde e de perda de produtividade) de um indivíduo com a doença crônica como US\$ 4.059 (US\$ 3.569–4.434). Na América Latina a maior perda econômica, para um indivíduo ao longo da vida, foi estimada no Brasil com a média de US\$ 55.793.074.641. Esse é um argumento econômico para que mais atenção e esforço seja deslocado para controlar a doença de Chagas. (19)

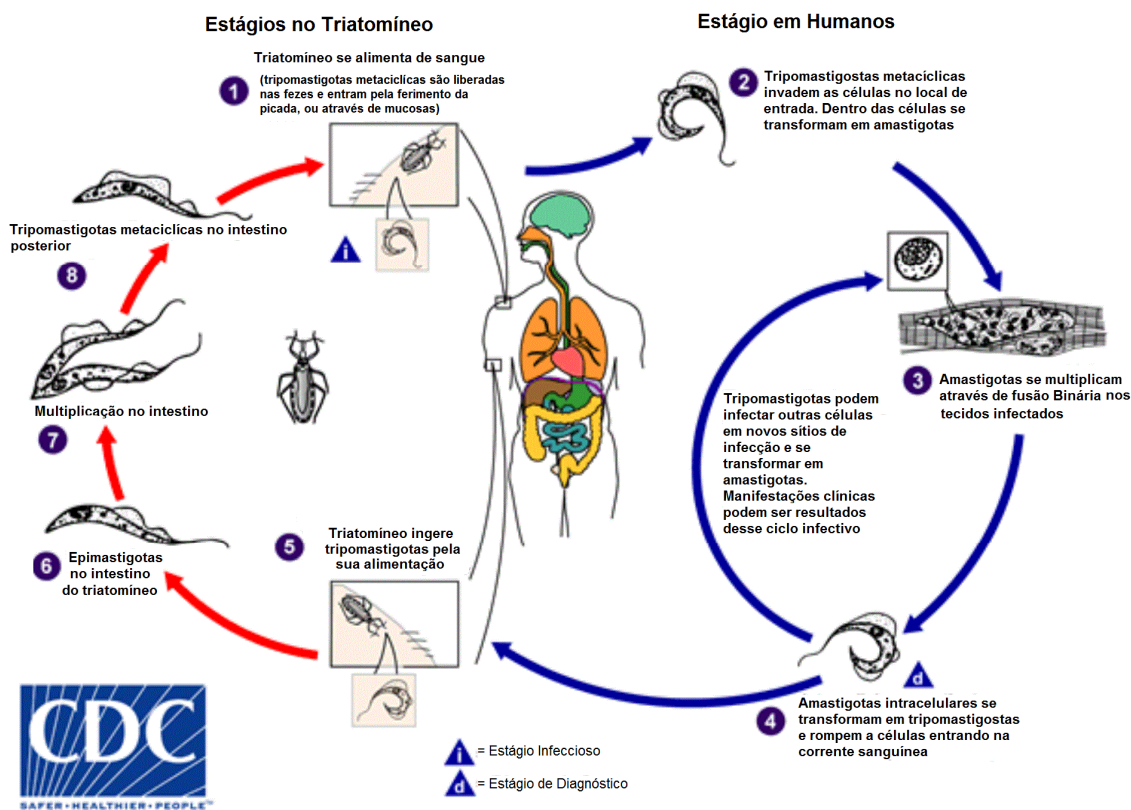


Figura 2- 1)Um triatomíneo infectado se alimenta de sangue humano e libera tripomastigotas nas fezes perto do local da picada. Esses parasitas penetram no hospedeiro através do ferimento da picada ou em membranas mucosas. 2) No hospedeiro, tripomastigotas invadem células perto do sítio de inoculação, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares. 3)Amastigotas se multiplicam por fusão binária, e se diferenciam em tripomastigotas, sendo liberadas para a circulação como tripomastigotas sanguíneas.4)Tripomastigotas podem infectar células de diferentes tecidos. 5) O inseto é infectado quando se alimenta de sangue humano ou animal que contém parasitas circulantes. 6) Os tripomastigotas ingeridos se transformam em epimastigotas no intestino médio do vetor. 7). Os parasitas se multiplicam e diferenciam 8) em Tripomastigotas metacíclicas infecciosos no intestino posterior.

Fonte: Adaptada de CDC (13)

Um desafio dessas estatísticas é que a mortalidade associada à doença de Chagas ainda é inadequadamente estimada, porque muitos indivíduos com a forma indeterminada da doença não sabem que estão infectados podendo ser potenciais transmissores de *T. cruzi*. Dessa forma a causa da morte pode não ser associada com a doença (18). Um estudo de 2017, que acompanhou doadores de sangue soropositivos e soronegativos para Chagas durante 5 anos, mostrou que os doadores soropositivos tiveram um risco de morte 2,3 vezes maior que os

indivíduos soronegativos. Com os dados desse estudo pôde ser concluído que a doença de Chagas é uma causa de morte sub-estimada pelo SIM. (18)

Uma das maneiras de monitorar a doença mais efetivamente é melhorar as formas de diagnóstico e ampliar os sistemas de vigilância. Atualmente, para a confirmação do quadro clínico são realizados testes de sangue parasitológicos e sorológicos. Os testes parasitológicos diretos são indicados na fase aguda da doença quando a parasitemia é elevada e inclui exames de sangue fresco, técnicas de concentração do parasita, etc. Os testes sorológicos detectam no soro do paciente a presença de antígenos do parasita ou anticorpos do hospedeiro e são utilizados para detecção da infecção na fase crônica devido a sua alta sensibilidade e especificidade, incluindo as técnicas de hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e ELISA (do inglês, *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). (20) O teste molecular de reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) acoplado à hibridização com sondas moleculares e o Western Blot, para detecção de proteínas circulantes do parasita, têm apresentado resultados promissores e podem ser utilizados como teste confirmatório em qualquer fase da doença (1), mas são tecnicamente avançados e de alto valor.

Confirmada a infecção por *T. cruzi*, o paciente pode ser tratado com dois medicamentos, benzonidazol e nifurtimox, que são eficazes na fase aguda da doença, e têm efeito parcial na fase crônica da doença. (2, 21) Tratamentos envolvendo a associação com outros medicamentos como allopurinol e alguns antifúngicos- da classe dos azóis, como o cetoconazol, o fluconazol, o itraconazol - também estão sendo estudados. (10) Além disso, para pacientes sintomáticos com cardiomiopatias está sendo estudada a utilização de células-tronco com capacidade de auto-replicação e de diferenciação para o reparo de lesões causadas no coração.(1) Fortalecer o sistema imunológico dos portadores também é importante, pois através de alimentação e hábitos saudáveis a evolução da doença é retardada. Todavia é imprescindível que nos casos em que a doença se apresenta assintomática, um acompanhamento anual dos pacientes seja realizado, assim, intervenções podem ser feitas no momento adequado. (8)

Apenas o benzonidazol é usado no Brasil. Ele é produzido pelo Laboratório Federal de Pernambuco (Fafepe) e distribuído pelo Sistema Único de Saúde (SUS), para casos agudos ou crônicos. A taxa de cura do benzonidazol na fase aguda para supressão da parasitemia é de 80% (22).

O mecanismo de ação do benzonidazol não é elucidado, uma hipótese sugere a ação por meio de intermediários radicalares e/ou metabólitos nucleofílicos que teriam efeito tripanomicida através de ligações covalentes com macromoléculas do parasita: DNA nuclear e mitocondrial, lipídeos e proteínas. Outro mecanismo de ação possível, resulta do aumento da fagocitose atuando na elevação da produção da citocina interferon gama (INF- γ), causando lise celular. Ainda, existem estudos relatando a ação do fármaco na inibição da enzima NADH-fumarase redutase bloqueando o crescimento do *T. cruzi*. (22)

A dose diária do benzonidazol é de 5 a 7 mg por quilograma de peso corporal, através de duas ou três administrações orais diárias visando manter uma disponibilidade contínua do medicamento no organismo, sendo que seu tempo de meia-vida de eliminação plasmática é de aproximadamente 12 horas. (23) O tempo longo de tratamento, de 30 a 60 dias consecutivos, acaba sendo um fator limitante desse fármaco.

Os efeitos colaterais também são um atributo negativo desse tratamento e incluem: insuficiência hepática, renal ou hematológica, assim como afecções neurológicas (como contra-indicações relativas) e reações cutâneas, febre, dores musculares, púrpura trombocitopênica, distúrbios gastrintestinais, náuseas, parestesias ou sintomas de polineurites periféricas, cefaléia, vertigem e fadiga, depressão da medula óssea (casos raros), leucopenia, agranulocitose, linfadenopatia, neutropenia e trombocitopenia. (20-21)

A eficiência do tratamento é inconstante e não garantida. As desvantagens do tratamento incluem: períodos de tratamento longo (60-90 dias), toxicidade dose-dependente e alta taxa de abandono dos pacientes devido aos efeitos colaterais. Por essas razões uma das diretrizes da Assembléia Mundial de Saúde focada na doença de Chagas (WHA63.20), encoraja a pesquisa sobre a doença afim de promover o desenvolvimento de medicamentos que são mais adequados, seguros e acessíveis financeiramente. (24)

Lamentavelmente, segundo a Iniciativa de Drogas para Doenças Negligenciadas (do inglês, *Drugs for Neglected Diseases*, DNDi), menos de 1% das pessoas infectadas têm acesso ao diagnóstico e aos tratamentos atuais. (2)

Além da exígua porcentagem de pessoas que tem acesso ao diagnóstico e tratamento, não existe vacina contra a doença de Chagas. A melhor estratégia disponível de prevenção e controle se baseia na eliminação dos vetores dentro e ao entorno das moradias, melhorando a qualidade dessas moradias, oferecendo educação sanitária e realizando triagem de doadores

de sangue e órgãos (18). Isso é possível pelo uso de inseticidas eficazes, vedação de frestas nos telhados e de buracos nas paredes, e uso de cortinados, mosquiteiros ou telas metálicas, controle e descarte do sangue contaminado pelo parasita e seus derivados; além do uso de proteção individual (repelentes, roupas longas, etc.) durante a realização de atividades noturnas em áreas de mata. Aderir as recomendações de boas práticas de higiene e manipulação de alimentos para a prevenção da transmissão oral, além das boas práticas laboratoriais para evitar a contaminação acidental ao se trabalhar com fluidos humanos (sangue, urina, soro, etc.) e culturas do parasita. (1,8,24) Todas essas ações combinadas, podem melhorar o quadro de saúde no Brasil pela diminuição do número de infectados. (11)

Embora a doença possa ser prevenida dessas diversas maneiras, existe um consenso dentro da comunidade científica de que a prevenção da transmissão através de combate aos insetos vetores é a solução mais importante e eficaz. (1,2,4,7-9,11,13,21,24-30) A interrupção definitiva da transmissão vetorial do *T. cruzi* é complexa, porque esse parasita é mantido em populações silvestres, animais domésticos e peridomésticos, que se tornam reservatórios para transmissão vetorial. Por isso, novas estratégias de controle dependem da compreensão dos padrões biológicos, ecológicos e evolutivos que estão envolvidos nos processos de domiciliação e especiação dos vetores invertebrados. (6)

1.3 Vetor *Rhodnius prolixus*

Como mencionado anteriormente, um dos vetores mais importantes do *T. cruzi* é o triatomíneo *Rhodnius prolixus*, mostrado na Figura 3. Isso se deve a sua antropofilia, rápido ciclo de desenvolvimento, intensa dispersão passiva e alta susceptibilidade de infecção e transmissão do parasita. É o principal vetor no Suriname, Guiana, Guiana Francesa, Colômbia e Venezuela; sendo nativo desses dois últimos países. A dispersão para a América Central pode ter acontecido por meio de transporte passivo, por meio de aves ou mamíferos, ou em fibras de palmeiras, local original de ocorrência do vetor que se adaptou à domicílios humanos. (4)



Figura 3 - *Rhodnius prolixus* durante repasto sanguíneo, mostrando deposição de fezes contaminadas.

Fonte: WHO (11)

A espécie *R. prolixus* além de um importante vetor, também é um organismo modelo para o estudo da fisiologia de insetos. Por isso seu genoma foi analisado, e alguns de seus mecanismos adaptativos se tornaram mais claros. Uma característica peculiar dessa espécie é sua relação "silenciosa" com o *T. cruzi*. Algumas descobertas indicaram que, ou a infecção por *T. cruzi* não ativa o sistema imune do vetor, ou o parasita não é afetado pelos peptídeos antimicrobianos do triatomíneo. É plausível que o *T. cruzi* tenha desenvolvido mecanismos de evasão do sistema imune, pois sua população não é controlada, o que aumenta a facilidade com que o *R. prolixus* transmite e infecta novos hospedeiros. (31)

A espécie *R. prolixus* se insere na ordem Hemiptera e família Reduviidae integrando a subfamília Triatominae, única estritamente hematofágica pertencente a essa ordem. Essa subfamília, além da tribo Rhodniini contém a tribo Triatomini como espécies epidemiologicamente relevantes. Estes insetos possuem desenvolvimento hemimetabólico com cinco estágios ninfais igualmente capazes de transmitir o protozoário apesar de serem ápteros e apresentarem baixa mobilidade em relação aos adultos, Figura 4. (6,32)



Figura 4 - Estágios ninfais até o vetor adulto de *Rhodnius prolixus*.

Fonte: LUNA (33)

As espécies da tribo Rhodniini podem ser encontradas em diferentes ecótopos silvestres, tais como fibras de palmeiras, ninhos de aves e abrigo de mamíferos; eventualmente, devido a sua capacidade de colonização podem ser encontrados no interior das habitações humanas .(6)

Estudos realizados com adultos de *R. prolixus* descrevem seu padrão de atividade como bimodal durante à noite, isto é, um pico de atividade no início da noite e um no final. O primeiro representa a saída destes insetos de seus abrigos em busca de alimento e o segundo a busca do abrigo onde permanecem em estado de acinésia durante o dia. (34)

O comportamento desses insetos tem papel fundamental na dinâmica de transmissão das doenças e do controle vetorial. (32-33) Ampliar o conhecimento sobre padrões de atividade e dispersão, busca por hospedeiros e comunicação intra e interespecífica possibilita o desenvolvimento de estratégias de controle vetorial mais eficientes. Um exemplo, relacionado aos padrões de atividade, é a aplicação de inseticidas no interior das casas no período inicial da noite quando a sensibilidade dos triatomíneos é maior, pois este é o momento de maior atividade e maior tempo fora de seus abrigos. Também, após o repasto sanguíneo as cutículas abdominais ficam distendidas facilitando a absorção dos componentes químicos ativos dos inseticidas. (34)

O comportamento dos insetos depende da interação desse com o ambiente. E a olfação é uma das maiores modalidades sensoriais que permite aos insetos interpretar o ambiente. Mesmo que não seja evocada uma resposta comportamental instantânea, o reconhecimento desses sinais auxilia o inseto a distinguir, compreender e estimar a situação em que se

encontra. Portanto a interferência na olfação pode controlar o comportamento dos mesmos. (26–28,30)

Uma gama distinta, porém limitada, de compostos orgânicos voláteis é utilizada guiando respostas comportamentais críticas (raramente existem compostos não voláteis). É bem fundamentado que insetos utilizam uma variedade de semioquímicos relacionados à atração ou repulsão, enquanto procuram habitats, hospedeiros, localizam fontes de comida, cópula ou sítios de oviposição e identificam predadores. Semioquímicos são definidos como produtos químicos que transmitem informações entre organismos. Essa comunicação pode ser entre organismos da mesma espécie, caso dos feromônios. Ou, pode ser uma comunicação interespecífica, incluindo compostos voláteis de plantas, odorantes de outras espécies animais ou da microbiota de sua pele, entre outros - sendo chamados nesse caso de aleloquímicos (24-25,34–36)

Em vetores artrópodes há uma constância entre as estruturas olfativas e suas funções, o que se reflete no uso dos semioquímicos. O alto grau de parcimônia no uso desses sinais químicos também se reflete nas estruturas sensoriais relativamente conservadas que as detectam com alta sensibilidade e seletividade. (39)

Um exemplo é que dos 1 700 semioquímicos que constituem o "volatiloma" humano (compostos orgânicos voláteis derivados da respiração, emanações de pele, urina, fezes e saliva), 200 compostos são sugeridos como atrativos putativos para *Aedes aegypti*, e estudos tem demonstrado que combinações desse repertório são necessárias para estimular o sistema olfativo do inseto vetor. Experimentos de silenciamento pos-transcricional de genes específicos por RNA de interferência (RNAi) comprovaram que esses compostos são reconhecidos por proteínas do sistema olfativo. (37-38)

Vários estudos demonstraram que o *R. prolixus* utiliza inúmeros compostos como sinais químicos, porém os mecanismos moleculares de como essa sinalização ocorre ainda não são totalmente conhecidos. Sabe se que esses sinais químicos são importantes para o comportamento normal do inseto, como por exemplo para encontrar alimento - sangue de vertebrados - para completar seu ciclo biológico. Se o comportamento normal dos triatomíneos for interrompido pela ação nessa via de sinalização, haverá uma redução na população de insetos (38). A melhor maneira de intervir nesses comportamentos é através do sistema olfativo, que é responsável e imprescindível para interação com o ambiente ao seu redor. (39)

1.4 Sistema Olfativo

Os semioquímicos, são moléculas hidrofóbicas que precisam atravessar um ambiente hidrofílico para gerar uma resposta adequada do sistema nervoso do inseto vetor. (24-25) Para tal, existe um sistema olfativo periférico composto de algumas famílias de proteínas e presente nas antenas.

As antenas dos triatomíneos, Figura 5, possuem 3 segmentos - escapo, pedicelo e flagelo - e nesses existem estruturas quitinosas, cuticulares, dotadas de poros, delicadas e semelhantes a fios de cabelo chamadas de sensilas. Apesar de apresentarem diferentes formas, tamanhos e números, por serem responsáveis por abrigar os dendritos dos neurônios sensoriais as sensilas compartilham organização e funções. (29,37,39,41) Na antena dos triatomíneos, podem ser encontradas sensilas envolvidas: na percepção de odorantes do meio externo (olfativas); na recepção de sinais mecânicos (mecanorreceptoras); na detecção de deformações na cutícula quando o inseto se movimenta, sendo críticas para que o inseto possa se movimentar de forma coordenada (*campaniformes*) (42) e; na percepção de mudanças térmicas e de umidade (termo-higro-recepção). (37) Foram descritos 4 tipos de sensilas olfatórias para triatomíneos, tricoides de paredes finas (TH), tricoides de paredes grossas (TK), basicônicas (BA) e brisas (BR). destacadas na Figura 5. (37)

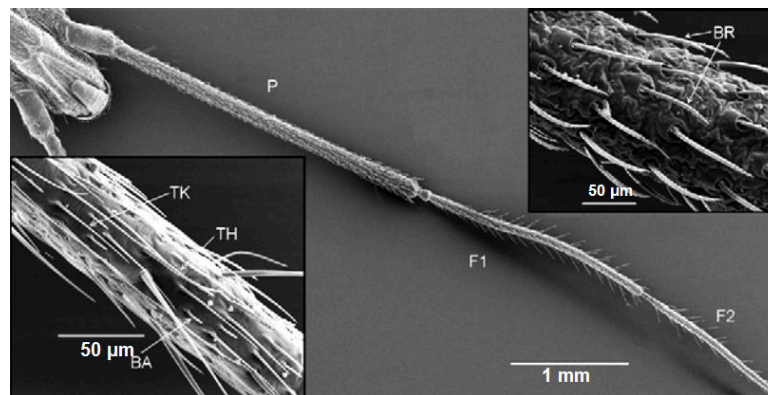


Figura 5 - Vista ventral por micrografia eletrônica de varredura da antena de um espécime adulto fêmea de *Rhodnius prolixus*. Segmentos da antena: pedicelo (P), segmento flagelar (F1 e F2) As inserções mostram os quatro tipos de sensila: tricoides de paredes finas (TH), tricoides de paredes grossas (TK), basicônicas (BA) e brisas (BR).

Fonte: Adaptada de ORTIZ et al. (37)

As sensilas olfativas são, portanto, responsáveis pela detecção dos semioquímicos no ambiente e consideradas como quimiorreceptores. A porosidade da cutícula das sensilas, permite que os semioquímicos alcancem o ambiente aquoso da linfa sensilar, nesse ambiente eles se ligam e são "solubilizados" por proteínas ligantes de odorante (do inglês, *odorant binding-protein*, OBPs), que são responsáveis por transportar e proteger, através da linfa sensilar, esses compostos hidrofóbicos do ambiente externo até os receptores de odorantes (*odorant receptors*, ORs), presentes nos dentritos sensores dos neurônios. (29,43) ORs são canais iônicos com sete domínios transmembrana - não homólogas as de vertebrados - que são co-expressas pelos neurônios olfativos (presentes nas sensilas tricóides e basicônicas) com um correceptor olfativo denominado ORCo. Esse heterodímero de estequiometria não conhecida forma canais iônicos não seletivos ativados por ligantes. Os ORs são responsáveis por conferir a especificidade desse heterodímero pois interagem com os ligantes, o que leva a transdução do sinal. (26-27,36,39,42) Além das OBPs e OR, existem mais 4 importantes proteínas do sistema olfativo periférico. (27)

As proteínas quimiosensoriais (do inglês, *chemosensory proteins*, CSPs), são encontradas na linfa sensilar apesar de não serem proteínas exclusivas das antenas. São proteínas de 12-13 kDa e possuem 4 cisteínas conservadas. Não são estruturalmente relacionadas as OBPs mas também tem a função de transportar odorantes, sendo capazes de se ligar a uma ampla gama de moléculas. Quando as CSPs são expressas em órgãos não sensoriais, parecem estar envolvidas em diferentes funções, como desenvolvimento e diferenciação. (27-28,39)

Os receptores ionotrópicos (*ionotropic receptors*, IRs), ainda não tiveram suas propriedades funcionais desvendadas, porém evidências indicam serem expressos em sensilas de parede dupla, tais como as sensilas celocônicas, o que sugere uma função de detecção de compostos nitrogenados, ácidos graxos de cadeia curta, aldeídos e ésteres. Alguns estudos confirmam a relação entre IRs e a detecção deste tipo de compostos e sua função como um quimiorreceptor cujo canal iônico é induzido por ligante. (27-28,39)

Alguns estudos suportam a função das proteínas da membrana do neurônio sensorial (*sensory neuron membrane proteins*, SNMPs), na comunicação química baseada em feromônios. Em *Drosophila melanogaster* foi demonstrado que uma SNMP é essencial para intermediar a interação entre um receptor e uma proteína ligante de feromônio (*pheromone-binding protein*, PBP). PBPs são consideradas um subgrupo da família de OBPs que se ligam

especificamente a feromônios e os transportam até receptores de feromônios (PRs). Segundo Jin *et al* 2008 (45), embora SNMP seja necessária para a sensibilidade ao feromônio de *D. melanogaster*, ela não é essencial para a sensibilidade de odorantes em geral. É possível que a sinalização de feromônios seja mais especializada que a de odorantes em geral, requerendo assim fatores adicionais, tais como SNMPs. Isso suporta a ideia de que SNMPs podem estar envolvidas, juntamente com o pH local, na liberação de feromônios das PBPs. A interação de OBPs e SNMPs é uma explicação alternativa para liberação dos odorantes das OBPs, que pode ocorrer em pH ácidos, básicos ou neutros. Nessa hipótese, o gatilho para a liberação do ligante poderia ser o estado ionizado do ectodomínio da SNMP - região da proteína que está exposta ao exterior da célula - que emergindo da superfície da membrana imporia sua própria influência eletrostática na liberação do ligante na vizinhança do OR. (29,45-47)

Por fim, as enzimas degradantes dos odorantes (*odorant-degrading enzymes*, ODEs) que são muito importantes para guiar o vôo dos insetos. A orientação de um inseto durante o vôo é guiada pela presença e concentração de odorantes. Este mecanismo requer que as moléculas odorantes sejam inativadas continuamente e rapidamente nas sensilas, em uma escala de milissegundos. Assim, logo que a mensagem é transmitida ao neurônio receptor ODEs degradam o semioquímico. Em um estudo cinético Ishida e Leal, 2005 (48), mostraram que o sinal emitido por um feromônio é terminado por degradação *in vivo*. Alguns estudos porém sugerem que fatores moleculares do processo de terminação e transmissão do sinal ainda não foram totalmente descobertos. (27,29,41,49)

A Figura 6 resume o processo molecular do sistema periférico olfativo de insetos, com a atuação de todas as proteínas até o momento identificadas.

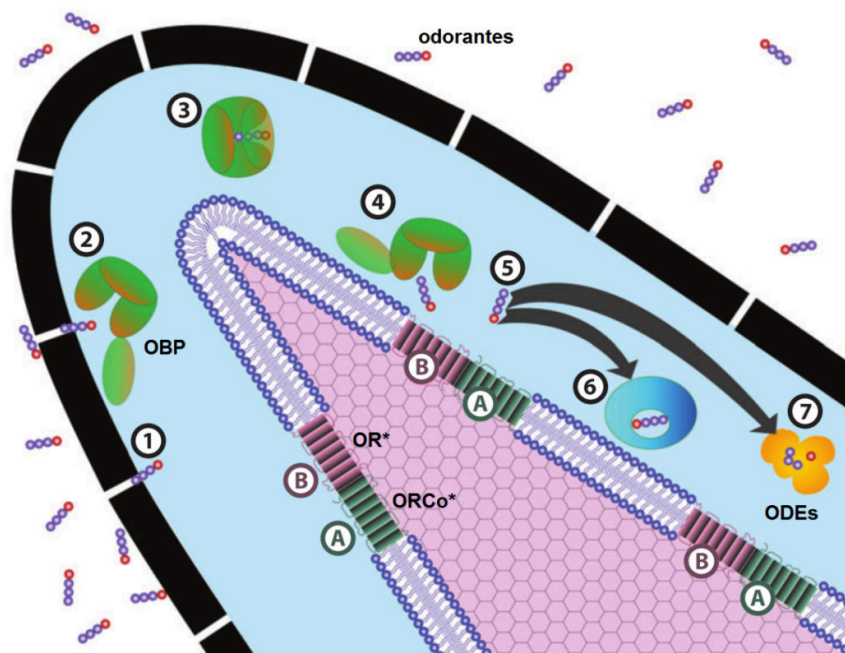


Figura 6- Esquema do mecanismo de ligação, liberação e degradação de semioquímicos. 1) odorantes atingem a linfa sensilar através dos poros da cutícula 2) e se ligam a OBPs. 3) Esse complexo é transportado através da linfa sensilar até atingir os ORs, 4) nesse exemplo é mostrado o modelo observado em *D. melanogaster*, no qual semioquímico e OBPs ativam juntos o OR; mas existem modelos descrevendo que apenas o odorante é capaz de acionar o OR. Os receptores são heterodímeros de estequiometria não conhecida com uma subunidade de ligação (A) e uma subunidade bem conservada do coreceptor ORCo (B). 5) Semioquímicos dispersos são inativados. Para esse processo existem duas hipóteses: 6) uma armadilha molecular até então desconhecida e/ou 7) a ação rápida de enzimas degradantes de odorantes. *estequiometria não conhecida.

Fonte: Adaptada de LEAL (27)

1.5 Proteínas Ligantes de Odorantes (OBPs)

A compreensão do comportamento de insetos depende fortemente do entendimento dos mecanismos moleculares fundamentais ao sistema olfativo; sendo essa informação importante para o desenvolvimento de algumas estratégias de controle dos vetores. Nessa conjuntura, a prospecção de novos atrativos ou repelentes capazes de intervir em respostas comportamentais dependentes do olfato pode ser realizada com base nessas interações moleculares entre semioquímicos e proteínas olfativas. (25,27-28)

Nesse contexto, como nenhum odorante se aproxima dos receptores olfativos, sem o auxílio de proteínas de ligação, OBPs, essas proteínas podem ser utilizadas como alvos para encontrar compostos comportamentalmente ativos - atrativos ou repelentes - em uma

abordagem denominada "ecologia química reversa" (37,48-49). Quando comparadas com ORs, as OBPs são um alvo mais acessível considerando que são proteínas menores, solúveis, estáveis e mais fáceis de serem alteradas geneticamente visando peptídeos com acréscimo ou decréscimo de alguma característica de interesse para seu estudo. Além do transporte das moléculas hidrofóbicas - semioquímicos - através do ambiente aquoso da linfa, OBPs também são responsáveis pelo reconhecimento, discriminação, desorção, vasculhamento (*scavenging*), proteção e possível seleção desses semioquímicos. (27–30,46,47,52)

As OBPs são proteínas solúveis, geralmente acídicas, pequenas - possuem entre 13 e 17 kDa - e são encontradas em altas concentrações na linfa sensilar, entre 10 e 20 mM, sendo capazes de se ligar a semioquímicos com constantes de dissociação em micromolares. (27–29,36,53–55)* A capacidade de ligação das OBPs não se restringe aos semioquímicos e inclui nutrientes, hormônios e compostos tóxicos ou nocivos. (28)

Em insetos as OBPs são as proteínas mais expressas nos tecidos olfativos (36), mas segundo estudos recentes não estão restritas a esse tecido, e podem estar envolvidas em outras funções fisiológicas. Dentre essas estão o acasalamento, embriogênese, absorção de nutrientes, resposta imune, regeneração, formação da casca dos ovos, resistência à inseticidas e ação anti-inflamatória em insetos hematófagos (30,55–60). Estudos comprovaram a presença de OBPs no veneno de certas vespas, cuja função foi especulada como carreadora de feromônios de alarme. (28)

Apesar da maior concentração de OBPs na linfa sensilar, conforme o conhecimento sobre essa família aumenta, fica claro que nem todas as OBPs estão associadas com órgãos sensoriais. Sua natureza simples e estrutura estável fazem com que essas proteínas sejam adaptáveis a diversas funções. (26,28,61)

Além da função olfativa, é bem documentada a função das OBPs no armazenamento de feromônios em glândulas e na sua liberação gradual. Uma sugestão é que talvez seja mais viável e fácil para que as células dos insetos regulem a expressão de uma única proteína, cuja ativação depende de um único gene, do que regular toda a síntese de um feromônio, que geralmente requer a ativação e expressão de diversas enzimas. (28) Para a espécie *Helicoverpa armigera*, uma das pragas mais importantes do algodão e outras plantações, a OBP 10 foi encontrada especificamente em órgãos reprodutores e glândulas de produção de

*Na antena da mariposa *Bombyx mori* apenas o subgrupo de PBPs apresenta essa concentração de 10-20 mM, ou 160 mg/mL (137).

feromônios. Essa localização sugere uma participação na liberação controlada de semioquímicos para o ambiente, corroborando a ação das OBPs em funções além da olfativa. Nesse mesmo inseto, a expressão das OBPs *HarmOBP 17* e *HarmOBP 18* foi descrita sendo muito variável em relação ao estágio de desenvolvimento, tecido e gênero do inseto (29,62). Uma investigação proteômica de *Anopheles gambiae* também mostrou diferenças de expressão de OBPs relacionadas ao gênero, sendo que as fêmeas expressam mais e em maior quantidade OBPs do que os machos, com 24 OBPs sendo identificadas em fêmeas e apenas 19 em machos. (26-27)

Em insetos, existe o mecanismo de proteínas de ligação que funcionam tanto como receptoras quanto como liberadoras de feromônios em tecidos olfativos e em glândulas sexuais. Porém, a existência de duas classes de proteínas, OBPs e CSPs, parece ser resultado do processo evolutivo, no qual, proteínas mais eficientes (OBPs) substituíram CSPs em funções críticas, como o reconhecimento de estímulos químicos. Essa hipótese é reforçada pela maior distribuição das CSPs em outros tecidos e pela sua vasta expressão em estágios de desenvolvimento específicos; além da provável participação na biossíntese de feromônios. (26,56-57) Ainda sim, algumas OBPs identificadas no esperma são transferidas para as fêmeas durante o acasalamento, provavelmente tendo um papel importante na comunicação entre esperma e óvulo, dentre elas estão: OBP 22 de *A. aegypti*, CSP 3 e OBP 9 de *Apis mellifera*, duas OBPs de *Tribolium castaneum* e a OBP 9 de *H. armigera*. (25 - 26,28,59)

Em relação a ação anti-inflamatória das OBPs em insetos hematófagos, é importante que os sintomas que aparecem após a picada - tais como inchaço, eritema, dor e coceira - sejam reduzidos pois podem causar uma reação do hospedeiro levando à interrupção da alimentação. Na saliva de *A. Gambiae* e *A. Aegypti* foram encontradas proteínas da família D7 (D7r) que contêm dois domínios de OBPs e funcionam independentemente atuando na redução da inflamação através da ligação de cisteinil-leucotrienos e de aminas biogênicas. Durante a picada, é importante diminuir a pressão da proboscis enquanto o inseto se alimenta, e já foi reportada essa ação para uma OBP de *Phormia regina*. Essa OBP está relacionada a nutrição tanto solubilizando nutrientes hidrofóbicos como agindo como surfactante na proboscis, além do mecanismo de liberação de nutrientes (ácidos graxos, lipídeos e carotenóides) no intestino devido a diminuição do pH local. (28,49,63-65)

O transcriptoma do intestino de *R. prolixus* também indicou que OBPs podem ser encontradas em tecidos não sensoriais, podendo estar associadas com o transporte de

nutrientes e outras moléculas envolvidas no funcionamento intestinal. Análises proteômicas e transcriptômicas combinadas, demonstraram que nem todas as OBPs previstas são expressas em órgãos sensoriais. Em *D. melanogaster*, por exemplo, foram descritas 51 possíveis OBPs, mas apenas 7 tiveram a expressão específica demonstrada em órgãos olfativos de adultos; e para *A. mellifera* apenas 12 de um total de 21 OBPs são expressas em órgãos de olfação. (26 - 27,64)

OBPs são expressas com um peptídeo sinal que é removido durante o processamento da proteína e que não é encontrado na forma madura. A sequência primária é muito divergente e a identidade de aminoácidos entre OBPs da mesma espécie pode ser menor que 10%. A correta designação de uma proteína para essa família é majoritariamente baseada no padrão das seis cisteínas cujas posições estão relativamente bem conservadas entre as ordens dos insetos.(29,61) Na Figura 7, pode ser observado um alinhamento de 9 OBPs de coleópteros, destacando as cisteínas e alguns resíduos conservados.

Além das cisteínas, a riqueza de α -hélices também é uma propriedade estrutural comum a essa família de proteínas. Essa é uma família com muitas proteínas diferentes devido à adaptação evolutiva dos insetos a habitats diversos com distintas moléculas de semioquímicos. Essa diversidade de OBPs pode também indicar a distinção entre diferentes ligantes ou diferentes maneiras de interagir com o mesmo ligante. (26,29,47)

Experimentos demonstraram que seis cisteínas formam três ligações dissulfeto interligadas em um arranjo que proporciona grande estabilidade à estrutura tridimensional da proteína, sendo esta uma característica conservada entre OBPs. Este padrão estrutural se tornou uma "assinatura" para OBPs clássicas de insetos. OBPs que apresentam apenas 4 ou 5 cisteínas receberam o nome de C-menos e possuem uma ligação dissulfeto a menos que as OBPs clássicas. O tipo C-mais, apresenta pelo menos oito cisteínas e uma prolina conservada depois da sexta cisteína. Uma outra família, inicialmente considerada uma família atípica de OBPs, encontrada em *D. melanogaster* tem estrutura dimérica formada por dois motivos das OBPs clássicas fusionados. Esta subfamília de OBPs, foi identificada apenas na família Culicidae, se mostrou na realidade um domínio duplo, provavelmente originado da fusão de duas OBPs clássicas, e portanto reconsideraram a existência delas como uma nova família e as incluíram como OBPs clássicas. (28–30,55,67–69)

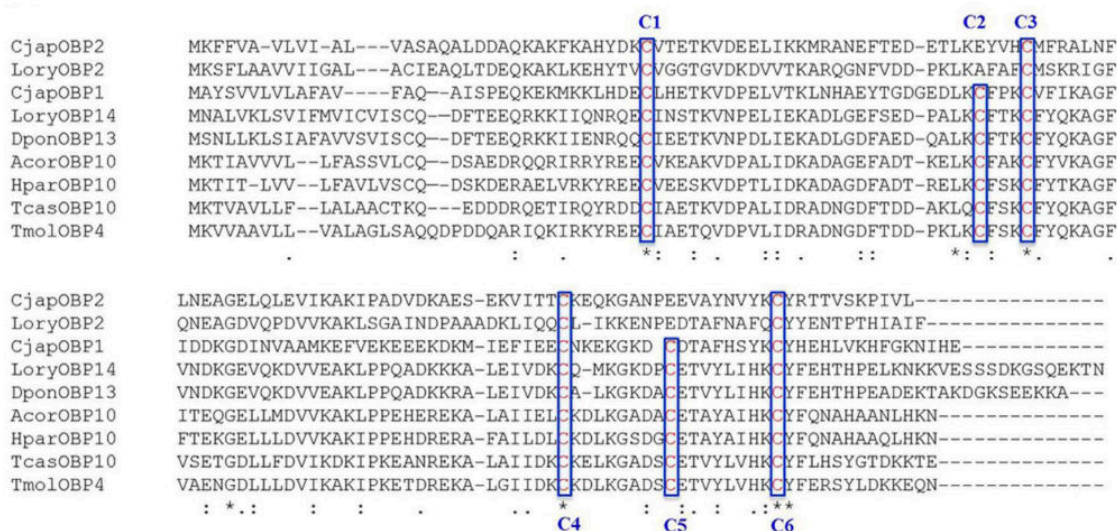


Figura 7 - Alinhamento de 9 sequências de OBPs de diferentes espécies de coleópteros, incluindo: *CjapOBP1* e *CjapOBP2* de *Cybister japonicus*, *LoryOBP2* e *LoryOBP14* de *Lissorhoptrus oryzophilus*; *TmolOBP4* de *Tenebrio molitor*; *TcasOBP10* de *Tribolium castaneum*; *AcorOBP10* de *Anomala corpulenta*; *HparOBP10* de *Holotrichia parallela*; *DponOBP13* de *Dendroctonus ponderosae*, destacando a posição das seis cisteínas que são conservadas nessa família de proteínas. A proteína *CjapOBP2* e a *LoryOBP2* são OBPs C-menos com apenas 4 cisteínas. Os asteriscos representam outros resíduos conservados.

Fonte: Adaptada de SONG et al. (70)

Além do número de cisteínas, o comprimento do C-terminal pode variar, e assim também varia o mecanismo de ligação dessas proteínas ao seus ligantes. PBP1 de *Bombyx mori* possui uma sequência C-terminal estendida que compete com o ligante pela cavidade de ligação. Caso o C-terminal tenha um comprimento médio, pode atuar como uma "tampa" sobre a cavidade de ligação como no caso da PBP1 de *A. mellifera*, e, em OBPs com um C-terminal curto, o sítio de ligação está aberto ao ambiente externo, como ocorre com a PBP de *Leucophaea maderae*. (28,68,71–73)

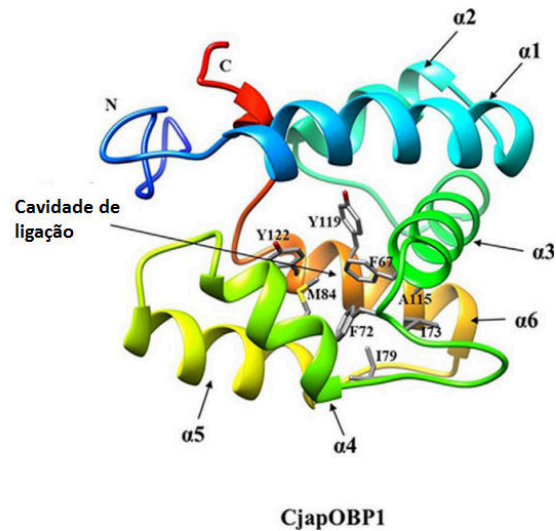


Figura 8 - Modelo da Estrutura 3D da OBP *CjapOBP1* de *Cybister japonicus* evidenciando as predominância de α -hélices ($\alpha 1$ a $\alpha 6$) na estrutura dessas proteínas, que concomitante com as ligações dissulfeto, são responsáveis pela estrutura compacta e grande estabilidade dessas proteínas. Os resíduos I79, I73, A115, F72, F67, M84, Y119 e Y122 são provavelmente os responsáveis pela ligação ao semioquímico.

Fonte: Adaptada de SONG et al. (70)

Além das cisteínas, uma segunda característica estrutural marcante são as α -hélices. Usualmente seis α -hélices enoveladas compõe as OBPs em uma estrutura globular compacta e estável, que também pode ser observada na Figura 8 (27 - 28,71). A presença dessas α -hélices sugere um encapsulamento dos semioquímicos hidrofóbicos e demais ligantes, pois a cavidade formada, na maioria das OBPs, é composta quase que exclusivamente de resíduos apolares, permitindo o transporte desses semioquímicos através de ambientes aquosos. É razoável, portanto, presumir que proteínas tão estáveis podem ser usadas em uma variedade de tecidos onde há necessidade de transporte, proteção ou mesmo para assegurar uma liberação gradual de semioquímicos no meio ambiente. (29)

Outra característica estrutural das OBPs é que geralmente apresentam um caráter ácido. A exceção é encontrada em dípteros, cuja variação de pontos isoelétricos (pI) é maior (entre 4 e 10), assim, as OBPs de dípteros podem ser positiva ou negativamente carregadas em pH fisiológico. (69) Para esse estudo em particular, é importante ressaltar que no genoma de *R. prolixus* também foram encontradas OBPs putativas com diferentes valores de pIs. (31)

O pI dessas proteínas é muito relevante no mecanismo de ação das mesmas, pois mudanças conformacionais pH-dependentes tem sido descrita. Em *BmorPBP1* de *Bombix*

mori foram descritos dois estados conformacionais distintos dependentes do pH. Essa proteína também apresentou afinidades diferentes pelo seu ligante, o feromônio bombicol, dependendo do pH. A alta afinidade encontrada no pH da linfa sensilar (~pH 7.0) está relacionada com a forma B, ou forma aberta, dessa proteína, que transiciona para a forma A, fechada, em pH mais baixo (~pH 4.0) (74). Resultados de NMR e difração de cristais da proteína obtidos em diferentes pHs sugeriram a seguinte função biológica para a mudança conformacional: a forma B da proteína se liga a bombicol no pH encontrado na linfa sensilar. *BmorPBP1* transporta o feromônio até as proximidades do OR, na membrana dos neurônios sensores, onde o pH é reduzido. Isso gera sua mudança conformacional para a forma acídica A de *BmorPBP1*, na qual o feromônio é liberado pela invasão da cavidade de ligação pela formação de uma sétima α -hélice. (29,53,64) A formação da α -hélice para a proteína *BmorPBP1* se deve a resíduos na extremidade C-terminal, majoritariamente não polares e 3 resíduos ácidos que interagem com histidinas protonadas. Esse mesmo mecanismo foi demonstrado para outras espécies com diferentes resíduos, e foi chamado de *switch* de protonação de histidina. Esse mecanismo fornece forças estabilizantes para que a hélice C-terminal se insira na cavidade de ligação pela formação de pontes de sal que, em pH neutros são desfeitas devido a desprotonação das histidinas. (27,29,75)

Outros mecanismos também foram descritos para OBPs de lepidópteras, que majoritariamente servem para localizar parceiros sexuais e encontrar plantas para oviposição. No caso da PBP1 de *Antheraea polyphemus* (*ApolPBP1*) há uma reorientação das hélices $\alpha 1$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$ pela protonação de outros resíduos de histidina em pHs ácidos. Essa mudança faz com que a cavidade se abra e libere o ligante perto da membrana do neurônio. Uma torção em $\alpha 3$ num pH neutro faz com que um resíduo ocupe parte do sítio de ligação, porém em pH ácido a hélice perde essa torção e a cavidade fica livre. Gong *et al* 2009 (76), também descreveu um mecanismo de ligação de duas fases, uma rápida e outra lenta, no qual depois de uma rápida interação inicial o ligante se acomoda melhor na cavidade formando um complexo mais estável. (26 - 27,61,73 - 74)

Diferente de lepidópteras, a maioria das OBPs de dípteras não possuem um C-terminal longo, capaz de competir com o sítio de ligação do ligante. Mudanças conformacionais sensíveis ao pH e associadas com perda de afinidade foram associadas com as OBPs *AgamOBP1* (*Anopheles gambiae*), *AaegOBP1* (*Aedes aegypti*) e *CquiOBP1* (*Culex quinquefasciatus*). Para *CquiOBP1* foi sugerido que ela não reconhece especificamente o grupo funcional de seu ligante, mas o comprimento da cadeia lipídica que se acomoda no seu

túnel hidrofóbico funcionando como um amplo filtro de seleção. Esse mesmo túnel foi reportado para *AgamOBP1*, mas a interação proteína-ligante se mostrou bem diferente. A *AgamOBP1* foi cristalizada como uma OBP dímera com um único túnel de ligação através das duas subunidades. O mecanismo descrito sugere que uma diminuição do pH causa uma abertura do C-terminal, deixando o túnel de ligação aberto ao solvente e diminuindo a afinidade ao ligante. Leite *et al* 2009 (78) descreveram que a região C-terminal dessas proteínas age como uma "tampa" sobre a cavidade de ligação, cuja a dobradiça é sensível ao pH. (29,63,78,79)

Para a OBP ASP1 de *A. mellifera* -ordem himenóptera - a dependência do pH ocorre de forma contrária. Em pH 4,0 a ASP1 apresenta alta afinidade pelo feromônio emitido pela abelha rainha, enquanto em pH neutro essa afinidade é dez vezes menor. Os autores sugeriram que em pH neutro o C-terminal pode recrutar o N-terminal de outra ASP1 e formar um dímero estável. Embora o C-terminal obstrua a cavidade de ligação em pH neutro, em pH ácido ASP1 monomérica ou em complexos assume diferentes volumes para essa cavidade dependendo da forma do ligante, permitindo a ligação em pHs mais baixos. Foi observado também que o pH influencia na protonação e desprotonação da proteína. Essas mudanças afetam a flexibilidade da proteína, mas não os ligantes que interagem com ASP1 em si. Essa diversidade de pHs que desencadeiam a liberação do ligante, suscitou a questão de se apenas a queda de pH na vizinhança da membrana seria suficiente ou se existem outros fatores. Um desses fatores poderia ser a ionização de SNMPs, citado anteriormente. (27,76-77)

Esses estudos evidenciaram que uma mudança conformacional dependente do pH está presente em diferentes classes de insetos e afetam a afinidade dessas OBPs com os seus ligantes. A variedade de maneira que essa interação entre OBP e ligante ocorre em diferentes grupos é consistente com a diversidade das espécies de insetos. A atividade de ligação de OBPs à pequenos compostos orgânicos, como feromônios e outros semioquímicos, é a característica-chave dessas proteínas e fornece informações essenciais para a compreensão de sua função fisiológica.. (24-25,65,75)

A especificidade de ligação das OBPs de insetos não foi conclusivamente comprovada. PBPs, pelo menos de lepidópteras, apresentaram grande especificidade em relação aos feromônios. Um estudo realizado por Forstner *et al.* 2009 (46) evidenciou o possível papel de seletividade das OBPs. Estudando PBPs de *A. polyphemus* obtiveram resultados que indicavam uma interação específica entre feromônios, proteína de ligação

correspondente e seu subtipo de receptor relacionado, que pode ser considerado como base para um sistema de detecção de feromônios com notável sensibilidade e especificidade (46). Também existem em machos dessa mesma espécie neurônios com maior especificidade, cujos OR reconhecem feromônios definidos, garantindo assim que proporções específicas de uma mistura de feromônios sejam detectadas. (29)

Apesar desses resultados que indicam especificidade de ligação, outros estudos indicam que PBPs podem se ligar a odorantes em geral além dos componentes dos feromônios e seus análogos. E, em alguns casos, proteínas ligadoras de odorantes em geral (*general odorant binding protein*, GOBP) que parecem ter afinidade por uma grande gama de ligantes mais do que especificidade, apresentam preferência por algum feromônio sexual. (74,76,82-83)

Em relação a ativação dos receptores olfativos, as OBPs podem modular a resposta dos ORs, porém os mecanismos dessa interação ainda não foram detalhados. Até esse momento existem duas hipóteses mais relevantes. Uma hipótese é de que as OBPs atuam como carreadoras passivas e que o ligante *per se* ativa seu OR. A segunda hipótese sugere que em alguns casos OBPs possuem um papel mais direto, sendo que o complexo OBP-ligante é especificamente necessário para a ativação do OR (26-27,50). A primeira hipótese é sustentada por experimentos *in vitro* em que ORs são ativadas pelos ligantes na ausência de OBPs. E a segunda por exemplos como a OBP *LmaPBP*. Lartigue *et al.* 2004 (72) demonstrou que a proteína *LmaPBP* tem uma cavidade com uma quantidade significativa de resíduos polares ou carregados, diferente do que é apresentado pela maioria das OBPs mas coerente com a natureza hidrofílica do feromônios dessa espécie. Essa hidrofílicidade questiona o papel das OBPs como transportadores passivos, e reforça a hipótese da ativação dos OR através de um complexo OBP-odorante. (52,72)

Esses neurônios que expressam ORs de feromônios se estendem até o complexo macrogglomerular no cérebro do inseto, aonde a informação do feromônios é transmitida adiante elicitando uma resposta comportamental. Em contraste, neurônios mais generalistas expressam outros ORs que detectam semioquímicos em geral, e o código de cada um é transmitido para diferentes áreas no cérebro. (29,84)

As diferentes respostas comportamentais geradas depois da percepção desses sinais são de interesse para controlar populações de insetos. Sejam eles vetores, como o *R. prolixus*, ou que tenham algum comportamento nocivo, como as pragas agrícolas.

1.6 Aplicações biotecnológicas de OBPs.

Além do controle comportamental de populações de insetos, OBPs podem ser utilizadas para diversas aplicações biotecnológicas, pois são capazes de interagir com uma vasta gama de ligantes em uma escala micromolar, além de serem resistentes a degradação térmica e proteolítica. Dentre as aplicações, OBPs podem ser usadas como biossensores de monitoramento ambiental, vasculhadores de poluentes ou outros compostos nocivos, sensores ópticos, detectores eletrônicos, colunas cromatográficas, armadilhas para capturar odores (deodorantes) e como liberadores controlados de químicos para o meio ambiente. (30,85) A disponibilidade de informações estruturais sobre essas proteínas torna mais fácil a síntese de mutantes com características interessantes para aplicações biotecnológicas. Além disso, OBPs são excepcionalmente estáveis, economicamente acessíveis de serem expressas de maneira recombinante e purificadas. (28,61)

A mimetização da olfação biológica através das OBPs pode ser usada para construção desses biossensores, que são mais promissores que os atuais "narizes eletrônicos" em relação a sensibilidade, seletividade e tempo de resposta. Larisika e colegas, 2015 (85), construíram um biossensor com a OBP14 de *A. mellifera* e um transistor de óxido de grafeno capaz de monitorar um amplo espectro de odorantes em soluções aquosas sabidamente atrativas para abelhas. Essa ampla especificidade das OBPs é requerida para aparelhos de detecção, que podem ser otimizados com uso simultâneo de diferentes OBPs combinadas ou com a modelagem de mutantes desejados. Outra maneira de detectar compostos orgânicos voláteis é o uso de microbalanças de quartzo, cuja massa aumenta com a ligação desses compostos e assim a frequência de ressonância diminui. Ao selecionar diferentes revestimentos no cristal de quartzo, os sensores podem ser sensibilizados a propriedades moleculares particulares, tais como polaridade, polarização, forma e volume. (54,61,85)

A OBP1 de *Sus domesticus*, foi utilizada para controle e liberação gradual de uma fragrância de uma superfície têxtil catiônica. Essas OBPs foram testadas e aprovadas pela sua capacidade de reter citronela e mascarar o cheiro da fumaça do cigarro. Esse controle de odores pode ser utilizado em materiais têxteis com aplicações cosméticas ou médicas. (86) Essa liberação gradual, que pode ser utilizada para outras funções, pode ser mais controlada com o uso de OBPs resultando em uma mistura mais complexa. (61)

O uso das OBPs se mostrou viável para química analítica. Duas OBPs derivaram colunas de cromatografia, a PBP1 de *B. mori* e a OBP1 de *C. quinquefasciatus*. Essas colunas são de fácil preparo -devido a alta estabilidade das OBPs e podem ser utilizadas várias vezes com extensivas lavagens com soluções tamponantes que podem conter solventes orgânicos. A imobilização dessas OBPs não afetou a capacidade de ligação, tampouco a afinidade dependente do pH. Portanto a variação de pH pode ser usada para eluir gradualmente ligantes aderidos à coluna. Essas colunas poderiam, se adequadamente utilizadas, resolver misturas racêmicas de compostos naturais. A vantagem das OBPs, além das outras proteínas que também poderiam diferenciar enantiômeros, é que elas têm demonstrado excepcional estabilidade para desnaturação térmica e degradação proteolítica. (61,67,87)

Embora OBPs tenham tantas possibilidades de utilização, a motivação desse estudo veio do custo humano e social que doença de Chagas representa. Essa doença é um problema de saúde pública e as dificuldades de interrupção definitiva da transmissão decorrem de um panorama epidemiológico complexo de endemismo e hipoendemismo. O que requer um investimento pelas autoridades e pesquisadores, no conhecimento da dinâmica populacional, da ecologia e do comportamento não apenas dos vetores primários, como também dos vetores silvestres. Existem outros desafios, tais como a resistência à inseticidas e uma preocupação ambiental considerando o uso de pesticidas e seus efeitos adversos na saúde humana e no meio ambiente. Por isso é importante identificar alternativas seguras para controlar espécies de insetos prejudiciais, sejam elas pestes agrícolas ou vetoras de doenças (38). Para a espécie *A. aegypti* já existem diversos tipos de compostos usados para controlar sua população. Tais compostos podem prevenir que as fêmeas se alimentem, conseqüentemente que se reproduzam e que ovipositem, ou podem ser agentes que matam ou inibem o desenvolvimento dos ovos ou larvas. (88)

Comportamentos do *R. prolixus*, como procura de comida, acasalamento, escolha de sítios de oviposição, fuga de predadores entre outros, dependem quase que exclusivamente da interpretação de sinais químicos provindos do ambientes. (29,38,75) Como a comunicação química desempenha um papel fundamental na vida desses insetos pode ser manipulada com semioquímicos sintéticos para guiar seu comportamento de acordo com os interesses sociais. Diminuir o número desses insetos através da captura massiva através de armadilhas com iscas de semioquímicos atraentes ou a proteção do indivíduo com o uso de repelentes são abordagens ecologicamente amigáveis de diminuir o número de insetos transmissores, monitorando e manejando seus níveis populacionais. (78,88)

Embora OBPs também possam ser encontradas em vertebrados, elas pertencem a família de lipocalinas e não apresentam semelhança estrutural com as OBPs de insetos que são enoveladas em α -hélices. As OBPs de vertebrados são dobradas em oito fitas β -antiparalelas e um curto segmento de α -hélice, na típica estrutura β -barril de lipocalinas. Ambos os tipos se apresentam extremamente estáveis a temperatura, solventes orgânicos e digestão proteolítica. É possível estabelecer um paralelo entre algumas funções que foram descritas para ambas, como a solubilização de ácidos graxos da dieta e pelo papel duplo de transmissoras e receptoras de mensagens químicas relacionadas ao acasalamento. (28,54,89)

As diferenças estruturais entre as OBPs humanas e de insetos, fazem com que as OBPs de *R. prolixus* sejam um bom alvo para intervir no comportamento do inseto vetor, já que seus compostos ativos não serão os mesmos que ativarão as lipocalinas de mamíferos.

Outra grande vantagem ao se utilizar OBPs como alvo, é a possibilidade de haver uma intervenção espécie específica. As análises de OBPs de genomas 12 de *D. melanogaster* sugeriram que é possível que as diferenças comportamentais e ecológicas entre espécies de insetos possam afetar não apenas os semioquímicos que são capaz de perceber, mas também como eles detectam e processam esses compostos. (29)

O comportamento de *R. prolixus* já foi afetado através do sistema olfativo. Porém a intervenção foi feita na expressão gênica e não nas proteínas diretamente. Franco *et al.* 2016 (38), silenciaram o gene do correceptor do receptor olfativo (*RproOrco*), que interferiu nas seguintes funções biológicas: perda da capacidade de encontrar um hospedeiro vertebrado em tempo hábil, o que refletiu na diminuição do volume de sangue ingerido, no atraso e diminuição da taxa de muda, no aumento da taxa de mortalidade e na diminuição da oviposição. Isso diminui o contato do vetor com o hospedeiro humano, reduzindo a possibilidade de transmissão da doença de Chagas. (38)

Isso mostra que o sistema olfativo, especificamente as OBPs, são um alvo em potencial para controlar populações de triatomíneos e, abre novas possibilidades para o controle de vetores transmissores de doenças. Assim, foram identificadas três proteínas ligadoras de odorantes no genoma de *R. prolixus* (*RproOBPs*), para serem expressas de maneira recombinante e purificadas. As *RproOBPs* serão então caracterizadas biofisicamente, afim de elucidar características sobre sua estrutura e função.

2 OBJETIVOS

Tendo em vista as potenciais aplicações biotecnológicas de OBPs, este projeto tem por objetivo identificação e caracterização de OBPs de *R. prolixus*.

Os objetivos específicos do projeto são:

1. Identificar candidatos a OBPs do genoma de *R. prolixus*.
2. Clonar e expressar de forma recombinante das OBPs identificadas.
3. Caracterizar biofísicamente essas OBPs.

3 MATERIAL E MÉTODOS

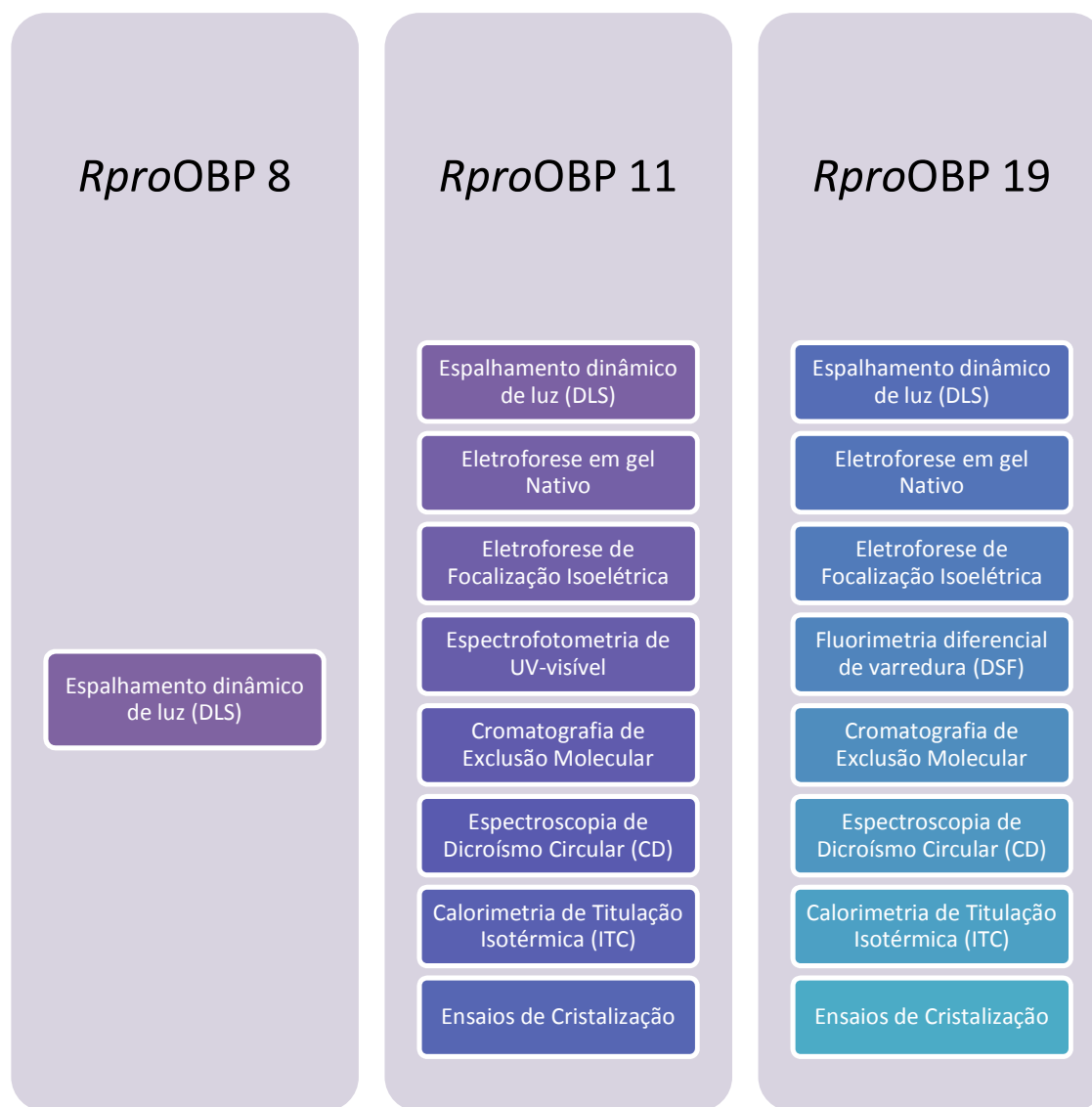


Figura 9 - Organograma dos experimentos realizados com as *RproOBPs*.

Elaborado pela autora.

3.1 Busca e Análise das *Rpro*OBPs através de programas de Bioinformática

O uso de programas de bioinformática tem se mostrado útil na investigação funcional de proteínas e como guia de trabalhos experimentais. Para a escolha das proteínas desse trabalho, foi utilizado um banco de dados cujas ferramentas de bioinformática são voltadas para vetores invertebrados de patógenos para humanos, o VectorBase (<https://www.vectorbase.org/>). (90)

As busca por proteínas ligadoras de odorantes de *Rhodnius prolixus* (*Rpro*OBPs) foi realizada empregando inicialmente o descritor "odor binding protein" e a ferramenta "Genome Browser" disponível nesse banco de dados, especificando proteínas do vetor. Em seguida, sequências de candidatos a *Rpro*OBPs identificadas foram comparadas a sequências de OBPs conhecidas por alinhamento de sequência no programa BLASTP (91), e as três proteínas que obtiveram mais confiança no alinhamento (menor E-value e maior cobertura de sequência) foram selecionadas.

As sequências codificadoras para cada uma das *Rpro*OBPs selecionadas foram sintetizadas pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT).

Em seguida, com base na sequência primária das *Rpro*OBPs selecionadas, foi realizada uma análise da estrutura primária assim como predições de estrutura secundária e terciária utilizando programas de bioinformática descritos a seguir.

3.1.1 Análise da composição de aminoácidos e ligação dissulfeto

Para computar parâmetros físicos e químicos das OBPs foi utilizado o programa ProtParam do servidor ExPaSy. (92) Então o programa DISULFIND (93) foi usado para estimar a probabilidade das cisteínas estarem formando ligações dissulfeto para formação e manutenção da estrutura terciária dessas proteínas.

3.1.2 Predição de Estrutura Secundária e Terciária

O servidor PSIPRED (94) foi utilizado para predição da estrutura secundária (PSIPRED), de desordem (DISOPRED) e de domínios (DomPred) com os parâmetros padrão do servidor. Para confirmar os resultados de estrutura secundária, foi utilizado o programa GOR4 do Prabi-Gerland Rhone-Alpes Bioinformatic Pole Gerland Site. (95)

Adicionalmente, para corroborar com resultados experimentais, os programas GlobPlot2 (96), RONN (97), MFDp (98), DisEMB (99), FoldIndex (99), Sprints (100), ESpritz (101) e Sprints (102) foram utilizados para analisar a *RproOBP* 19 como uma possível proteína com regiões intrinsecamente desordenadas, comparando os resultados com os obtidos para as demais OBPs.

O programa I-TASSER foi utilizado para obter uma estimativa da estrutura terciária das OBPs. (101-102) Os parâmetros utilizados eram o padrão do programa.

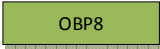




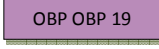

3.2 Obtenção de *RproOBPs* recombinantes

3.2.1 Obtenção das construções gênicas em vetores de propagação

As sequências gênicas selecionadas foram sintetizadas pela empresa IDT com a otimização para códons raros de *Escherichia coli*, e adicionando as extremidades dessas sequências, sítios de restrição para as enzimas *Xho*I (C/TCGAG) e *Nco*I (C/CATGG). Oligodesoxirribonucleotídeos (SIGMA) foram sintetizados para amplificar esses fragmentos e para realizar alterações nas construções conforme os resultados experimentais foram indicando melhores formas para se obter a proteína solúvel e em concentração suficiente para ser analisada biofísicamente (Tabela 1).

A amplificação do número de fragmentos foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (em inglês, *Polimerase Chain Reaction* - PCR), nas condições da Tabela 2 e com o ciclo esquematizado na Figura 10.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados nas clonagens das *RproOBPs*

Proteína	Construção	Oligonucleotídeo 5'	Oligonucleotídeo 3'
<i>RproOBP</i> 8		ACTGACTCCATGGAAG	AGTCAGTCTCGAGTTACT
		ACATGGAAGTTTG	AGAAATAGATATGCTTGT TGAC
		CCGGATCCACACCACCA	CCCTCGAGCGACTGAAA
		CCACCACCACGAAAAC	GTATAAGTTTTCGAAATA
		TTATACTTTCAGTCGAT	GATATGCTTGTTGAC
		GGAAGACATGGAAGTT TG	
	CAGGGCGCCATGGAAG	GACCCGACGCGGTTAGA	
	ACATGGAAGTTTGTAAC	AATAGATATGCTTGTGA CTTCTTCCG	
	AAC		
<i>RproOBP</i> 11		ACTGACTCCATGGAAAC	AGTCAGTCTCGAGTTACT
		TATCGCTGTTATCGC	AAGGGCGGGTAAACGC
		CAGGGCGCCATGTTCCGAG	GACCCGACGCGGTTAAG
		CCATTCTCCGGAAGTGG	GGCGGGTAAACGCACAG C
<i>RproOBP</i> 19		ACTGACTCCATGGGTTA	AGTCAGTCTCGAGTTACT
		CTACCTGCCGG	ATTTTTTCGCGTAATCG
		CAGGGCGCCATGCTGG	GACCCGACGCGGTTATTT
		ATGAAAACGTAAAGGA CAAGATCCTGG	TTTCGCGTAATCGTGGGA GC

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 - Condições da reação para amplificação dos genes

Reagentes	Volume (µL)
Tampão 10x [50 mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 8.4]	5
MgCl ₂ [25mM]	4
dNTP [10mM]	1
Oligonucleotídeo 5' [10µM]	1
Oligonucleotídeo 3' [10µM]	1
DNA molde (5 - 50 ng de DNA)	-
<i>Phusion High-Fidelity</i> DNA polimerase (Thermo Scientific)	0,25
H ₂ O (tipo Milli-Q) para volume final de	50

Fonte: Elaborada pela autora.

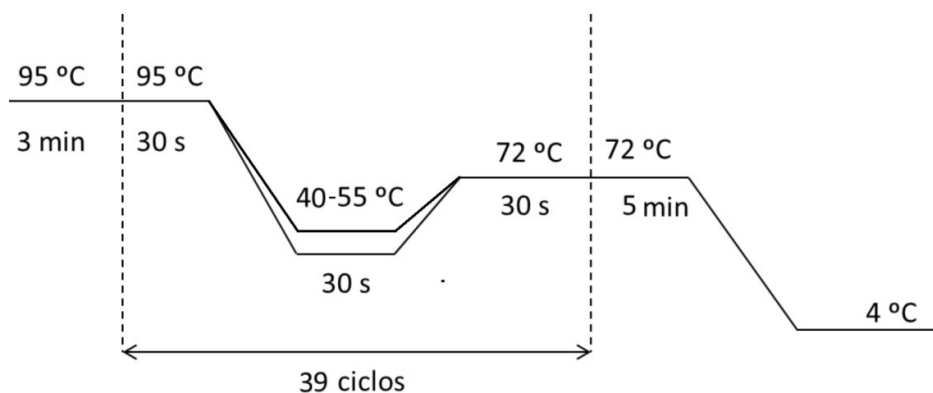


Figura 10 - Representação Esquemática da Reação de amplificação dos genes das OBPs selecionadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado da amplificação foi analisado por gel-eletroforese em agarose 1% com corante SYBR Safe (1 μ L/10mL, ThermoFisher Scientific), em tampão TAE 1x (8mM Tris-acetato pH 8,0; 0,2 mM EDTA). Foram aplicados 2 μ L de cada PCR no gel. O restante das reações foram purificados com o PCR Purification Kit (Jena Bioscience), seguindo o protocolo do fabricante.

A clonagem dos genes das *RproOBPs* em vetores de expressão seguiram um protocolo de duas etapas. Primeiro os fragmentos de PCR amplificados foram clonados em vetor pGEM®-T Easy (Promega Corporation) (Figura 11). Do vetor pGEM-T Easy as sequências foram clivadas com enzimas de restrição específicas e clonadas nos vetores de expressão desejados.

Assim, para que os fragmentos do gene fossem ligados corretamente ao vetor, as extremidades 3' tiveram a adição de uma adenina. A adenilação dos fragmentos ocorre incubando-os com a enzima Taq polimerase, 2U (ThermoFischer Scientific) e seu tampão (500 mM KCl, 200 mM Tris HCl pH 8.4, ThermoFischer Scientific), na presença de 1 μ L de 100 mM dATP's (desoxiAdenosina Trifosfatada), por 15 minutos á 72°C. Os fragmentos adenilados dos genes de interesse são então incubados 16-19 horas com o vetor de propagação pGEM®-T Easy na presença de 1,5 μ L da enzima T4 DNA ligase (ThermoFischer Scientific) e seu tampão 1x (66 mM Tris-HCl pH 7.6; 10 mM DTT; 6,6 mM MgCl₂ e 66 μ M ATP). A reação de ligação foi então introduzida em bactérias *Escherichia coli* quimiocompetentes ou pelo método de eletroporação

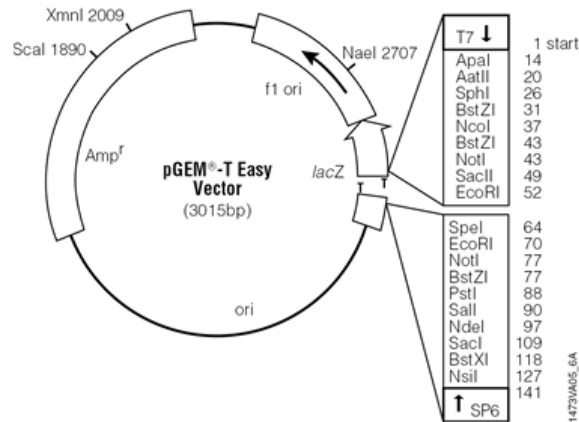


Figura 11- Esquema do vetor pGEM®-T Easy da empresa PROMEGA. Esse vetor já vem linearizado com 3'-T overhangs no site de inserção para fornecer uma complementaridade compatível para produtos de PCR.

Fonte: PROMEGA (105).

3.2.2 Clonagem e Transformação de linhagens de propagação de *Escherichia coli* por choque térmico

Os dois métodos de transformação de bactérias utilizados nesse trabalho foram: choque térmico e eletroporação em células competentes. O primeiro foi aplicado para linhagens de propagação e o segundo para linhagens de expressão (Tabela 4).

A transformação de bactérias se inicia no tratamento dessas células para que elas estejam aptas a receber um DNA exógeno. Para que as células sejam transformadas por choque térmico, elas são tratadas quimicamente e portanto dizemos que as células resultantes são quimiocompetentes. Células de *E. coli* TOP 10 e DH5 α , linhagens capazes de replicar alto número de cópias de um mesmo plasmídeo, cresceram em 5 mL de meio TYM (20 g triptona, 5,8 g NaCl, 5 g extrato de levedura e 2,5 g MgSO₄.7 H₂O, para 1 L) 16 horas á 37°C. . Essa cultura foi diluída 1:100 em 10 mL de meio TYM e incubada nas mesmas condições até atingir a DO₆₀₀ entre 0,2 e 0,6. Por sua vez essa cultura é diluída em outros 40 mL de TYM até atingir DO₆₀₀ entre 0,5 e 0,9. Finalmente os 50 mL resultantes são então diluídos em 200 mL de TYM e incubados até DO₆₀₀ 0,6. A cultura é rapidamente esfriada em um banho de gelo, e deve permanecer no gelo durante todo procedimento a partir desse ponto. As células são concentradas por centrifugação á 4000 rpm por 15 minutos á 4°C. Suspendidas em 100

mL de TBF 1 (0.03 M KOAc, 0.05 M MnCl₂, 0.10 M KCl, 0.01 M CaCl₂ e 15% glicerol). Centrifugadas por 8 minutos à 4000 rpm e 4°C, e depois gentilmente suspensas em 100 mL de TBF 2 (0.01 M MOPS, 0.01 M KCl, 0.075 M CaCl₂.2H₂O e 15% glicerol). As células são então, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido em alíquotas de 100µL e armazenadas à -80°C.

Essas células quimiocompetentes são descongeladas no momento do uso e misturadas com 0,05 µg - 0,20 µg de DNA plasmidial. São mantidas no gelo por 20 -30 minutos seguidas de choque térmico à 42°C por 2 minutos. É adicionado 1 mL de meio LB (10 g triptona, 5 g extrato de levedura, 10 g NaCl para 1 L, pH ajustado para 7,5) e as células são incubadas por 1 hora à 37°C. Entre 100 e 200 µL dessa suspensão de células é aplicada em placas de Petri com meio LB-sólido (10 g triptona, 5 g extrato de levedura, 10 g NaCl e 15g Agar Bacteriológico para 1 L volume final, pH ajustado para 7,5) e os antibióticos e marcadores adequados, mantendo se incubada à 37°C durante 12 - 16 horas. No caso de produtos de ligação, a suspensão de células foi centrifugada, o sobrenadante descartado, e foi aplicado na placa todo o conteúdo de células.

Para a seleção das colônias transformantes, o vetor pGEM-T Easy tem a vantagem de possibilitar a seleção dos clones fenotipicamente por beta-complementação funcional. A presença de lactose ao entorno da célula de *E. coli*, causa uma resposta de ativação do operon lacZ, produzindo a enzima β-galactosidase, capaz de clivar lactose em glicose e galactose. O vetor pGEM tem o gene codificante para a β-galactosidase, porém quando a clonagem é bem sucedida, o gene de interesse interrompe o gene da β-galactosidase, e a enzima funcional não é produzida. Para que essa seleção seja feita fenotipicamente é utilizado 50 µg/ml do cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo (X-Gal) e 0,16 mM/mL do indutor de expressão Isopropil β-D-tiogalactosídeo (IPTG).

O IPTG é um análogo da lactose que ativa a expressão de genes que estão sob controle do operon lac ao se ligar ao repressor lacI e alterar sua conformação. Porém, diferente da lactose, o IPTG não é hidrolisado pela β-galactosidase e sua concentração permanece constante, sempre ativando a expressão dos genes que estão sob controle do operon lac, incluindo a β-galactosidase.

O cromogênico X-gal é substrato para essa mesma enzima e forma o composto 5-bromo-4-cloro-indoxilo, que dimeriza espontaneamente para produzir um pigmento azul insolúvel chamado 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo. Assim, com esses dois compostos no

meio de cultura, as células são constantemente estimuladas a produzir mais β -galactosidase que é capaz de hidrolisar mais X-gal, gerando mais pigmento azul nas células não recombinantes.

Resumindo, colônias formadas por células não recombinantes aparecem com a cor azul, pois possuem a enzima β -galactosidase que irá hidrolisar o composto X-gal resultando no pigmento azul, enquanto as recombinantes parecem brancas. As colônias recombinantes desejadas podem ser facilmente escolhidas visualmente.

Para confirmar a presença de DNA inserido no vetor, algumas colônias brancas foram selecionadas analisadas por PCR, semelhante ao descrito na Tabela 2. Para tanto, as colônias são suspensas em 10 μ L de água Milli-Q e 1 μ L é utilizado como fonte de DNA molde. O resultado foi analisado em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X com SYBR Safe.

Os plasmídeos pGEM-T Easy contendo as *RproOBPs* de interesse foram purificados usando o kit *GenElute™ Plasmid Miniprep* (SIGMA) e digeridos com as enzimas de restrição *XhoI* e *NcoI*, segundo a reação na Tabela 3, a 37°C por 2 horas.

Tabela 3 - Digestão Dupla do vetor de propagação com os genes de interesse, utilizando as enzimas *XhoI* e *NcoI* da empresa ThermoScientific.

Reagentes	Volume (μ L)
10X Tango Buffer (330 mM Tris-acetato pH 7.9, 100 mM acetato de magnésio, 660 mM acetato de potássio, 1 mg/ml BSA)	2
<i>XhoI</i>	1.0 - 2.0
<i>NcoI</i>	0.5 - 2.0
DNA, 1mg	-
H ₂ O ultrapura (tipo milli-Q) q.s.p.	20

Fonte: Elaborada pela autora.

O produto da digestão foi aplicado em um gel de agarose 1% e a banda correspondente ao gene de interesse foi purificada com kit de *Extração de gel de agarose* da Jena Biosciences. Esse DNA foi quantificado e armazenado à -20 °C até o momento que foi ligado aos vetores de expressão. O vetor pETTrx_1a/LIC é um plasmídeo que dispensa a etapa de clonagem em vetores de propagação, e portanto não passou pelo processo descrito acima.

3.2.3 Clonagem dos genes em vetores expressão

O sistema de vetores pET (Novagen) foi desenvolvido por Studier e Moffatt (106) na década de 1980 para clonagem de proteínas recombinantes em *E. coli*. Quando os genes de interesse são clonados nos plasmídeos pET, eles permanecem sob forte controle do promotor T7, presente nesses vetores. Na ausência do agente indutor, nesse caso IPTG, a célula não produz a proteína de interesse - embora, as vezes possa ocorrer um "vazamento" da expressão da proteína. A T7 RNA polimerase tem alta especificidade ao promotor T7 é provida pela linhagem de células de expressão. Devido a alta atividade e especificidade dessa polimerase, quando totalmente induzida, praticamente todos os recursos da célula são destinados a produção da proteína heteróloga (107). O uso de diferentes plasmídeos pET permitem que diferentes peptídeos sinais sejam incorporados as proteínas de interesse.

As clonagens nos vetores: pET22, pET28 e pET32 (Tabela 4) requereram que os mesmos fossem digeridos com as mesmas enzimas e nas mesmas condições que os insertos. Depois, separadamente, cada um dos vetores foi incubado como um excesso de 5 vezes de número de insertos, durante de 16 horas à 4°C, na presença de 2 U de T4 DNA ligase e seu tampão (66mM Tris-HClpH7.6; 6,6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 66 µM ATP; 3,3 µM 32P-pirofosfato, ThermoFisher Scientific) para um volume total de 20 µL. O produto dessa ligação foi transformado nas linhagens de expressão através do processo de eletroporação descrito anteriormente.

O pET 22 carrega uma seqüência sinal no N-terminal *pelB* para potencial localização periplasmática (Tabela 4), utilizando as enzimas *NcoI* e *XhoI* a proteína de interesse é expressa fusionada com esse peptídeo sinal. No pET28, com as mesma enzimas, a proteína é produzida sem nenhum peptídeo sinal ou cauda (Tabela 4). Enquanto no pET 32 a proteína será expressa fusionada a uma tiorredoxina (Tabela 4) que é extremamente solúvel em células de *E. coli*; com uma seqüência de clivagem reconhecida pela enteroquinase e com uma cauda de histidina no N-terminal.

Foi utilizado o sequenciador 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies), no Laboratório de Biofísica do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, em São Carlos, para confirmar a seqüência clonada.

Depois que o DNA foi clonado em vetores de expressão, foi realizada uma extração do DNA plasmidial com o kit *GenElute™ Plasmid Miniprep* (SIGMA). E esse DNA foi utilizado para transformar linhagens de expressão através de eletroporação, que será descrita na próxima seção.

O pETTrx_1a/LIC dispensa o processo de digestão e de ligação para produzir construções de expressão. A sigla LIC denota uma Clonagem Independente de Ligase (*Ligase Independent Cloning*), para isso, utiliza a atividade 3'-5' da enzima T4 DNA polimerase que cria protrusões de DNA fita simples específicos de 10 a 15 pares de base, complementares entre vetor e inserto. É realizada uma PCR com um gradiente de temperaturas de anelamento entre 40 e 55°C. Os fragmentos dos genes de interesse amplificados são purificados e tratados com a DNA polimerase T4 na presença de dATP, devido a atividade 3'-5' exonuclease dessa enzima os resíduos de ambas as extremidades 3' são removidos até a primeira adenosina da sequência. Etapa essencial para a clonagem independente de ligase. Por sua vez, o vetor é digerido com *BsaI*, purificado do gel de agarose e incubado com a DNA polimerase T4 na presença de dTTP, e os nucleotídeos serão removidos até a primeira timina. Assim, as extremidades salientes do vetor serão complementares as extremidades criadas nos insertos, permitindo uma clonagem independente da enzima T4 DNA ligase e com alta eficiência.

O anelamento ocorre na ausência de ligase incubando os fragmentos de inserto e vetor por 10 minutos, metade do tempo com a adição de 25 mM de EDTA, como esquematizado na Figura 12 (108). A ligação fosfodiéster é reparada pela célula hospedeira após transformação.

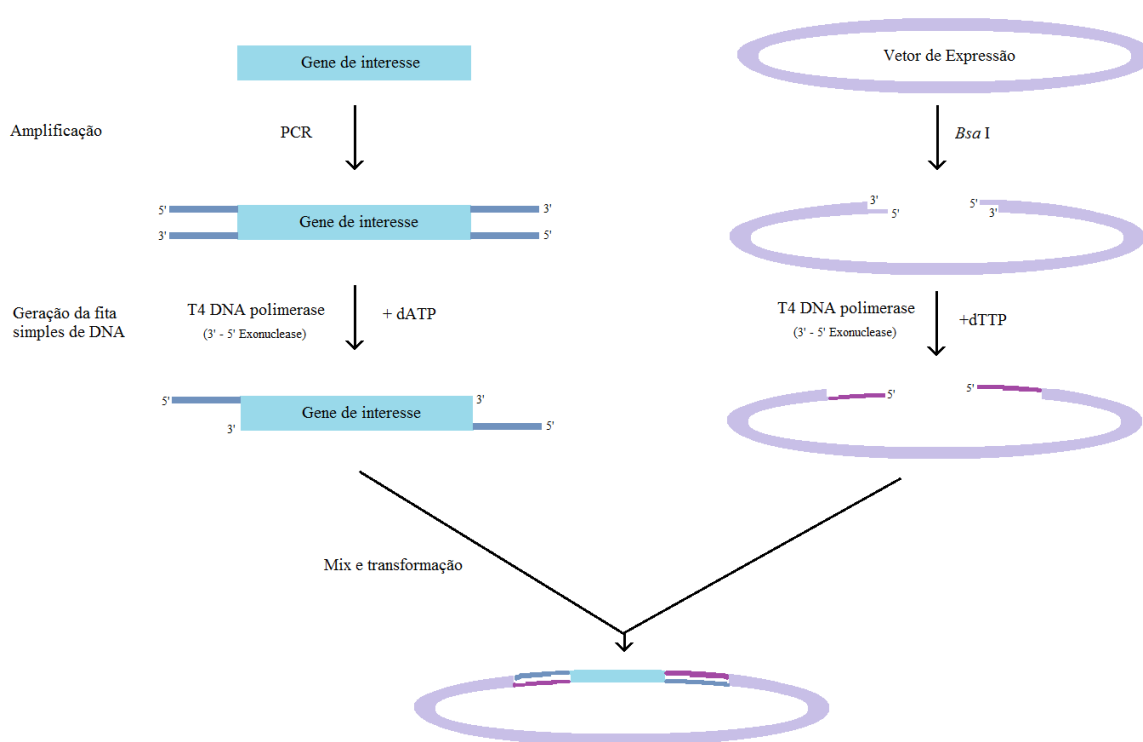


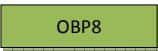
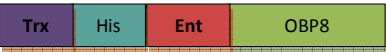

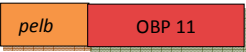
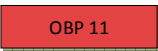



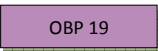
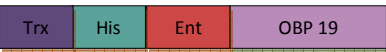



Figura 12 - Esquema do sistema de clonagem LIC. Amplificação do gene de interesse com primers contendo overhangs específicos e complementares ao vetor pETTrx_1a/LIC. Geração de fragmentos definidos de DNA simples fita nas extremidades desses produtos de PCR através da atividade 3'-5' da polimerase que irá remover nucleotídeos das extremidades 3' até encontrar a primeira adenosina, que está presente em solução como dATP. O vetor é preparado através de uma digestão com *Bsa* I, seguida da remoção de bases até o primeiro resíduo de tiamina ser encontrado pela polimerase. São misturados 1 μ L de vetor com 2 μ L de inserto tratado, esses são incubados por 5 min. à 22°C; depois é adicionado 1 μ L de EDTA (25 mM) e são incubados por mais 5 min.

Fonte: Adaptada de ASLANIDIS et al. (108).

Diversas construções em diferentes plasmídeos foram testadas e transformadas por eletroporação em diferentes linhagens de expressão. A Tabela 4 mostra as construções que foram feitas, em quais plasmídeos foram obtidas e em quais linhagens de expressão foram clonadas.

Tabela 4 - Construções, Vetores e Linhagens de Expressão. As siglas correspondem a: *pelb*)peptídeo sinal para potencial endereçamento ao periplasma; **TEV**), sítio de reconhecimento de clivagem de TEV protease; **His**) cauda de seis histidinas para auxiliar na purificação por cromatografia de afinidade; **Trx**) cauda de fusão para aumentar a solubilidade da proteína; e **Ent**) sítio de reconhecimento de clivagem de enteroquinase

Proteína	Construções	Vetores	Linhagens de Expressão
OBP 8		pET 22	BL21-CodonPlus BL21(DE3)
		pET22	BL21(DE3) BL21(DE3)pLysS
		pET 28	BL21(DE3) Origami B
		pET32	Origami 2
		pETTrx_1a/LIC	BL21(DE3) BL21(DE3)pLysS Rosetta-gami 2
	OBP 11		pET22
		pET28	BL21(DE3) Origami B
		pET32	Origami 2
		pETTrx_1a/LIC	BL21(DE3) BL21(DE3)pLysS Rosetta-gami 2
OBP 19			pET22
		pET28	BL21(DE3) Origami B
		pET32	Origami 2
		pETTrx_1a/LIC	BL21(DE3) BL21(DE3)pLysS Rosetta-gami 2

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2.4 Transformação de linhagens de expressão de *Escherichia coli* por eletroporação

A transformação das células de expressão foi realizada por eletroporação. Células eletrocompetentes são obtidas através de um pré inoculo de 100 mL de meio LB que cresceu 16 horas e deve ser diluído em 1 L de meio fresco pré aquecido, no qual as células devem crescer sob agitação á 37°C até atingir uma densidade óptica de $DO_{600} = 1,0$ a 1,2. Essas células devem ser então centrifugadas á 4000 rpm por 20 min á 4°C. Depois as células devem ser lavadas uma vez com 500 mL e duas vezes com 250 mL de água gelada, centrifugando-as a 3500 rpm, 7 min e 4°C a cada lavagem. O precipitado de células deve ser então lavado duas vezes com 30 mL de glicerol 20% gelado. A centrifugação final deve ser de 3500 rpm 15 min e 4 °C, sendo que o sobrenadante deve ser descartado com cuidado. As células são ressuspensas em 3 mL de glicerol 20 % e alíquotadas a cada 40 µL para serem mantidas congeladas á -80°C. No momento da transformação, essas células são descongeladas no gelo, misturadas com 1 - 2 µL de DNA e são transferidas para uma cubeta de eletroporação. Nesse trabalho foram utilizadas cubetas de 0,1 cm de espaçamento e as condições do pulso foram as seguintes: 1,7 kV, 200 Ω e 25 µF. Imediatamente após o pulso foi adicionado 1 mL de LB as células e elas foram incubadas durante 1 hora sob agitação á 37°C. Depois elas foram plaqueadas com os antibióticos adequados até a obtenção de colônias aproximadamente 16 horas depois.

3.2.5 Expressão de proteínas ligadoras de odorante recombinantes de *Rhodnius prolixus* (RproOBPs)

Para encontrar condições em que as proteínas fossem solúveis e em quantidade suficiente para realizar ensaios biofísicos, uma combinação de concentrações de IPTG e diferentes temperaturas foram testadas para as diferentes linhagens de expressão e diferentes tampões de lise. A Tabela 7 na seção de Resultados e Discussão mostra essas combinações já com os resultados obtidos para cada uma delas.

Dentre as linhagens testadas, cada uma possui características de interesse para produção de proteínas heterólogas. A linhagem BL21 de *E. coli* naturalmente não possui a

protease *Lon*, que pode degradar proteínas recombinantes e foi modificada geneticamente para não ter uma segunda protease, chamada de *OmpT*. A linhagem BL21 de *E. coli* (DE3) possui o lisógeno λ DE3 que carrega o gene para expressão de T7 RNA polimerase sobre controle do promotor lacUV5. O IPTG é requerido para máxima indução de expressão da polimerase com o intuito de expressar genes recombinantes clonados a jusante do promotor T7 que essa polimerase reconhece.

Uma desvantagem da linhagem *E. coli* BL21(DE3) é que o controle de expressão não é tão intenso e pode haver um "vazamento" da expressão de proteínas que são potencialmente tóxicas para a célula. Assim, foi desenvolvida a linhagem de *E. coli* BL21(DE3)pLysS que expressa a lisozima T7, cuja ação é suprimir a expressão basal de T7 RNA polimerase antes da indução com IPTG.

A linhagem *E. coli* BL21-CodonPlus (Agilent Technologies) foi modificada geneticamente a partir da BL21 para conter mais cópias de tRNAs que frequentemente são limitantes na tradução de proteínas heterólogas em *E. coli*.

E. coli Origami B (Novagen) também é uma linhagem derivada da *E. coli* BL21. Ela carrega mutações em duas proteínas, a tiorredoxina redutase (*trxB*) e a glutatona redutase (*gor*), sem as quais, a formação de ligações dissulfeto aumenta consideravelmente no citoplasma. As mutações são selecionadas com canamicina e tetraciclina, respectivamente. A linhagem *E. coli* Origami 2 (Novagen) deriva da linhagem *E. coli* K-12 e tem as mesmas mutações que a linhagem *E. coli* Origami B. A diferença é que essas células são sensíveis a canamicina*.

E. coli Rosetta-Gami 2 é uma linhagem que permite um aumento na formação de ligações dissulfeto devido a mutações *trxB/gor* e aumenta a expressão de proteínas eucarióticas por conter códon raros em *E. coli*.

Depois de diversos testes foi estabelecido um protocolo para cada OBP.

A *Rpro*OBP 8 teve melhores resultados sendo expressa na linhagem de *E. coli* Rosetta-gami 2 com a construção Trx-His-TEV-OBP8 no vetor pETTrx_1a/LIC. Foram inoculados 50 mL de meio de cultura LB contendo canamicina (30 μ L/mL) e clorofenicol (60 μ L/mL) e incubados por 16 horas sob agitação de 250 rpm á 37°C. Após crescimento das células foi medida a densidade óptica com a absorbância de 600 nm, a quantidade necessária para que a absorbância final fosse de 0,1 foi adicionada á 1 L de meio de cultura LB. Quando

*informações obtidas do fabricante: Merck.

as células atingiram 0,3 de absorvância a temperatura da cultura foi reduzida para 18°C, e quando atingiram 0,6 foram induzidas com 0,5 mM de IPTG e cresceram 16 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas a 3000 g por 45 minutos á 4°C na Sorvall™ RC3BP Plus (ThermoFisher Scientific). As células foram congeladas á 80°C para facilitar a lise. As células foram então suspendidas em 50 mL de 25 mM tampão Tris-HCl pH 7,5, em 50 mL de 25 mM tampão Tris-HCl pH 7,5, e submetidas a lise por ultrassonicação por 4,5 minutos em ciclos de 4 seg. ON e 9 seg. OFF no equipamento 550 *Sonic Dismembrator* (Fisher Scientific). As células lisadas passaram então pelo processo de clarificação na centrifuga Sorvall RC-5C Plus (GMI) por 45 minutos, 13000 rpm, á 4°C. A fração solúvel (sobrenadante) foi então submetida á purificação.

A *RproOBP* 11 teve melhores resultados também na linhagem Rosetta-gami 2 com a construção Trx-His-TEV-OBP11 no vetor pETTrx_1a/LIC. O processo para lise e obtenção da proteína no sobrenadante solúvel foi o mesmo descrito acima, as únicas diferenças foram: as células do cultivo cresceram a todo momento á 37°C e após a indução foram cultivadas por 3 horas; e o tampão de lise foi um tampão 20 mM tampão fosfato pH 7,0.

Para a *RproOBP* 19 a linhagem *E. coli* BL21(DE3)pLysS teve melhores resultados com a construção Trx-His-TEV-OBP19 no vetor pETTrx_1a/LIC, e a proteína foi expressa na mesma condição que a *RproOBP* 11 e seu tampão foi 20 mM tampão HEPES pH 7,0.

3.2.6 Purificação das *RproOBPs* recombinantes

Durante todo o processo, construções diferentes da proteína foram usadas, e coerentemente diferentes métodos de purificação foram utilizados. Quando a proteína *RproOBP* 8 foi produzida no periplasma da célula, houveram testes para tentar purificar essa proteína com colunas de troca iônica, que também foram testadas com a produção da mesma OBP no citoplasma com o pET28. Como será descrito posteriormente, a quantidade de proteína obtida nas purificações bem sucedidas de troca iônica foi insuficiente para realizar testes biofísicos, e assim passou a se produzir as proteínas como cauda de histidina para realizar uma cromatografia de afinidade. Conforme os experimentos foram realizados, notou-se que apenas a cauda de histidina fusionada a OBP gerava um produto protéico insolúvel, e as construções da proteína fusionada com cauda de histidina e uma tiorredoxina foram feitas.

O resultado final indicou que para as três proteínas, a melhor purificação inclui a expressão da proteína fusionada com uma cauda de histidina e uma cauda de tiorredoxina, uma cromatografia de afinidade, duas diálises que permitem a clivagem com TEV protease e uma segunda cromatografia de afinidade com o intuito de retirar a cauda de histidina e tiorredoxina que tem um tamanho muito próximo das *RproOBPs* e portanto não são separadas com a cromatografia de exclusão molecular que é realizada como passo final para retirar outras proteínas contaminantes.

3.2.6.1 Cromatografia de Troca Iônica

Cromatografias de troca iônica separam biomoléculas pela carga que elas possuem em sua superfície. Interações reversíveis entre moléculas carregadas e resinas carregadas com a carga oposta são controladas de forma a favorecer a ligação ou a eluição das moléculas para obter a separação. Uma proteína que tem carga total igual a zero no pH equivalente ao seu ponto isoelétrico (pI) não irá interagir com a resina. Entretanto, num pH maior que seu pI, a proteína irá se ligar a resinas positivamente carregadas - troca aniônica - e, num pH abaixo do seu pI, a proteína irá se ligar a uma resina negativamente carregada - troca catiônica (109).

Cromatografia iniciais de troca iônica foram realizadas para a *RproOBP* 8, cujo pI teórico é de 4,52. Foram testadas cinco colunas diferentes do kit HiTrap™ IEX Selection (*GE Healthcare*): Mono Q, ANX Sepharose 4 Fast Flow, Q Sepharose Fast Flow, Q Sepharose XL e DEAE. Para as duas ultimas colunas, diferentes tampões foram testados

Foi realizada uma cromatografia na resina Mono Q, que é um forte trocador aniônico, utilizando a fração solúvel em tampão A, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, de uma purificação da *RproOBP* 8 expressa em *E. coli* BL21(DE3). O tampão de eluição, B, foi 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, aplicado em gradiente linear de 0% a 100%. O processo foi realizado em um cromatógrafo Äkta.

Foram testadas as colunas Q Sepharose XL e Q Sepharose FF, fortes trocadores aniônicos, e as colunas DEAE e ANX Sepharose 4 FF, fracos trocadores aniônicos. E para assegurar que as condições impostas não fossem muito restritivas, seguindo as recomendações das colunas, foram testados 8 tampões diferentes com um trocador forte, Q

sepharose XL, e um trocador fraco, DEAE, com uma concentração de íons suficiente para manter a capacidade tamponante e fraca o suficiente para não interferir com a ligação da amostra na resina. Os tampões A, utilizados foram: tampão citrato 20 mM pH 4,0, tampão citrato 20 mM pH 4,5, tampão citrato 20 mM pH 5,0, tampão citrato 20 mM pH 5,5, tampão MES 50 mM pH 6,0, tampão fosfato 50 mM pH 6,6, tampão fosfato 50 mM pH 7,0 e tampão fosfato 50 mM pH 7,5. Os tampões B, foram os mesmos com a adição de 500 mM de NaCl. Adicionalmente, para a coluna DEAE foi injetado a amostra resultante do periplasma solúvel resultante da lise parcial as células, nas quais elas se encontram numa solução de 5 mM $MgSO_4$.

3.2.6.2 Cromatografia de Afinidade

Como pode ser observado na Tabela 4, algumas construções possuem uma cauda de histidina fusionada as OBPs. São seis resíduos de histidina que permitem utilizar a técnica de cromatografia de afinidade para seletivamente recuperar a proteína de interesse dentre todas as que estão na amostra depois da lise celular. A técnica se baseia na interação reversível entre as histidinas e um íon metálico com carga positiva que permanece imobilizado na resina dentro da coluna de cromatografia. Neste trabalho foram testadas duas resinas distintas: *His60 Ni Superflowe TALON His-Tag*, ambas da empresa Clontech. A primeira resina é carregada com íons de níquel, e a segunda com íons de cobalto. Pela melhor especificidade da resina de cobalto e, conseqüentemente, melhor pureza da proteína de interesse, ela foi escolhida e padronizada para as cromatografias de afinidade. Essas cromatografias aconteceram acopladas ao sistema de purificação de proteínas *ÄKTA Explorer 10* (GE Healthcare).

A eluição das proteínas dessa coluna ocorre utilizando-se imidazol. Um composto químico cuja afinidade com íons Co^{2+} é maior que da cauda de histidina, e assim o imidazol compete com a proteína de interesse pela ligação e essa acaba sendo eluída da coluna e coletada da maneira adequada. A cada passo de purificação por cromatografia de afinidade, uma coluna de 10 mL de resina *TALON His-Tag* empacotada foi lavada com 30 mL de água milli-Q, em seguida, equilibrada com 30 mL do tampão A da proteína de interesse (25 mM tampão Tris-HCl pH 7,5, para *RproOBP 8*; 20 mM tampão fosfato pH 7,0 para *RproOBP 11* e 20 mM tampão HEPES pH 7,0 para *RproOBP 19*). O sobrenadante contendo a proteína de

interesse foi injetado na coluna em alíquotas de 50 mL. Em seguida, a coluna passou por uma lavagem com o tampão A. As proteínas de interesse foram eluídas com seus respectivos tampões A adicionados com 300 mM de imidazol (tampão B).

3.2.6.3 Diálise e Clivagem com TEV protease

As amostras de proteínas recombinantes eluídas na purificação por afinidade foram submetidas à diálise para retirar o imidazol da amostra. A *RproOBP* 8 foi dialisada em uma membrana de diálise SERVAPOR[®] 3,6 em um tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,5 já com 2 mM de DTT. A diálise foi realizada sob agitação suave à 4°C, e 500 mL do tampão foi trocado duas vezes a cada 3 horas.

A clivagem com TEV protease ocorreu por 16 horas na própria membrana de diálise à 4°C. E foi procedida por outra troca de tampão, para a retirada do DTT.

Antes de adicionar TEV na membrana de diálise, a concentração de proteína foi estimada utilizando um espectrofotômetro *NanodropTM 1000* (Thermo Scientific). É importante ressaltar que a TEV utilizada sofre uma auto clivagem da cauda de histidina, restando um peptídeo de pouco mais de 30 kDa.

A purificação da *RproOBP* 11 ocorreu da mesma maneira porém em 20 mM tampão fosfato pH 7,0. E a *RproOBP* 19 em 20 mM tampão HEPES pH 7,0.

3.2.6.4 Segunda Cromatografia de Afinidade

Como foi citado anteriormente, o último passo de purificação é uma cromatografia de exclusão molecular. Porém, essa técnica de purificação não tem resolução suficiente para separar a cauda tiorredoxina fusionada a histidina (13,5 kDa) das *RproOBPs* 8, 11 e 19 (13,3 kDa, 14,8 kDa e 15,4 kDa, respectivamente). Por isso é realizada uma segunda cromatografia de afinidade - nas mesmas condições de purificação já descritas - com o intuito de separar apenas a cauda de tiorredoxina e histidina que permanece retida na resina enquanto as proteínas de interesse passam sem interagir com a resina, coletando o eluato.

As biomoléculas que são eluidas com tampão contendo 300 mM de imidazol incluem as caudas com tiorredoxina e histidina, e também *RproOBPs* que não foram clivadas pela TEV e ainda possuem essa cauda.

3.2.6.5 Cromatografia de Exclusão Molecular

Nessa cromatografia, também chamada de gel filtração, as moléculas são separadas de acordo com diferenças de tamanho e formas moleculares. Pode ser utilizada com uma etapa de aprimoramento da purificação de proteínas ou como uma ferramenta analítica para prever o tamanho das proteínas. A matriz da coluna é um polímero que possui poros de tamanhos definidos. Proteínas com maior massa molecular tem menos possibilidades de caminhos através da resina, pois não tendem a entrar nos poros menores da mesma, e portanto passam mais rápido pela resina. Enquanto proteínas menores entram nesses poros e migram mais devagar através da coluna.

A coluna *Superdex[®] 75 10/300* (GE Healthcare) mostrou os melhores resultados para a separação das *RproOBPs*. É capaz de separar moléculas cujos pesos variam entre 3 000 e 70 000 Daltons. Essas cromatografias também aconteceram acopladas ao sistema de purificação de proteínas *ÄKTA*.

Uma característica limitante da cromatografia de exclusão molecular é o volume de amostra aplicada na coluna para que a separação seja eficiente, por isso, as amostras que saíram da segunda cromatografia de afinidade foram concentradas.

A amostra da proteína concentrada a 2 mg/mL em dispositivos *Amicon[®] Ultra-15 3K* (Millipore) em centrifugações consecutivas a 2500 rpm, 15 min. á 4°C foi aplicada na coluna já equilibrada com os respectivos tampões de cada *RproOBP*, adicionados de 150 mM de NaCl. E a proteína pura, foi concentrada até aproximadamente 2 mg/mL (~140 mM) para ser utilizada em ensaios biofísicos. Quando os ensaios não foram realizados imediatamente, as proteínas foram congeladas alíquotadas com 10% de glicerol em nitrogênio líquido e mantidas á -80°C.

3.3 Western Blot

Western Blot ou imuno-plotagem (do inglês, *immuno blot*) é uma técnica de detecção e análise de proteínas que se baseia interação específica entre anticorpo e proteína. As proteínas se encontram imobilizadas em uma membrana de nitrocelulose, e os anticorpos, específicos para determinada proteína ou para determinado atributo distintivo de uma proteína, reconhecem esses sítios e se ligam a eles, permitindo que um anticorpo secundário, que reconhece o primeiro, seja aplicado sobre as amostras, e no caso positivo, emita um sinal fluorescente que pode ser detectado.

Neste trabalho, a técnica de western blot foi usada para confirmar a presença das proteínas, que possuem cauda de histidina com o anticorpo monoclonal anti-poli Histidina (SIGMA). Dessa forma, a clivagem com TEV e o sucesso da segunda purificação puderam ser confirmados.

Foi realizada uma eletroforese em SDS-PAGE 15% em tampão de corrida (125 mM Tris, 960 mM glicina e 0,5 % SDS, pH 8,3) utilizando o aparato *Mini-Protean Tetra Cell* (Bio Rad). Frações do extrato proteico foram desnaturadas por fervura durante 5 minutos com o Tampão de Amostra (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol e 20% DTT), foram aplicadas juntamente com o marcador de massa molecular *SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Life Technologies). A eletroforese foi realizada á 80 V, 400 mA por 30 minutos, seguida de 200 V, durante mais 60 minutos.

O sistema *Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell* (Bio Rad) foi utilizado para a transferência para a membrana de nitrocelulose *Hybond ECL* (Amersham Bioscience) utilizando o tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina e 20% metanol) durante 0,5 hora, 100 V e 350 mA. A eficiência da transferência foi avaliada corando-se a membrana com 0,2 % *Ponceau*, que foi retirado através de lavagens subsequentes com água. A membrana foi bloqueada com 5 % de leite em pó desnatado (Molico) diluído em PBS, 0,1 % Tween-20 (PBST), por 1 hora á 25°C. Em seguida a membrana foi incubada por 16 horas á 4°C, sob agitação no *Agitador Multifuncional VDRL-Kline*, com o anticorpo primário anti-histidina diluído (1:15.000) em PBST. Depois foram realizadas três lavagens com PBST, de 10 minutos. A membrana foi então incubada com o anticorpo secundário, anti-IgG de camundongos, na diluição 1:5.000, sob agitação leve durante 80 minutos á temperatura

ambiente. A membrana passou por três lavagens de 5 minutos com PBST. A membrana foi revelada por quimioluminescência: a membrana é rapidamente submergida em uma solução com 1,1 % luminol, 0,48 % ácido P-cumárico, 11,1% Tris 1M pH 8,5 e peróxido de hidrogênio na proporção 1:300 (v/v). As membranas foram analisadas com o *scanner C-digit Blot* (LI-COR Biosciences UK Ltd) e as imagens adquiridas pelo software *Image Studio™* (LI-COR Biosciences UK Ltd).

3.4 Caracterização Biofísica das proteínas recombinantes

A caracterização biofísica das *RproOBPs* 8, 11 e 19 foi feita através da espectroscopia de dicroísmo circular para a investigação de sua estrutura secundária, além de eletroforese em gel nativo, eletroforese de gel de ponto isoelétrico e espalhamento dinâmico de luz. Ensaios de cristalização e experimentos de dicroísmo circular com possíveis ligantes das *RproOBPs* também foram realizados.

3.4.1 Espalhamento dinâmico de Luz (DLS)

DLS (*Dynamic Light Scattering*), também chamada de espectroscopia de correlação de fótons, analisa as biomoléculas como elas se encontram em solução, ou seja, hidratadas. Essas macromoléculas hidratadas podem ter seu raio calculado a partir do coeficiente de difusão e isso oferece uma estimativa da partícula com sua camada de solvatação, denominado raio hidrodinâmico, e a partir deste também pode-se estimar sua massa molecular, e estado oligomérico

O espalhamento de Rayleigh é o fenômeno que fundamenta o DLS. O campo elétrico de um feixe de luz monocromático que incide em uma amostra, cujas partículas são menores que o comprimento de onda, induz um dipolo elétrico oscilante nas moléculas, que age como uma fonte de luz secundária, ou seja, luz espalhada. Essa intensidade de luz espalhada varia. A razão com que essas flutuações ocorrem com o tempo (ordem de nano ou microssegundos) depende do tamanho da partícula. As partículas menores causam uma variação mais rápida na intensidade quando comparada a partículas maiores; pois, quanto maior a partícula, maior o

atrato sentido para seu movimento translacional, já que isso também depende do seu raio hidrodinâmico (110). Sumarizando, o DLS se baseia na incidência de luz monocromática em moléculas em solução, monitorando as flutuações de intensidade de luz espalhada com o tempo. O tamanho da partícula (raio hidrodinâmico) pode ser estimado, portanto, a partir do coeficiente de difusão dessa partícula.

Considerando a proteína esférica é possível calcular sua massa e densidade, e dessa forma estimar seu estado oligomérico em solução (110).

As proteínas purificadas centrifugadas, 10 000 g e 10 min, 4°C, foram aplicadas em uma cubeta de quartzo e as medidas foram realizadas em diferentes tampões no equipamento *Zetasizer* (Malvern). O software *Zetasizer*, foi utilizado para analisar os resultados.

3.4.2 Espectrofotometria UV-Visível

A *RproOBP* 11 tem uma cor vermelha intensa. Para confirmar qual o comprimento de onda que representa essa intensidade foi utilizado o espectrofotômetro UV-1700 da Shimadzu, que é capaz de medir a quantidade de luz (radiação eletromagnética) absorvida, transmitida ou refletida por uma determinada amostra.

Medidas de absorbância da *RproOBP* 11 á 18 mM em tampão 20 mM fosfato pH 7,0, foram realizadas em triplicata a cada 1 nm de 300 a 500 nm. Foi utilizada uma cubeta de caminho óptico de 0,1 cm, a temperatura de 20°C.

3.4.3 Fluorimetria diferencial de varredura (DSF)

A obtenção de um cristal de proteína depende muito de como a proteína se encontra em solução. Se a amostra está homogênea, estável e solúvel, características que dependem de muitos fatores, tais como força iônica do tampão, sais, aditivos, pH, precipitantes e concentração de proteína.

Fluorimetria diferencial de varredura (do inglês, *Differential Scanning Fluorometry*, DSF), foi empregada para analisar a estabilidade das proteínas em diferentes condições. A

técnica se baseia na medida indireta, através de uma sonda fluorescente hidrofóbica, do enovelamento da proteína.

A emissão do fluoróforo *SYPRO Orange* (excitação ~470 nm, emissão ~570 nm) é extinta em solução aquosa. Conforme há um aumento da temperatura, a proteína começa a sofrer um desenovelamento térmico e expõe seu cerne hidrofóbico. O SYPRO Orange, então se liga a essas regiões hidrofóbicas expostas e passa a emitir o sinal de fluorescência. Com o contínuo aumento da temperatura as proteínas irão agregar e a precipitar devido a interação de suas regiões hidrofóbicas, liberando o fluoróforo para o ambiente aquoso da solução, onde sua emissão é novamente extinta como mostrado na Figura 13. A temperatura de desenovelamento (*melting temperature*, T_m) pode ser obtida através do ponto intermediário da curva de desenovelamento da proteína, caso essa transição termal seja simples (sem transições secundárias, ruído ou picos). (111-112)

Concentrações diferentes da proteína *RproOBP 19* (de 1 a 75 μM) em tampão 25 mM Tris-HCl pH 8,0, foram combinadas com diferentes concentrações de *Sypro Orange* (Thermofisher Scientific) (de 5 a 75 μM), afim de obter a melhor condição para os ensaios com o kit StockOptionsTMpH, da *Hampton Research*. A leitura dessas condições foi realizada em triplicata, em placas de 96 poços no aparelho CFX96™ *Real Time System* (Bio-Rad) e a análise foi feita através do software Bio-Rad CFX manager.

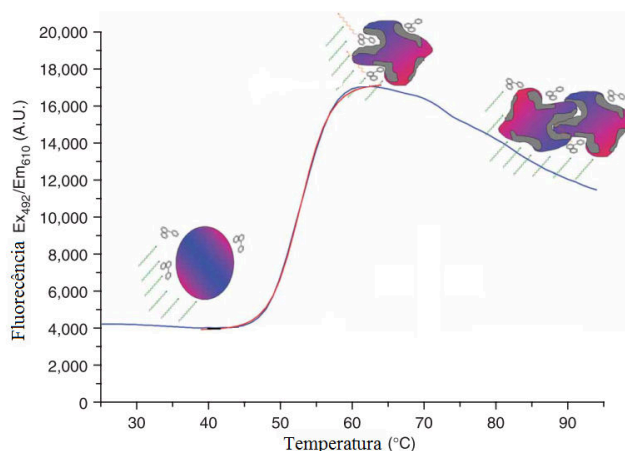


Figura 13 - Representação da curva de desenovelamento de uma proteína relacionada a intensidade da fluorescência. O fluoróforo, na presença de uma proteína globular, apresenta fluorescência no comprimento de onda de 492 nm, com o aumento de temperatura a proteína começa a se desenovelar, e regiões hidrofóbicas (representadas em cinza) são expostas e se ligam com o fluoróforos que emitem forte fluorescência à 610 nm. O pico de intensidade então começa a decair,

pois proteínas são removidas da solução através da agregação e precipitação, interagindo entre si ao invés de com o fluoróforo.

Fonte: Adaptada de NIESEN et al. (113)

3.4.4 Eletroforese em gel Nativo

Essa técnica permite determinar o estado oligomérico da proteína em solução, assim como a homogeneidade da amostra, pois as proteínas são separadas em seu estado nativo. As *RproOBPs* foram aplicadas em um gel comercial com gradiente *PhastGel 8-25* (GE). Foram aplicados 4 μL da amostra proteica. O gel foi corado com solução Corante (0,2% do corante pronto *PhastGel Blue R*, GE, 60% metanol), e descorado com três incubações em solução Descorante (30% metanol, 10% ácido acético) por 5, 8 e 10 minutos. Uma solução de Preservação de 10 % glicerol é utilizada para secar o gel. Comparando a migração das OBPs com a migração de um padrão cujas massas e raio hidrodinâmico são conhecidos é possível estimar essas parâmetros através de uma curva de calibração.

3.4.5 Eletroforese de Focalização Isoelétrica

A eletroforese de ponto isoelétrico parte do princípio que num gradiente de pH as moléculas migram em direção ao cátodo ou ânodo, até o valor de pH no qual a soma das cargas totais da proteína é igual a zero, ou seja, o ponto isoelétrico - pI. Se a proteína migram além de seu pI, ela deve adquirir uma carga total diferente de zero, e migrar de volta ao gradiente de seu pI, isso é chamado de focalização isoelétrica. Os pontos isoelétricos das proteínas de interesse podem então ser estimados com base numa curva de calibração feita com proteínas de pI conhecido que são usadas como marcador na corrida do gel (114).

As *RproOBPs* foram aplicadas no *PhastGel IEF 3-9* (GE Healthcare). Foram aplicados 4 μL da amostra proteica e, nas condições padrão do equipamento, a corrida durou 25 minutos. Então o gel foi incubado em solução Fixadora (20% ácido tricloroacético) por 5 min, depois em solução Descorante (30% metanol, 10% ácido acético) por 2 min., só então o gel permaneceu na solução Corante (0,2% do corante pronto *PhastGel Blue R*, GE, 60% metanol) por 8 min. Depois o gel passa por duas incubações com solução descorante, 5 e 10 min. Uma solução de Preservação de 10 % glicerol é utilizada para secar o gel.

3.4.6 Estimativa de massa molecular por Cromatografia de Exclusão Molecular

A massa molecular foi determinada padronizando as condições de cromatografia de exclusão molecular, com proteínas padrão cujas massas moleculares são conhecidas, na coluna *Superdex 75* em tampão PBS (Tampão Fosfato Salino, 1,4 M NaCl; 27 mM KCl; 0,1 M Na₂PO₄; 18 mM KH₂PO₄; pH 7,5) a 0,5 mL/min. A partir do volume de eluição de cada padrão, é possível obter as curvas de calibração a partir do programa *ORIGIN 8.0* (ORIGINLab).

Segundo a fórmula:

$$KV_a = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0}$$

onde:

V_e - Volume de Eluição

V_0 - Void

V_c - Volume geométrico da coluna (mL resina)

O KV_a é então calculado para cada proteína padrão que foi injetada, e é construído um gráfico do $\log_{10} MW$ versus KV_a . Então é feito um "fit linear" da curva e com a equação da reta obtida é possível calcular a massa molecular da proteína de interesse.

3.4.7 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Espectroscopia de Dicroísmo Circular (*Circular Dicroism*, CD) é uma técnica que se baseia nas diferenças de interação que biomoléculas assimétricas têm com feixes de luz circularmente polarizada. Os feixes de luz são absorvidos de maneira diferente quando atingem moléculas opticamente ativas, dependendo dos diferentes coeficientes de extinção intrínsecos de cada molécula. Após interagir com a molécula, cada componente do feixe de luz continua circularmente polarizado porém os raios das circunferências traçadas pelo vetor campo elétrico de cada componente são diferentes. Como as duas componentes tem amplitudes diferentes o resultado é um feixe de luz elipticamente polarizado (115), como observado na Figura 14.

A maior parte das biomoléculas é opticamente ativa devido a sua estrutura. As proteínas tem diversos centros assimétricos, ou quirais, que incluem os carbonos α (C_α) de todos os aminoácidos, exceto a glicina e o carbono β (C_β) da treonina e da isoleucina. Esses centros quirais que caracterizam as proteínas como moléculas opticamente ativas.

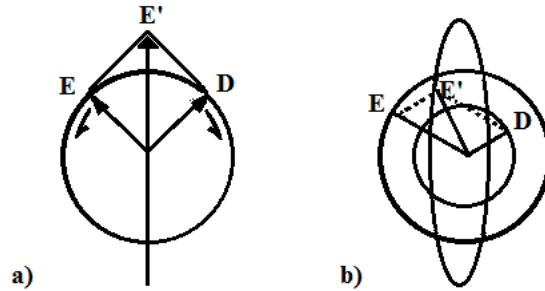


Figura 14 - Decomposição do feixe de luz em duas componentes circulares polarizadas à esquerda (E) e à direita (D), a) antes e b) depois de passar por uma amostra opticamente ativa.

Fonte: Adaptada de CANTOR (115).

É possível utilizar o UV distante na técnica de CD para determinar a estrutura de proteínas porque os elétrons ligados a amins absorvem em intervalos específicos de energia (Figura 15). A intensidade e energia dessas transições depende dos ângulos que o peptídeo ligado assume (ângulos ϕ e ψ) e por isso podemos prever a porcentagem de uma estrutura secundária na proteína, pois diferentes estruturas secundárias (α -hélices, folhas- β , volta- β , estruturas desordenadas) tem diferentes conformações de interação com os aminoácidos em sua vizinhança.

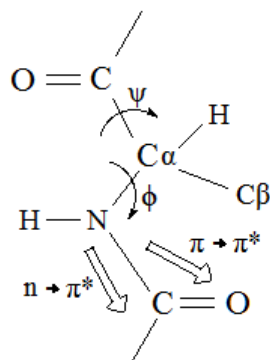


Figura 15 - Ângulos torcionais ϕ (phi) e ψ (psi) são responsáveis pela curvatura da estrutura das proteínas. O ângulo torcional ϕ (phi) representa o grau de liberdade de torção entre o $C\alpha$ e o N, do NH_2 , e o ângulo ψ (psi) o grau de liberdade de torção entre o $C\alpha$ e o C, do $COOH$. Sendo $n \rightarrow \pi^*$ centrado em torno de 220 nm e $\pi \rightarrow \pi^*$ centrado em torno de 190 nm.

Fonte: Adaptada de FARID (116)

Espectros de CD de proteínas revelam picos na região de 250-260 nm que correspondem a ligações dissulfeto, e na região 180-250 nm que correspondem a ligações peptídicas (115). As diferentes estruturas secundárias formadas nas proteínas também apresentam espectros característicos, como podemos observar na Figura 16 a. Esses espectros correspondem a variações nos ângulos, ϕ e ψ , que representam as rotações possíveis entre os átomos, e portanto, a estrutura secundária que a proteína está assumindo, como pode ser visto na Figura 16 b, c e d.

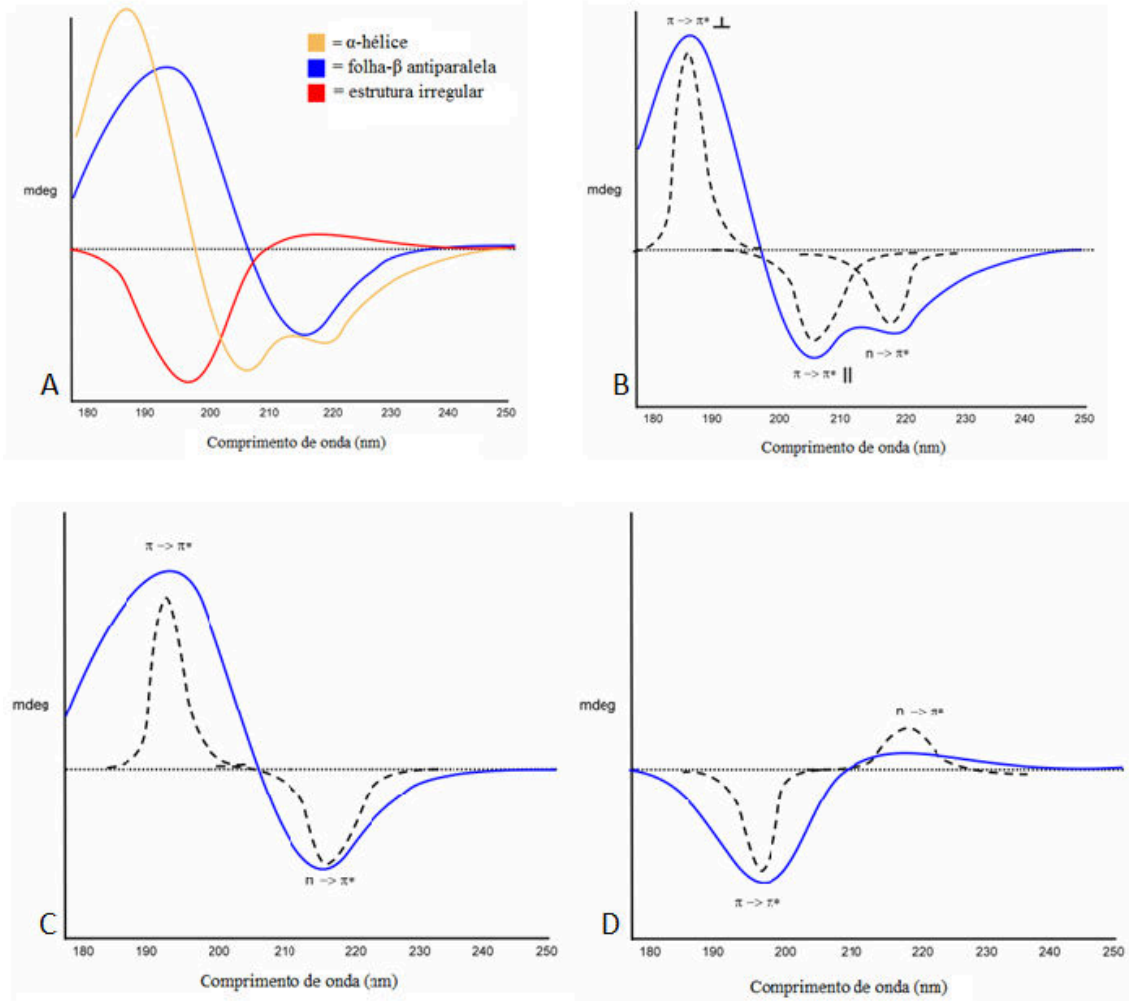


Figura 16 - Espectro de Dicroísmo Circular no UV distante. a) Espectro de estruturas secundárias de uma α -hélice, uma folha- β antiparalela e uma estrutura irregular. b) Espectro de uma α -hélice, cuja transição $\pi \rightarrow \pi^*$ leva aos valores: positivo ($\pi > \pi^*$) perpendicular á 192 nm, negativo ($\pi > \pi^*$) paralelo á 209 nm e negativo ($n > \pi^*$) á 222 nm. . c) Espectro de uma folha- β : positivo ($\pi > \pi^*$) á 218nm, e negativo ($n > \pi^*$) á 196 nm. d) Espectro de uma estrutura desordenada: positivo ($\pi > \pi^*$) á 212nm, e negativo ($n > \pi^*$) á 195 nm.

Fonte: Adaptada de FARID (116)

É considerado que o espectro de uma proteína é uma combinação linear dos espectros de estrutura secundária de α -hélices, folhas- β , voltas- β e estruturas desordenadas, segundo a equação (115):

$$[\theta(\lambda)] = X_{\alpha}[\theta_{\alpha}(\lambda)] + X_{\beta}[\theta_{\beta}(\lambda)] + X_t[\theta_t(\lambda)] + X_r[\theta_r(\lambda)]$$

onde θ_i , com $i = \alpha, \beta, t$ e r , designam, respectivamente, os espectros característicos das estruturas escritas acima. A deconvolução de um espectro de CD consiste em se obter os

coeficientes X_α , X_β , X_γ e X_τ , que correspondem as porcentagens de cada estrutura secundária em toda a estrutura da proteína analisada. (115)

O espectro de dicroísmo circular das *RproOBPs* foi obtido pelo uso de um espectropolarímetro *JASCO J-180* (JASCO International Co. Ltd), equipado com um sistema de controle de temperatura *PELTIER PTC 42S/15*. O espectro foi coletado 6 vezes entre 190 e 270 nm, com resolução de 0,2 nm e tempo de resposta de 0,5 segundo, em uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,1 cm. O programa usado para registro dos dados foi o *Spectra Manager* (JASCO).

Pelo espectro resultante da OBP 19, novas medidas foram realizadas em colaboração com a Dra Patricia S Kumagai, pós-doutoranda do grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”, IFSC – USP. Esse novo experimento foi realizado por radiação síncrotron na linha AU-CD, ASTRID2 – ISA, na Universidade de Aarhus (Aarhus, Dinamarca). Os espectros de SRCD foram coletados no intervalo de comprimento de onda de 180 a 280 nm, com intervalos de 1 nm, à 25°C. Utilizou-se cela de quartzo (Hellma Ltd, UK) com caminho óptico de 102,7 μm . O espectro final é a resultante da média de cinco varreduras acumulativas. A concentração da amostra utilizada foi de 1,5 mg/mL (~70 μM) em tampão 20 mM de fosfato de sódio, pH 6,8. Espectros de SRCD também foram coletados na presença de 50% de trifluoroetano (TFE). Os espectros foram processados usando-se o software CDTools(117), incluindo subtração de linha de base e média dos espectros. E, os espectros finais estão expressos em unidade de absorvidade molar ($\Delta\epsilon$).

3.4.8 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

A calorimetria de titulação isotérmica (*Isothermal titration calorimetry* ITC) é uma medida direta associada com uma reação química em que dois componentes são misturados em um ambiente termicamente controlado.

A partir de uma seleção comportamental de 5 possíveis atratantes descritos para outras espécies de insetos hematófagos, as *RproOBPs* 11 e 19 foram tituladas com esses 5 possíveis ligantes, que são alcoóis insaturados e saturados, sendo eles: pentanol, hexanol, heptanol, octanol e octenol (118). A titulação foi realizada em um calorímetro MicroCal VP-ITC

(Malvern), 20 μM de *RproOBP* foram titulados com 30 injeções de 10 μL cada dos ligantes, exceto a primeira que foi de 2 μL , á uma concentração de 5000 μM .

Como os ligantes são alcoóis, antes de realizar o experimento avaliou-se que seus respectivos calores de diluição, titulando apenas tampão com os ligantes sem a proteína assim como a proteína sem os ligantes, apenas com tampão.

3.4.9 Ensaios de Cristalização

Para elucidar a estrutura terciária de proteínas o método de cristalografia de raios X é o mais utilizado (119), e se baseia na incidência de raios X sobre um monocristal de proteína, e na coleta dos dados de difração desse cristal. Essa área tem tido grandes avanços nas últimas décadas, porém a taxa de sucesso na cristalização das proteínas é muito pequena. Apenas 13-15 % das proteínas purificadas são cristalizadas em uma forma que possibilita a determinação da sua estrutura (120).

O cristal representa a proteína num estado termodinamicamente estável em fase sólida. Isso é obtido através da concentração da solução da proteína. A difusão de vapor é o método mais utilizado para cristalização de proteínas. Nele duas soluções, uma mais concentrada, no reservatório, e uma menos concentrada, na gota contendo a proteína, permanecem num ambiente hermético. Por pressão de vapor, a gota menos concentrada começa a equilibrar sua concentração difundindo compostos voláteis para o reservatório. Isso leva a uma concentração lenta e gradual dos componentes presentes na gota, levando a precipitação da proteína e sua cristalização.

Dois métodos utilizam esse princípio: gota pendurada (*hanging drop*) e gota apoiada (*sitting drop*). A única diferença entre eles é a orientação da gota no sistema, como podemos observar pela Figura 17 .

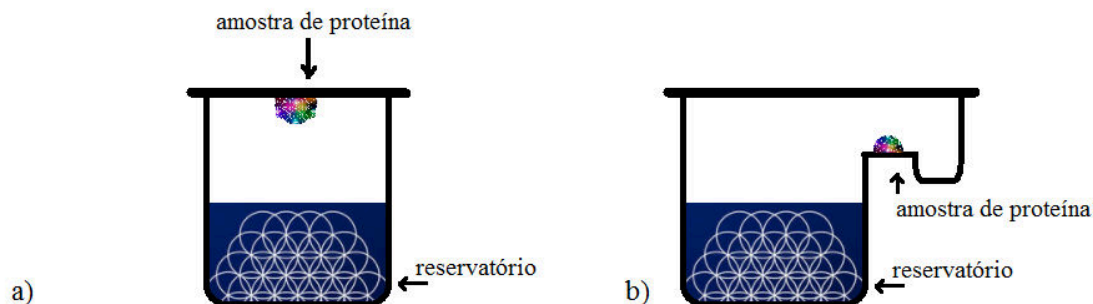


Figura 17-Método de Difusão por vapor: a) gota pendurada e b) gota apoiada.

Fonte: Elaborada pela autora.

O tempo desse processo tem grande impacto no resultado final. Ao invés de um cristal, a proteína pode formar um precipitado amorfo, ou mesmo micro-cristais, que não possibilitam a difração (115). A cristalização também depende de outros fatores, tais como: concentração e solubilidade da proteína, tampão, sal usado para induzir a supersaturação, presença de íons metálicos e etc. Assim, várias condições são testadas e as que apresentarem resultados promissores, podem ser mais minuciosamente repetidas com o intuito de se obter um cristal.

Algumas condições de cristalização foram testadas, utilizando-se diferentes concentrações das *RproOBPs* (2, 5, e 10 mg/mL). O método utilizado foi o de difusão de vapor por gota apoiada, em placas de 96 poços á 20°C. Foram utilizados os kits comerciais *Index HT* (Hampton Research), *861* (Hampton Research), *MORPHEUS HT* (Molecular Dynamics), *MIDAS* (Molecular Dynamics) *Classic II Suite* (QIAGEN) e *Classic Suite* (QIAGEN), *SG1 Screen HT* (Molecular Dynamics); em um total de 672 condições diferentes (sem incluir as diferentes concentrações das *OBPs*). O robô Honeybee 939 (Molecular Dynamics) montou as placas com 0,7 µL da solução de proteína, cada *RproOBP* em seu tampão de purificação, e 0,7 da solução de precipitação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Busca e Análise das *RproOBPs* através de programas de Bioinformática

Como foi citado anteriormente, o banco de dados VectorBase (90), foi utilizado para a busca das proteínas desse trabalho. Utilizando a ferramenta de busca "Genome Browser" e limitando os resultados de "odorant binding protein" para a espécie *R. prolixus*, foram encontrados 20 resultados, dentro dos quais, 10 representavam genes anotados como OBPs e 10 como possíveis OBPs (Anexo A).

É importante destacar que se a pesquisa não for restringida, irão aparecer um total de 31 036 proteínas como resultado relacionado. Incluindo, por exemplo, proteínas ligantes de ferro, proteínas ligantes de dsRNA (RNA dupla fita) e receptores de odorante. Apesar de diferentes famílias de proteínas estarem incluídas nesse resultado, vale a pena ressaltar que algumas OBPs responsáveis por outras funções no organismo estão também presentes nessa listagem, assim como a subfamília de PBPs.

As 10 OBPs que aparecem já anotadas no VectorBase foram as OBPs 3, 4, 8, 9, 11, 19, 22, 25, 26 e uma OBP sem nome. As sequências dessas proteínas foram então alinhadas com a ferramenta BLASTP (91), no banco de dados NCBI nr, e as sequências que retornaram foram majoritariamente de OBPs, putativas ou não.

Seguindo a nomenclatura adotada em que o nome específico do organismo é associado a designação da OBP, passamos a adotar a seguinte designação para as enzimas de *R. prolixus* deste trabalho: *RproOBP* 8, *RproOBP* 11 e *RproOBP* 19.

As *RproOBPs* 8, 11 e 19 mostraram o melhor alinhamento e mais confiança e foram as escolhidas para esse trabalho. A *RproOBP* 8 é um transcrito de 349 pares de base resultante de um gene com 5 éxons. A *RproOBP* 11 se origina de um gene com 6 éxons e um transcrito de 501 pb, dois genes são reconhecidos como parálogos da *RproOBP* 11, aOBP 9 e um gene ainda sem descrição na mesma espécie. A *RproOBP* 19 provém de um transcrito de 411 pb e 5 éxons, seu gene foi reconhecido como parálogo de outros dois genes (ainda sem descrição) e ortólogo de um terceiro gene sem descrição de *Cimex lectularius*.

As *RproOBP* 8, 11 e 19 possuem os seguintes códigos no Banco de Dados UniProt, T1H963, Q8T5U0 e T1H992, respectivamente. As *RproOBP* 8 e *RproOBP* 19 foram anotadas como proteínas ligadoras de odorante, porém a *RproOBP* 11 foi anotada como uma outra proteína ligadora de grupo heme. A *RproOBP* 11 mostrou 90% de identidade com uma proteína *R. prolixus* e outra de *R. neglectus*, além de 50 % de identidade com 9 proteínas encontradas nas espécies *R. prolixus*, *R. neglectus*, *Panstrongylus lignarius*, *Triatoma infestans* e *Triatoma dimidiata*. E a *RproOBP* 19 apresentou 50 % de similaridade com uma proteína de *T. infestans*.

Tanto a *RproOBP* 11 como da *RproOBP* 19, apresentaram uma sequência de aminoácidos no N-terminal indicadas como um peptídeo sinal pelo UniProt (121). Como existem muitos programas de predição de peptídeos sinal e nem todos tem um resultado de qualidade satisfatória (122), foram realizadas novas análises com os programas PrediSi (123), Probius (124) e SignalP 4.0 (125). Todos esses programas indicaram a ausência de peptídeo sinal para a *RproOBP* 8, e a presença de um peptídeo para ambas *RproOBPs* 11 e 19. Na Figura 18 e Figura 19 pode ser observado o resultado do programa SignalP 4.0, que indica um peptídeo sinal de 23 aminoácidos para a *RproOBPs* 11, e 21 para a *RproOBPs* 19. Como os demais programas - UniProt, PrediSi, Probius - indicaram que o peptídeo sinal se encontrava entre o décimo nono e o vigésimo aminoácido, foi decidido que esse seria a região retirada da síntese dos oligonucleotídeos. Esse peptídeo sinal foi bem descrito nessa família de proteínas. (29,61)

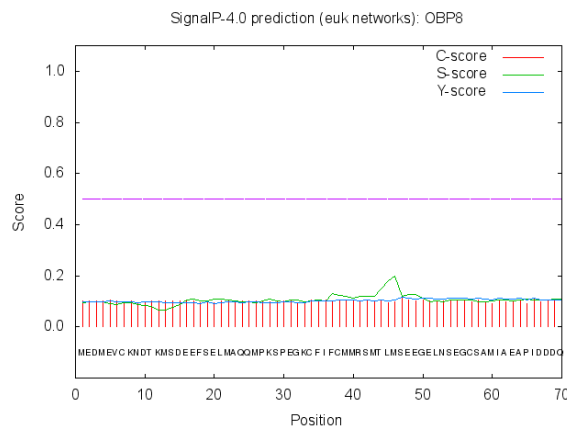


Figura 18 - Resultado obtido pelo programa SignalP 4.0 para *RproOBP* 8, mostrando os valores do C-score que deve ser apenas significativamente alto no local de clivagem. O S-score relacionado ao comprimento do peptídeo sinal previsto. E o Y-score que é uma previsão melhor do local de

clivagem derivado do *C-score* combinado com o *S-score*. Esse resultado indica que a *RproOBP* 8 não possui um peptídeo sinal.

Fonte: Adaptada do SignalP 4.0. (125)

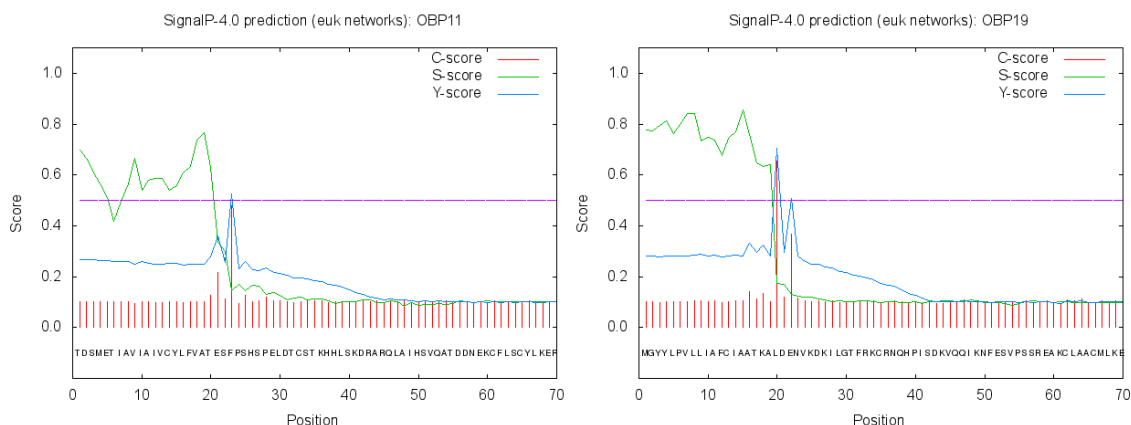


Figura 19 - Resultado obtido pelo programa SignalP 4.0 para *RproOBP* 11 e 19, mostrando os valores do *C-score* que deve ser apenas significativamente alto no local de clivagem. O *S-score* relacionado ao comprimento do peptídeo sinal previsto. E o *Y-score* que é uma previsão melhor do local de clivagem derivado do *C-score* combinado com o *S-score*. Esse resultado indica que a *RproOBP* 11 possui um peptídeo sinal nos primeiros 23 aminoácidos, e que a *RproOBP* 19 possui um peptídeo sinal nos primeiros 21 aminoácidos.

Fonte: Adaptada do SignalP 4.0. (125)

De qualquer maneira, as *RproOBP* 8, 11 e 19 foram incluídas pelo BLASTp na superfamília PBP_GOBP, ou seja são proteínas que contêm o domínio das proteínas ligadoras de feromônios ou ligadoras de odorantes gerais. A Figura 20 mostra esse resultado para a *RproOBP* 8, e ilustra o obtido para as demais.



Figura 20 - Resultado do BLASTp obtido para a *RproOBP* 8, evidenciando que essa proteína faz parte da superfamília PBP_GOBP.

Fonte: Adaptada de BLASTp. (91)

Com esses resultados podemos concluir que as sequências gênicas selecionadas representam de fato proteínas ligantes de OBPs do vetor *R. prolixus*. A *RproOBP* 8 possui uma identidade de 25 a 36 % com as 100 sequências primeiras do BLASTp. Enquanto a *RproOBP* 11 tem identidade de 21 a 97 %, e a *RproOBP* 19 de 25 a 50 %. E que *RproOBP* 11 e 19, possuem um peptídeo sinal nos primeiros 19 aminoácidos.

4.1.1 Análise da composição de aminoácidos e ligação dissulfeto

Os monômeros das *RproOBP* 8, 11 e 19 tem respectivamente: 116, 128 e 137 aminoácidos; massas moleculares de 13,3 kDa, 14,8 kDa e 15,4 kDa; e pontos isoelétricos teóricos de 4,52, 5,94 e 6,88 conforme computado pelo servidor ProtParam (92). A composição de aminoácidos está detalhada na Tabela 5.

Tabela 5 - Número de Aminoácidos, Massa Molecular, Ponto isoelétrico e Porcentagem de aminoácidos nas estruturas primárias das *RproOBP* 8, 11 e 19. Os valores dessa Tabela se referem a construção resultante utilizando o pET-Trx LIC.

OBP 8		OBP 11		OBP 19	
Número de Aminoácidos	116	Número de Aminoácidos	128	Número de Aminoácidos	137
Massa Molecular	13323.25 Da	Massa Molecular	14780.77 Da	Massa Molecular	15428.83 Da
Ponto Isoelétrico Teórico	4.52	Ponto Isoelétrico Teórico	5.94	Ponto Isoelétrico Teórico	6.88
Coefficiente de Extinção Molar teórico	3480 M ⁻¹ cm ⁻¹	Coefficiente de Extinção Molar teórico	9315 M ⁻¹ cm ⁻¹	Coefficiente de Extinção Molar teórico	7825 M ⁻¹ cm ⁻¹
Aminoácido	Porcentagem (%)	Aminoácido	Porcentagem (%)	Aminoácido	Porcentagem (%)
Cisteína (C)	6.9	Cisteína (C)	5.5	Cisteína (C)	5.1

Fonte: Elaborada pela autora.

Considerando as OBPs proteínas pequenas, elas apresentam um número considerável de cisteínas: a *RproOBP* 8 possui 8 cisteínas. Por essa razão e pela importância que as ligações dissulfeto tem apresentado na estrutura dessa família de proteínas (27–29), foi utilizado o servidor *DISULFIND* (93) para prever as possíveis ligações dissulfeto.

O programa predisse 4 ligações dissulfeto para a *RproOBP* 8, entre os resíduos 7 e 86, 34 e 57, 38 e 81, e 93 e 102; como esquematizado na Figura 21. O coeficiente de extinção molar calculado é considerado então $3480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, assumindo que todos os pares de cisteínas foram ligações dissulfeto, esse valor foi utilizado para medir a concentração das amostras de proteína.

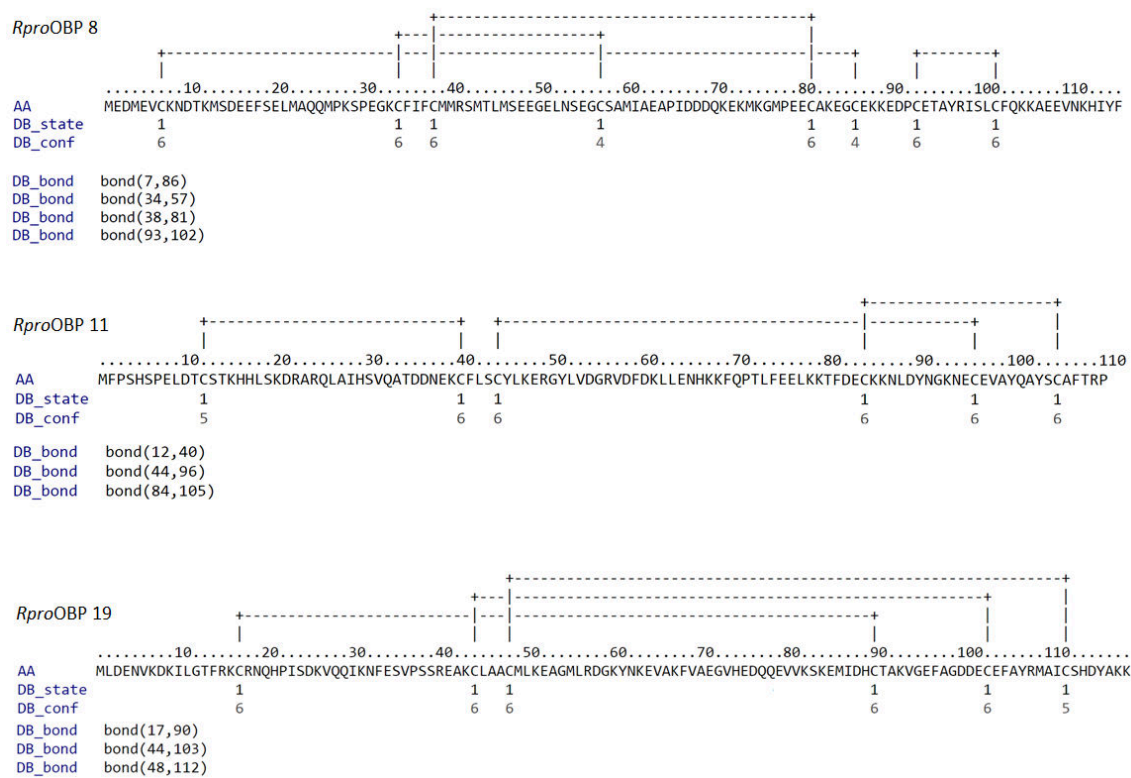


Figura 21 - Esquema das ligações dissulfeto previstas para as *RproOBP* 8, 11 e 19 utilizando o programa DISULFIND. Abreviações: AA) sequência de aminoácidos; DB_state) predição do estado de ligação dissulfeto (1 = há ligação dissulfeto, 0 = não há ligação dissulfeto); DB_conf confiança da predição do estado de ligação dissulfeto (0=baixo a 9=alto).

Fonte: Adaptada de DISULFIND (93).

O mesmo foi feito com as demais *RproOBPs*. Para a *RproOBP* 11 foram previstas três ligações dissulfeto, entre os resíduos 12 e 14, 44 e 96, e entre 84 e 105; como pode ser visto na Figura 21. Assumindo que todos os seis resíduos de cisteína da proteína se encontram em ligações dissulfeto e seu coeficiente de extinção molar é $9315 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

A *Rpro*OBP 19 também apresentou 3 possíveis ligações dissulfeto, entre os seguintes resíduos: 17 e 90, 44 e 103, e 48 e 112. e assumindo que todos os pares de cisteínas foram ligações dissulfeto seu coeficiente de extinção molar é $7825 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Figura 21).

Essas análises *in silico* sugerem que as *Rpro*OBPs 11 e 19 são OBPs clássicas, já que possuem três ligações dissulfeto interligadas, característica dessas OBPs. A *Rpro*OBP 8 poderia ser do tipo C-mais, já que possui 8 cisteínas, mas não possui o resíduo de prolina conservado depois da sexta cisteína que foi descrita para esse grupo. (26–29) O ideal é que experimentos laboratoriais sejam realizados para comprovar e verificar a presença dessas ligações, e os respectivos resíduos que as formam.

4.1.2 Predição de Estrutura Secundária e Terciária

O servidor PSIPRED (94) foi utilizado para prever estrutura secundária de todas as *Rpro*OBPs (Figura 22, o mapa mais detalhado se encontra no Anexo B). E como esperado para essa família de proteínas, elas são ricas em α -hélices. Seis domínios α -hélice enovelados compõe as OBPs, a diferença- *Rpro*OBP 8 com 8 α -hélices, e as demais com 7 - encontrada pelo PSIPRED pode ser um erro na predição *in silico* ou mesmo, a formação da sétima α -hélice que ocorre em algumas OBPs e faz parte do mecanismo de ligação e liberação dos ligantes. (29,30,73) Para verificar esses resultados foi utilizado o servidor GOR4 (Figura 23) (95) e servidor Spritz. (102)

Mapa da Estrutura Secundária - OBP 8

1 M Q D M E V C K N D T K M S D E E F S E L M A Q Q H P K S P E G K C F I F C M H R S H T L M S E E G 50
 51 E L N S E G C S A M I A E A P I D D Q K E K M K G M P E E C A K E G C E K K E D P C E T A Y R I S 100
 101 L C F Q K K A E E V N K H I Y F

Mapa da Estrutura Secundária - OBP 11

1 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 50
 51 A T D D N E K C F L S C Y L K E R G 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 100
 101 E C K K N L D Y N G K N E C E V A Y Q A Y S C A F T R P

Mapa da Estrutura Secundária - OBP 19

1 M R Y Y L P V L L I A F C I A A T K A L D E N V K D K I L G T F R K C R N Q H P I S D K V Q Q I K N 50
 51 F E S V P S S R E A K C L A A C M L K E A G M L R D G K Y N K E V A K F V A E G V H E D Q Q E V V K 100
 101 S K E M I D H C T A K V G E F A G D D E C E F A Y R M A I C S H D Y A K

α-hélice folha β desordenada proteína de ligação desordenada Limite do Dompred Limite do DomSSEA
 Anotações M L E E A B

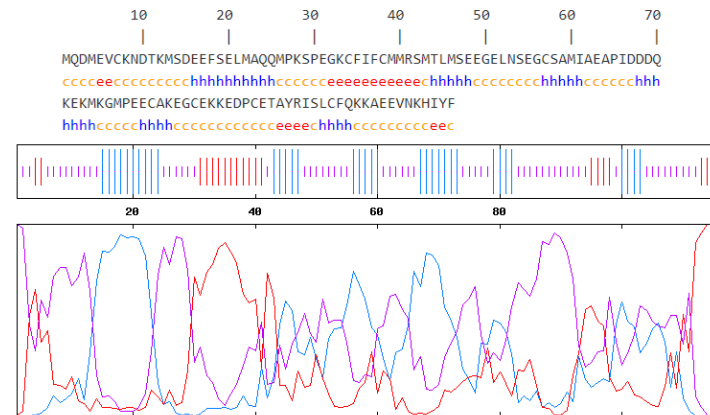
Figura 22 - Predição da Estrutura secundárias das OBPs 8, 11 e 19 pelo programa PSIPRED.

Fonte: Adaptada de PSIPRED. (94)

GOR4 :

Alpha helix (Hh) :	35 is	30.17%
3 ₁₀ helix (Gg) :	0 is	0.00%
Pi helix (Ii) :	0 is	0.00%
Beta bridge (Bb) :	0 is	0.00%
Extended strand (Ee) :	19 is	16.38%
Beta turn (Tt) :	0 is	0.00%
Bend region (Ss) :	0 is	0.00%
Random coil (Cc) :	62 is	53.45%
Ambiguous states (?) :	0 is	0.00%
Other states :	0 is	0.00%

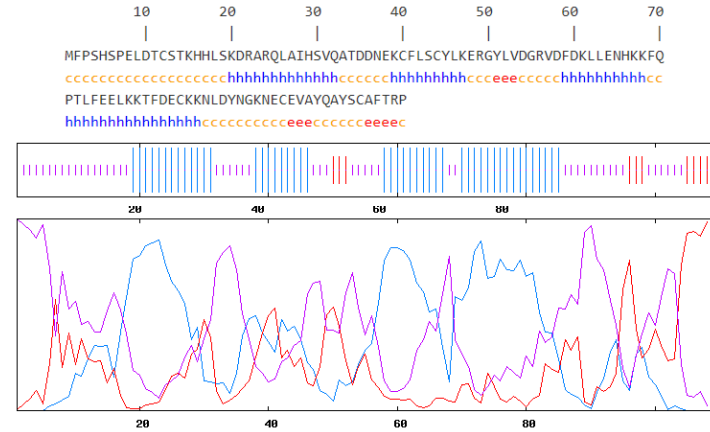
Mapa da Estrutura Secundária GOR4 - OBP 8



GOR4 :

Alpha helix (Hh) :	48 is	43.64%
3 ₁₀ helix (Gg) :	0 is	0.00%
Pi helix (Ii) :	0 is	0.00%
Beta bridge (Bb) :	0 is	0.00%
Extended strand (Ee) :	10 is	9.09%
Beta turn (Tt) :	0 is	0.00%
Bend region (Ss) :	0 is	0.00%
Random coil (Cc) :	52 is	47.27%
Ambiguous states (?) :	0 is	0.00%
Other states :	0 is	0.00%

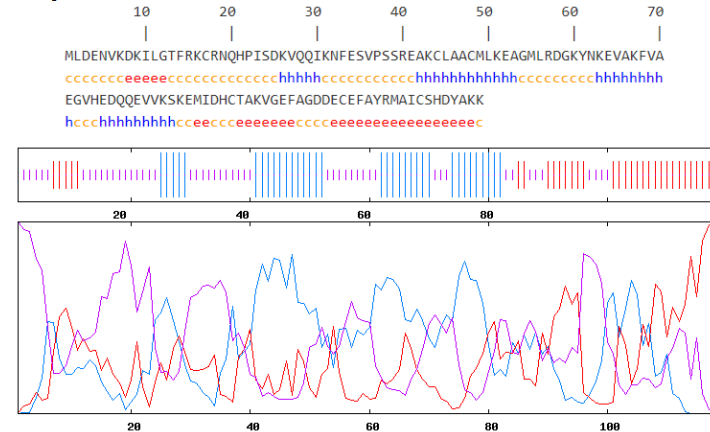
Mapa da Estrutura Secundária GOR4 - OBP 11



GOR4 :

Alpha helix (Hh) :	35 is	29.41%
3 ₁₀ helix (Gg) :	0 is	0.00%
Pi helix (Ii) :	0 is	0.00%
Beta bridge (Bb) :	0 is	0.00%
Extended strand (Ee) :	31 is	26.05%
Beta turn (Tt) :	0 is	0.00%
Bend region (Ss) :	0 is	0.00%
Random coil (Cc) :	53 is	44.54%
Ambiguous states (?) :	0 is	0.00%
Other states :	0 is	0.00%

Mapa da estrutura Secundária GOR4 - OBP 19



— α-hélice
 — folha β
 — fita simples

Figura 23 - Mapa da estrutura secundária das OBPs 8, 11 e 19 pelo servidor GOR4. São dois gráficos para cada proteína. O primeiro é para visualizar melhor a predição. E o segundo, representa as curvas de *score* para cada estado predito.

Fonte: Adaptada de GOR4.(95)

GOR4 previu para a *RproOBP* 8 6 α -hélices, e para as *RproOBPs* 11 e 19, 4 α -hélices. O servidor Spritz (102) previu 6 α -hélices para a *RproOBP*19, nenhuma folha beta, e o restante da estrutura de coil. O mesmo resultado foi encontrado para a *RproOBP* 8, mas para a *RproOBP*11 foram encontradas 7 α -hélices. Essas discrepâncias evidenciam a necessidade de experimentos *in vitro* para confirmação da estrutura secundária dessas proteínas.

O programa DOMPRED utiliza dois algoritmos de predição independentes, DOMPRED e DomSSEA. O primeiro compara a sequência de aminoácidos da proteína com alguns bancos de dados e tenta encontrar um domínio similar, caso não apareçam sequência significativamente similares- que foi o caso das três *RproOBPs*, o DomSSEA é utilizado para prever a existência de domínios com base na estrutura secundária. Nenhum dos programas foi capaz de prever os possíveis domínios dessas OBPs.

O servidor RONN (97) realiza uma predição de desordem por resíduo. A *RproOBP* 8 apareceu com mais de 50% seus resíduos como desordenados. A OBP 11 apresentou os primeiros 22 resíduos como desordenados e a OBP 19 apresentou três regiões de desordem, como pode ser visto na Figura 24.

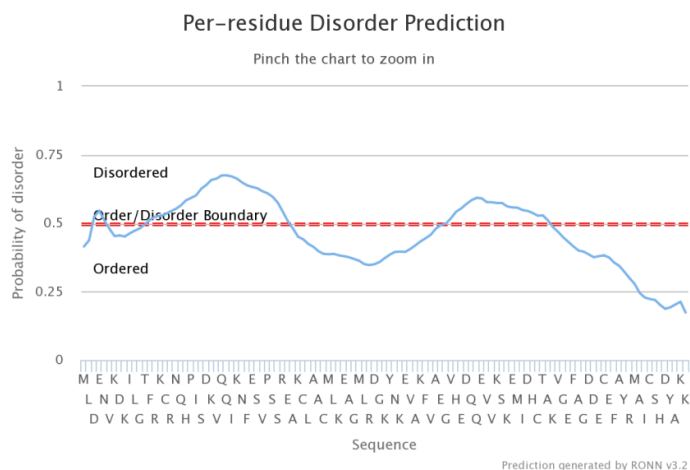


Figura 24 - Resultado obtido para a *RproOBP* 19 gerado pelo programa RONN.

Fonte: Adaptada de RONN. (97)

Para averiguar regiões de desordem nas proteínas foi utilizado mais de um servidor. Foi prevista uma região de desordem no N-terminal, pelo DISOPRED, para as *RproOBPs* 11

e 19, mas não para a OBP 8 (Gráfico 1 e Gráfico 2). Como os métodos de predição são muito diferentes entre si, outras predições foram realizadas com outros programas para verificar se havia consenso em alguma região.

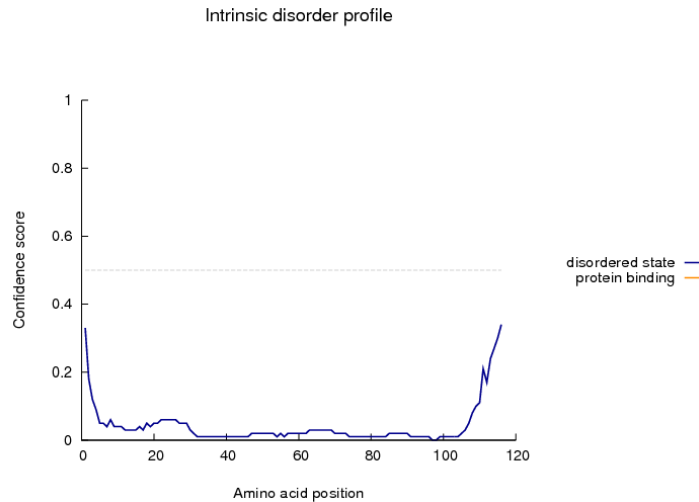


Gráfico 1 - Predição de Regiões Desordenadas da *RproOBP 8* pelo programa DISOPRED do servidor PSIPRED. Os aminoácidos da sequência de entrada são considerados desordenados quando o *Score* de Confiança, linha azul, é maior que 0,5, ou seja quando está acima da linha tracejada. A linha laranja mostra a confiança das previsões dos resíduos de ligação de proteínas desordenadas.

Fonte: Adaptado de DISOPRED. (94)

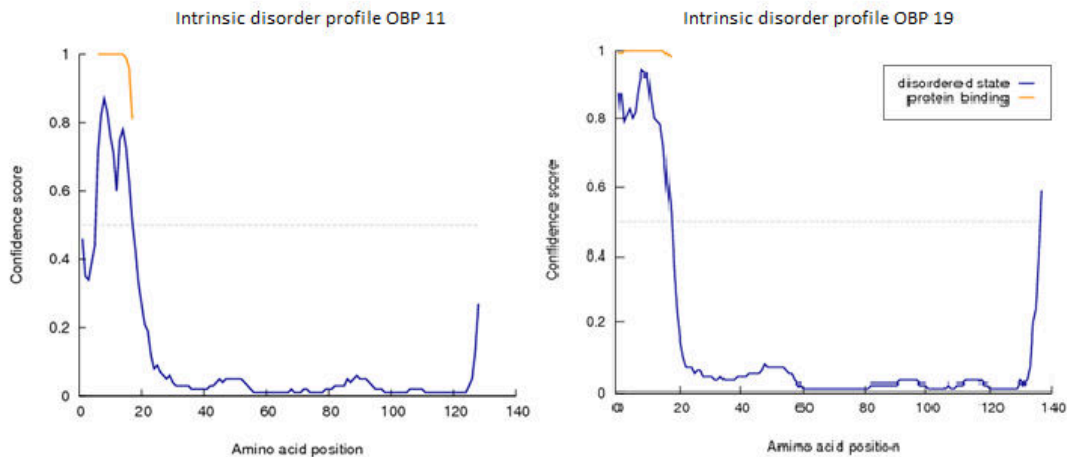


Gráfico 2 - Predição de Regiões Desordenadas da *RproOBP 11* e da *RproOBP 19* pelo programa DISOPRED do servidor PSIPRED. Os aminoácidos da sequência de entrada são considerados desordenados quando o *Score* de Confiança, linha azul, é maior que 0,5, ou seja quando está acima da linha tracejada. A linha laranja mostra a confiança das previsões dos resíduos de ligação de proteínas desordenadas.

Fonte: Adaptado de DISOPRED. (94)

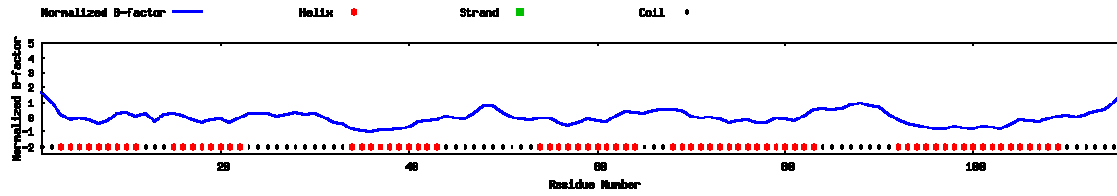


Figura 26 -Fator-B da *RproOBP 8*. Esse fator indica a extensão da mobilidade termal inerente dos resíduos/átomos da proteína.

Fonte: Adaptada de I-TASSER. (103-104)

A partir desses dados e da comparação com outras proteínas do PDB (*protein data bank*) o programa gera 5 modelos da estrutura terciária da proteína de interesse. Todas as 10 proteínas análogas utilizadas para realizar a predição são da família das OBPs, sendo encontradas nas espécies: *A. gambiae*, *A. mellifera*, *B. mori*, *A. aegypti*, *Amyeloid transitella* e *Megoura viciae*. O grau de confiabilidade de cada modelo é quantitativamente medido pelo fator-C. Esse fator é baseado na significância dos alinhamentos do modelo de *threading* e nos parâmetros de convergência das simulações de montagem da estrutura. A pontuação C está tipicamente na faixa de [-5, 2], onde uma pontuação C de maior valor significa um modelo com maior confiança e vice-versa. Na Figura 27 está representado o modelo da *RproOBP 8* de maior Fator C. Sendo o modelo gerado pelo I-TASSER o modelo mais plausível.

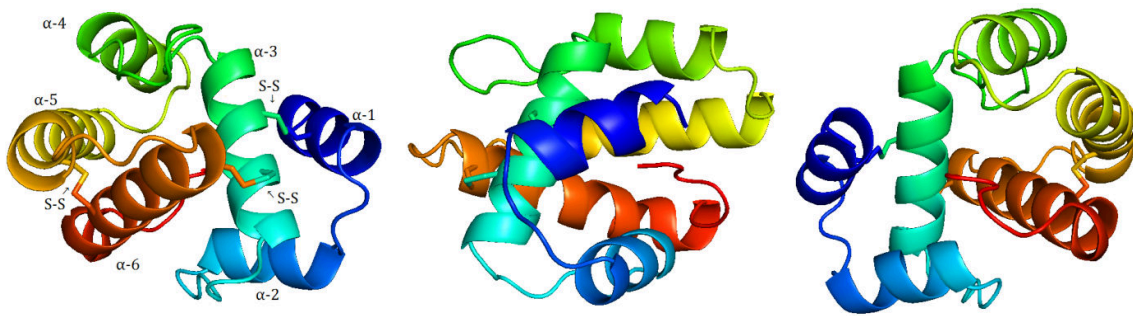


Figura 27 - Predição da Estrutura Terciária da *RproOBP 8* pelo programa I-TASSER, modelo 1 C-score=0.19. Imagem obtida pelo programa Pymol, destacando-se as ligações dissulfeto (S-S) e as α -hélices, de 1 a 6.

Fonte: Adaptada de I-TASSER. (103-104)

Nesse modelo há formação de 6 α -hélices e três ligações dissulfeto, o que é esperado para as OBPs clássicas - diferente do que foi predito pelo programa DISULFIND de 4 ligações dissulfeto (Figura 21).

Quando observados a Figura 27, parece haver um sítio de ligação ao ligante no centro da proteína, e esse centro está parcialmente encoberto pela extremidade C-terminal da *RproOBP* 8. Se compararmos a estrutura predita com a estrutura da OBP 20 de *A. gambiae*, que foi a proteína identificada como o melhor análogo estrutural no PDB (Figura 28), é possível observar que os ligantes, nesse exemplo o glicerol, irão interagir com o centro da proteína. Assim, é possível rever quais são os possíveis ligantes dessa OBPs.

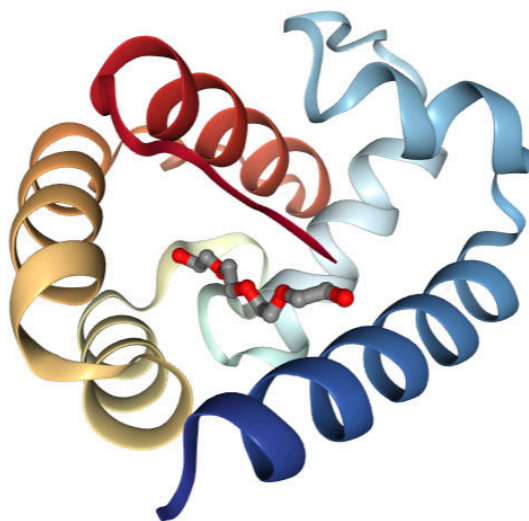


Figura 28 - Estrutura da proteína ligadora de odorante 20 de *A. gambiae* ligada com polietileno glicol. PDB 3V2L.

Fonte: ZIEMBA (126).

Em relação a esses possíveis ligantes, os programas COFACTOR e COACH sugeriram que a *RproOBP* 8 pode se ligar a butan-1-ol utilizando os resíduos 40, 45, 46, 52, 96, 99, 100, 103 e 116; ou mesmo com os resíduos 40, 45, 46, 52, 96, 99, 100, 103 e 116. Também apareceram como possíveis ligantes os compostos (z)-octadec-11-enil acetato e ácido (2z)-9-oxodec-2-enoico. Todos os valores dos possíveis ligantes obtiveram um *Tm-score* acima de 0,5, o que significa que a semelhança dessa OBP, com as respectivas proteínas

que comprovadamente se ligam a esses compostos é grande o suficiente para sugerir um mesmo enovelamento.

Essa ampla gama de capacidade de ligação a diferentes ligantes, e a possibilidade de resíduos diferentes estarem interagindo na ligação, já foi descrita para as OBPs. Como foi citado anteriormente, algumas OBPs parecem não reconhecer o ligante em si, e apenas interagir aos ligantes que se acomodam dentro do seu sítio de ligação.

Para a *RproOBP* 11 a predição da estrutura secundária, a acessibilidade ao solvente e o fator-B obtido pelo programa I-TASSER, podem ser observados na Figura 29 e Figura 30.

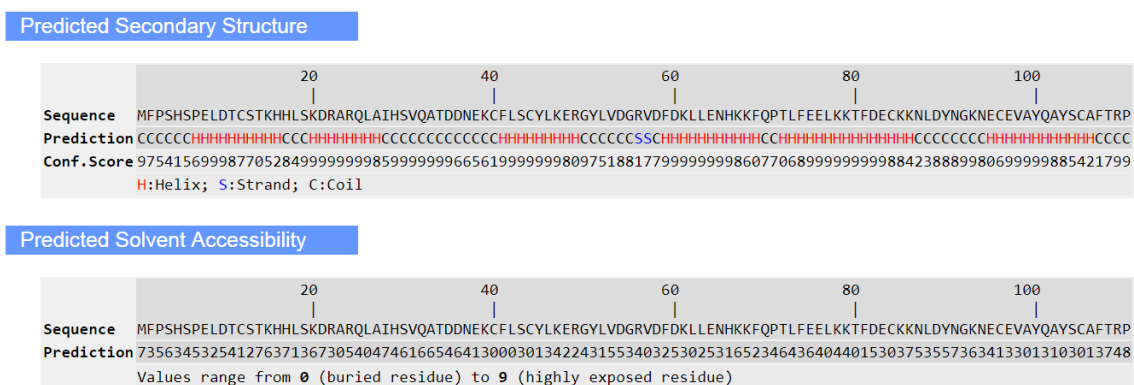


Figura 29 - Predição pelo programa I-TASSER da Estrutura secundária e acessibilidade do solvente para a *RproOBP* 11.

Fonte: Adaptada de I-TASSER (103-104).

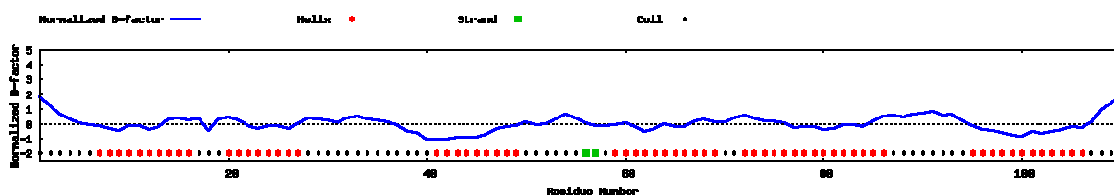


Figura 30 - Fator-B da *RproOBP* 11. Esse fator indica a extensão da mobilidade termal inerente dos resíduos/átomos da proteína.

Fonte: Adaptada de I-TASSER (103-104).

Também foram preditas 6 α -hélices para a *RproOBP* 11. Porém dois resíduos parecem formar uma folha β , o que não é confirmado por predições quando a estrutura dessa OBP é

comparada com dez proteínas análogas encontradas no PDB, que nesse caso são das espécies *Phormia regina*, *A. gambiae* e *A. mellifera*. Todas as cisteínas da *RproOBP* 11 correspondem em posição as cisteínas conservadas dessa família de proteínas.

O modelo gerado pode ser visto na Figura 31, e o fator-C teve um valor de 0,24. A única diferença em relação as ligações dissulfeto, entre essa predição e a do programa DISULFIND é que a primeira cisteína se liga a terceira, ao invés da segunda, e assim, a segunda cisteína se liga a quinta.

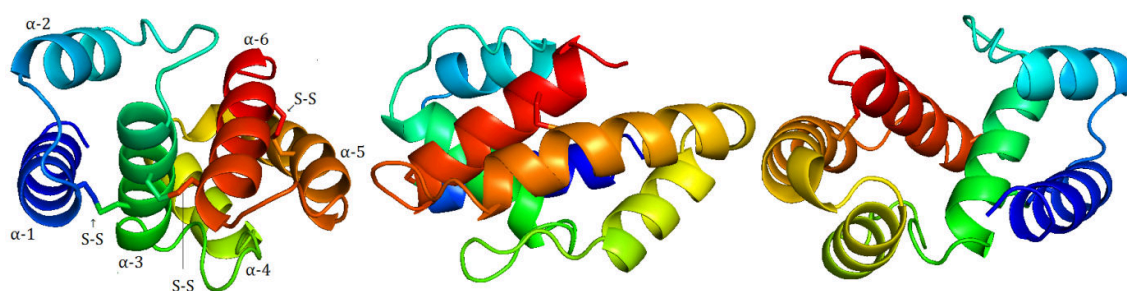


Figura 31 - Predição da Estrutura Terciária da *RproOBP* 11 pelo programa I-TASSER, modelo 1C-score=0.24. Imagem obtida pelo programa Pymol, destacando-se as ligações dissulfeto (S-S) e as α -hélices, de 1 a 6.

Fonte: Adaptada de I-TASSER (103-104).

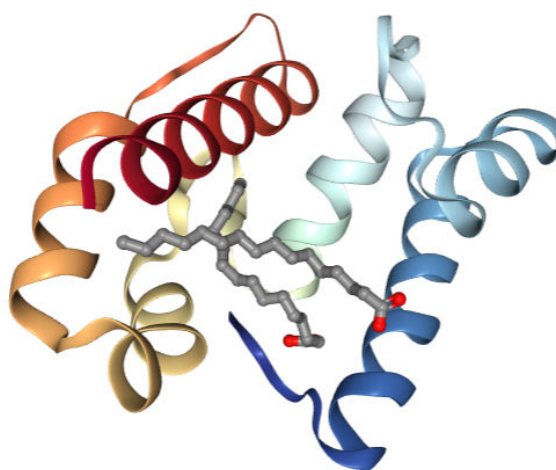


Figura 32 - Proteína ligadora de ácidos graxos do disco oral de *P. regina*, OBP56a. PDB 5DIC.

Fonte: PDB 5DIC[†]

[†] PDB 5DIC (DOI:10.220/PDB5DIC/PDB)

Da mesma maneira que para a *Rpro*OBP 8, a *Rpro*OBP 11 parece ter um sítio de ligação no centro da proteína. Porém a distância entre as α -hélices parece um pouco menor do que quando comparada a *Rpro*OBP 8. Sua maior similaridade estrutural, é com a proteína ligadora de ácidos graxos, OBP56a, de *P. regina* (Figura 32).

Para a *Rpro*OBP 11 foram sugeridos outros compostos de ligação, mas o TM-score resultante dessa predição não se apresentou tão confiável quanto o calculado para a *Rpro*OBP 8. Os compostos sugeridos foram: etanol, 8-anilino-1-naftaleno sulfonato, ácido palmítico, ácido (2z)-9-oxodec-2-enoico, e n-fenilnaftalen-1-amina.

Por fim, os resultados obtidos para a *Rpro*OBP 19, podem ser observados na Figura 33, Figura 34 e Figura 35.

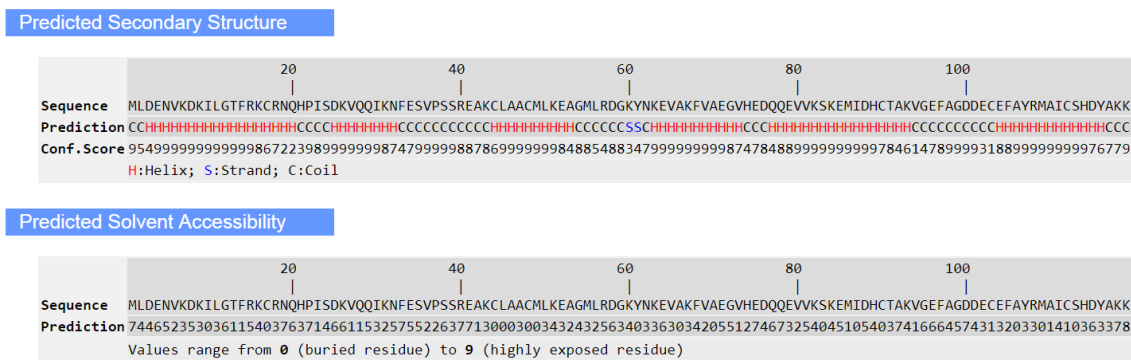


Figura 33 - Predição pelo programa I-TASSER da Estrutura secundária e acessibilidade do solvente para a *Rpro*OBP 19.

Fonte: Adaptada de I-TASSER. (103-104)

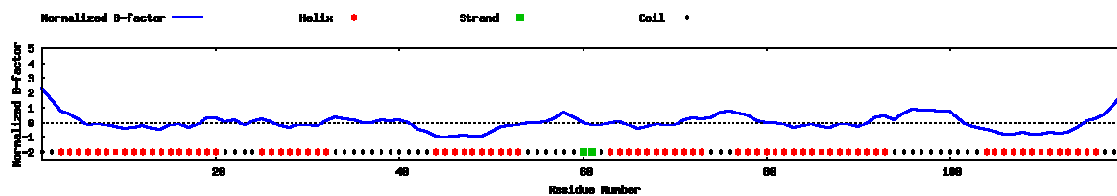


Figura 34 -Fator-B da *Rpro*OBP 19. Esse fator indica a extensão da mobilidade termal inerente dos resíduos/átomos da proteína.

Fonte: Adaptada de I-TASSER (103-104)

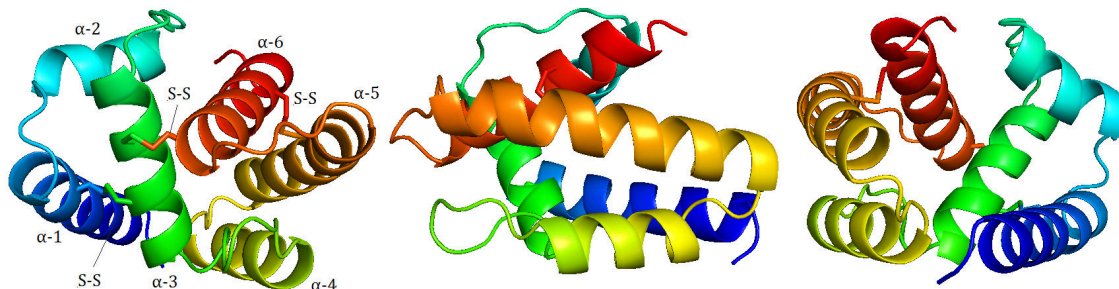


Figura 35 - Predição da Estrutura Terciária da *RproOBP 19* pelo programa I-TASSER, modelo 1C-score=0.24. Imagem obtida pelo programa Pymol, destacando se as ligações dissulfeto (S-S) e as α -hélices, de 1 a 6.

Fonte: Adaptada de I-TASSER. (103-104)

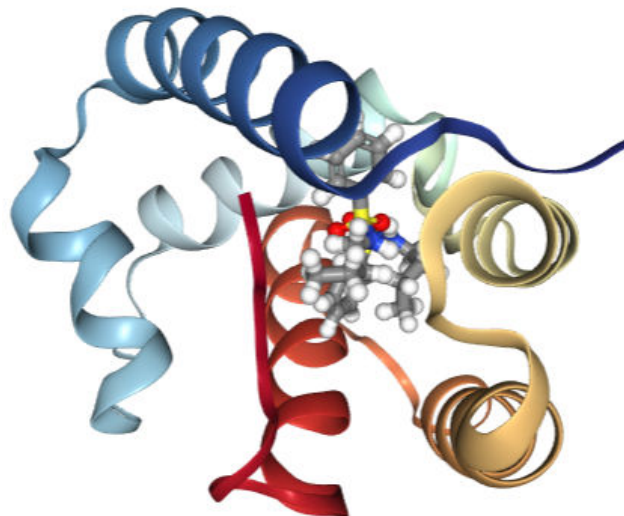


Figura 36 - Proteína ligadora de odorantes 5, OBP 5, de *A. mellifera*. PDB 3R72.

Fonte: SPINELLI (68)

Que da mesma maneira quer as *RproOBP 8* e *11*, o modelo de estrutura tridimensional previsto, apresenta um sítio de ligação no centro da molécula, também da mesma forma que a maior análoga estrutural prevista, mostrada na Figura 36, uma OBP de *A. mellifera*. Dentre as demais proteínas análogas da *RproOBP 19* estavam OBPs e PBPs das espécies *D. melanogaster*, *A. mellifera*, *A. gambiae*, *L. migratoria*, *A. aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.

A ligação entre a segunda e a quinta cisteína foi prevista também pelo DISULFIND, porém, a predição pelo I-TASSER, sugeriu que a primeira cisteína se liga a terceira, e a quarta

á sexta. Para a *Rpro*OBP 19 os compostos sugeridos foram: etanol, n-butil-benzenesulfonamida, (z)-octadec-11-enil acetato e tetraetileno glicol.

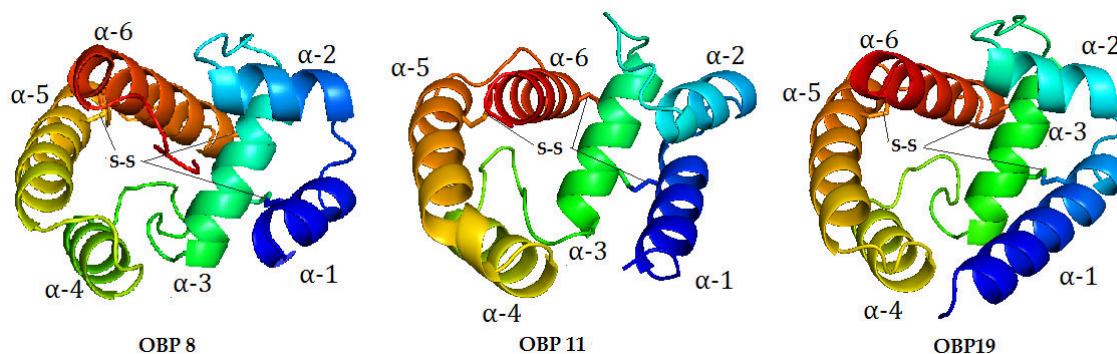


Figura 37 - Predição da Estrutura Terciária das *Rpro*OBPs 8, 11 e 19 pelo programa I-TASSER. Imagem obtida pelo programa Pymol, destacando se as ligações dissulfeto (S-S) e as α -hélices, de 1 a 6.

Fonte: Adaptada de I-TASSER (103-104)

Comparando a estrutura das três *Rpro*OBPs (Figura 37), elas tem uma disposição de α -hélices similar, embora algumas tenham comprimentos diferentes. Os loops também tem uma variação de tamanho. O C-terminal da *Rpro*OBP 8 é mais comprido que das *Rpro*OBP 11 e 19, que é uma característica das OBPs que cobrem o sítio de ligação. E embora, não estejam nos mesmos resíduos, as ligações dissulfeto unem as mesmas α -hélices: $\alpha 1$ e $\alpha 3$, $\alpha 3$ e $\alpha 6$, $\alpha 5$ e $\alpha 6$.

As análises de predição de regiões enoveladas e desordenadas, ligações dissulfeto e predição de estrutura terciária corroboram com a idéia de que as ligações dissulfeto são importantes para manter a estrutura terciária das proteínas dessa família, e que a presença de α -hélices representa a maior parte da estrutura dessas proteínas.

4.2 Obtenção de *Rpro*OBPs recombinantes

4.2.1 Obtenção das construções gênicas em vetores de propagação

As sequências sintetizadas pela empresa IDT se encontram na Tabela 6, e foram amplificadas para que pudessem ser clonadas nos vetores de propagação. O resultado das ampliações foi analisado em gel de agarose 1% e pode ser observado na Figura 38.

Tabela 6 - Sequência das *Rpro*OBPs 8, 11 e 19. As sequências reconhecidas pelas enzimas de restrição *Nco* I (cCATGG) e *Xho* I (Ctcgag) estão destacadas em negrito

Gene	Oligonucleotídeos
OBP 8	actgactc CATGGA AAGACATGGAAGTTTGTAAAAACGACACTAAAATGTCCGATG AAGAATTCAGCGAACTGATGGCTCAGCAGATGCCGAAGAGCCCAGGAAAGGTA AGTGTTCATCTTCTGCATGATGCGCTCTATGACTCTGATGTCTGAAGAAGGT GAGCTGAACTCCGAAGGCTGCTCCGCAATGATCGCTGAGGCGCCGATCGATG ACGATCAGAAAAGAAAAGATGAAAGGTATGCCAGAAGAATGTGCGAAAAGAAG GCTGCGAAAAGAAAAGAACCCGTGCGAAAAGTGCCTACCGCATCTCTCTGTG CTTCAAAAAAAGGCGGAAGAAGTCAACAAGCATATCTATTTCTAGTAA Ctcg agactgact
OBP 11	actgactc CATGGA AACTATCGCTGTTATCGCTATCGTTTGCTACCTGTTTCGTTGC AACCGAATCCTTTCCGAGCCATTCTCCGAACTGGACACCTGCTCCACCAAA CACCACCTGTCTAAAGACCGTGCTCGCCAGCTGGCGATCCACTCTGTACAGG CAACTGACGACAACGAAAAGTGCTTTCTGAGCTGCTACCTGAAAGAACGTG GCTACCTGGTAGACGGTCGCGTTGACTTTGACAAAAGTCTGGAAAACCACAA AAAATTCCAGCCGACCCTGTTTGAGGAGCTGAAAAAGACCTTCGACGAATGT AAAAAGAATCTGGATTACAACGGCAAAAATGAATGCGAAGTGGCCTATCAG GCCTATAGCTGTGCGTTTACCCGCCCTTAGTAA Ctcgagactgact
OBP 19	actgactc CATGGG TACTACCTGCCGGTTCTGCTGATTGCATTCTGCATTGCAGC AACTAAGGCACTGGATGAAAACGTAAAGGACAAGATCCTGGGCACTTTCCG TAAATGCCGTAATCAACACCCGATCAGCGACAAAAGTACAACAGATTAATAAA CTTCGAGTCCGTCCCATCTTCTCGTGAAGCAAAAATGCCTGGCGGCATGTATG CTGAAAGAAGCTGGTATGCTGCGTGACGGCAAATACAACAAAGAGGTGCGA AAATTCGTTGCTGAAGGTGTGCACGAAGACCAGCAGGAGGTAGTTAAATCC AAGGAAATGATCGACCACTGCACCGCTAAAGTGGGTGAGTTTGCTGGCGAC GACGAATGCGAATTTGCTTATCGTATGGCTATTTGCTCCCACGATTACGCGA AAAAATAGTAA Ctcgagactgact

Fonte: Elaborada pela autora.

Essa análise mostra produtos de PCR com tamanho entre 300 e 400 pares de base (pb) para a *Rpro*OBP 8 e entre 400 e 500 pb para as *Rpro*OBPs 11 e 19, o que é consistente com o tamanho esperado para cada gene das OBPs, que são 376, 412 e 439 pb, respectivamente.

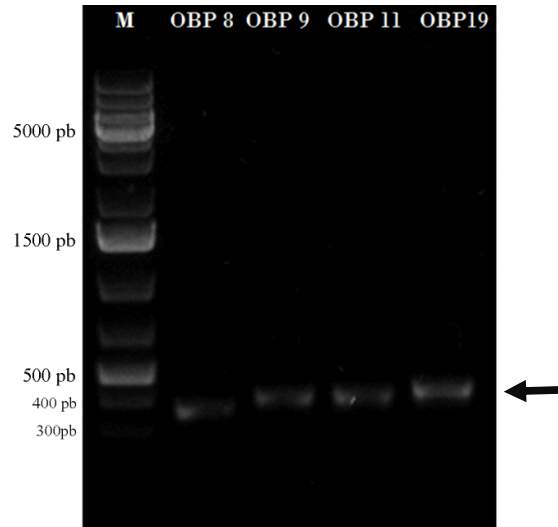


Figura 38 - Amplificação dos fragmentos das *RproOBPs*. M, representa o marcador de peso molecular, *GeneRuler1kb.Ladder Plus* (Fermentas Life Science). Os experimentos com a OBP 9, que aparece nesse gel, não foram continuados.

Fonte: Elaborada pela autora.

As amplificações dos fragmentos, indicam que os genes foram amplificados corretamente e os fragmentos purificados do gel foram ligados ao vetor pGEM[®]-T Easy, e depois foram transformados em uma linhagem de propagação de *E. coli* DH5 α .

4.2.2 Transformação de linhagens de propagação de *Escherichia coli* por choque térmico

A ligação dos insertos no pGEM[®]-T Easy foi confirmada pela coloração das colônias por β -complementação, por PCR de colônia e por digestão com as enzimas *NcoI* e *XhoI*. O resultado do PCR é mostrado na Figura 39, e o da digestão na Figura 40. Todos os fragmentos se encontram dentro do tamanho esperado, inclusive o vetor pGEM que tem 3015 pb.

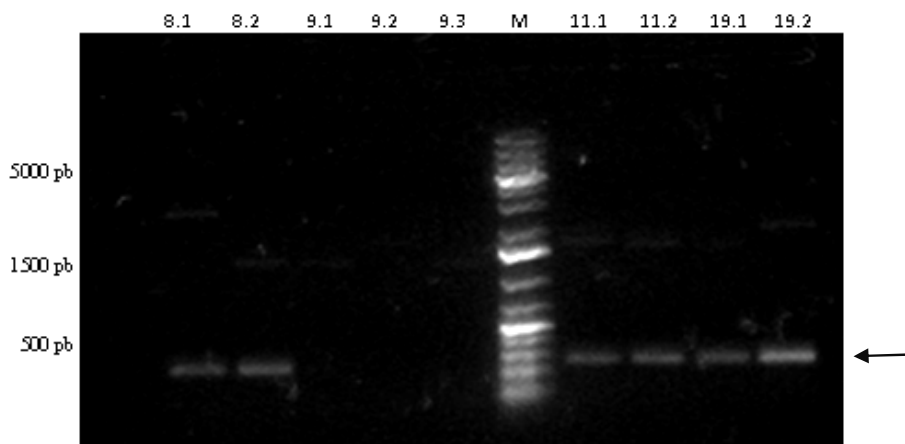


Figura 39 - PCR de confirmação da clonagem das *RproOBPs* 8, 9, 11 e 19 no pGEM T easy. M, representa o marcador de peso molecular, *GeneRuler1kb.Ladder Plus* (Fermentas Life Science). As denominações 8.1 e 8.2 discriminam entre diferentes colônias da *RproOBP* 8. Idem para as demais.

Fonte: Elaborada pela autora.

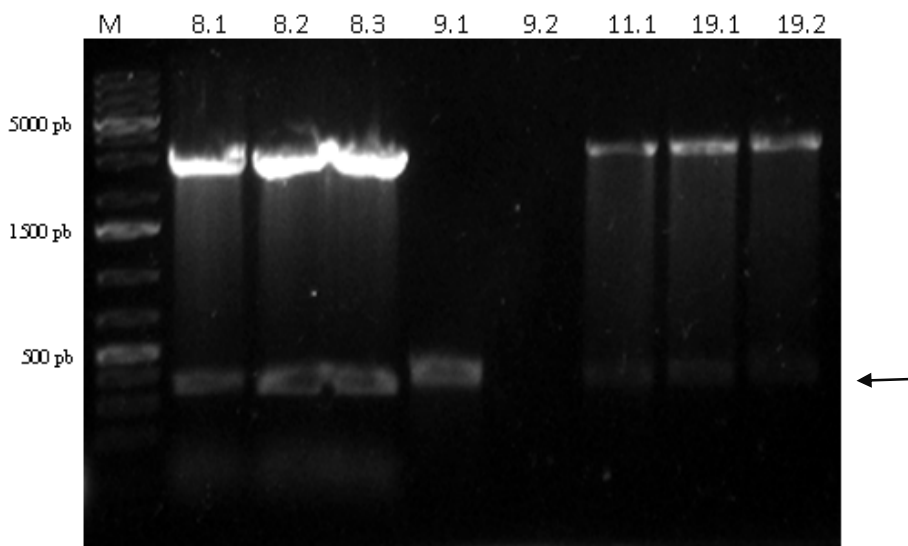


Figura 40- Digestão do pGEM com os insertos, com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI*. M, representa o marcador de peso molecular, *GeneRuler1kb.Ladder Plus* (Fermentas Life Science). As denominações 8.1, 8.2 e 8.3 discriminam entre diferentes colônias da *RproOBP* 8. Idem para as demais. O vetor pGEM está ao lado da banda de 3000 pb, e seu tamanho é de 3015 pb. Os experimentos com a *OBP* 9, que aparece nesse gel, não foram continuados.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com esses resultados podemos concluir que a clonagem em vetores de propagação foi bem sucedida para prosseguir com os experimentos de clonagem em vetor de expressão.

4.2.3 Clonagem dos genes em vetores expressão

A ligação nos vetores de expressão pET22b, pET28a e pET32, cujas vantagens foram descritas anteriormente, foi feita com a digestão do vetor pGEM com *NcoI* e *XhoI* liberando os insertos das OBPs, como mostrado na Figura 41, para o pET22b.

Os insertos e os vetores de expressão extraídos do gel de agarose foram, separadamente, incubados como um excesso molar de 5 vezes do inserto, 16 horas à 4°C, na presença de DNA ligase, conforme descrito na seção de Obtenção de *RproOBPs* recombinantes de Material e Métodos. As reações de ligação foram transformadas na cepa de propagação *E. coli* DH5 α ou TOP 10 quimiocompetentes com a finalidade de manter/propagar o plasmídeo de expressão.

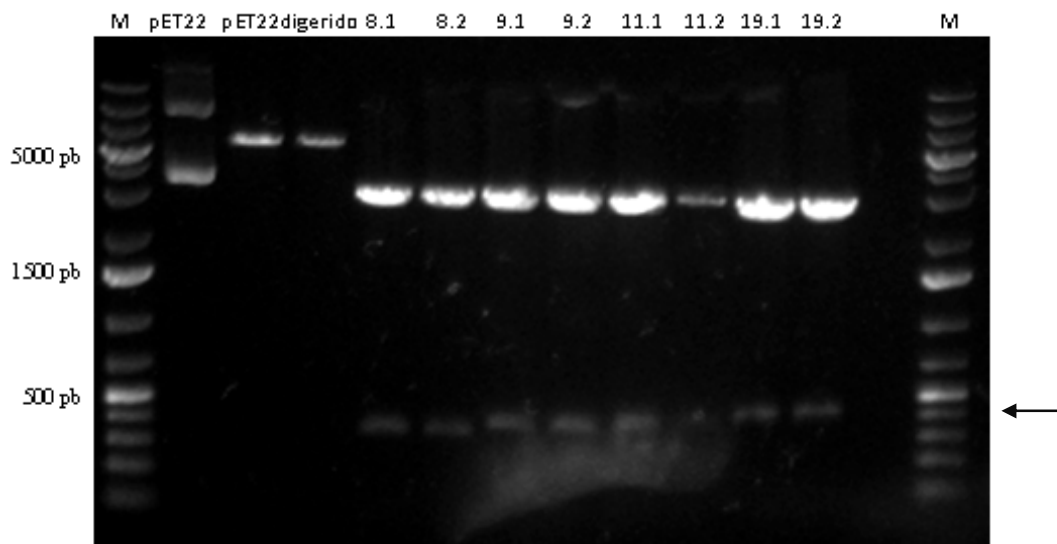


Figura 41 - Digestão do pET22b+ e do pGEM com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI*. M, representa o marcador de peso molecular. pET22 representa o vetor não digerido. As denominações 8.1 e 8.2 discriminam entre diferentes clones do vetor pGEM de colônias da *RproOBP* 8, idem para as demais, que foram obtidas por Miniprep da na cepa de propagação *E. coli* DH5 α .

Fonte: Elaborada pela autora.

A confirmação da ligação dos insertos nos vetores de expressão foi feita por "PCR de colônia" empregando os oligonucleotídeos T7 e SP6, e por digestão do DNA plasmidial com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI*. Na Figura 42, é mostrado o resultado do PCR das

RproOBP8 e *RproOBP9* inseridos no vetor pET22. Apenas a colônia 2 (8.2) apresentou presença de inserto da *RproOBP8*. As demais amplificaram apenas a região do vetor entre os dois oligonucleotídeos, que tem em torno de 200 - 300 pares de bases, correspondendo ao *polilinker* do vetor. Esses nucleotídeos também são responsáveis pela banda da OBP estar entre 500 e 700 pb, já que eles são acrescidos aos 379 pb do próprio gene da *RproOBP8*. As duas últimas amostras, N.1 e N.2 são colônias que sabidamente não possuem o inserto, e é possível observar a mesma banda entre 200 e 300 pb que corresponde a distância entre os dois oligonucleotídeos do vetor que aparece em colônias em que a clonagem não foi bem sucedida.

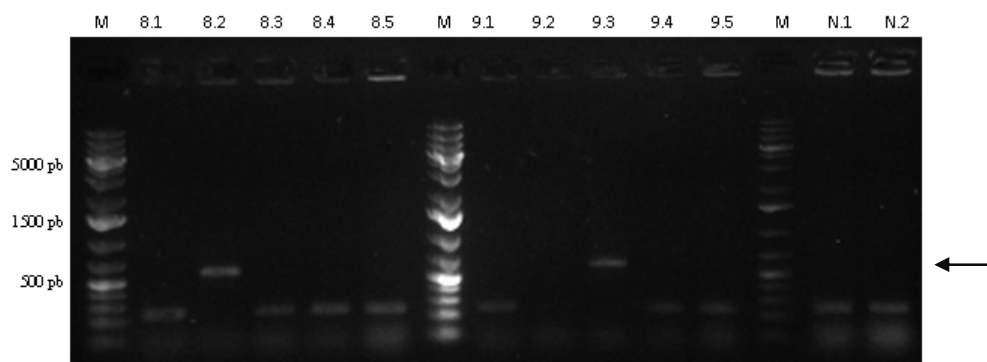


Figura 42 - PCR para confirmar a clonagem no pET22b(+) dos insertos dos genes da OBP 8 e 9, e mais duas colônias que estavam na placa controle (N.1 e N.2), na qual não havia DNA dos insertos. Apenas as colônias 8.2 e 9.3 apresentaram um resultado positivo, mas demais não houve uma clonagem com sucesso (exceto pela 9.2, na qual houve algum problema na PCR). M representa o marcador de peso molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 43, é mostrado o mesmo experimento para as *RproOBPs* 11 e 19. Da mesma forma que para a *RproOBP* 8, os fragmentos das OBPs apresentam um tamanho entre 500 e 700 pb devido ao uso dos oligonucleotídeos do vetor que adicionam pouco mais de 200 pb a cada sequência. As colônias de 1-8 e a 10 da *RproOBP* 11 apresentam a confirmação da clonagem no pET22, enquanto a colônia 9 apresenta um resultado negativo, e a 8 não teve uma PCR adequada. Para a OBP 19, as colônias 1 e de 3 a 5 foram positivas, nas demais a PCR não ocorreu, provavelmente devido a quantidade de DNA molde adicionado.

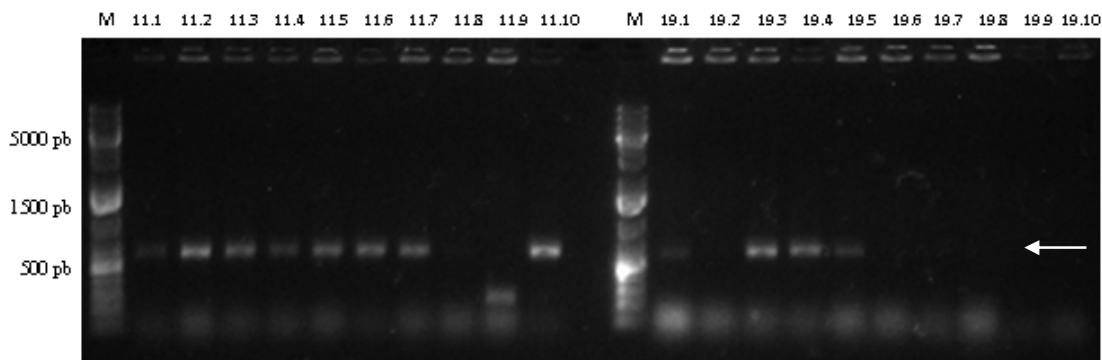


Figura 43 - PCR para confirmar a clonagem no pET22b(+) dos insertos dos genes da *RproOBP* 11 e 19. As colônias de 11.1 à 11.7 e a 11.10 se mostram positivas para inserção do gene da OBP 11, e as colônias 19.1 e 19.3 à 19.5. M representa o marcador de peso molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para os demais vetores de expressão, com exceção do vetor de expressão pETTrx_1a/LIC, essa confirmação por PCR foi realizada. Quando o resultado da clonagem foi positivo, as colônias selecionadas foram utilizadas em inóculos de 5 mL, parte desse inóculo serviu para armazenar esses clones glicerinados em ultrafreezer -80°C , e parte foi utilizada para extrair o DNA plasmidial e transformar diferentes linhagens de expressão.

A confirmação da sequência dos insertos foi realizada em sequenciador 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies) empregando os oligonucleotídeos do vetor. Os resultados desse sequenciamento confirmaram a identidade de sequência e a presença das mesmas em fase de leitura apropriado.

Como já foi descrito anteriormente, o pETTrx_1a/LIC dispensa a etapa de clonagem em vetores de propagação. Os fragmentos foram amplificados por PCR em praticamente todas as temperaturas dentro do intervalo testado, o resultado pode ser observado na Figura 44. Depois foram purificados e tratados DNA polimerase T4 na presença de dATP.

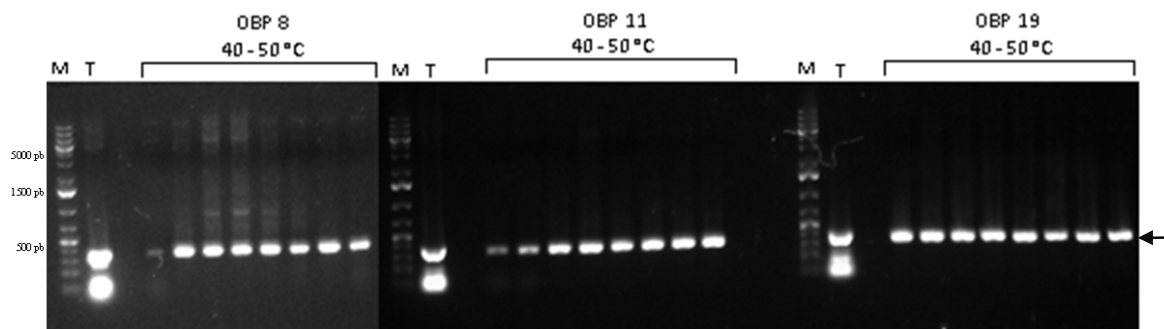


Figura 44 - PCR com gradiente de temperatura entre 40 - 55°C. Os produtos de PCR observados constituem se dos genes das OBPs 8, 11 e 19 com *overhangs* específicos para anelamento no vetor pETTrx_1a/LIC. O DNA molde utilizado para essa amplificação proveio de plasmídeos de propagação pGEM que já tinham a sequência das OBPs confirmadas por sequenciamento, mas como controle, também foi utilizado o gene adquirido pela empresa IDT, anotado como T nessa imagem.

Fonte: Elaborada pela autora.

O vetor pETTrx_1a/LIC precisa ser digerido com a enzima de restrição *BsaI*. Essa enzima flanqueia o gene codificante para uma GFP (*green flourecent protein*) e é essa banda de 717 pb que pode ser observada na Figura 45. O vetor, que possui 6401 pb, e pode ser observado linearizado entre as bandas de 5000 e 7000 pb do marcador de peso molecular.

Depois de purificado do gel de agarose, o vetor foi incubado com a DNA polimerase T4 na presença de dTTP, fazendo com que as extremidades salientes do vetor fossem complementares as extremidades criadas nos insertos, permitindo uma clonagem independente da enzima T4 DNA ligase e com alta eficiência.

Os fragmentos de inserto e vetor foram incubados por 10 minutos e transformados em linhagens de propagação *E. coli* DH5 α . A confirmação da transformação foi feita por PCR de seis colônias em um gradiente de temperatura de 40-50°C e pode ser observada na Figura 46. Duas colônias positivas de cada OBP foram inoculadas em 5 mL de meio LB e parte foi armazenada com 15% de glicerol em ultrafreezer a -80C. O DNA plasmidial extraído foi empregado na transformação em diferentes linhagens de expressão. Foram selecionadas as colônias 8.2 e 8.3, 11.4 e 11.5 e as 19.4 e 19.5, para esse fim.

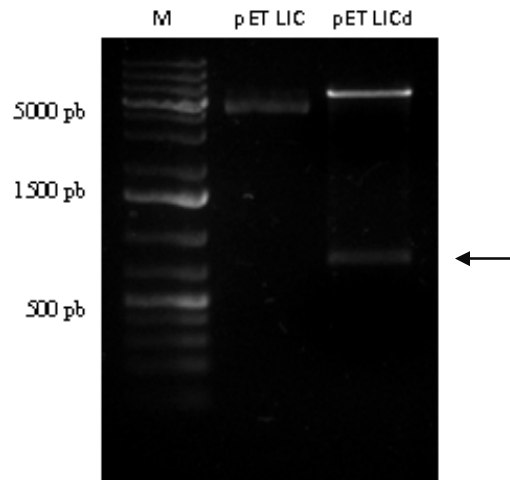


Figura 45 - Resultado da digestão do vetor pETTrx_1a/LIC com a enzima de restrição *Bsa*I. M representa o marcador de peso molecular, pET LIC o vetor íntegro e pET LICd do vetor digerido.

Fonte: Elaborada pela autora.

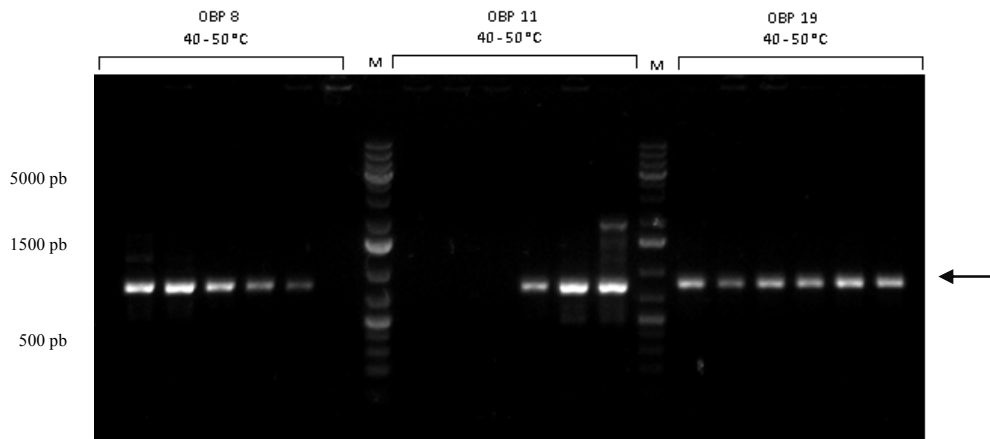


Figura 46 - PCR de confirmação de clonagem das OBPs no vetor pETTrx_1a/LIC. Foi utilizado um gradiente de temperatura de 40 - 50 °C. M representa o peso molecular. As bandas da OBPs se encontram entre os pesos moleculares de 700 e 1000pb, o que é esperado para esse vetor, pois a proteína será expressa com a adição de uma cauda de tioredoxina e com uma cauda de histidina.

Fonte: Elaborada pela autora.

Desta seção podemos concluir que as *Rpro*OBPs foram clonadas com sucesso em vetores de expressão

4.2.4 Transformação de linhagens de expressão de *Escherichia coli* por eletroporação

Da mesma maneira que o PCR foi utilizado para confirmar a clonagem nos vetores de expressão, ele também foi utilizado para confirmar a transformação das linhagens de expressão.

Na Figura 47 pode ser observado no gel de agarose o resultado de uma PCR realizada com um oligonucleotídeo 3' do vetor (*reverse*) e um oligonucleotídeo do inserto 5' (*forward*), o que possibilita já confirmar que o gene se inseriu na orientação correta. As três primeiras amostras confirmam a clonagem das *RproOBPs* 8, 11 e 19 no vetor pET22b e as três últimas a clonagem no vetor pET28a, na linhagem de expressão BL21(DE3).

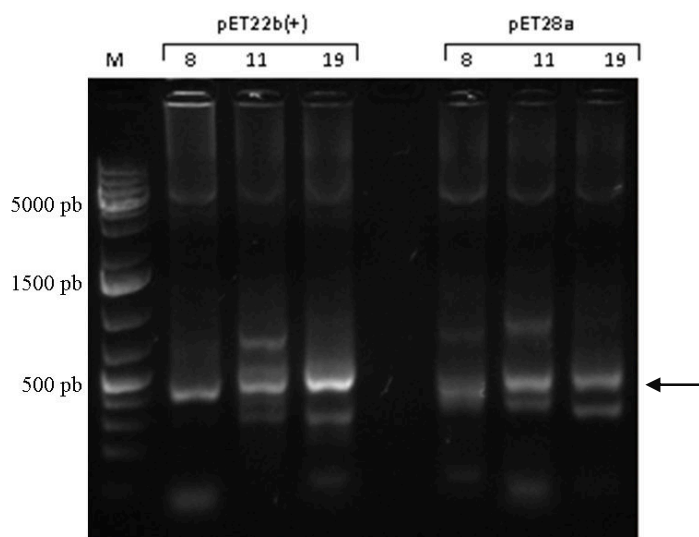


Figura 47 - PCR para verificar a clonagem no pET22b(+) e no pET28a na linhagem de expressão BL21(DE3), utilizando um primer FOWARD do inserto e um primer REVERSE do vetor. Como um dos primers é do vetor para cada uma das combinações, os fragmentos esperados são um pouco maiores que os genes de cada OBP; mas todas as OBPs estão dentro do esperado.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como linhagens de *E. coli* de expressão foram transformadas com sucesso, prosseguiram se com os experimentos de expressão de proteína recombinante.

4.2.5 Expressão de proteínas ligadoras de odorante recombinantes de *Rhodnius prolixus* (*RproOBPs*)

Diversas condições de expressão foram testadas a fim de estabelecer as condições de melhor expressão das OBPs solúveis. Foram variadas as construções das OBPs (Tabela 4) com diferentes fusões e características, combinadas com as linhagens de expressão, as temperaturas de cultivo, a concentração de IPTG e tampões de lise. O resultado para cada combinação se encontra resumido na Tabela 7, já discriminando a quantidade de proteína expressa (♠ não expressa, ♠ expressa pouco, ♠♠ expressa, e ♠♠♠ expressa bem), a solubilidade da mesma (◇ insolúvel, ◇ mais que 50% insolúvel, ◇ em torno de 50% insolúvel, ◇ mais que 50% solúvel e ♠ solúvel).

A discriminação da solubilidade em Fração do Meio, do Periplasma e do Citoplasma Solúvel, está relacionada com a expressão periplasmática da OBP. É possível observar duas bandas distintas de expressão da *RproOBP8* em 3 clones (Figura 48). Essas duas bandas muito provavelmente representam a proteína com a cauda de endereçamento para o periplasma, *pelB*, e a proteína sem essa cauda. Por essa razão foi utilizado o protocolo descrito para 'verificação de proteína alvo' do Manual do Sistema pET (107), onde se verifica a presença da proteína no meio extracelular, no periplasma e no citoplasma. Quantidades significativas da proteína solúvel não foram encontradas em nenhuma dessas frações e outras formas de expressão passaram a ser testadas.

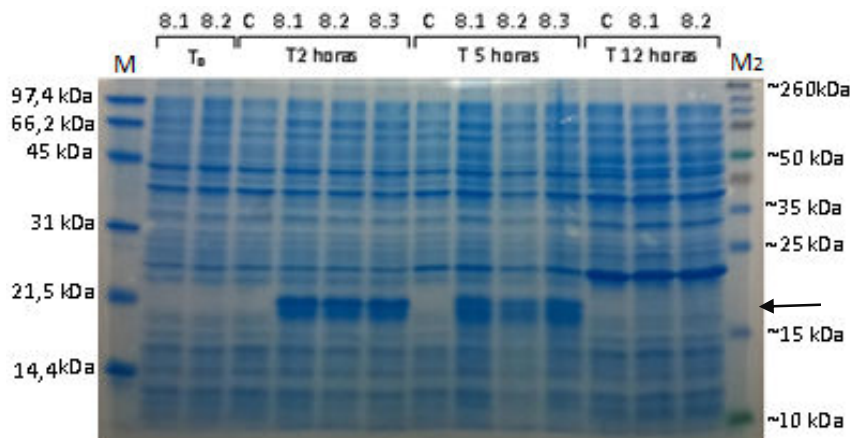


Figura 48 - SDS-PAGE 15% mostrando o resultado um teste de expressão da *RproOBP 8* em pET 22 na cepa de expressão códon plus. A numeração 8.1, 8.2 e 8.3 representam diferentes colônias da OBP 8. As amostras denominadas C, representam um controle da linhagem de expressão códon-plus clonada com o pET22b(+) sem inserto. M representa o marcador de peso molecular *Standards Low Range*

(Bio-Rad), e M2 representa o marcador de peso mole *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Scientific).

Fonte: Elaborada pela autora.

A *RproOBP8* apresentou os melhores resultados de expressão e purificação, sendo expressa na linhagem *E. coli* Rosetta-gami 2 com a construção Trx-His-TEV-OBP 8 no vetor pETTrx_1a/LIC. As melhores condições de expressão foram: indução por 16h, a 20°C em meio LB, induzida com 0,5 mM de IPTG (Figura 49). Como já foi citado a linhagem *E. coli* Rosetta-Gami 2 permite um aumento na formação de ligações dissulfeto o que é relevante para as OBPs analisadas. A fusão com tioredoxina aumentou a solubilidade da proteína e assim foi possível conseguir uma quantidade de proteína solúvel suficiente para prosseguir com as etapas posteriores de purificação. Essa proteína foi purificada com tampão 150 mM de NaCl e 25 mM Tris-HCl pH 8.

A *RproOBP11* teve melhores resultados também na linhagem *E. coli* Rosetta-gami 2 com a construção Trx-His-TEV-OBP 11, que também permitiu obter proteína solúvel e presumivelmente de forma enovelada. A *RproOBP11* foi expressa em meio LB durante 2-3 horas depois da indução com 0,5 mM de IPTG a 37°C (Figura 49). Essa proteína foi purificada em tampão fosfato 100 mM, pH 7,5.

A *RproOBP19* apresentou melhores resultados quando expressa na linhagem *E. coli* BL21(DE3)pLysS, na construção Trx-His-TEV-OBP 19 no vetor pETTrx_1a/LIC. Sendo expressa a 37 °C durante 2-3 horas depois de induzida com 0,5 mM de IPTG (Figura 49). Essa linhagem resultou em menor degradação da proteína recombinante, aumentando a expressão gênica da *RproOBP19*. Além da construção aumentar a solubilidade da proteína e permitir uma purificação por cromatografia de afinidade. As células foram lisadas e purificadas em um tampão A, 20 mM HEPES, pH 7,5.

As construções escolhidas das *RproOBP* 8, 11 e 19 nas linhagens: BL21(DE3)pLysS e Rosetta-gami 2 adicionam em torno de 13 kDa para cada OBP (11,8 kDa da Tioredoxina e em torno de 1 kDa das histidinas) resultando em proteínas fusionadas com aproximadamente 26 kDa para a *RproOBP* 8, 27,5 kDa para a *RproOBP* 11 e 28,3 kDa para a *RproOBP* 19. A *RproOBP* 11 e a 19 aparecem em um tamanho próximo ao esperado, no SDS-PAGE da Figura 49. Apenas a *RproOBP* 8 que tem um tamanho aparente maior que o esperado, estando acima da banda de 31 kDa no marcador de peso molecular.

Com essas condições estabelecidas, as proteínas passaram a ser expressas em maior escala, erlenmeyer de 2 L, e iniciaram-se as etapas de estabelecimento dos protocolos de purificação.

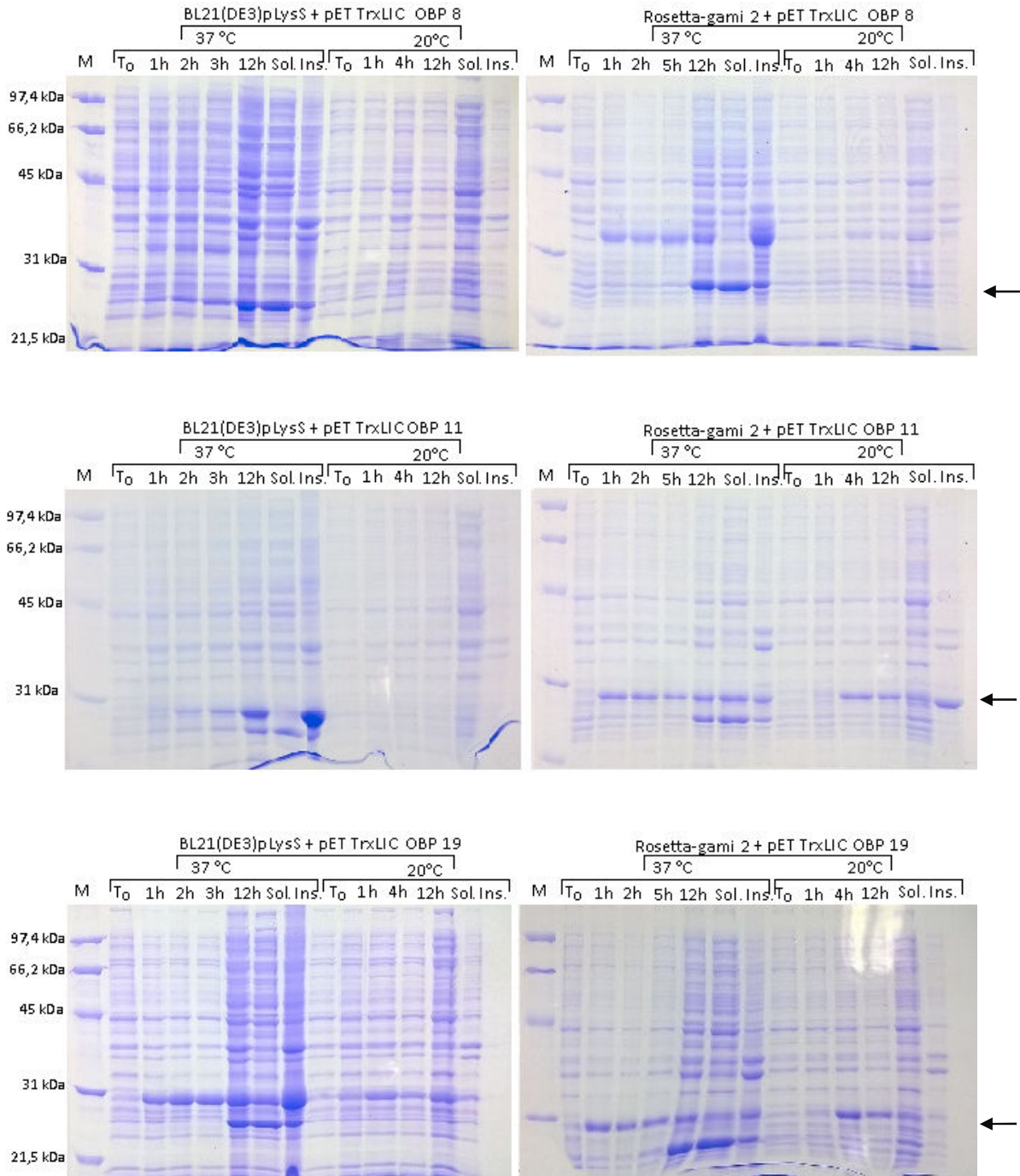


Figura 49 - Teste da expressão das *RproOBP8*, 11 e 19 em meio LB, induzidas com 0,5 mM de IPTG em duas linhagens: BL21(DE3)pLysS e Rosetta-gami 2. M - Marcador de massa molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 7 - Resultado das combinações de diferentes construções, linhagens, concentração de IPTG, temperatura e de soluções de lise para a solubilidade da proteína.

				Tampão citrato 20 mM pH4,0	Tampão citrato 20 mM pH5,5	Tampão MES 50 mM pH 6,0	Tampão fosfato 50 mM pH 6,6	Tampão fosfato 50 mM pH 7,0	Tampão fosfato 50 mM pH 7,5	Tampão Tris -HCl 50 mM pH 7,5	Fração do Meio de Cultivo	Fração Perioplasmática MgSO ₄ 5 mM	Fração Solúvel do Citoplasma Tampão 20mM pH 7,5			
Rpro OBP 8	pelB - OBP 8	pET 22	BL21- CodonPlus	28°C	0,1 mM	◇	-	-	-	-	-	◇	◇	◇		
					0,5 mM	◆	-	-	-	-	-	-	◇	◇	◆	
				37°C	-	◇	-	-	-	-	-	-	◇	◇	◇	
					0,1 mM	◇	-	-	-	-	-	-	◇	◇	◇	
					0,5 mM	◆◆◆	-	-	-	-	-	-	◇	◇	◇	
					1,0 mM	◇	-	-	-	-	-	-	◇	◇	◇	
						BL21(DE3)	20°C	-	◇	-	-	-	-	◇	◇	◇
							0,1 mM	◇	-	-	-	-	-	◇	◇	◇
							0,5 mM	◇	-	-	-	-	-	◇	◇	◇
							1,0 mM	◇	-	-	-	-	-	◇	◇	◇
							28°C	-	◆	-	-	-	-	-	◇	◆
							37°C	-	◇	-	-	-	-	-	-	◆
								0,1 mM	◆◆	-	-	-	-	-	-	◆*
								0,5 mM	◆◆◆	-	-	-	-	-	-	◆*
								1,0 mM	◆◆◆	-	-	-	-	-	-	◆*
			BL21(DE3)	20°C	-	◆◆◆	-	-	-	-	◇	◇	◇			
				0,5 mM	◆	-	-	-	-	-	◇	◇	◇			
				37°C	-	◆	-	-	-	-	◇	◇	◇			

◆◆◆Expressa bem ◆◆Expressa ◆Expressa pouco ◇Não expressa *Banda de menor peso molecular 50% no SCF, e a banda de maior no ICF **depois de 16 horas de cultivo OBP começa a ser degradada

◇Insolúvel ◇>50% insolúvel ◇~50% insolúvel ◇>50% solúvel ◆ solúvel

continua

continuação

OBP 8	pET 28	BL21(DE3)	20°C	0,5 mM	◆◆◆	-	-	-	-	-	-	-	◇	◇	◇	◇					
			37°C	0,5 mM	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◇	◇	◇	◇			
			Origami B	18°C	Meio auto indutor 1	-	◇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◇		
						0,1 mM	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◇	
						⁵ 0,5 mM	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◇	
						1,0 mM	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◇	
						28°C	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◇	
						37°C	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◇	
					Meio auto indutor 2	0,1 mM	◆◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◇	
						0,5 mM	◆◆◆	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	-	-	-	-	◇	
						1,0 mM	◆◆◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	
						20°C	-	◇	-	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	-
							0,1 mM	◇	-	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	-
							0,5 mM	◇	-	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	-
			37°C	-	◇	-	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	-			
				0,1 mM	◆◆◆	-	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	-			
				0,5 mM	◆◆◆	-	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	-			
			Origami 2	37°C	0,5 mM	-	◆◆◆	-	-	-	-	-	-	-	-	◇	-	-	-		
						1,0 mM	◆◆◆	-	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	-	-		
			Trx- Ent - OBP 8	His -	pET32	Origami 2	37°C	0,5 mM	◆◆◆	-	-	-	-	-	-	◇	-	-	-		

continua

◆◆◆Expressa bem ◆◆Expressa ◆Expressa pouco ◇Não expressa *Banda de menor peso molecular 50% no SCF, e a banda de maior no ICF **depois de 16 horas de cultivo OBP começa a ser degradada

◇Insolúvel ◇>50% insolúvel ◇~50% insolúvel ◇>50% solúvel ◆ solúvel

continuação

Trx-	His-	pETTr	BL21(DE3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TEV - OBP 8	x_1a/L	IC	BL21(DE3)	20°C	0,5 mM	◇	-	-	-	-	-	-	-	-	◇	-	-	-
			pLysS	37°C	0,5 mM	◆◆	-	-	-	-	-	-	-	-	◆◆◆	-	-	-
			Rosetta-gami 2	20°C	0,5 mM	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	-	-	-
				37°C	0,5 mM	◆◆◆	-	-	-	-	-	-	-	-	◇◆◆	-	-	-
<i>Rpro</i>	<i>pelB</i> - OBP	pET22	BL21-CodonPlus	37°C	0,5 mM	◇	-	-	-	-	-	-	-	-	◇	-	-	-
OBP 11			BL21(DE3)	37°C	0,5 mM	◇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	OBP 11	pET28	BL21(DE3)	37°C	0,5 mM	◇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Origami B	18°C	Meio auto indutor 1	◇	-	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	-	-
					Meio auto indutor 2	◇	-	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	-	-
				20°C	-	◆◆	-	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	-	-
					0,1 mM	◆◆◆	-	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	-	-
					0,5 mM	◆◆◆	-	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	-	-
					1,0 mM	◆◆◆	-	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	-	-
				37°C	-	◆◆	-	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	-	-
					0,1 mM	◆◆◆	-	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	-	-
					0,5 mM	◆◆◆	-	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	-	-
					1,0 mM	◆◆◆	-	-	◇	-	◇	-	◇	-	◇	-	-	-
Trx-	His-	-	pET32	Origami 2	37°C	0,5 mM	◆◆	-	-	-	-	-	-	-	◇	-	-	-
Ent - OBP 11																		
Trx-	His-	pETTr	BL21(DE3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TEV - OBP 11	x_1a/L	IC	BL21(DE3)	20°C	0,5 mM	◇	-	-	-	-	-	-	-	-	◇	-	-	-
			pLysS	37°C	0,5 mM	◆◆◆	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	-	-	-
			Rosetta-	20°C	0,5 mM	◆◆◆	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	-	-	-

continua

◆◆◆Expressa bem ◆◆Expressa ◆Expressa pouco ◇Não expressa *Banda de menor peso molecular 50% no SCF, e a banda de maior no ICF **depois de 16 horas de cultivo OBP começa a ser degradada

◇Insolúvel ◇>50% insolúvel ◇~50% insolúvel ◇>50% solúvel ◆ solúvel

continuação

			gami 2	37°C	0,5 mM	◆◆◆	-	-	-	-	-	-	-	◆**	-	-	-
Rpro	<i>pelB</i> - OBP	pET22	BL21-	37°C	0,5 mM	◇	-	-	-	-	-	-	-	◇	-	-	-
OBP	19		CodonPlus														
			BL21(DE3)	37°C	0,5 mM	◇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	‡
19 ^{††}	OBP 19	pET28	BL21(DE3)	37°C	0,5 mM	◇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Origami B	18°C	Meio auto indutor 1	◇	-	-	◇	-	◇	-	◇	◇	-	-	-
					Meio auto indutor 2	◇	-	-	◇	-	◇	-	◇	◇	-	-	-
				20°C	-	◇	-	-	◇	-	◇	-	◇	◇	-	-	-
					0,1 mM	◆◆◆	-	-	◇	-	◇	-	◇	◇	-	-	-
					0,5 mM	◆◆◆	-	-	◇	-	◇	-	◇	◇	-	-	-
					1,0 mM	◆◆◆	-	-	◇	-	◇	-	◇	◇	-	-	-
				37°C	-	◇	-	-	◇	-	◇	-	◇	◇	-	-	-
					0,1 mM	◆◆◆	-	-	◇	-	◇	-	◇	◇	-	-	-
					0,5 mM	◆◆◆	-	-	◇	-	◇	-	◇	◇	-	-	-
					1,0 mM	◆◆◆	-	-	◇	-	◇	-	◇	◇	-	-	-
	Trx- His- Ent - OBP 19	pET32	Origami 2	37°C	0,5 mM	◆◆◆	-	-	-	-	-	-	-	◆	-	-	-
	Trx- TEV - OBP 19 [§]	pETTr x_1a/L IC	BL21(DE3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			BL21(DE3)	20°C	0,5 mM	◆◆◆	-	-	-	-	-	-	-	◆**	-	-	-
			pLysS	37°C	0,5 mM	◆◆◆	-	-	-	-	-	-	-	◆	-	-	-
			Rosetta-gami 2	20°C	0,5 mM	◆◆◆	-	-	-	-	-	-	-	◆**	-	-	-
				37°C	0,5 mM	◆◆◆	-	-	-	-	-	-	-	◆	-	-	-

Fonte: Elaborada pela autora.

◆◆◆Expressa bem ◆◆Expressa ◆Expressa pouco ◇Não expressa *Banda de menor peso molecular 50% no SCF, e a banda de maior no ICF **depois de 16 horas de cultivo OBP começa a ser degradada

◇Insolúvel ◇>50% insolúvel ◇~50% insolúvel ◇>50% solúvel ◆ solúvel

4.2.6 Purificação das *RproOBPs* recombinantes

A proteína *RproOBP* 8 foi produzida no periplasma da célula sem nenhuma cauda - construção no pET22 - e os testes de purificação foram realizados em colunas de troca iônica. Que também foram testadas com para a mesma OBP na construção do pET28. Como a quantidade de proteína obtida nas purificações de troca iônica bem sucedidas foi insuficiente para realizar testes biofísicos, foi adicionada uma cauda de histidinas a sequência N-terminal das *RproOBP* 8, 11 e 19 para realizar a purificação por cromatografia de afinidade a metal quelado. Foram realizadas dois tipos de construções, uma fusionada a cauda de histidinas - que gerou produtos insolúveis - e outra a cauda de histidina e tiorredoxina.

A melhor construção para as três *RproOBPs*, foi a proteína fusionada com uma cauda de histidina e uma cauda de tiorredoxina, e para a purificação: uma cromatografia de afinidade, duas diálises que permitem a clivagem com TEV protease, uma segunda cromatografia de afinidade com o intuito de retirar a cauda de histidina e tiorredoxina seguida de uma cromatografia de exclusão molecular.

4.2.6.1 Cromatografia de Troca Iônica

A cromatografia foi utilizada apenas para as construções que não possuíam cauda de histidina e foi realizada principalmente com a *RproOBP* 8. Mesmo com o uso de diferentes colunas combinadas com diferentes tampões, não foi possível separar essa OBP de maneira satisfatória das demais proteínas de *E. coli*. Na Figura 50, está representado um dos testes de purificação da OBP 8 nas colunas de troca aniônicas ANX FF, Q FF e Q XL de 1 mL, nesse exemplo, apenas a membrana externa das células foi rompida liberando as proteínas do periplasma em uma solução de 5 mM MgSO₄, que foi concentrada e aplicada nas colunas. Embora exista uma banda com tamanho menor que 17 kDa e que pode ser a *RproOBP* 8, não foi possível separar essa proteína de maneira satisfatória dos demais contaminantes eluídos (E₁), pois são proteínas com pI próximo e com uma diferenças de tamanho de apenas 10 kDa.

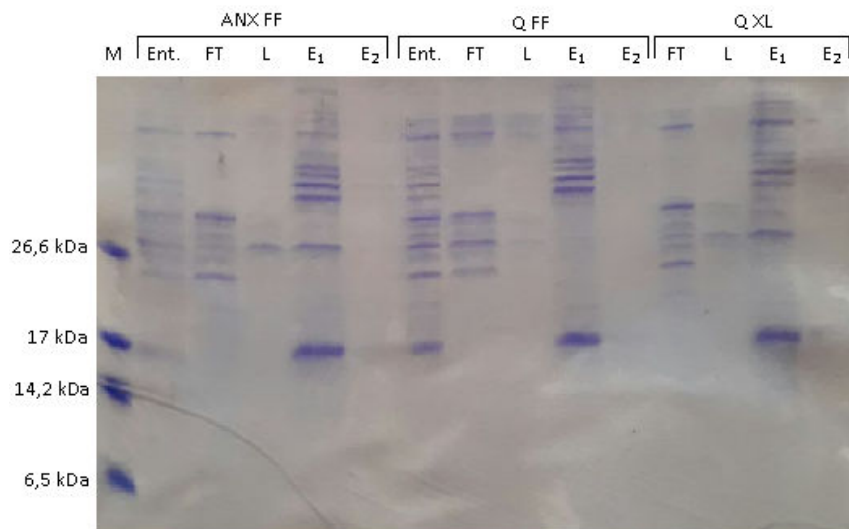


Figura 50 - Gel de Tricina com o resultado de testes de purificação utilizando o periplasma da expressão da OBP 8 em linhagens de *E. coli* BL21(DE3), com três tipos diferentes de coluna Sepharose: ANX FF, Q FF e Q XL. As siglas Ent. representam todo o periplasma das células e o aplicado na coluna; FT significa Flowthrough, e representa a porção de proteínas que não interagiu com a coluna; L representa a lavagem apenas com o tampão, o mesmo que foi utilizado na lise, nesse caso 5 mM MgSO₄; e E₁ e E₂ que representam a eluição das proteínas que se ligaram a coluna com a adição de 0,5 M de NaCl ao tampão. A OBP 8 pode ser a banda em torno de 17 kDa.

Fonte: Elaborada pela autora.

Outro exemplo, foi a tentativa de purificar a *Rpro*OBP 8 utilizando uma coluna com a resina DEAE, que foi descrita na purificação de outras OBPs. (48,50,65,78,127-128) O periplasma de um volume de 6 L de células em cultivo foi concentrado e aplicado na coluna, utilizando um gradiente de 0 a 100% de tampão B (5 mM MgSO₄ e 0,5 M NaCl), utilizando passos de incremento de tampão B de 10 % (Figura 51). Também não foi possível separar a proteína de interesse das demais dessa maneira, pelos mesmos motivos: pI das proteínas contaminantes é próximo e uma cromatografia de exclusão molecular não consegue separar a proteína de interesse das demais sem que haja muita perda. Portanto, mudou-se a construção utilizada.

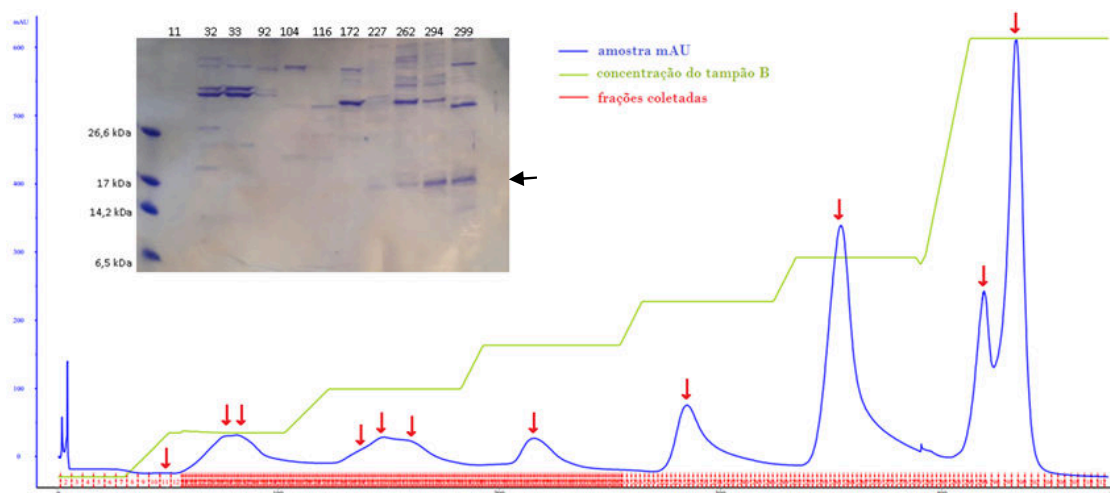


Figura 51 - Cromatograma da purificação de troca iônica na resina DEAE, da *RproOBP* 8 obtida no periplasma dos clones da linhagem BL21(DE3) com o plasmídeo pET22b(+). A concentração do tampão B variou de 0 à 100%, com *steps* a cada 10% no início da purificação. As flechas vermelhas representam as frações que podem ser observados no Gel de SDS

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.6.2 Cromatografia de Afinidade

A purificação das *RproOBPs* 8, 11 e 19 fusionadas com uma cauda de histina e de tioredoxina foi padronizada da seguinte maneira: o primeiro passo é feito por uma cromatografia de afinidade na coluna de Co^{+2} TALON. O cromatograma obtido nessa etapa para a *RproOBP* 11 serve de exemplo para ilustrar o resultado de todas as *RproOBPs* e pode ser observado na Figura 52. Aliquotas das frações 6, 16, 20, 30, 31, 32, 34 e 36 foram analisadas em gel de SDS-page 15% para confirmar a purificação.

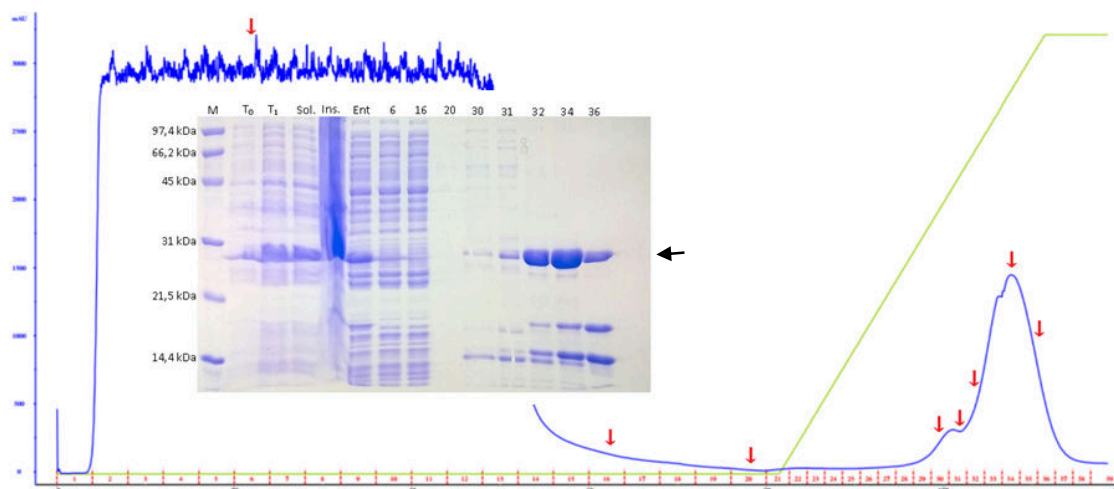


Figura 52 - Cromatograma da Afinidade realizada na resina TALON com a porção solúvel da *RproOBP 11* expressa na linhagem Rosetta-gami 2 com a construção no pET Trx LIC. A linha verde representa a concentração do tampão B, cuja variação foi de 0 à 100% em 1,5 volumes de coluna, e cuja composição é o tampão de lise acrescido de 300 mM de imidazol. As flechas vermelhas representam as frações que podem ser observadas no Gel de SDS-PAGE. M representa o marcador de peso molecular *Standards Low Range* (Bio-Rad). T_0 representa o cultivo no momento da indução e T_1 depois de uma hora. Sol representa o citoplasma solúvel no tampão dessa proteína que é 100 mM fosfato pH 7,5 e Ins. a fração de proteínas que permanece insolúvel. Ent é a amostra antes de entrar na coluna e as demais amostras são as frações do cromatograma acima que foram selecionadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

É possível observar uma banda bem expressa entre 21,5 e 31 kDa, um intervalo que comporta o tamanho esperado dessa *RproOBP 11* que seria em torno de 27,5 kDa quando fusionada com as caudas de histidina e tioredoxina. Essa banda interagiu com a coluna e as frações eluídas de 34 à 36 foram submetidas à diálise.

O mesmo processo foi realizado com as *RproOBPs 8* e *19*, a diferença foi apenas a composição do tampão 150 mM de NaCl, 25 mM Tris pH 7,5 para a *RproOBP 8*; 100 mM fosfato pH 7,0 para a *RproOBP11* e 20 mM HEPES pH 7,0 para a *RproOBP19*. Os cromatogramas e os géis são muito similares e não serão apresentados.

Uma característica interessante da *RproOBP11* é possuir cor avermelhada, como pode ser observado na Figura 53. Isso será discutido nas próximas seções.



Figura 53 -Foto das aliquotas recolhidas pelo Äkta, da OBP 11 na primeira cromatografia de afinidade realizada com essa proteína em maior escala (1L) numa resina de Colbalto.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.6.3 Diálise e Clivagem com TEV protease

As frações selecionadas de cada OBP foram então dializadas no tampão da purificação, sem imidazol e com 2 mM de DTT, na membrana SERVAPOR[®] 3,6, com o intuito de retirar o imidazol e adicionar o DTT para a clivagem por TEV protease.

Estimando a quantidade de proteína pelo *NanoDrop* foi adicionada a quantidade recomendada de TEV dentro da própria membrana de diálise 16 h á 4°C.

Para retirar o peptídeo formado pela tioredoxina e a cauda de histidina, que tem um tamanho muito próximo das OBPs, a amostra total submetida a uma segunda cromatografia de afinidade. Mas para isso foi necessário realizar uma segunda diálise nos mesmos moldes da primeira, para retirar DTT que é incompatível com a resina de cobalto da TALON.

O processo foi o mesmo para as três proteínas, variando apenas o tampão.

4.2.6.4 Segunda Cromatografia de Afinidade

A segunda cromatografia teve o objetivo de separar as *Rpro*OBPs 8, 9 e 11 da cauda de histidina e tioredoxina que tem em torno de 13 kDa e não são separadas por exclusão molecular das OBPs desse estudo, cujas massas estimadas são de 13,3 kDa, 14,8 kDa e 15,4 kDa respectivamente. Como essa cauda fica retida na coluna, a proteína de interesse faz parte do *eluato*, ou seja, as frações de proteína que não interagem com a resina, frações de 6 à 12 do cromatograma da Figura 54.

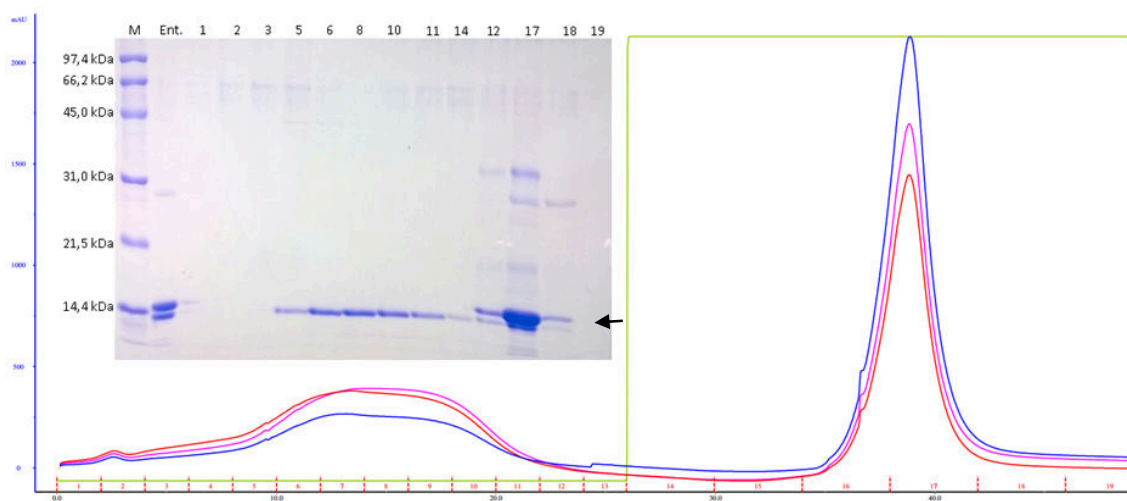


Figura 54 - Cromatograma da segunda cromatografia de afinidade realizada com a *Rpro*OBP 11. A linha azul representa a absorvância em mAU em um comprimento de onda de 280 nm, e as linhas vermelha e rosa representam um λ de 260 e 242 nm respectivamente. A linha verde representa o gradiente do tampão B, que tem 300 mM de imidazol para eluir as proteínas com cauda de histidina da coluna. SDS-PAGE com frações dessa segunda cromatografia. Ent representa a amostra que foi aplicada na coluna e os números, as frações purificadas que foram aplicadas no gel.

Fonte: Elaborada pela autora.

Existe uma diferença na intensidade da absorvância nos diferentes comprimentos de onda, o pico com a proteína de interesse tem uma absorvância maior á 260 e 242 nm (linha vermelha e rosa, respectivamente) do que á 280 nm, oposto do que acontece quando a cauda de histidina e tioredoxina é eluída. Isso ocorre pelas características intrínsecas da proteína que serão discutidas nas próximas seções. O SDS-PAGE da Figura 54 no qual é possível observar a *Rpro*OBP 11 migrando na altura de 14,4 kDa, e uma banda mais forte na fração 17, que é a

cauda clivada de histidina e tioredoxina. As frações das OBPs foram concentradas por ultrafiltração em dispositivos de ultrafiltração *Amicon*[®] *Ultra-15* 3K (Millipore), por meio de centrifugações consecutivas até uma concentração superior á 1 mg/mL (~70 mM) para a cromatografia de exclusão molecular.

Uma vantagem dessa segunda cromatografia, é que as biomoléculas que são eluídas com tampão contendo 300 mM de imidazol incluem as caudas com tioredoxina e histidina e também OBPs que não foram clivadas pela TEV e ainda possuem essa cauda.

4.2.6.5 Cromatografia de Exclusão Molecular

A etapa final de purificação das três OBPs foi uma cromatografia de exclusão molecular na coluna *Superdex*[®] *75 10/300* (GE Healthcare), essas cromatografias também aconteceram acopladas ao sistema de purificação de proteínas ÄKTA. Cada proteína foi purificada em seu próprio tampão acrescido de 150 mM NaCl: 150 mM de NaCl, 25 mM Tris pH 7,5 para a *RproOBP* 8; 150 mM NaCl, 100 mM fosfato pH 7,0 para a *RproOBP*11 e 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,0 para a *RproOBP*19,. Os cromatogramas são mostrados nas figuras a seguir.

As frações de eluição da *RproOBP*8 representam uma proteína de maior massa molecular do que o esperado, como será tratado numa seção a seguir, assim, antes de prosseguir com demais ensaios com essa proteína, todo o processo de concentração dessa OBP deve ser reavaliado pois ela pode estar agregando e saindo depois de aplicar 1 volume de coluna de tampão.

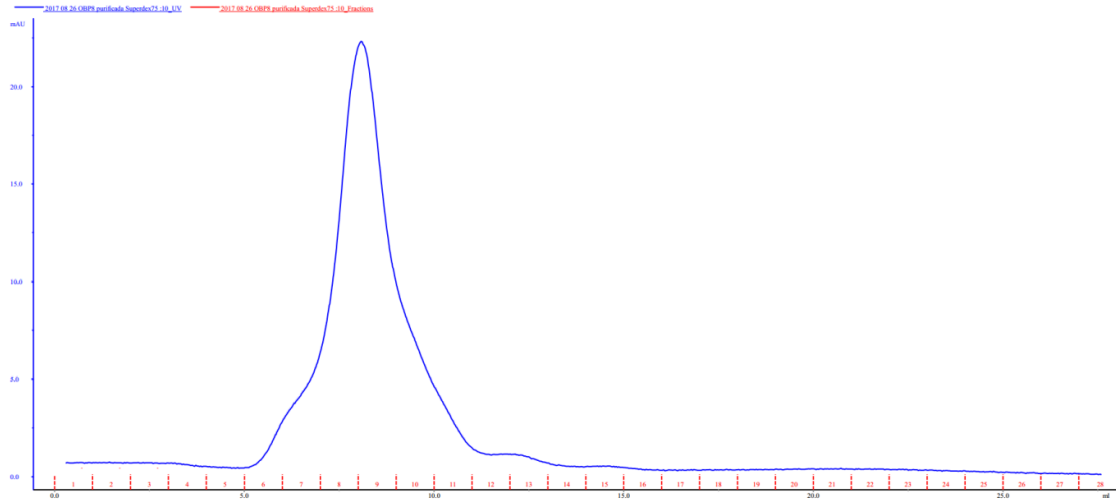


Figura 55 - Cromatografia de Exclusão Molecular da *RproOBP* 80 pico de eluição se encontra em 8,5 mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

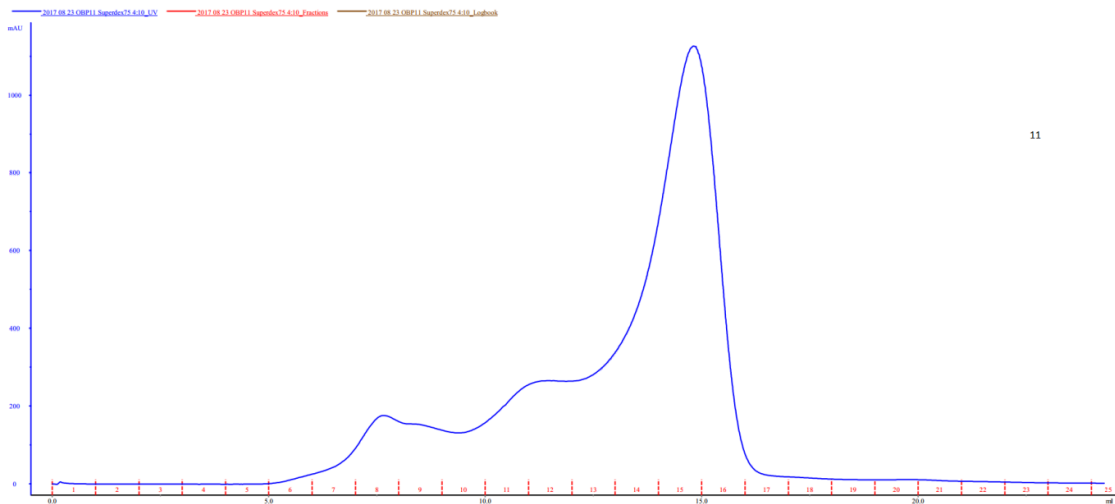


Figura 56- Cromatografia de Exclusão Molecular da *RproOBP* 11. O pico de eluição se encontra em 14,8 mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

As *RproOBPs* 11 e 19 puras, foram concentradas até aproximadamente 2 mg/mL (~140 mM) para serem utilizadas em ensaios biofísicos. Quando os ensaios não foram realizados imediatamente, alíquotas da proteínas foram congeladas em nitrogênio líquido com adição de 10% de glicerol e mantidas á -80°C.

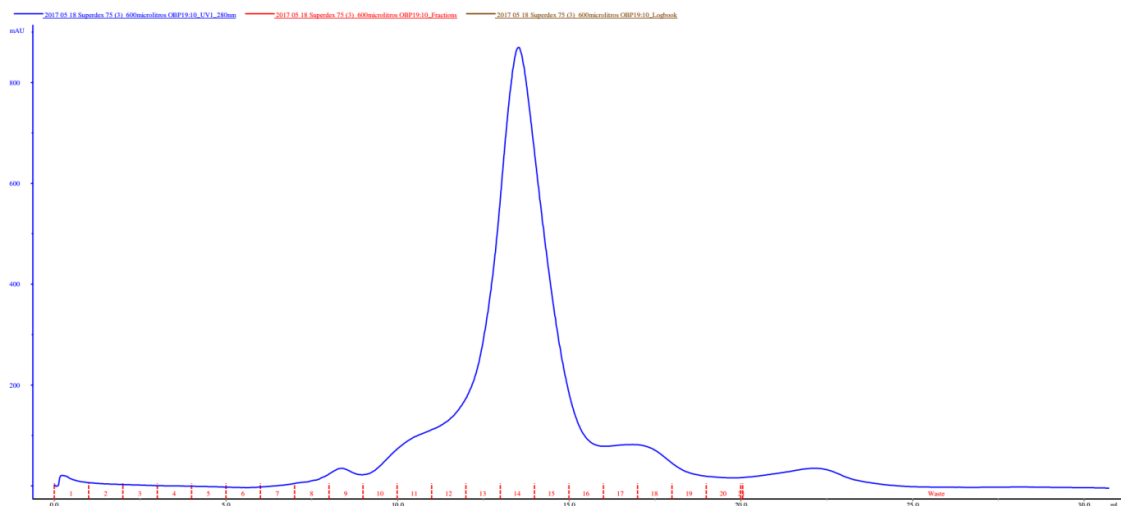


Figura 57 - Cromatografia de Exclusão Molecular da *RproOBP 19* já purificada. O pico de eluição se encontra em 14,6 mL. Isso mostra que embora seja aplicada a proteína pura na coluna, aparecem diferentes picos na cromatografia.

Fonte: Elaborada pela autora.

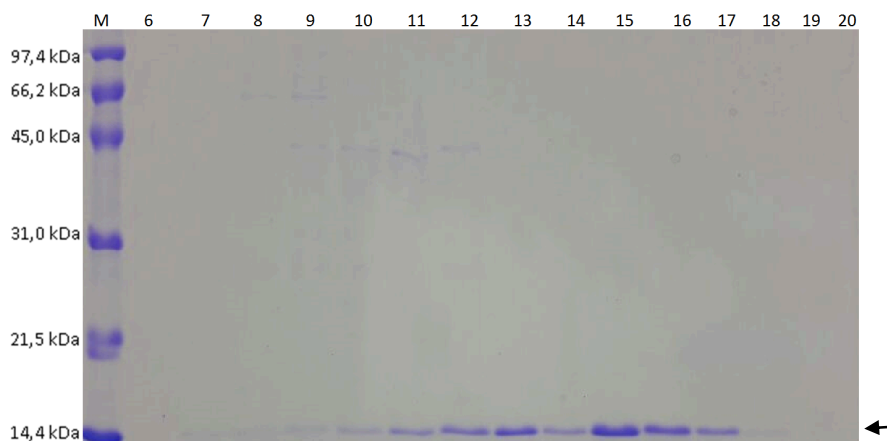


Figura 58 - SDS-PAGE com frações da cromatografia de exclusão molecular realizada com a OBP 19 já purificada. M representa o marcador de peso molecular e os números, as frações do cromatograma da Figura 57. Isso mostra que embora seja aplicada a proteína pura na coluna, aparecem diferentes picos na cromatografia, mas todas representam a *RproOBP 19*, com o mesmo peso molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma particularidade da *RproOBP 19*, cujo cromatograma é mostrado na Figura 57, esse é o resultado obtido quando a proteína já purificada é aplicada novamente à coluna, ou seja, mesmo pura aparecem picos adicionais ao escolhido inicialmente. A presença de mais de um pico, para a proteína pura, foi descrita para proteínas intrinsecamente desordenadas, uma

possibilidade que foi confirmada pelos experimentos de diroísmo circular da *RproOBP* 19 (128).

4.3 Western Blot

O western blot foi usando para confirmar a presença das proteínas recombinantes que possuem cauda de histidina. Assim, foram aplicadas num SDS-PAGE, mostrado na Figura 59, amostras da fração solúvel dessas proteínas, a fração eluída na primeira cromatografia de afinidade (CA1_E) e as frações da segunda cromatografia de afinidade que não interagiram com a resina da cromatografia de afinidade (CA2_{FT}) e que interagiram com a resina de cromatografia de afinidade (CA2_E). Na mesma Figura também é exibida a membrana de transferência com as mesmas amostras corada com 0,2 % *Ponceau* evidenciando que a transferência foi eficiente.

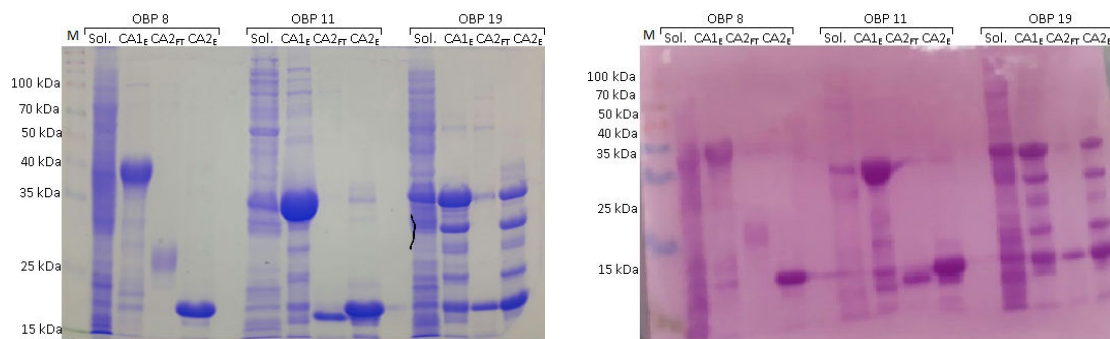


Figura 59 - SDS-page e membrana de transferência corada com 0,2 % *Ponceau* com amostras dos dois primeiros passos de purificação das OBPs. M representa o marcador de peso molecular. Sol, a fração solúvel dessas proteínas, CA1_E a fração eluída na primeira cromatografia de afinidade; CA2_{FT} frações da segunda cromatografia de afinidade que não interagiram com a coluna e CA2_E e que interagiram.

Fonte: Elaborada pela autora.

A membrana foi revelada com o *scanner C-digit Blot* e a Figura 60 adquirida pelo software *Image Studio*TM.

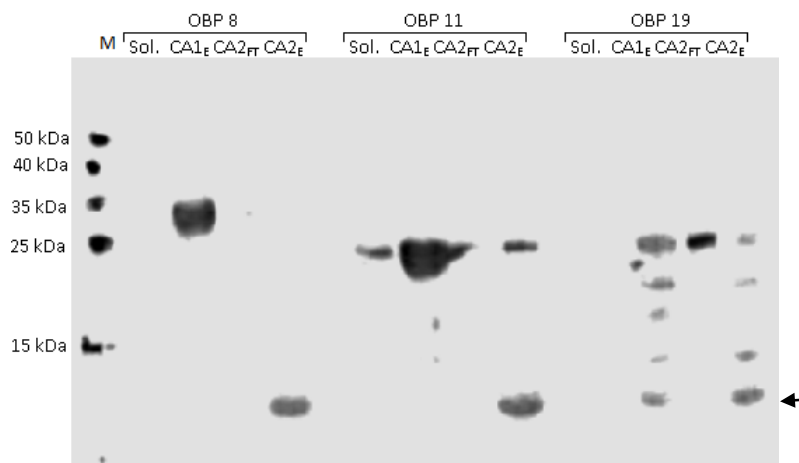


Figura 60 - Imagem adquirida pelo software *Image Studio*TM a partir da membrana da Figura 59.

Fonte: Elaborada pela autora.

O anticorpo utilizado reconhece a cauda de histidina dessas proteínas, a qual é retirada entre a primeira e a segunda cromatografia de afinidade, assim o resultado apresentado é o esperado: uma banda próxima 35 kDa para as proteínas solúveis e que são iluídas na primeira afinidade. E ausência de sinal na fração que não interage com a membrana segunda afinidade (CA2_{FT}) pois representa as OBPs sem a cauda de histidina e tioredoxina, que aparecem com um sinal na fração que interagiu com a cromatografia de afinidade (CA2_E). A banda que aparece em CA2_{FT} para a OBP 19, se comparada com o gel de SDS, representa uma quantidade pequena de proteínas contaminantes (*Rpro*OBP19 sem clivagem da cauda de tioredoxina e histidina) que eluíram na etapa seguinte de purificação.

4.4 Caracterização Biofísica das proteínas recombinantes

4.4.1 Espalhamento dinâmico de Luz (DLS)

Proteínas em solução tiveram seu tamanho (raio hidrodinâmico) estimado a partir do coeficiente de difusão dessas partículas, o que foi realizado com o equipamento *Zetasizer* (Malvern). As OBPs purificadas foram submetidas a centrifugação a 10 000 g por 10 min a 4°C, e as medidas realizadas em diferentes tampões, analisando a homogeneidade da amostra para cada tampão.

Como foi citado anteriormente, a *RproOBP* 8 formou agregados quando concentrada, além de se apresentar polidispersa. Para buscar um tampão mais adequado para essa proteína, ela foi purificada em tampão Tris-HCl pH 7 e posteriormente, alíquotas da *RproOBP* 8 tiveram seu tampão substituído. As amostras foram analisadas quanto a sua homogeneidade e agregação por DLS. A proteína formou grandes agregados ($>e^3$) nos tampões: 100mM ácido acético pH 4,7, 50 mM citrato pH 5,0, 100 mM fosfato pH 5,8, 20 mM HEPES, e no tampão Tris-HCl pH 7,0 depois de congelada. Sua massa estimada também estava acima do esperado, 45,0 +/- 15 kDa e 191,6 +/- 53,6 kDa, para os tampões 20 mM fosfato pH 7,5 e 20 mM CHES pH 9,25, respectivamente. Essa proteína se mostrou muito sensível aos passos de purificação e concentração, uma nova alternativa deve ser pensada para todo o processo. Seja trabalhar com a proteína mais diluída, ou buscar ainda outros tampões que ela poderia se comportar de uma maneira melhor. Ou mesmo utilizar aditivos, como por exemplo glicerol.

Para a *RproOBP* 11 o resultado obtido experimentalmente concorda com o teórico. Em tampão 25 mM fosfato pH 7,0 o raio hidrodinâmico é de 16,2 +/- 8,3 kDa, um intervalo que contém o tamanho esperado da *RproOBP* 11 de 14,8 kDa. Em outra medida foi obtido o valor de 19,6 +/- 3,6 kDa que chega muito próximo do esperado. Se considerarmos que para essa medida a proteína é pressuposta esférica e é contabilizada sua camada de solvatação, pequenas variações são aceitáveis. Por esses resultados, a *RproOBP* 11 se apresentou monodispersa e monomérica em solução, o que concorda com os resultados observados para a Cromatografia de Exclusão Molecular.

A *RproOBP* 19, dentre todos os tampões testados, teve os melhores resultados em tampão 20 mM HEPES, cujo tamanho estimado foi de 16,4 +/- 5,4 kDa para uma amostra monodispersa, sendo esse um valor próximo ao tamanho esperado dessa proteína de 15,4 kDa. Com esses resultados, supõem-se que a *RproOBP* 19 também seja um monômero (resultados observados na Figura 61. Isso corrobora com os resultados da Cromatografia de Exclusão Molecular.

Vale a pena observar que com o experimento de DSF a proteína apresentou maior solubilidade em tampão CAPSO pH 9,0. Porém, embora uma grande quantidade da proteína tenha sido obtida quando a lise e a purificação tenham sido feitas nesse tampão, ela estava agregada segundo os resultados de DLS.

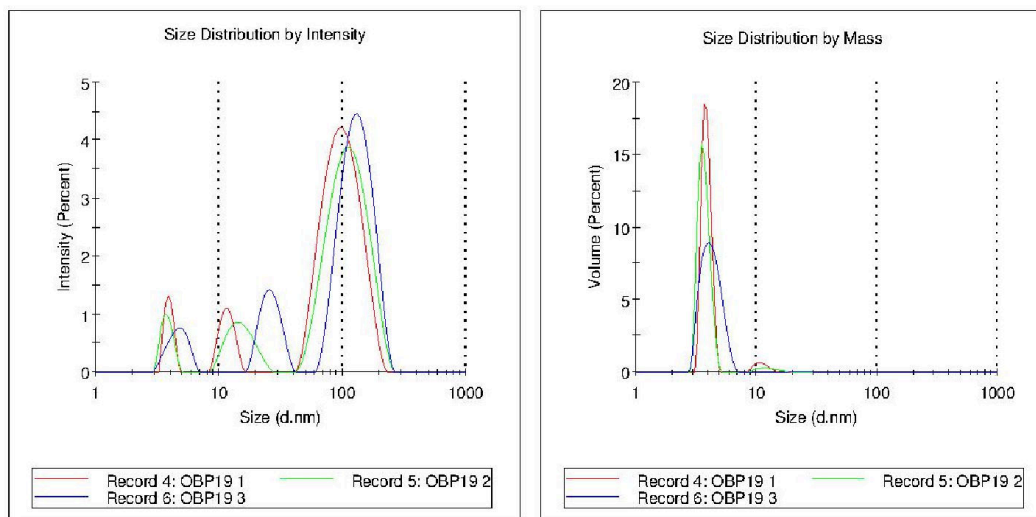


Figura 61 - Resultado obtido pelo DLS para a *RproOBP 19* em tampão HEPES.

Fonte: Elaborada pela autora.

Todas essas medidas de DLS foram realizadas em temperatura ambiente. Adicionalmente foi realizado um experimento em que as mesmas medidas são realizadas variando a temperatura de 4°C a 90°C, com incrementos de 5°C. Esse experimento permite estimar a temperatura de desenovelamento (temperatura de *melting*, T_m) da proteína. Esse experimento foi realizado com a *RproOBP 11* e a *19*, mas nas temperaturas mais elevadas, por questões experimentais, não foi possível fazer a medida de maneira adequada. De qualquer forma, os resultados indicavam uma temperatura de desenovelamento acima de 40°C.

4.4.2 Espectrofotômetro de UV-Visível

Como pode ser observado na Figura 62, a *OBP 11* tem cor vermelha. Um espectro de absorção foi realizado em uma amostra diluída (18 mM) em espectrofotômetro UV-1700 (Shimadzu) de 300 a 500nm. O espectro obtido pode ser observado na Figura 63 e se assemelha ao obtido para a cadeia H da apoferritina humana, com um pico ente 360 e 370 nm e outro pico entre 410 e 420 nm. (129)



Figura 62 - Amostra da *RproOBP 11* concentrada á 2 mg/mL (~135 mM).

Fonte: Elaborada pela autora.

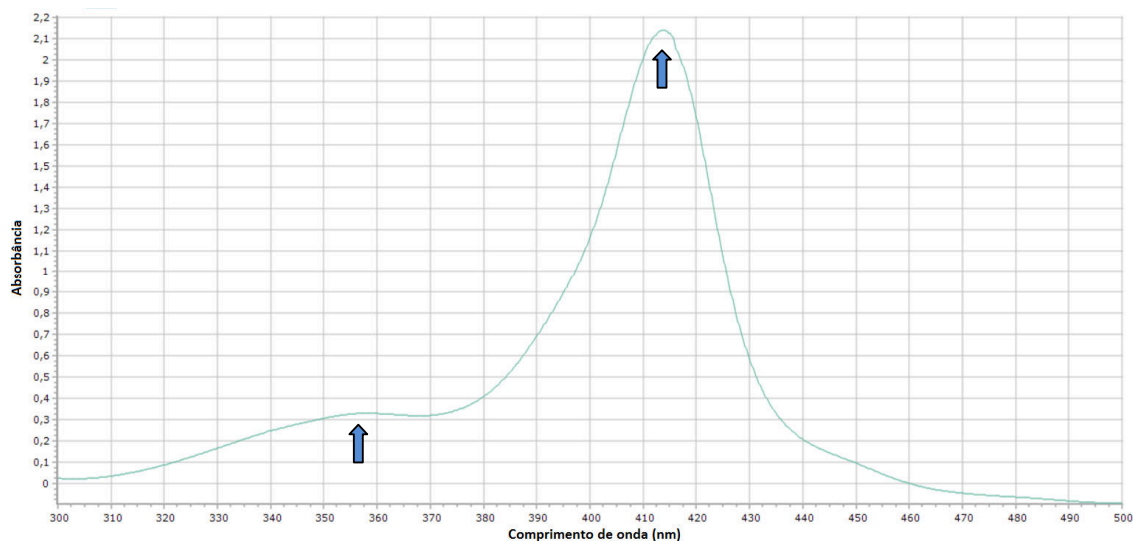


Figura 63 - SpeKWin32 Espectro de absorbância da *RproOBP 11* á 18 mM entre 300 e 500 nm, com medidas a cada 1nm. Os picos de intensidade se encontram em 357 e 413 nm como indicado pelas setas azuis. Imagem obtida com o programa SpeKWin32(130).

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao se observar os espectros de absorbância de uma proteína com o grupo heme nos estados oxidados e reduzidos (Figura 64), e comparando-os com o obtido para a *RproOBP 11*, podemos sugerir que essa proteína tem um grupo heme que está no estado oxidado, já que tem um sinal máximo á 413 nm. (131) Esse máximo de absorção a 400-440 nm recebe o nome de banda de Sorét.

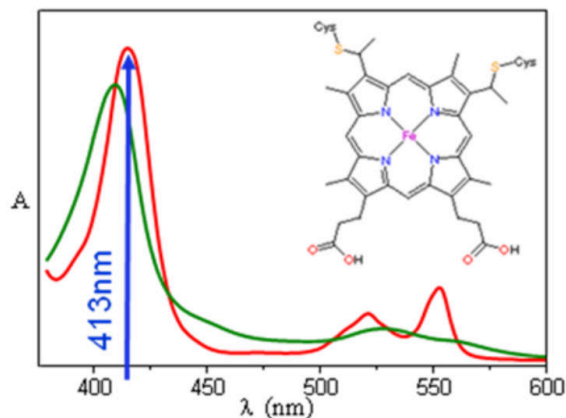


Figura 64 - Espectros UV-Vis de uma proteína heme nos estados oxidados (linha azul) e reduzidos (linha vermelha), ambos em ressonância com a linha laser 413 nm.

Fonte: ESPECTROSCOPIA... (131)

O grupo prostético heme confere a estas proteínas uma cor característica, que pode ser observada na *RproOBP 11* e é constituído por uma parte orgânica e um átomo de ferro, no estado ferroso Fe^{2+} . Esse átomo de ferro também pode estar no estado de oxidação férrico, Fe^{3+} , porém, apenas no estado ferroso proteínas que tem esse grupo podem se ligar ao oxigênio (132). A presença desse grupo é coerente com a anotação dessa proteína no banco de dados UniProt, no qual a *RproOBP 11* está anotada como uma proteína ligadora de grupo heme.

O espectro da *RproOBP 11* também é consistente com a presença de ligações dissulfeto, pois há uma proeminência á 395 nm (133).

4.4.3 Fluorimetria diferencial de varredura (DSF)

Apenas a proteína *RproOBP 19* foi estudada por DSF, como o intuito de encontrar condições em que a proteína se apresentasse mais estável, tanto em solução, como para aumentar a probabilidade de formação de cristais. A T_m , temperatura de desenovelamento, está relacionada com a estabilidade da proteína, sendo que quanto maior a T_m , maior a estabilidade térmica da proteína. Foi utilizado o kit StockOptionsTMpH, da *Hampton Research*.

Dentre todos os tampões testados, o tampão 100 mM CAPSO pH 9,0 resultou no maior T_m (Figura 65), e uma nova purificação da *RproOBP* 19 foi realizada nesse tampão, mas ao final da purificação a proteína estava totalmente agregada, e a busca de um tampão mais adequado por DLS foi realizada. É provável que esse resultado tenha direcionado para condições não promissoras porque a medida do DSF é uma medida indireta. A intensidade do fluoróforo mede a exposição das partes hidrofóbicas da proteína. Como as OBPs possuem um *core* hidrofóbico, que pode ou não estar exposto ao solvente dependendo do tampão, a técnica de DSF talvez não seja a mais indicada para essas proteínas. Assim, com as demais OBPs foi utilizado o DLS, que é uma medição direta, para buscar soluções tampão mais adequadas para a *RproOBP* 19.

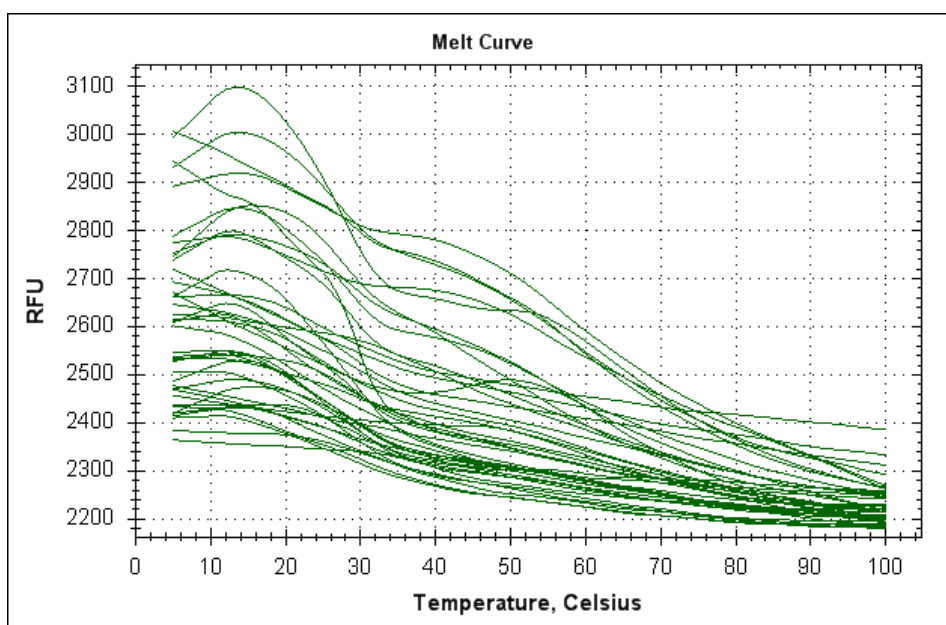


Figura 65- Curva de Unidade de Fluorescência Relativa (RFU) em função da temperatura, obtida pelo DSF.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.4 Eletroforese em gel Nativo

O experimento de eletroforese em gel nativo foi realizado com a *RproOBP* 11 e *RproOBP* 19, aplicando a fração 11 do cromatograma da OBP 11 (Figura 56) e as frações 11, 14 e 17 da purificação da *RproOBP* 19 (Figura 57). Mais de uma amostra da OBP 19 foi selecionada, pois mesmo realizando uma segunda cromatografia de exclusão com uma

alíquota purificada, a amostra ainda apresentava os mesmos picos, sugerindo mais de uma forma estrutural.

O padrão de massa molecular utilizado é o conjunto de proteínas mostradas na Tabela 8, na qual já são apresentados os valores dos raios hidrodinâmicos e sua distância de migração no gel de 3,9 cm de extensão.

Tabela 8 - Padrões para determinação da massa molecular e raio hidrodinâmico a partir da Eletroforese em Gel Nativo e respectivas distâncias de migração.

Padrões	MW (kDa)	R _H (Å)	D (cm)
Tiroglobulina bovina	669,0	85,0	0,25
Ferritina equina	440,0	61,0	0,8
Catalase	232,0	52,2	1,2
Aldorase	140,0	43,0	1,37
BSA	66,0	33,9	2,08

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado da migração pode ser observado na Figura 66, e as curvas de calibração na Figura 67. A distância de migração é linearmente proporcional ao logaritmo da massa molecular para proteínas nativas, globulares e entre 50 e 750 kDa. O raio hidrodinâmico, é linearmente proporcional a distância de migração.

Como foi citado, esse gel tem uma proporção linear entre o logaritmo do peso molecular e a distância percorrida pela amostra no gel. Porém, para proteínas menores que 50 kDa essa proporção não é necessariamente linear. (134) Assim os resultados obtidos para as bandas das OBPs que migraram mais que a BSA (66 kDa) devem ser consideradas com ressalvas. As duas bandas da *RproOBP* 11 migraram, 2,28 e 2,62 cm, o que pode corresponder á proteínas de 50,4 e 32,1 kDa, que representariam um tetrâmero ou um dímero, respectivamente. A *RproOBP* 19 tem 4 bandas, de maior ou menor intensidade dependendo da sua fração da purificação, as distâncias que elas percorreram foram de 1,74, 1,96, 2,4 e 2,62 cm, o que corresponde á proteínas de 103,3, 77,1, 42,9 e 32,1 kDa, respectivamente. Essas massas moleculares representam uma forma de dímero, trímero, e até pentâmeros e hexâmeros.

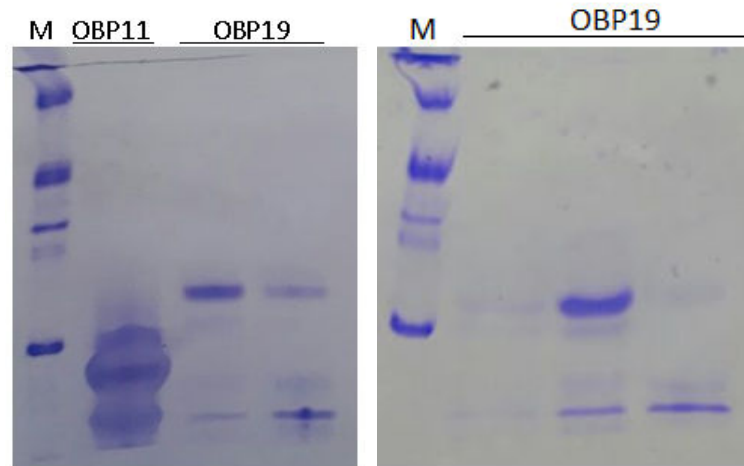


Figura 66 - Eletroforese em Gel Nativo. M são as proteínas padrão descritas na Tabela 8. No primeiro gel, tem uma amostra da fração 11 do cromatograma da *RproOBP* 11 e as frações 14 e 17 da purificação da *OBP* 19. O segundo gel contém os picos 11, 14 e 19 da *RproOBP* 19.

Fonte: Elaborada pela autora.

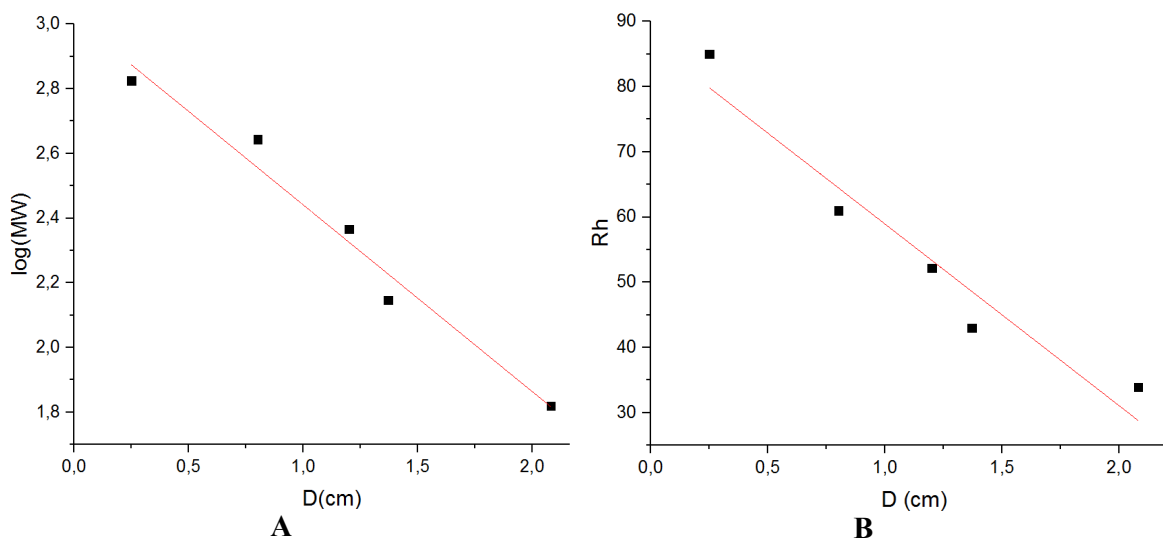


Figura 67 - A) Curva de calibração para as Massas Moleculares (MW) a partir da eletroforese em gel nativo e B) Curva de calibração para Raio hidrodinâmico a partir da eletroforese em gel nativo. Da menor para a maior distância de migração, os pontos representam os padrões: Tiroglobulina bovina, Ferritina equina, Catalase, Aldorase e BSA.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para o raio hidrodinâmico, é evidenciado um tamanho de 23,2 e 13,8 Å para as bandas da *RproOBP* 11. E de 38,3; 32,2; 19,9 e 13,8 Å do menor para o maior R_H da *RproOBP* 19 respectivamente. Outros fatores que também influenciam a distância de migração incluem proteínas não globulares e a distribuição de cargas superficiais das proteínas, o que faz com que a distância de migração não seja proporcional ao log da massa molecular. (134)

4.4.5 Eletroforese de Focalização Isoelétrica

A eletroforese de ponto isoelétrico foi realizada para a *RproOBP* 11 e para a *RproOBP* 19. A foto do gel pode ser observada na Figura 68.

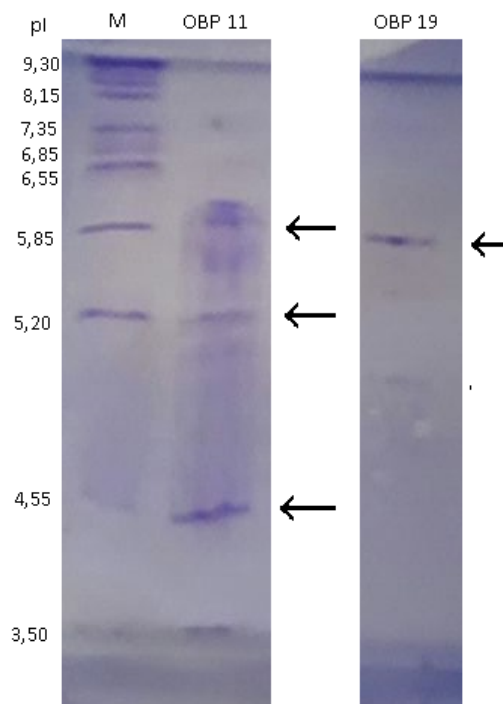


Figura 68 -Foto do gel de Focalização Isoelétrica, com amostras da *RproOBP* 11 e 19.M representa o marcador das proteínas de diferentes pontos isoelétricos, que estão anotados ao lado da figura.

Fonte: Elaborada pela autora.

A *RproOBP* 11 apresentou 3 bandas no gel, uma possibilidade é que as proteínas possam estar agregando, e assim não estar expondo todas as suas carga, e portanto,

apresentam mais de um banda no gel. O pI teórico da *RproOBP* 11 é 5,94. o que estaria em torno das bandas entre 5,85 e 6,55 do padrão molecular.

A *RproOBP* 19 apresentou uma banda bem próxima da proteína do padrão cujo pI é 5,85. O pI teórico dessa OBP é de 6,88, mas pelos resultados experimentais, o pI dessa proteína é menor ou equivalente á 5,85.

4.4.6 Estimativa de massa molecular por Cromatografia de Exclusão Molecular

Para verificar o estado oligomérico das *RproOBPs*, foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular, nas mesmas condições da purificação, com as proteínas padrão descritas na Tabela 9, da Sigma-Aldrich.

Tabela 9 - Padrões para a calibração da Superdex™ 75 10/30 (GE Healthcare) e respectivos volumes de eluição obtidos.

Padrões	Massa Molecular (kDa)	R _H (Å)
Citocromo C equino	12,4	17,0
Anidrase Carbônica bovina	29,0	23,6
BSA	66,	33,9
Álcool Desidrogenase	150,0	46,0
B-amilase	200,0	50,4
Dextran azul	2000,0	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Como foi descrito anteriormente, com esses dados e os respectivos valores de eluição foi feita a curva de calibração a seguir:

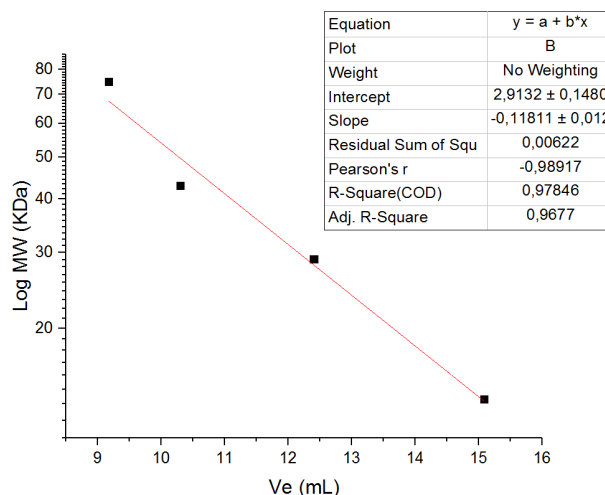


Figura 69 - Curva de Calibração para a resina Superdex 75 10/30 para a estimativa da massa molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

No caso da *RproOBP* 11, o tamanho estimado por esse método é de 14,4 kDa, o que equivale a um monômero da proteína que tem 14,8 kDa. Esse resultado é mais conclusivo que o gel nativo e sugere que a *RproOBP* 11 é um monômero em solução. O resultado da exclusão molecular é coerente com o obtido por DLS para essa *RproOBP*.

Os resultados para a *RproOBP* 19 também são mais conclusivos que os do gel nativo. A *RproOBP* 19, tem um volume de eluição de 14,6 mL em seu maior pico, o que corresponde a 15,2 kDa. O tamanho de uma subunidade dessa *RproOBP* tem 15,4 kDa, assim o resultado sugere que a *RproOBP* 19 é um monômero em solução também. Os demais picos que aparecem para essa *RproOBP*, e que foram descritos para proteínas intrinsecamente desordenadas, possuem dos volumes de eluição de 8,5, 10,8 e 17,1 mL, somente o valor de 10,8 mL está dentro de um intervalo de confiança, e sugere uma proteína em torno de 42 kDa, que corresponde a massa próxima de um trímero para essa OBP. (128) Os resultados da massa molecular estimada da *RproOBP* 19 por exclusão molecular são coerentes com os obtidos por DLS.

4.4.7 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

O espectro de dicroísmo circular da *RproOBP11* foi obtido pelo uso de um espectropolarímetro *JASCO J-180*, como descrito anteriormente, e pode ser observado na Figura 70.

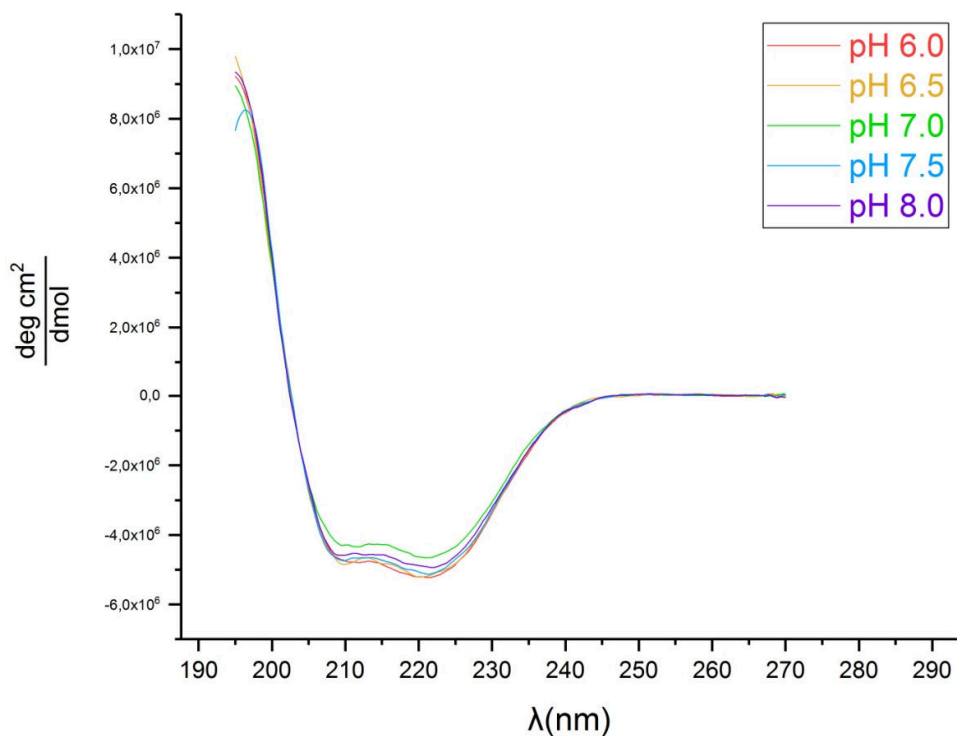


Figura 70 - Espectro de Dicroísmo Circular (CD) no UV distante da *RproOBP 11*, em diferentes pHs.

Fonte: Elaborada pela autora.

A curva da *RproOBP 11* é característica de proteínas ricas em α -hélice, devido aos dois picos negativos centrados em 208 e 222 nm, uma indicação clara da presença α -hélice. (54)

Como foi descrita uma possível mudança conformacional das OBPs de inseto mediante a mudança de pH na sensila olfativa, o espectro da *RproOBP 11* foi medido em diferentes pHs. Como pode ser observado na mesma figura, o espectro permanece o mesmo

em diferentes pH, o que sugere que não há mudança na estrutura secundária dessa OBP no intervalo de pH testado. É possível que haja uma diferença se a variação de pH testada for ampliada. Mas também é possível que não aconteça nenhuma mudança na estrutura secundária detectável por dicroísmo circular. Uma mudança em uma alça flexível, por exemplo, também poderia acontecer e poderia não ser detectada por dicroísmo circular.

Para uma OBP de *A. aegypti* que tem uma tampa sensível á mudanças de pH, não houveram mudanças no espectro de CD entre 187-260 nm porém, no espectro entre 250 e 320 nm houveram mudanças significativas que podem ser relacionadas a interrupção das ligações de hidrogênio que são responsáveis pela movimentação do C-terminal sobre a cavidade de ligação. Os autores então sugeriram que a mudança de pH não interrompe a estrutura secundária como um todo, mas modifica a estrutura terciária (78).

Essa ausência de mudança na estrutura secundária, pode indicar portanto, ausência de ligação ou que forças mais fracas, tais como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, estão envolvidas entre odorante e OBP. Uma maneira de verificar isso, foi descrita por Schwaighofer *et al* 2014, através da temperatura de desnaturação das OBPs (54).

Em experimentos realizados com a OBP 14 de *A. mellifera* não ocorreu uma mudança significativa no espectro de CD da proteína devido a interação com o ligante (54). Porém, quando foram comparados os espectros de CD utilizados para verificar a temperatura de desnaturação na ausência e na presença de seus possíveis ligantes, os resultados indicaram que era possível verificar a interação da proteína com o ligante e ainda discriminar entre ligantes de baixa ou alta afinidade de acordo como aumento da temperatura de desnaturação. Essa mudança de temperatura foi atribuída ao efeito de estabilização que interações não covalente entre odorante e proteína (54). Por isso, foram realizados experimentos em que a medida de CD da *Rpro*OBP 11 foi realizada na presença dos possíveis ligantes: pentanol, hexanol, heptanol, octanol e octenol, mas o espectro permaneceu o mesmo, o que nos retorna a discussão anterior. A desnaturação na presença e ausência de possíveis ligantes é um experimento complementar que pode ser feito para a *Rpro*OBP 11, mas uma maneira de controlar o ambiente para que a evaporação dos compostos voláteis não altere o resultado desse experimento precisa ser encontrada.

A *Rpro*OBP 19 apresentou um espectro semelhante a de proteínas com estrutura irregular. Para confirmar esses dados, novas medidas foram realizadas em colaboração com a

Dra Patricia S Kumagai, pós-doutoranda do grupo de Biofísica Molecular IFSC – USP. Esse novo experimento foi realizado por radiação síncrotron na linha AU-CD, ASTRID2 – ISA, na Universidade de Aarhus (Aarhus, Dinamarca),

A primeira medida da *RproOBP* 19 foi realizada entre 20°C e 90°C com incrementos de 10°C. Para verificar se a *RproOBP* 19 de fato possui características de uma proteína intrinsecamente desordenada a temperatura foi reduzida para 20 °C e uma nova medida foi realizada, os espectros de SRCD podem ser observados na Figura 71. Essa redução de temperatura é uma maneira de verificar se a *RproOBP* 19 tem características de uma proteína intrinsecamente desordenada e também, é uma maneira de avaliar a estabilidade térmica dessa OBP. A capacidade de OBPs se re-enovelarem foi descrita para várias OBPs. (61)

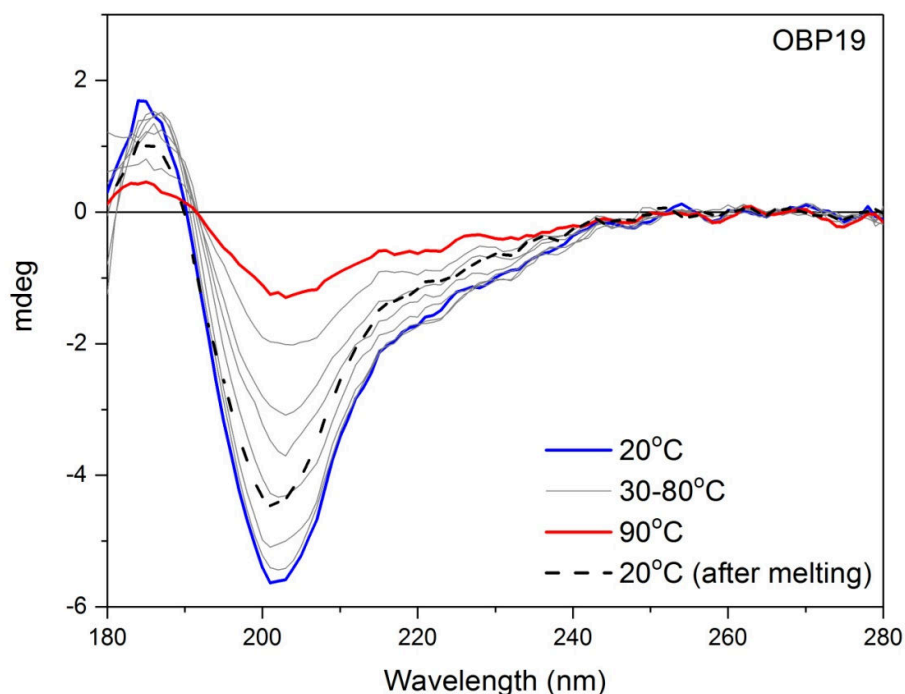


Figura 71 - Espectro SR da *RproOBP* 19 medido a 20°C e a cada 10 °C até atingir a temperatura de 90°C. Depois de atingir essa temperatura, a amostra foi resfriada à 20°C e uma nova medida foi realizada.

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado desse experimento de CD indica que a *RproOBP* 19 não é uma proteína intrinsecamente desordenada (IDP), porém possui regiões intrinsecamente desordenadas. O espectro da *RproOBP* 19 é muito semelhante ao de IDPs, porém em torno de 220 nm esse

sinal está mais próximo de 0 para IDPs. Isso sugere que a *RproOBP 19* é uma proteína com regiões desordenadas, mas que retêm alguma porcentagem de estrutura secundária.

O processo de ganho e perda de estrutura secundária é reversível para IDPs, ou seja, essas proteínas retornam ao seu estado original depois de terem a temperatura reduzida após aquecimento. No caso da *RproOBP 19*, a proteína retoma grande parte de seu espectro inicial, mas ainda permanece com algumas diferenças por causa do aumento da temperatura. Isso reforça a sugestão que essa proteína tenha alguma região estruturada, mas tenha também uma região intrinsecamente desordenada. IDPs tem funções em diversos processos biológicos, especialmente na regulação de sinais em vias de transdução. (128)

Realizando a deconvolução através do programa BestSel (135), obtemos os dados da figura a seguir:

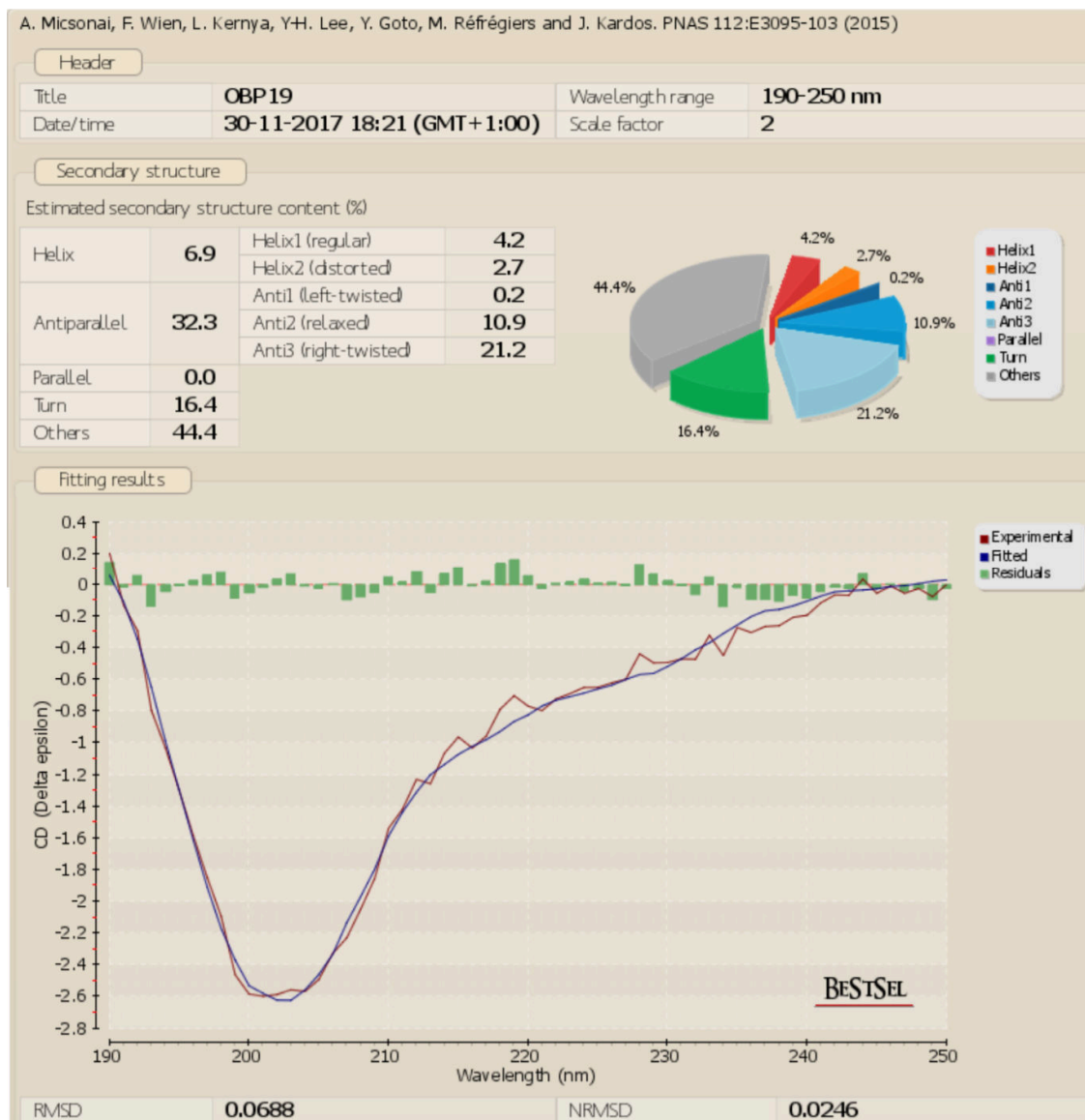


Figura 72 - Deconvolução do espectro da *Rpro*OBP 19 utilizando o programa BeStSel.

Fonte: Elaborada pela autora.

Esses resultados indicam que apenas 39,2% da estrutura da *Rpro*OBP 19, se encontra em estruturas definidas de α -hélice e folha β .

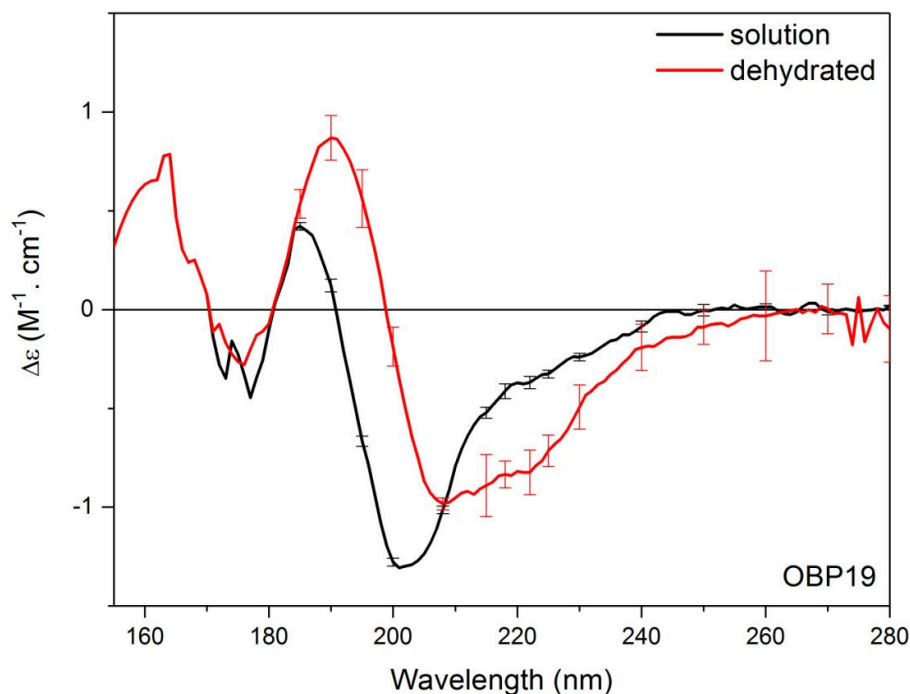


Figura 73 - Espectro da OBP 19 medido a 20°C em solução 20 mM de fosfato de sódio, pH 6,8e desidratada na presença de 50% de trifluoroetano (TFE).

Fonte: Elaborada pela autora.

Outra característica que corrobora a hipótese de que a *Rpro*OBP 19 é uma proteína com regiões intrinsecamente desordenadas, é a mudança do espectro dessa OBP na presença de TFE (2,2,2-trifluoroetanol) como mostrado na Figura 73.

O TFE é um solvente que tende a induzir a formação de estruturas helicoidais em proteínas que não possuem essas estruturas naturalmente. Foi proposto que o TFE produz estruturas secundárias regulares como consequência da estabilização das ligações de hidrogênio intraproteicas ao invés de ligações de hidrogênio entre a proteína e o solvente. Na Figura 70, a presença de TFE faz com que o espectro da OBP 19 se assemelhe mais a estruturas de α -hélice do que a estruturas desordenadas. (136)

Para testar se a *Rpro*OBP 19 adquire uma estrutura secundária mais organizada na presença de seu ligante, foram realizadas medidas espectropolarímetro *JASCO J-180* dessa OBP com 5 possíveis ligantes: pentanol, hexanol, heptanol, octanol e octenol. Caso fosse observada uma mudança no espectro dessa OBP na presença de algum desses compostos, isso seria um indicativo de que essa proteína adquire estrutura para realizar sua função e hipóteses

mais fundamentadas sobre sua função poderiam ser feitas. Porém nenhum desses compostos alterou o espectro da *RproOBP* 19. Isso não os descarta como possíveis ligantes dessa OBP, pois os experimentos foram realizados em 20 mM tampão fosfato pH 7,0, que pode não ser o ideal para a interação entre OBP e ligante.

4.4.8 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

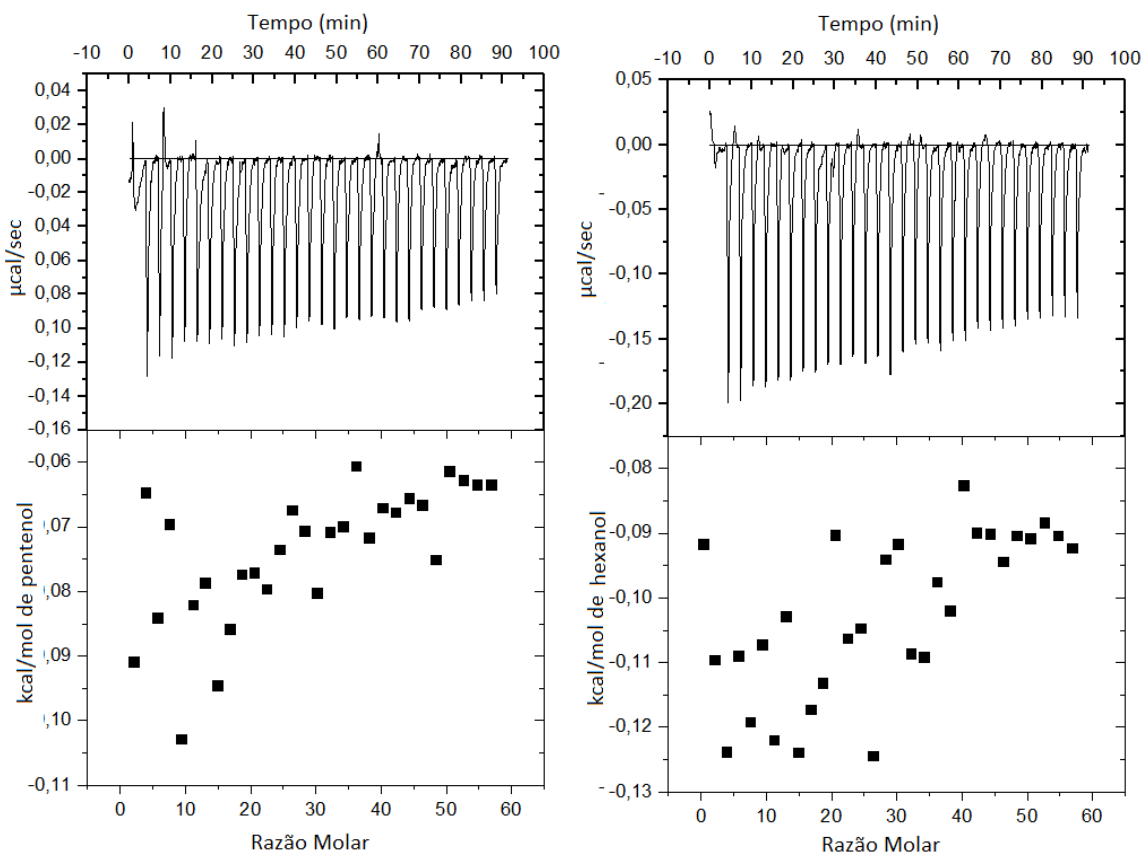


Figura 74 - Resultado do experimento de ITC para a *RproOBP* 11, com os possíveis ligantes pentanol e hexanol.

Fonte: Elaborada pela autora.

Medir a afinidade de ligação e especificidade é importante para caracterização das OBPs e relacionar sua expressão em órgãos específicos e função fisiológica (30). Com o intuito de investigar a possível função das *RproOBPs* 11 e 19, foram realizados experimentos de ITC. Como foi citado anteriormente, as OBPs foram tituladas com 5 possíveis ligantes.

Nas Figura 74 e Figura 75, são mostrados os resultados desse experimento para a *RproOBP* 11 e os ligantes pentanol, hexanol, octenol e octanol. Esses resultados são similares aos obtidos para *RproOBP* 11 e heptanol e para *RproOBP* 19 e todos os 5 ligantes.

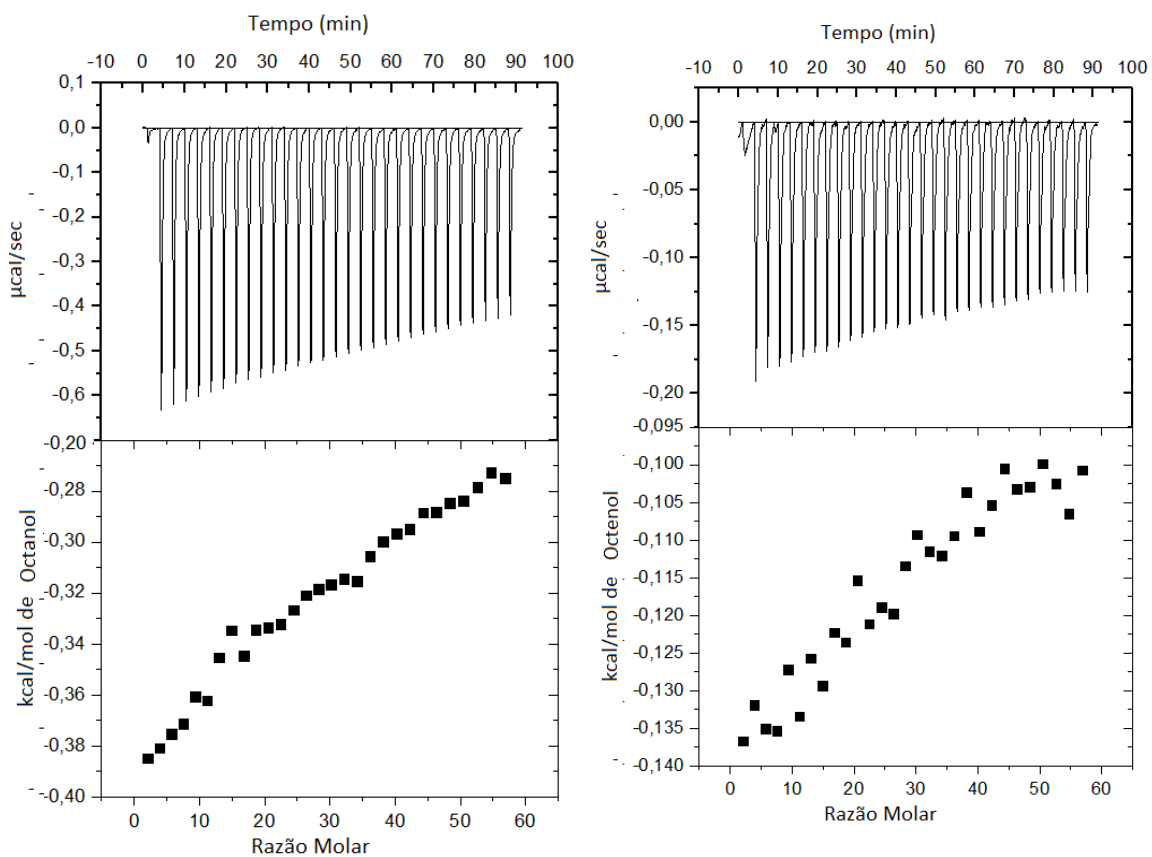


Figura 75 - Resultado do experimento de ITC para a *RproOBP* 11, com os possíveis ligantes octanol e octenol.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser observado por essas figuras, mesmo com 500 mM de ligantes sendo injetados, o calor mensurado não indica que ocorreu ligação em nenhuma das condições. Mesmo que as OBPs difiram muito em relação á sua seletividade, uma especificidade muito alta nunca foi associada a OBPs (30). Ainda sim, os resultados obtidos nessas condições e com esses ligantes, indicam que não houve interação.

Curvas de ligação foram obtidas para outras OBPs recombinantes em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,5, sendo titulada com várias concentrações do seu ligante, no caso,

aminoantraceno (86). Assim, talvez uma mudança de tampão e adição de aditivos, possa possibilitar a interação entre OBPs e seu ligante. A realização de um *docking* também poderia ser útil para que ligantes pré escolhidos *in silico* sejam testados com as OBPs desse estudo.

4.4.9 Ensaios de Cristalização

Com o objetivo de obter informações experimentais sobre a estrutura 3D das OBPs de *R. prolixus*, foram realizadas triagens iniciais das condições de cristalização como descrito no item 2.3.7. Em nenhuma das condições testadas até o momento foram obtidos cristais com superfícies lisas e mais propícias para serem difratadas por raios-X. Porém foram obtidos cristais amorfos (Figura 76, A e B), quase cristais (Figura 76 D e E) e agulhas (Figura 76 H), nas condições descritas na figura.

Para obter cristais da *RproOBP* 11, que apresentou algumas condições que parecem favoráveis a cristalização, é possível abrir essas condições de sais e precipitantes realizando uma investigação mais minuciosa das condições.

Entre os possíveis motivos da dificuldade em cristalizar a *RproOBP* 19, ou mesmo em achar condições em que ela forme algum tipo de estrutura, encontra-se a sua região intrinsecamente desordenada como foi sugerido pelos dados de Dicroísmo Circular. O cristal representa as proteínas dentro de uma estrutura relativamente organizada, sem que um padrão possa ser formado, não serão obtidos cristais possíveis de serem estudados por raios X. Uma solução seria o estudo da estrutura terciária dessa OBP por meio de NMR.

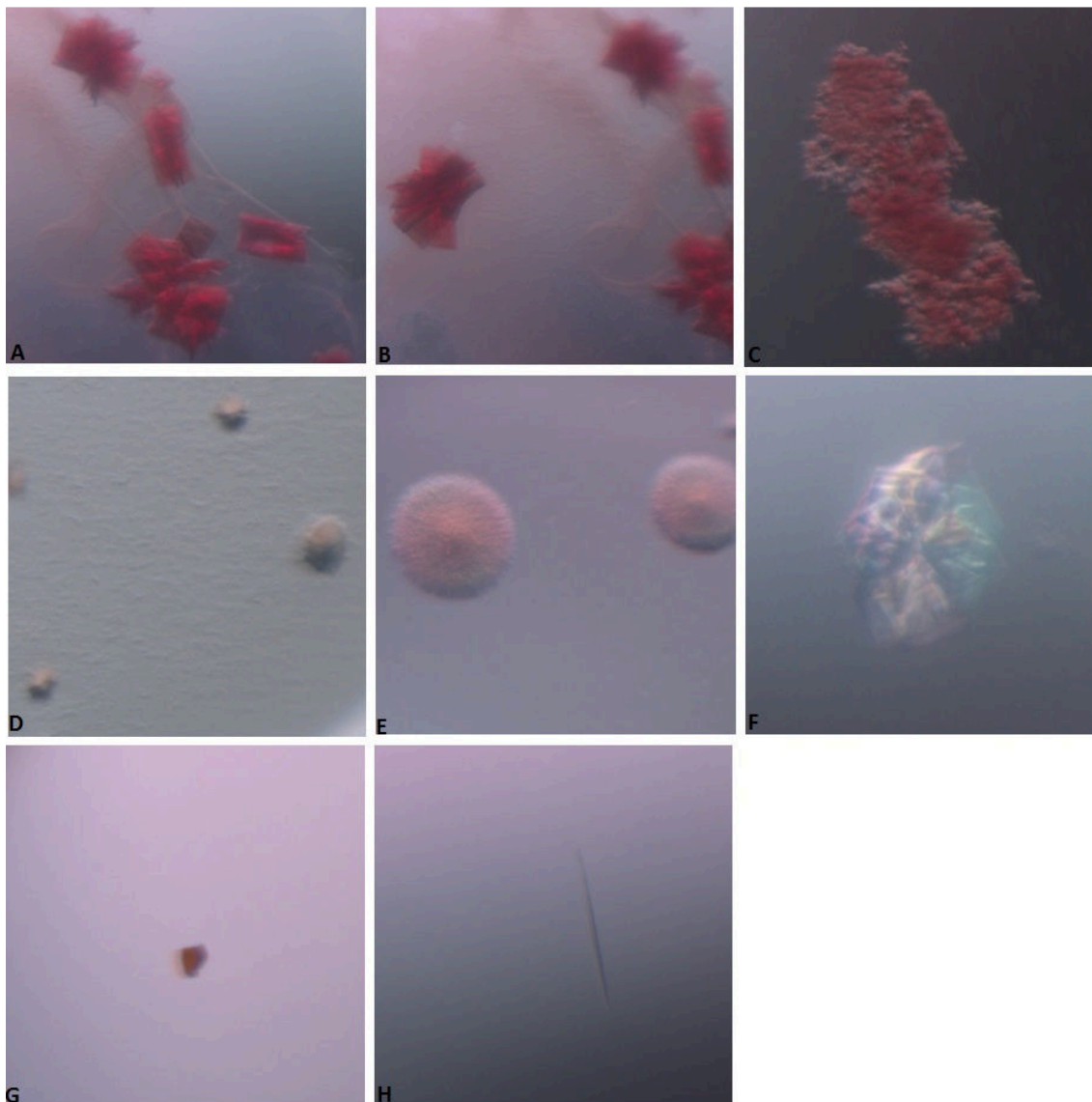


Figura 76 - A e B) Cristal amorfo da OBP 11 em 0,2 M sulfato de amônio, 0,1M bis-tris pH 5,5 e 25% PEG 3350, Kit Classic II suite(QIAGEN). C) Precipitado da OBP 11 em 0,2 M sulfato de amônio, 0,1M HEPES pH 7,5 e 20% PEG 3350, Kit Classic II Suite (QIAGEN). D) Quase cristal da OBP 11 em 0,2 M cloreto de cálcio, 0,1M acetato de sódio pH 4,6 e 20% isopropanol, Kit Classic Suite (QIAGEN). E) Quase Cristal da OBP 11 em 0.2 M acetato de magnésio tetrahidratado, 0.1 M cacodilato de sódio pH 6.5 e 20 % w/v PEG 8000, SG1 Screen HT (Molecular Dynamics). F) Possível cristal da OBP 19 em 0.2 M Acetato de Potássio, 0.1 M HEPES pH 6.5 e 6 % w/v Polivinilpirrolidona, Kit MIDAS (Molecular Dynamics). G) Possível cristal da OBP 11 em 2,0 M de sulfato de amônio, 0,1 M HEPES pH 7,5 e 30% v/v PEG 400, Kit SG1 Screen HT (Molecular Dynamics). H) Agulha da OBP 19 em 3,5 M de formato de sódio, 0,1 M HEPES pH 7,5 e 30 % v/v PEG 400, SG1 Screen HT (Molecular Dynamics).

Fonte: Elaborada pela autora.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, são apresentados os resultados de clonagem, expressão e purificação das *RproOBPs* 8, 11 e 19 de *Rhodnius prolixus* e a caracterização estrutural das duas últimas, assim como investigação da função dessas OBPs através da técnica de ITC.

Um estudo através de ferramentas de bioinformática revela que essas três proteínas pertencem à superfamília de PBPs e GOBPs - proteínas ligantes de odorantes em geral e de feromônios - que tem como substrato semioquímicos que guiam o comportamento de insetos. A predição da estrutura terciária dessas *RproOBPs* por programas de bioinformática, indicou que essas OBPs são compostas majoritariamente por α -hélices que possuem três ligações dissulfeto, características comuns as OBPs em geral, e que caracterizam essas proteínas como termicamente estáveis.

Os espectros de CD entre 187-260 nm indicam que a *RproOBP* 11 é uma proteína globular rica em α -hélices, cuja estrutura secundária não é alterada na variação de pH entre 6,0 e 8,0, nem com a adição dos compostos pentanol, hexanol, heptanol, octenol e octanol, que são possíveis ligantes. Os resultados obtidos por CD confirmam as predições *in silico* dessa OBP. Além disso, o espectro de UV-Visível da *RproOBP* 11 sugere que essa seja uma proteína com o grupo heme no estado oxidado, o ferro está no estado ferroso Fe^{2+} , nessas condições que algumas proteínas conseguem interagir com seus ligantes, como é o caso da mioglobulina e da hemoglobina.

O espectro de CD da *RproOBP* 19 também não é alterado com a adição desses possíveis ligantes. Mas diferente de outras OBPs a *RproOBP* 19 é uma proteína com regiões intrinsecamente desordenadas, como foi mostrado nos espectros da proteína em solução comparado com o espectro da proteína desidratada, na presença de 40% TFE.

Os experimentos que comprovariam a função das OBPs, mostram que nas condições testadas, a *RproOBP* 11 e a OBP 19 não interagiram com possíveis ligantes testados.

Os dados de DLS mostraram condições melhores para purificar e manter as OBPs em solução, e são fundamentais para os ensaios de cristalização. Apesar das diversas condições testadas, esses ensaios não resultaram em cristais com superfícies adequadas à difração.

6 PERSPECTIVAS

- Realizar uma busca mais aprofundada de possíveis ligantes para essas proteínas com o uso de programas de bioinformática
- Realizar um *docking* com os possíveis ligantes
- Testar outras condições para a *RproOBP 8*
- Identificar a presença das *RproOBPs 11 e 19* em *R. prolixus* empregando anticorpos
- Refinar as condições de cristalização da *RproOBP 11*
- Realizar novos experimentos de ITC, com outros possíveis ligantes, tampões e/ou aditivos
- Realizar a desnaturação térmica das *RproOBPs* na presença e na ausência de possíveis ligantes através de dicroísmo circular

REFERÊNCIAS

- 1 AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS. **Doença de Chagas**. 2017. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>>. Acesso em: 30.11.2017.
- 2 DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INICIATIVE. DNDi. **Doença de Chagas**. 2017. Disponível em: < <http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas.htm>>. Acesso em: 30.11.2017.
- 3 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected tropical diseases**. 2018. Disponível em: < http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 02.04.2018.
- 4 COURA, J.R. The main sceneries of chagas disease transmission. the vectors, blood and oral transmissions - a comprehensive review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.
- 5 WORLD HEALTH ORGANIZATION **Informal consultation on chagas disease in the Western Pacific**. Nagasaki: 2011. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 30.11.2017.
- 6 PAVAN, M.G. **Especiação em triatomíneos: uma abordagem filogenética, biogeográfica e comportamental dos vetores de Chagas Rhodnius prolixus e R. robustus s.l. (Hemiptera: Reduviidae)**. 2013. 261f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.
- 7 DIAS, J.C.P. Perspectivas de controle da Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 2, n. 1, p. 84–103, 1986.
- 8 DIAS, C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 21, p. 1–10, 2016.
- 9 VINHAES, M.C.; DIAS, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. suppl 2, p. S7–S12, 2000
- 10 MARCOLIN, N. Mais uma tentativa: terapia de medicamentos já existentes pode ser a nova arma contra o Trypanossoma cruzi. **Pesquisa FAPESP**, n.163, p. 61-63, 2019.
- 11 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)** More on Chagas disease symptoms. 1–2. Disponível em: < http://www.who.int/chagas/disease/home_symptoms_more/en/ >. Acesso em: 04.12.2017.
- 12 CAMARA-LOPES, L.H. Carcinoma of the esophagus as a complication of megaesophagus an analysis of seven cases. **American Journal of Digestive Diseases**, v. 6, n. 8, p. 742–756, 1961.
- 13 CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. **Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease)**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/mpi>> (NPI), >. Acesso em: 04.2.2017.
- 14 TANOWITZ, H.B. et al. Adipose tissue: a safe haven for parasites? **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 4, p. 276–284, 2017.
- 15 MATOS- FERREIRA, A.V. et al. Evidence for trypanosoma cruzi in adipose tissue in human chronic chagas disease. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 12–13, p. 1002–1005, 2011.
- 16 MARINHO, I. **Desvendada a relação entre Doença de Chagas e depressão**. 2013. Disponível em: < <https://agencia.fiocruz.br/desvendada-rela%C3%A7%C3%A3o-entre-doen%C3%A7a-de-chagas-e-depress%C3%A3o> >. Acesso em: 30.11.2017.

17 ANDRADE JR, B. et al. Identificação do trypanosoma cruzi nos tecidos extracardíacos de portadores de miocardite crônica chagásica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 17, p. 123–126, 1984.

18 CAPUANI, L. et al. Mortality among blood donors seropositive and seronegative for Chagas disease (1996– 2000) in São Paulo, Brazil: a death certificate linkage study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p. e0005542, 2017.

19 LEE, B.Y. et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **Lancet Infectious Diseases**. v. 13, n. 4, p. 342–348, 2013.

20 LUQUETTI, A. et al. **Doença de Chagas – triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde público**. Brasília: Ministério da Saúde, 1998.

21 DIAS, J.C.P. Facing chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 3, p. 285–286, 2017.

22 DAVANÇO, M.G. **Farmacocinética do benznidazol administrado em coelhos na forma de comprimidos de liberação imediata e comprimidos de liberação prolongada**. 2015. 153f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2015.

23 ROCHAGAN (Benzonidazol). São Paulo: Laboratório Roche, 2017. Bula de remédio.

24 WORLD Health Assembly 63.20 Chagas Disease: control and elimination Disponível em :<www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/WHA_63.20_Eng.pdf>. Acesso em: 12.04.2018.

25 DIAS, J.C.P. et al. The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 123–125, 2014.

26 FAN, J. et al. Review an overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 3056–3069, 2011.

27 LEAL, W.S. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 373–391, 2013.

28 PELOSI, P. et al. Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects. **Biological Reviews**, v. 93, p. 184–200, 2018.

29 BRITO, N.F.; MOREIRA, M.F.; MELO, A.C.A. A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception. **Journal of Insect Physiology**, v. 95, p51-65, 2016. doi: 10.1016/j.jinsphys.2016.09.008.

30 PELOSI, P. et al. Soluble proteins of chemical communication: an overview across arthropods. **Frontiers in Physiology**, v. 5, n.14, p. 1–14, 2014.

31 MESQUITA, R.D. et al. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 48, p. 14936–14941, 2015.

32 VAZQUEZ-PROKOPEC, G.M. et al. Active dispersal of natural populations of *triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in rural Northwestern Argentina. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 4, p. 614–621, 2006.

33 LUNA, F.O. **Ettotalora**. Disponível em : <https://en.wikipedia.org/wiki/Rhodnius_prolixus#/media/File:Rp-nymphs-adult.JPG>. Acesso em 11.03.2018.

- 34 LAZZARI, C.R.; LORENZO, M.G. Exploiting triatomine behaviour: alternative perspectives for their control. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. suppl. 1, p. 65–70, 2009.
- 35 PATES, H.; CURTIS, C. Mosquito behavior and vector control. **Annual Review of Entomology**, v. 50, n. 1, p. 53–70, 2005.
- 36 ZWIEBEL, L.J.; TAKKEN, W. Olfactory regulation of mosquito - host interactions. **Insect Biochemical Molecular Biology**, v. 34, n. 7, p. 645–652, 2004.
- 37 ORTIZ, M.I. et al. Behavioural responses to human skin extracts and antennal phenotypes of sylvatic first filial generation and long rearing laboratory colony *Rhodnius prolixus*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 461–466, 2011.
- 38 FRANCO, T.A. et al. Silencing the odorant receptor co-receptor RproOrco affects the physiology and behavior of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 69, p. 82–90, 2016.
- 39 SYED, Z. Chemical ecology and olfaction in arthropod vectors of diseases. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p. 83–89, 2015.
- 40 BIESSMANN, H. et al. The *Anopheles gambiae* odorant binding protein 1 (AgamOBP1) mediates indole recognition in the antennae of female mosquitoes. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0009471
- 41 LORENZO, M.G.; MELO, A.C. do A. Olfacção e comportamento. In: ____ **Tópicos avançados em entomologia molecular**. Rio de Janeiro: INCT, 2012. cap.9, p. 1–20.
- 42 MOYES, C.D.; SCHULTE, P.M. **Princípios de fisiologia animal**. Rio de Janeiro. Artmed Editora, 2009.
- 43 SCHULZ, S. **The chemistry of pheromones and other semiochemicals II**. Berlin: Springer-Verlag, 2005.
- 44 SATO, K. et al. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. **Nature**, v. 452, n. 7190, p. 1002–1006, 2008.
- 45 JIN, X. et al. SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 31, p. 10996–11001, 2008.
- 46 FORSTNER, M. et al. A receptor and binding protein interplay in the detection of a distinct pheromone component in the silkworm *Antheraea polyphemus*. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 7, p. 745–757, 2009.
- 47 VENTHUR, H. et al. Ligand binding and homology modelling of insect odorant-binding proteins. **Physiological Entomology**, v. 39, p. 183–198, 2014.
- 48 LEAL, W.S. et al. Kinetics and molecular properties of pheromone binding and release. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 102, n. 15, p. 5386–91, 2005.
- 49 SHIDA, Y.; LEAL, W.S. From the cover: rapid inactivation of a moth pheromone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 39, p. 14075–14079, 2005.
- 50 LEAL, W.S. et al. Reverse and conventional chemical ecology approaches for the development of oviposition attractants for *Culex* mosquitoes. **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, 2008.

- 51 KEMPRAJ, V. et al. Computational reverse chemical ecology: virtual screening and predicting behaviorally active semiochemicals for *Bactrocera dorsalis*. **BioMedical Central Genomics**, v. 15, p. 209, 2014.
- 52 LAUGHLIN, J.D. et al. Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein. **Cell**. v. 133, n. 7, p. 1255–1265, 2015.
- 53 WOJTASEK, H.; LEAL, W.S. Conformational change in the pheromone-binding protein from *Bombyx mori* induced by pH and by interaction with membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 43, p. 30950–30956, 1999.
- 54 SCHWAIGHOFER, A. et al. Honey bee odorant-binding protein 14: effects on thermal stability upon odorant binding revealed by FT-IR spectroscopy and CD measurements. **European Biophysics Journal**, v. 43, n. 2–3, p. 105–112, 2014.
- 55 VIEIRA, F.G.; ROZAS, J. Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the arthropoda: origin and evolutionary history of the chemosensory system. **Genome Biology and Evolution**, v. 3, n. 1, p. 476–490, 2011.
- 56 DIPPEL, S. et al. Tissue-specific transcriptomics, chromosomal localization, and phylogeny of chemosensory and odorant binding proteins from the red flour beetle *Tribolium castaneum* reveal subgroup specificities for olfaction or more general functions. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2014.
- 57 FINDLAY, G.D. et al. Proteomics reveals novel drosophila seminal fluid proteins transferred at mating. **Plos Biology**, v. 6, n. 7, 2008.
- 58 DANI, F.R. et al. Odorant-binding proteins and chemosensory proteins in pheromone detection and release in the silkworm *Bombyx mori*. **Chemical Senses**, n. 36, p. 335–344, 2011. doi: 10.1093/chemse/bjq137.
- 59 MALESZKA, J. et al. RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*) **Development Genes Evolution**, v.217, n.3, p. 189–196, 2007.
- 60 LEVY, F. et al. Proteomic analysis of the systemic immune response of drosophila. **Molecular & Cellular Proteomics** 3.2, v. 32. n.2, p. 156–166, 2004. doi: 10.1074/mcp.M300114-MCP200.
- 61 PELOSI, P. et al. Structure and biotechnological applications of odorant-binding proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 1, p. 61–70, 2014.
- 62 LI, Z.Q. et al. Two Minus-C odorant binding proteins from *Helicoverpa armigera* display higher ligand binding affinity at acidic pH than neutral pH. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, n. 3, p. 263–272, 2013.
- 63 MAO, Y. et al. Crystal and solution structures of an odorant-binding protein from the southern house mosquito complexed with an oviposition pheromone. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v. 107, n. 44, p. 3–8, 2010.
- 64 DAMBERGER, F.F. et al. Structural basis of ligand binding and release in insect pheromone-binding proteins : NMR structure of *Antheraea polyphemus* PBP1 at pH 4 . 5. **Journal of Molecular Biology**. v.373, p. 811–819, 2007. doi:10.1016/j.jmb.2007.07.078
- 65 ISHIDA, Y. et al. Fatty acid solubilizer from the oral disk of the blowfly. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2013.
- 66 RIBEIRO, J.M.C. et al. An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 27, 2014.

- 67 PELOSI, P. et al. Soluble proteins in insect chemical communication. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 14, p. 1658–1676, 2006.
- 68 SPINELLI, S. et al. Crystal structure of *Apis mellifera* OBP14, a C-minus odorant-binding protein, and its complexes with odorant molecules. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 41–50, 2012.
- 69 ZHOU, J.J. et al. Identification of odorant-binding proteins of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: genome annotation and comparative analyses. **Insect Molecular Biology**, v. 17, p. 147–163, 2008.
- 70 SONG, L.M. et al. Male tarsi specific odorant-binding proteins in the diving beetle *Cybister japonicus* sharp. **Scientific Reports**, v. 6, p. 31848, 2016. doi: 10.1038/srep31848.
- 71 ZHOU, J. et al. Characterisation of *bombyx mori* odorant-binding proteins reveals that a general odorant-binding protein discriminates between sex pheromone components. **Journal of Molecular Biology**, v. 389, n. 3, p. 529–545, 2009.
- 72 LARTIGUE, A. et al. Sulfur single-wavelength anomalous diffraction crystal structure of a pheromone-binding protein from the honeybee *Apis mellifera*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 6, p. 4459–4464, 2004.
- 73 SANDLER, B.H. et al. Sexual attraction in the silkworm moth: structure of the pheromone-binding-protein – bombykol complex. **Chemical & Biology**, v. 7, n.2, p. 143–151, 2000.
- 74 HE, X. et al. Binding of the general odorant binding protein of *Bombyx mori* BmorGOBP2 to the moth sex pheromone components. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 12, p. 1293–1305, 2010.
- 75 XU, X. et al. NMR Structure of navel orangeworm moth pheromone-binding protein (AtraPBP1): implications for pH-sensitive pheromone detection. **Biochemistry**, v. 23, n.49, 2010. doi:10.1021/bi9020132.
- 76 GONG, Z.-J. et al. Cloning, expression and functional analysis of a general odorant-binding protein 2 gene of the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Insect Molecular Biology**, v. 18, n. 3, p. 405–417, 2009.
- 77 ZUBKOV, S. et al. Structural consequences of the pH-induced conformational switch in a polyphemus pheromone-binding protein: mechanisms of ligand release. **Journal of Molecular Biology**, v.351, , p. 1081–1090, 2005. doi: 10.1016/j.jmb.2005.10.015.
- 78 LEITE, N.R. et al. Structure of an odorant-binding protein from the mosquito *Aedes aegypti* suggests a binding pocket covered by a pH-sensitive “Lid.” **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, p. 1–7, 2009.
- 79 WOGULIS, M. et al. The crystal structure of an odorant binding protein from *Anopheles gambiae*: evidence for a common ligand release mechanism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, p. 157–164, 2006.
- 80 PESENTI, M.E. et al. Structural basis of the honey bee PBP pheromone and pH-induced conformational change. **Journal of Molecular Biology**, v. 380, n.1, p. 158–169, 2008.
- 81 HAN, L. et al. Operating mechanism and molecular dynamics of pheromone-binding protein ASP1 as influenced by pH. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1–9, 2014.
- 82 JIN, J.Y. et al. Different roles suggested by sex-biased expression and pheromone binding affinity among three pheromone binding proteins in the pink rice borer, *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 66, p. 71–79, 2014.

- 83 SONG, Y. et al. Molecular characterization, expression patterns and binding properties of two pheromone-binding proteins from the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, n. 12, p. 2709–2720, 2014.
- 84 NAKAGAWA, T. et al. Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. **Science**, v.307, p. 1638–1642, 2005. doi: 10.1126/science.1107580.
- 85 LARISIKA, M. et al. Electronic olfactory sensor based on *A. mellifera* odorant-binding protein 14 on a reduced graphene oxide field-effect transistor. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 45, p. 13245–13248, 2015.
- 86 SILVA, C. et al. Odorant binding proteins: a biotechnological tool for odour control. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 8, p. 3629–3638, 2014.
- 87 MARGARYAN, A. et al. Synthesis of an immobilized *Bombyx mori* pheromone-binding protein liquid chromatography stationary phase. **Talanta**, v. 70, n. 4, p. 752–755, 2006.
- 88 BEZERRA-SILVA, P.C. et al. Evaluation of the activity of the essential oil from an ornamental flower against *aedes aegypti*: electrophysiology, molecular dynamics and behavioral assays. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–15, 2016.
- 89 BIANCHET, M.A. et al. The three-dimensional structure of bovine odorant binding protein and its mechanism of odor recognition. **Nature Structural Biology**, v. 3, n. 11, p. 934–939, 1996.
- 90 GIRALDO-CALDER, G.I. et al. VectorBase: an updated bioinformatics resource for invertebrate vectors and other organisms related with human diseases. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D707–D713, 2015
- 91 BLAST. Basic local alignment search tool. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 04.10.2017.
- 92 GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, J.M. (Ed.) **The proteomics protocols handbook**. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p. 571–607.
- 93 CERONI, A. et al. Disulfind: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 177–181, 2006.
- 94 BUCHAN, D.W.A. et al. Scalable web services for the PSIPRED protein analysis workbench. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Web Server issue, p. 349–357, 2013.
- 95 SEN, T.Z. et al. GOR V server for secondary structure prediction. **Bioinformatics**. v. 21, n. 11, p. 2787–2788, 2005.
- 96 LINDING, R. et al. GlobPlot: exploring protein sequences for globularity and disorder. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3701–3708, 2003.
- 97 YANG, Z.R. et al. RONN: The bio-basis function neural network technique applied to the detection of of natively disordered regions in proteins. **Bioinformatics**, v.21, n.16, p.3369-76,2005.
- 98 MIZIANTY, M.J.; PENG, Z.; KURGAN, L. MFDp2: accurate predictor of disorder in proteins by fusion of disorder probabilities, content and profile. **Intrinsically Disordered Proteins**, v. 1, n. 1, p. e24428, 2013.
- 99 LINDING, R. et al. Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. **Structure**, v. 11, n. 11, p. 1453–1459, 2003.

- 100 WALSH, I. et al. CSpritz: accurate prediction of protein disorder segments with annotation for homology, secondary structure and linear motifs. **Nucleic Acids Research**, v. 39, suppl.2, p. 190–196, 2011.
- 101 WALSH, I. et al. Espritz: accurate and fast prediction of protein disorder. **Bioinformatics**, v. 28, n. 4, p. 503–509, 2012.
- 102 VULLO, A. et al. Spritz: a server for the prediction of intrinsically disordered regions in protein sequences using kernel machines. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 164–168, 2006.
- 103 YANG, J. et al. The I-TASSER suite: protein structure and function prediction. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 7–8, 2014.
- 104 ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 1–8, 2008
- 105 PROMEGA. **pGEM®- T and pGEM®- T easy vector systems**. 2010. Disponível em: <https://www.promega.co.uk/~media/files/resources/protocols/technical_manuals/0/pgem-t_and_pgem-t_easy_vector_systems_protocol.pdf>. Acesso em: 12.04.2018.
- 106 STUDIER, F.W.; MOFFATT, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **Journal of Molecular Biology**, v. 189, n. 1, p. 113–130, 1986.
- 107 NOVAGEN. **pET system manual: user protocol**. 11th. ed. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24451672>>. Acesso em: 12.04.2018.
- 108 ASLANIDIS, C. et al. Minimal length requirement of the single-stranded tails for Ligation-independent Cloning (LIC) of PCR products. **Genome Research**. v. 4, p.172-177, 1994.
- 109 HEALTHCARE. G. **Ion exchange chromatography: principles and methods**. 2016. Disponível em: <www.proteins.gelifesciences.com/~...purification-ib/.../ion_exchange_chromatography.pdf>. Acesso em: 13.04.2018.
- 110 BERNE, B. J.; PECORA. R. **Dynamic light scattering**. New York, John Wiley. 1976. p. 376.
- 111 SIMEONOV, A. Recent developments in the use of differential scanning fluorometry in protein and small molecule discovery and characterization. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 8, n. 9, p. 1071–1082, 2013.
- 112 PANTOLIANO, M.W. et al. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 6, n. 6, p. 429–440, 2001.
- 113 NIESEN, F.H. et al. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2212–2221, 2007.
- 114 AMERSHAM BIOSCIENCES. **Guide to isoelectric focusing**. 1998. Disponível em: <<https://www.scientificlabs.co.uk/handlers/libraryFiles.ashx?filename=40083.pdf>>. Acesso em: 13.04.2018.
- 115 CANTOR, C.R., SCHIMMEL, P.R. **Biophysical chemistry: Part II - techniques for the study of biological structure and function**. New York, Freeman and Coeditora, 1980.
- 116 FARID, R.S. **Circular dichroism (CD) spectroscopy**. 1–7. Disponível em: <<http://www.proteinchemist.com/cd/cdspec.html>>. Acesso em 10.10.2017.
- 117 LEES, J.G. et al. CDtool - an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving. **Analytical Biochemistry**, v. 332, n. 2, p. 285–289, 2004.


- 118 MACHADO, V.E. et al. Attraction of the sand fly *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to chemical compounds in a wind tunnel. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 147, 2015.
- 119 BLUNDELI, T.L. et al. High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 1, p. 45–54, 2002.
- 120 WERNIMONT, A.; EDWARDS, A. In situ proteolysis to generate crystals for structure determination: an update. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, p. 1–15, 2009.
- 121 CONSORTIUM, T.U. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. 158, 2017.
- 122 ZHANG, Z.; HENZEL, W.J. Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites. **Protein Science**, v. 13, n. 10, p. 2819–2824, 2009.
- 123 HILLER, K. **PrediSi - prediction of signal peptides**. Disponível em : < <http://www.predisi.de/home.html>>. Acesso em 06.05.2015.
- 124 STOCKHOLM BIOINFORMATICS CENTRE. **Phobius: a combined transmembrane topology and signal peptide predictor**. Disponível em : < <http://phobius.sbc.su.se>>. Acesso em 15.08.2015.
- 125 PETERSEN, T.N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011.
- 126 ZIEMBA, B.P. et al. A novel mechanism of ligand binding and release in the odorant binding protein 20 from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **Protein Science**. v. 22, p. 11–21, 2013.
- 127 CAMPANACCI, V. et al. Revisiting the specificity of mamestra brassicae and *Antheraea polyphemus* pheromone-binding proteins with a fluorescence binding assay. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, p. 20078–20084, 2001.
- 128 PEREZ, Y. et al. Lipid binding by disordered proteins. **Nature Protocol Exchange**, 2013. Disponível em : < <https://www.nature.com/protocolexchange/protocols/2923> >. Acesso em: 03.04.2018.
- 129 CARMONA, U. et al. Ferritin light-chain subunits: key elements for the electron transfer across the protein cage. **Chemical Communication**, v. 50, n. 97, p. 15358–15361, 2014.
- 130 MENGES, F. **Spekwin32 v.1.72 user manual**. Berchtesgaden, 2015.
- 131 RAMAN spectroscopy of metalloproteins. Disponível em: <http://www.itqb.unl.pt/raman_spectroscopy_of_metalloproteins/RRS_s.html>. Acesso em: 12.03.2018.
- 132 SEMEDO, M. Mioglobina e hemoglobina. In: ____ **Utilização de derivados de calixarenos no isolamento de proteínas e biocatálise em solventes orgânicos**. Rio de Janeiro, INCT, 2007. cap.1, p. 115- 145.
- 133 GHOSH, K. et al. Spectroscopic and biochemical characterization of heme binding to yeast Dap1p and mouse PGRMC1p+. **Biochemistry**. v. 44, n. 50, p. 16729–16736, 2005
- 134 THERMOFISHER. **Native page protocol**. 2014 Disponível em: < https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nativepage_man.pdf >. Acesso em 12.04.2018.
- 135 MICSONAI, A. et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) Plus**. v. 112, n.24, p. 1–9, 2015.

136 LOPES, J.L.S. et al. Folding factors and partners for the intrinsically disordered protein micro-exon gene 14 (MEG-14). **Biophysical Journal**, v. 104, n. 11, p. 2512–2520, 2013.

137 LAUTENSCHLAGER, C. et al. Bombyx mori pheromone-binding protein binding non-pheromone ligands: implications for pheromone recognition. **Structure**. v. 15, n. 2, p. 1148– 1154, 2007.

ANEXO A – Pesquisa de OBPs de *Rhodnius prolixus* no VectorBase

2/14/2018 Site | VectorBase



VectorBase

Bioinformatics Resource for Invertebrate Vectors of Human Pathogens

GO

Advanced Search
Switch Search Type

[LOGIN](#)

ZIKA
ABOUT
ORGANISMS
DOWNLOADS
TOOLS
DATA
HELP
COMMUNITY
CONTACT US

Home » Data » Site

Search

Filter Results

Domain	Show/Hide Category	Hits
Genome		20
Sub-domain		Hits
Gene		20
Species(Reset Filter)		Hits
Rhodnius prolixus		20
Strain		Hits
CDC		20

Enter terms GO

Cannot find what you are looking for? Try a global search

RESET FILTERS AND GO
Export

[Switch Search Type](#)

Advanced Search

1-20 OF 20 RESULTS

OBP9 (RPRC000194)

Genome > Gene

odorant binding protein 9

Species: *Rhodnius prolixus*

Location: KQ034184:546308-550101

OBP26 (RPRC000182)

Genome > Gene

odorant binding protein 26

Species: *Rhodnius prolixus*

Location: KQ034392:229461-294009

RPRC005773

Genome > Gene

Putative odorant binding protein

Species: *Rhodnius prolixus*

Location: KQ034137:933380-945028

RPRC008276

Genome > Gene

Putative odorant binding protein

Species: *Rhodnius prolixus*

Location: KQ034251:907807-917956

OBP19 (RPRC000593)

Genome > Gene

odorant binding protein 19

Species: *Rhodnius prolixus*

Location: KQ034151:1140477-1143954

RPRC007845

Genome > Gene

Putative odorant binding protein

Species: *Rhodnius prolixus*

Location: KQ034069:998370-1007964

OBP11 (RPRC004408)

Genome > Gene

odorant binding protein 11

Species: *Rhodnius prolixus*

Location: KQ034184:557405-563812

OBP8 (RPRC000564)

Genome > Gene

odorant binding protein 8

Species: *Rhodnius prolixus*

Location: KQ034184:542726-544431

RPRC009555

Genome > Gene

Putative odorant binding protein

Species: *Rhodnius prolixus*

Location: KQ034069:1941189-1962945

https://www.vectorbase.org/search/site/%2522odorant%2520binding%2520protein%2522?species_category=%22Rhodnius%20prolixus%22
1/3

continua

continuação

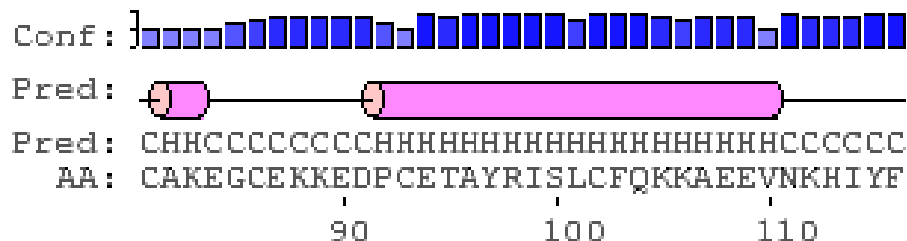
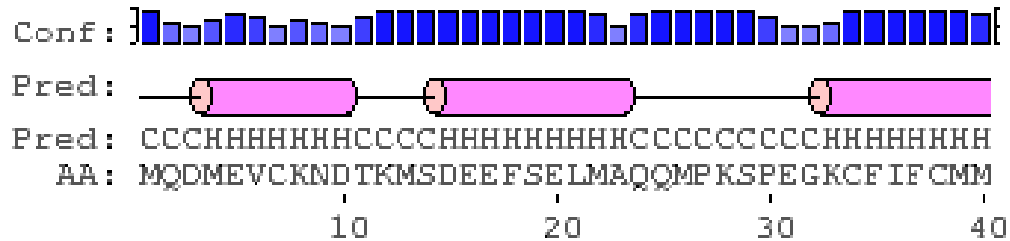
2/14/2018

Site | VectorBase

<p>RPRC006278 Genome > Gene Putative odorant binding protein Species: <i>Rhodnius prolixus</i> Location: KQ034157:455937-463055</p>
<p>OBP4 (RPRC000274) Genome > Gene odorant binding protein 4 Species: <i>Rhodnius prolixus</i> Location: KQ034610:64515-68148</p>
<p>OBP25 (RPRC000257) Genome > Gene odorant binding protein 25 Species: <i>Rhodnius prolixus</i> Location: KQ034392:143085-144440</p>
<p>RPRC006282 Genome > Gene Putative odorant binding protein Species: <i>Rhodnius prolixus</i> Location: KQ034157:429573-453888</p>
<p>OBP3 (RPRC000527) Genome > Gene odorant binding protein 3 Species: <i>Rhodnius prolixus</i> Location: KQ034243:355590-355991</p>
<p>OBP22 (RPRC000115) Genome > Gene odorant binding protein 22 Species: <i>Rhodnius prolixus</i> Location: KQ034392:111970-115707</p>
<p>RPRC006285 Genome > Gene Putative odorant binding protein Species: <i>Rhodnius prolixus</i> Location: KQ034157:413466-421855</p>
<p>RPRC015086 Genome > Gene Putative odorant binding protein Species: <i>Rhodnius prolixus</i> Location: KQ034103:1266498-1270802</p>
<p>RPRC004407 Genome > Gene Putative odorant-binding protein Species: <i>Rhodnius prolixus</i> Location: KQ034184:589672-593282</p>
<p>RPRC010284 Genome > Gene Odorant-binding protein Species: <i>Rhodnius prolixus</i> Location: KQ034056:13216009-13223357</p>
<p>RPRC004413 Genome > Gene Putative odorant-binding protein 19a Species: <i>Rhodnius prolixus</i> Location: KQ034184:516904-525926</p>

Figura 77 - Pesquisa de OBPs de *Rhodnius prolixus* no VectorBase
Fonte: Adaptada de VectorBase.

ANEXO B - Análise da Estrutura Secundária com PSIPRED



Legends:

	- helix	Conf: } - +	- confidence of prediction
	- strand	Pred: —————(—————(—————(—————	- predicted secondary structure
—————	- coil	AA: CAKEGCEKKEDPCETAYRISLCFQKKAEEVNKHIYF	- target sequence

Figura 78 - Predição da estrutura secundária da *RproOBP 8* utilizando o servidor PSIPRED.
 Fonte: Adaptada de PSIPRED (94).

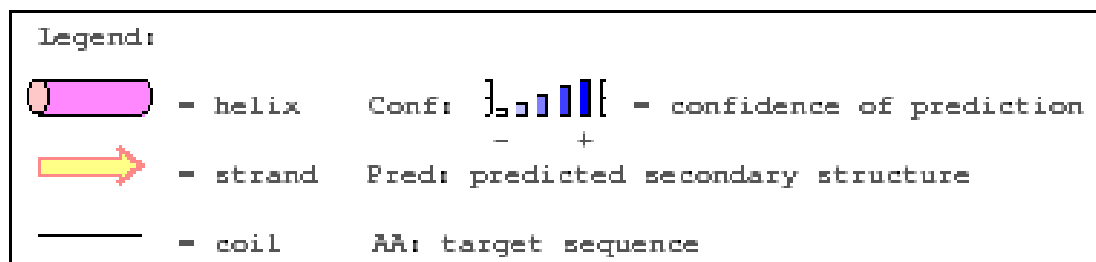
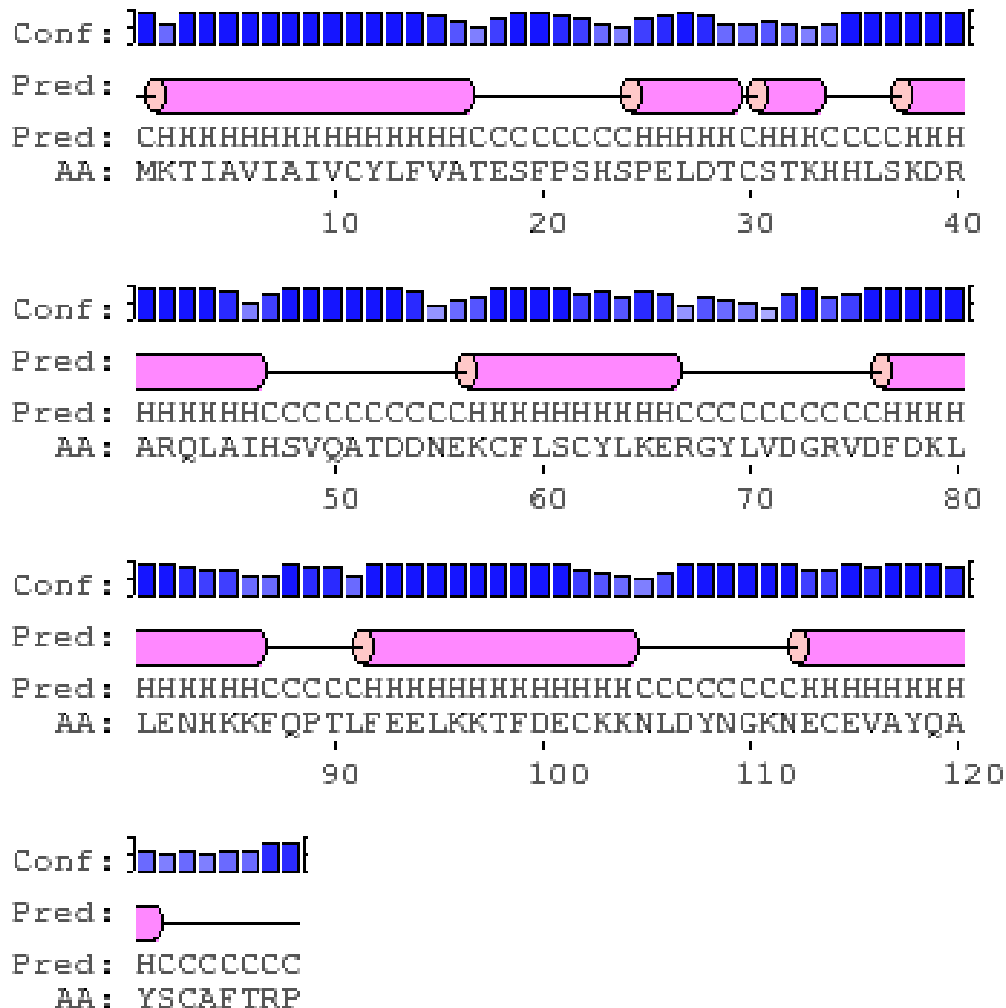


Figura 79 - Predição da estrutura secundária da *RproOBP 11* utilizando o servidor PSIPRED.

Fonte: Adaptada de PSIPRED (94).

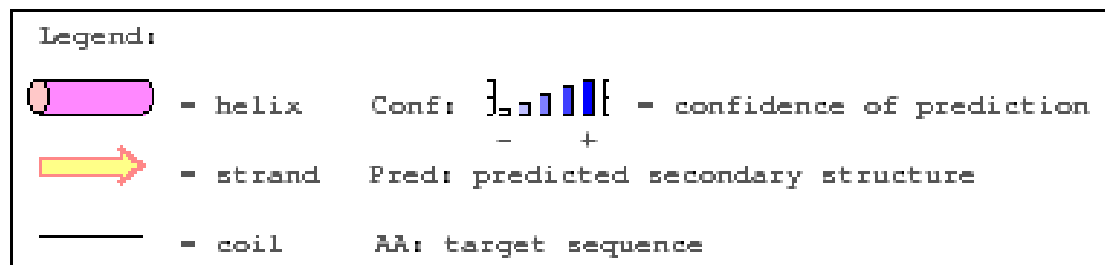
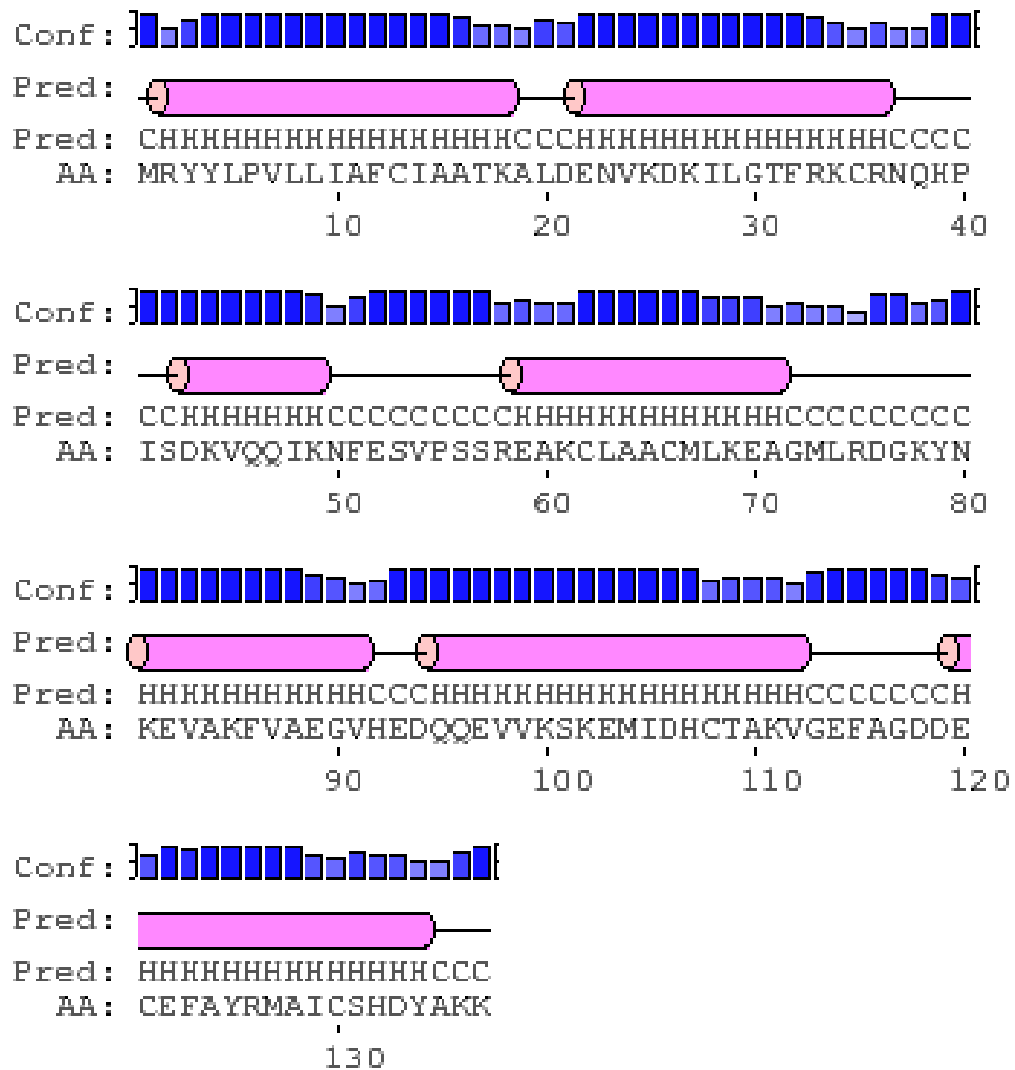


Figura 80 - Predição da estrutura secundária da *RproOBP* 19 utilizando o servidor PSIPRED.
Fonte: Adaptada de PSIPRED (94).