

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*João Ramalho Ortigão-Farias*

Caracterização de gene de quitinase de *Lutzomyia longipalpis*:  
descrição de processamento alternativo e busca por seqüência  
promotora

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Ciências – Área de concentração: Biologia  
Celular e Molecular.

**Orientadora:** Prof. Dra. Yara Maria Traub-Csekö

**RIO DE JANEIRO**

2009

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

O775

Ortigão-Farias, João Ramalho.

Caracterização de gene de quitinase de *Lutzomyia longipalpis* :  
descrição de processamento alternativo e busca por seqüência  
promotora / João Ramalho Ortigão-Farias. – Rio de Janeiro, 2009.

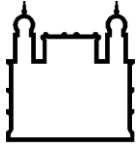
xviii, 103 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular, 2009.

Bibliografia: f. 92-103

1. *Lutzomyia longipalpis*. 2. Quitinase. 3. Promotor. 4. Processamento  
alternativo. I. Título.

CDD 616 027



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***JOÃO RAMALHO ORTIGÃO-FARIAS***

CARACTERIZAÇÃO DE GENE DE QUITINASE DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS*:  
DESCRIÇÃO DE PROCESSAMENTO ALTERNATIVO E BUSCA POR SEQUÊNCIA  
PROMOTORA

**ORIENTADORA: Prof. Dra. Yara Maria Traub-Csekö**

**Aprovada em: 18/11/2009**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Fernando Ariel Genta - Presidente**  
**Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo**  
**Prof. Dr. Pedro Lagerblad Oliveira**  
**Prof. Dra. Leila de Mendonça Lima**  
**Prof. Dra. Rafaela Vieira Bruno - Revisora**

Rio de Janeiro, 18 de novembro de 2009

Dedico esta dissertação aos meus pais Ana e David, ao meu irmão Francisco e ao mestre Nitiren Daishonin (1222-1282).

## Coisas do Amor

Cheguei como um posseiro  
Grilando sentimentos.  
Só que sendo verdadeiro  
Não tive em pensamentos.  
Estava perdido em nevoeiro.

Contar fatos passados  
Permite-nos revelar  
A realidade distorcida.  
Deixando o medo pros lados  
Abro o meu particular  
Trazendo a realidade não conhecida.

De guerreiro confiante  
Fui peito aberto a lanças.  
Com o desconhecido adiante  
Entrei na melhor das danças.  
Tentei ser comandante  
Mas caiu-me ser raso soldado  
E no baile o par guiado.

Talvez no uso capião  
Eu é que fui tomado!

João Farias

Dedico este poema ao amor pela ciência e à sedução que os mistérios do desconhecido exercem sobre o ser humano. Quando contamos uma história de hipóteses que deram certo, deixamos de expor a versão daquelas que ficaram pelo caminho. Através do surgimento de idéias que vêm ao acaso, aparecem novas hipóteses que são submetidas a uma seleção naturalmente experimental. Aquelas que se adaptam melhor aos modelos vigentes perpetuam-se até que o universo do saber ao seu redor se transforme.

O bom mesmo é trabalhar com o que gostamos num jogo de sedução em que o dominar e ser dominado é separado por uma linha tênue chamada razão. De certo, uma coisa eu aprendi: “a idéia mais perigosa é aquela que gostamos mais”.

“Não faz mal que seja pouco,  
O que importa é que o avanço de hoje  
Seja maior que o de ontem.  
Que nossos passos de amanhã  
Sejam mais largos que os de hoje.”

Daisaku Ikeda

## Agradecimentos

Guardarei por toda a vida um profundo débito de gratidão à orientadora e amiga Yara Maria. Uma mulher de garra, de ideais feministas e de extrema dedicação ao seu trabalho. Aqueles que já passaram pelo seu laboratório sabem que a ciência feita ali também tem como um dos principais objetivos a formação de pesquisadores. Através do diálogo democrático de uma excelente educadora, nos conduz pelo tortuoso caminho do erro e acerto, inerente à própria pesquisa. Completamos a poucos meses uma década de relação de mestre e discípulo e é com muito orgulho que concluo mais uma etapa da minha vida guiado por esta mãe no universo do saber.

Agradeço de coração ao amigo e companheiro Antônio Jorge Tempone pelo apoio e orientação que mudaram significativamente o desenvolver da dissertação. Possuidor de grande conhecimento e experiência de vida, pode me dar conselhos tanto sobre os assuntos do laboratório como sobre os assuntos de bar durante as poucas e marcantes saídas de final do dia.

As estudantes Tatiana e Ana Carolina foram grandes companheiras ajudando em todos os aspectos do trabalho desde a parte de preparo de materiais até a interpretação final dos dados. Estiveram o tempo todo ao meu lado, apoiando-me incondicionalmente e sempre dispostas a avançar cada vez mais. Para elas, o tempo no laboratório era visto como uma oportunidade de aprender mais e mais. A vocês duas, o meu muito obrigado.

Aos companheiros da bioinformática Diogo, Rafael e Kary que diversas vezes pararam o que estavam fazendo para me explicar tudo o que eu perguntava, e tornava a perguntar, e perguntava de novo... Sem dúvida, este trabalho só foi possível por causa da ajuda e carinho de vocês. Serei sempre grato.

Aos companheiros André, Ana Cristina, Erich e Igor que sempre estiveram por perto fornecendo preciosas informações que contribuíam notavelmente para o avanço da pesquisa, obrigado pelo apoio.

Agradeço também às companheiras Adriana e Juliana que cuidaram habilidosamente dos insetos e células em cultura possibilitando o avanço de todos os projetos do laboratório.

Aos pesquisadores do IOC Alexandre Peixoto e Alberto Dávila que de forma direta e indireta contribuíram com a interpretação dos dados obtidos, muito obrigado.

Ao pesquisador e estimado amigo Fernando Genta que com cinco conversas rápidas ao longo de 2 anos me fez olhar os mesmos dados com uma perspectiva bastante diferente, muito obrigado. Seu jeito simples de tornar o complexo tão claro e evidente faz com que tenhamos uma visão diferenciada no mundo da enzimologia.

À pesquisadora da UFRJ Elvira Saraiva por ter gentilmente cedido células embrionárias que passaram a ser cultivadas no laboratório, agradeço imensamente a imprescindível ajuda.

Ao pesquisador da UFMG Nelder Gontijo pelo breve e significativo dialogo no ano de 2006 quando voltávamos de barco de um encontro do grupo Arthromint realizado na Ilha Grande, muito obrigado. A partir dali surgiu o espírito de procura que culminou com a descoberta do processamento alternativo do gene de quitinase.

Aos demais companheiros de laboratório que de uma forma ou de outra ajudaram muito na realização deste trabalho. Dentre aqueles que já saíram, voltaram e acabaram de chegar posso citar: Silvana, Joana, Renata, João Paulo, Graziela, Chris, Luanda, Sebastião, Luana, Patrícia Temporal, Anissa, Letícia, Juliano, Diamar, Conceição, Marcel Ramirez, Amanda, Vicente, Anderson, Patrícia Fampa, Aline, Gustavo, Karine, Isadora, Marcel Marin, Monique, Marina, Tassy, Rodrigo. Muitos outros não citados, mas não menos importantes, também contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal. Muito, muito, muito obrigado a todos vocês.

A todos os meus amigos que estiveram presentes durante estes duros anos de muitos estudo: Marcelo (eterno Doca), Júlio, Zé, João Paulo, Tiago, Gabriel, Maria Rita, Ema, André Pedro, Evandro, Edson, Monique, Su, Claudinho, Earl, Rodrigão, Wudson, Kly, Erick, Ed, Roberta, Leonardo; muito obrigado. Os livros e artigos podem parecer me roubar do mundo, mas saibam que vocês moram no meu coração. Aonde eu vá ou esteja, carrego um pouco de vocês dentro de mim. Obrigado pelo apoio e tenham em mente que contarei com vocês por toda a vida.

Três grupos de trabalho foram de suma importância nessa trajetória: o pessoal da coordenação de ensino, do laboratório de biologia molecular de insetos e do laboratório de bioquímica de proteínas. A eles, o meu muito obrigado.

À pesquisadora Rafaela Bruno pela prontidão, dedicação e competência em revisar este trabalho. Sua ajuda está marcada no meu aprendizado.

Ao meu tio Marcelo por sempre, direta ou indiretamente, impulsionar o meu crescimento e desenvolvimento interior.

Aos meus avós por terem me ajudado muito ao longo de toda a vida, obrigado de coração.

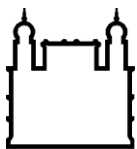
À tia Celeste e ao tio José Honório (*in memoriam*) pelo exemplo que foram e sempre serão, muito obrigado.

A minha tia Elisa pelas diversas conversas literárias e mais, mais, mais, meu muito obrigado!

À Lílian Fernanda por todo o apoio e companheirismo nos últimos meses antes da defesa. Não sei como teria sido chegar ao final sem a sua ajuda.

Aos meus pais e irmão que sempre me deram todo apoio, suporte e carinho para que eu tivesse forças para lutar pelos meus ideais.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO DE GENE DE QUITINASE DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS*:  
DESCRIÇÃO DE PROCESSAMENTO ALTERNATIVO E BUSCA POR SEQÜÊNCIA  
PROMOTORA

### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

João Ramalho Ortigão-Farias

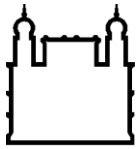
### RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* transmitidos pela picada de flebotomíneos infectados. Os atuais métodos de combate a estas moléstias têm se mostrado ineficazes e maiores conhecimentos sobre a interação *Leishmania*-flebotomíneos são necessários para o desenvolvimento de novas formas de controle. Com o emprego da técnica de amostragem diferencial por RT-PCR (DDRT-PCR), foi encontrado anteriormente em nosso laboratório um cDNA codificante para uma quitinase intestino-específica de *Lutzomyia longipalpis*, nomeada LIChit1A. Foi visto que este produto do gene LIChit1 possui altos níveis de transcrição em fêmeas adultas 3 dias após a alimentação sanguínea, indicando um possível papel na degradação da matriz peritrófica (MP).

Neste trabalho, um fragmento do LIChit1A foi usado para sondar uma biblioteca genômica de *L. longipalpis*, possibilitando o isolamento de um clone contendo o gene codificador desta enzima, que recebeu o nome LIChit1G. A amplificação por PCR e seqüenciamento deste gene revelaram a presença de 4 introns que interrompem a seqüência codificante para a LIChit1A. Foi visto por RT-PCR que o gene LIChit1 também está ativo em larvas, transcrevendo mais duas novas formas de *splicing*, nomeadas LIChit1B e LIChit1C. Estes dois novos transcritos possuem códons de parada, introduzidos a partir do quarto íntron, que interrompem a tradução do domínio de ligação à quitina codificado pelo último éxon. As possíveis novas enzimas codificadas devem atuar na digestão de alimentos ricos em quitina de maneira similar ao proposto para outras quitinases de inseto sem este domínio funcional.

A região flanqueadora 5' (RF5') do clone genômico também foi amplificada por PCR e seqüenciada, evidenciando um possível promotor mínimo. Curiosamente, um gene ortólogo de *Phlebotomus papatasi* contém o começo da seqüência UTR 5' idêntica ao começo do RNAm da quitinase de *L. longipalpis*. Isso pode ser um indício de um possível sistema promotor conservado em flebotomíneos e com possível atuação na regulação da espessura da MP. Através da técnica de PCR invertido foi amplificada e seqüenciada uma região a montante do gene, não presente no LIChit1G. Análises de bioinformática indicaram a presença de um possível envolvimento de ecdisona no controle deste promotor.

Através da anotação de ESTs codificantes para a seqüência completa ou parcial de proteínas similares a quitinases de *L. longipalpis* e *P. papatasi* foi possível identificar possíveis ortólogos de glicosídeo-hidrolases da família 18. As seqüências primárias correspondentes ao domínio catalítico encontrado nesta família foram comparadas por filogenia a seqüências já publicadas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO DE GENE DE QUITINASE DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS*:  
DESCRIÇÃO DE PROCESSAMENTO ALTERNATIVO E BUSCA POR SEQUÊNCIA  
PROMOTORA

### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

João Ramalho Ortigão-Farias

#### ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by *Leishmania* protozoa transmitted by the bite of infected sand flies. Current methods used to combat this illness have been shown to be inefficient, and better knowledge of aspects related to *Leishmania*-sand fly interaction are necessary for the development of new controlling methods. A cDNA codifying for a midgut-specific chitinase of *Lutzomyia longipalpis*, nominated LIChit1A, was previously identified in our laboratory using differential display RT-PCR (DDRT-PCR). It was found that the LIChit1 gene had high transcription levels 3 days after blood meal, which indicated a putative role on peritrophic matrix (PM) degradation.

A LIChit1A fragment, was used for screening a *L. longipalpis* genomic library, which led to the isolation of a clone called LIChit1G, containing the chitinase gene. The PCR amplification and sequencing of this gene revealed 4 introns which interrupt the LIChit1A cDNA sequence. RT-PCR showed that the LIChit1 gene is also expressed in larvae where it transcribed two new forms of splicing, called LIChit1B and LIChit1C. These two transcripts possess early stop codons in the last intron, interrupting the translation of the chitin binding domain (CBD) codified by the last exon. These putative enzymes possibly act in the digestion of chitin rich food, as previously observed for others insect chitinases without this functional domain.

The flanking region 5' (FR5') present in the genomic clone was also sequenced, evidencing a possible minimum promoter. Curiously, the initial part of this 5' UTR sequence was identical to the initial part of a *Phlebotomus papatasi* orthologous gene. This may be an indication of a promoter system conserved among sandflies, with possible performance in the control of PM thickness, which seems to occur exactly at the moment and place of *Leishmania* attachment to the epithelium of the midgut. The use of inverted PCR allowed the sequencing of a region upstream the chitinase gene, which is not present in the genomic clone. Bioinformatics analyzes suggested the participation of ecdysone on the expression control of this gene.

The annotation for ESTs codifying complete and partial chitinase like proteins from *L. longipalpis* and *P. papatasi* provided the identification of 4 new genes from the first specie and 5 new genes from the later. These genes codify for protein conserved domains with high similarity to the catalytic domain of family 18 glycosylhydrolases. Phylogenetic trees were also constructed.

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>Símbolos</b>	<b>Significado</b>
°C	graus Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
M	molar

<b>Abreviaturas</b>	<b>Significado</b>
BLAST	Ferramenta básica de procura por alinhamento local ( <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> )
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CBD	domínio de ligação à quitina ( <i>chitin binding domain</i> ).
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO <sub>600</sub>	densidade ótica a 600 nanômetros
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	desoxinucleotídeos trifosfato
DEPC	dietil pirocarbonato
EDTA	ácido etileno diaminotetracético
EST	etiqueta de seqüências expressas ( <i>expressed sequence tag</i> )
FCR	força centrífuga relativa
g	grama(s)
h	hora (s)
HMM	modelos escondidos de Markov ( <i>hidden Markov models</i> )
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
LB	Meio Luria-Bertani
mA	miliampere (s)
mg	miligrama
min	minuto (s)
mJ	milijoule (s)
mL	mililitro
mM	milimolar
MG	Minas Gerais

MGM	mosquitos geneticamente modificados
MP	matriz ou membrana peritrófica
ng	nanograma(s)
ORF	quadro aberto de leitura ( <i>open reading frame</i> )
p	peso
pb	par (es) de base
PCR	reação em cadeia da polimerase ( <i>polimerase chain reaction</i> )
PEG	polietilenoglicol
Pfam	HMM de perfil de família de proteína
RNA	ácido ribonucleico
RNases	ribonucleases
RPM	rotações por minuto
RT-PCR	PCR por transcriptase reversa
seg	segundo(s)
SDS	sódio dodecil sulfato
SSC	solução tampão salina de citrato de sódio ( <i>saline sodium citrate buffer solution</i> )
U	unidade enzimática
UFP	unidade formadora de placa

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Legenda</b>	<b>Página</b>
Figura 1.1	Distribuição das mortes por doenças transmitidas por vetores	1
Figura 1.2	Escultura em cerâmica de povo pré-colombiano	6
Figura 1.3	Formas de leishmaniose	6
Figura 1.4	Distribuição da leishmaniose visceral pelo mundo	7
Figura 1.5	Manifestações clínicas da leishmaniose dérmica-pós-calazar.	7
Figura 1.6	Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	9
Figura 1.7	Esquema mostrando o desenvolvimento da <i>Leishmania</i> dentro do tubo digestivo de flebotomíneos	10
Figura 1.8	Imagens de flebotomíneos dos gêneros <i>Phlebotomus</i> e <i>Lutzomyia</i>	12
Tabela 1.1	Vetores comprovados ou suspeitos de transmitirem parasitos humanos do gênero <i>Leishmania</i>	13
Figura 1.9	Comparação do tamanho de um mosquito <i>Aedes aegypti</i> com um flebotomíneo <i>Lutzomyia longipalpis</i>	15
Figura 1.10	Estágios do ciclo de vida de <i>L. longipalpis</i>	15
Figura 1.11	Esquema mostrando a formação da MP1 e MP2	19
Figura 1.12	Esquema mostrando estiramento das células epiteliais e secreção da MP1	20
Figura 1.13	Estrutura do domínio de ligação à quitina (CBD)	23
Figura 1.14	Arquitetura de domínio de possíveis quitinases e proteínas de <i>T. castaneum</i> similares a quitinase	24
Figura 1.15	RT-PCR mostrando perfil de transcrição dos genes LIChit1 e PpChit1	26
Figura 3.1	Esquema mostrando a posição aproximada de anelamento dos oligonucleotídeos sobre a seqüência do clone genômico	42
Tabela 3.1	Oligonucleotídeos senso	43
Tabela 3.2	Oligonucleotídeos anti-senso	43
Tabela 3.3	Oligonucleotídeos senso e anti-senso para Histona	43
Figura 3.2	Mapa do plasmídeo pGEM®-T Easy	44
Figura 3.3	Esquema mostrando estratégia de PCR invertida	49
Tabela 3.4	Oligonucleotídeos desenhados com base nas seqüências de EST de <i>L. longipalpis</i> codificantes para proteínas similares a quitinases	51
Figura 4.1	Auto-radiografia do experimento de hibridação	52
Figura 4.2	Amplificação por PCR do gene de quitinase a partir do clone genômico LIChit1G	53
Figura 4.3	Esquema mostrando os fragmentos amplificados por PCR para subclonar em vetor plasmidial o gene de quitinase LIChit1 e sua região flanqueadora 5'	54
Figura 4.4	Gene de quitinase LIChit1 seqüenciado a partir do clone genômico	55, 56
Figura 4.5	Esquema mostrando o resultado das duas RT-PCR utilizadas para checar atividade dos promotores	58
Figura 4.6	Seqüência da região flanqueadora 5' do gene LIChit1	59

Figura 4.7	Esquema mostrando seqüência imediatamente a montante do promotor 3 conservada em gene ortólogo de <i>P. papatasi</i> (Ppcht1)	60
Figura 4.8	RT-PCR a partir de RNA extraído de formas imaturas do inseto: indício de processamento alternativo da região 3' do gene LlChit1	61
Figura 4.9	RT-PCR para amplificar toda a extensão dos produtos do gene LlChit1 presentes em larvas L4	63
Figura 4.10	Amplificação por PCR do extremo 5' das formas de <i>splicing</i> clonadas	63
Figura 4.11	Amplificação por PCR do extremo 3' das formas de <i>splicing</i> clonadas	64
Tabela 4.1	Clones das formas de <i>splicing</i> do gene Llchit1	64
Figura 4.12	Seqüência da forma de <i>splicing</i> LlChit1A	65
Figura 4.13	Seqüência da forma de <i>splicing</i> Llchit1B	66
Figura 4.14	Seqüência da forma de <i>splicing</i> LlChit1C	67
Figura 4.15	Alinhamento da porção C-terminal de diversas quitinases de inseto. No topo são apontados os últimos aminoácidos conservados do domínio catalítico	68
Figura 4.16	RT-PCR a partir de RNA extraído de larvas estádios L4, fêmeas adultas 72 horas após a alimentação sanguínea e células LL5	69
Figura 4.17	Comparação dos padrões eletroforéticos obtidos por <i>Southern blot</i> feito com DNA genômico de células LL5 e com DNA do clone Llchit1G	71
Figura 4.18	PCR para amplificar a região que é alternativamente processada a partir de DNA genômico de células LL5 e do clone genômico	71
Tabela 4.2	ESTs de <i>L. longipalpis</i> codificantes para possíveis quitinases e proteínas similares a quitinases	74
Tabela 4.3	ESTs de <i>P. papatasi</i> codificantes para possíveis quitinases e proteínas similares a quitinases	74
Figura 4.19	Análise filogenética usando seqüências dos domínios catalíticos de possíveis quitinases e proteínas similares a quitinases	75
Figura 4.20	Ramificação da correspondente aos grupos I, II e III	76
Figura 4.21	Ramificação correspondente ao grupo IV	78
Figura 4.22	Ramificação correspondente ao grupo V	79
Figura 4.23	Amplificação por PCR de fragmentos gênicos possivelmente codificantes para quitinases de <i>L. longipalpis</i>	79
Figura 5.1	Esquema mostrando o padrão de <i>splicing</i> comum na região 5' e os três padrões diferentes na porção 3' do gene LlChit1	83
Figura 5.2	Esquema mostrando as três formas de RNA codificadas pelo gene de quitinase	83
Figura 5.3	Arquitetura de domínios de possíveis quitinases	83

# ÍNDICE

I- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Doenças negligenciadas e transmitidas por vetores.....	1
1.2- Controle alternativo para doenças transmitidas por vetores .....	2
1.2.1- Vacinas contra artrópodes para bloqueio de transmissão.....	2
1.2.2 - Mosquitos transgênicos como uma abordagem no controle de doenças transmitidas por vetores.....	3
1.3- Leishmaniose .....	4
1.4- <i>Leishmania</i> .....	8
1.5- Flebotomíneos.....	11
1.5.1- Importância médico veterinária.....	11
1.5.2- Biologia do vetor.....	14
1.6- Compartimentalização da digestão em insetos .....	16
1.7- Metabolismo de quitina em insetos .....	17
1.7.1- Quitina.....	17
1.7.2- Composição e função da matriz peritrófica.....	17
1.7.3- Matriz peritrófica do tipo 1 (MP1).....	19
1.7.4- Matriz peritrófica do tipo 2 (MP2).....	20
1.8- Fisiologia do tubo digestivo de <i>L. longipalpis</i> .....	21
1.8.1- Matriz peritrófica.....	21
1.8.2- Controle do pH do tubo digestivo .....	21
1.9- Quitinases.....	22
1.9.1- Quitinases de insetos .....	22
1.9.2- Quitinases de flebotomíneos .....	25
II- OBJETIVOS.....	28
2.1- Objetivo geral.....	28
2.2- Objetivos específicos .....	28
III- MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1- Tampões e soluções.....	29
3.1.1- TE 1X (Tris - EDTA).....	29
3.1.2- TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) .....	29
3.1.3- PBS (Phosphate Buffered Saline) .....	29
3.1.4- Solução SM .....	29
3.1.5- Reagentes adiconados as placas de transformação .....	30
3.1.7- Ampicilina.....	30
3.1.8- Marcadores de peso molecular.....	30
a) Lambda-Hind III (New England BioLabs, EUA) .....	30
b) øX174 RF/Hae III (New England BioLabs) .....	30
c) 100 pb DNA Ladder (Life Technology®).....	30
d) GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas) .....	31
3.1.9- STET (Solução TRIS-NaCl-EDTA-Triton® X-100).....	31
3.1.10- Lisozima .....	31
3.1.11- Solução de desnaturação de DNA.....	31
3.1.12- Solução de neutralização de membranas.....	31
3.1.13- SSC 20X.....	32
3.1.14- Tampão de diálise.....	32
3.2- Meios de cultura .....	32
3.2.1- Meio Luria-Bertani (LB).....	32
3.2.2- Meio LB-ágar e LB-ágar semi-sólido .....	32
3.2.3- Meio NZY .....	33
3.2.4- Meio L-15 suplementado .....	33

3.2.5- Meio Triptose fosfato .....	33
3.3- Organismos utilizados .....	33
3.3.1- Insetos .....	33
3.3.2- Bactérias .....	34
3.3.4- Células em cultura de <i>Lutzomyia longipalpis</i> (LL5) .....	34
3.3.3- Bacteriófagos .....	34
3.4- Alimentação sangüínea de insetos .....	34
3.5- Extração de Ácidos nucléicos de <i>L. longipalpis</i> .....	35
3.5.1- Extração de RNA .....	35
3.5.1.1- Preparo de material livre de RNases .....	35
3.5.1.2- Extração de RNA total .....	35
3.5.2- Extração de DNA genômico de células LL5 .....	36
3.6- Sondagem molecular de biblioteca genômica .....	36
3.6.1- Plaqueamento de população de bacteriófagos .....	36
3.6.2- Transferência e fixação de DNA recombinante de fagos à membrana de nitrocelulose .....	36
3.6.3- Hibridações .....	37
3.6.4- Isolamento de clones positivos .....	37
3.7- Amplificação da população de bacteriófagos .....	37
3.8- Preparação de DNA de bacteriófago em larga escala .....	38
3.8.1- Infecção com alta taxa de rendimento .....	38
3.8.2- Purificação de bacteriófagos por Cloreto de Césio .....	38
3.8.3- Extração de DNA de bacteriófago .....	39
3.9- PCR a partir do clone genômico de quitinase .....	39
3.9.1- PCR para amplificação da região entre os extremos codificantes do gene de quitinase LIChit1 .....	39
3.9.2- PCR para amplificação da região flanqueadora 5' do gene LIChit1 a partir do clone genômico .....	40
3.9.3- PCR para amplificação das regiões internas do gene de LIChit1 e subcloná-lo fragmentado em vetor plasmidial .....	40
3.10- PCR por transcriptase reversa (RT-PCR) .....	40
3.10.1- Síntese de cDNA .....	40
3.10.2- RT-PCR para amplificação dos produtos do gene LIChit1 .....	41
3.10.3- RT-PCR para testar atividade promotora .....	41
3.11- PCR a partir de cDNA de formas de splicing clonadas .....	41
3.12- Oligonucleotídeos .....	42
3.13- Purificação de produtos de PCR para posterior clonagem em vetor plasmidial ou seqüenciamento direto .....	44
3.14- Ligação de produtos de PCR a vetor plasmidial .....	44
3.15- Transformação de células competentes .....	45
3.16- Preparação de DNA plasmidial por fervura .....	45
3.17- Digestão com enzimas de restrição para confirmar a ligação dos produtos de PCR ao vetor plasmidial .....	45
3.18- Eletroforese em gel de agarose .....	45
3.19- Seqüenciamentos .....	46
3.20- Análise de seqüências .....	46
3.20.1- Análises preliminares dos resultados do seqüenciamento .....	46
3.20.2- Análises de seqüências do gene LIChit1: identificação das regiões de <i>splicing</i> e possíveis seqüências regulatórias do promotor .....	47
3.20.3- Análises das seqüências de aminoácido .....	47
3.21- Southern blot e PCR com DNA do clone genômico para confirmar número de cópias do gene LIChit1 .....	47



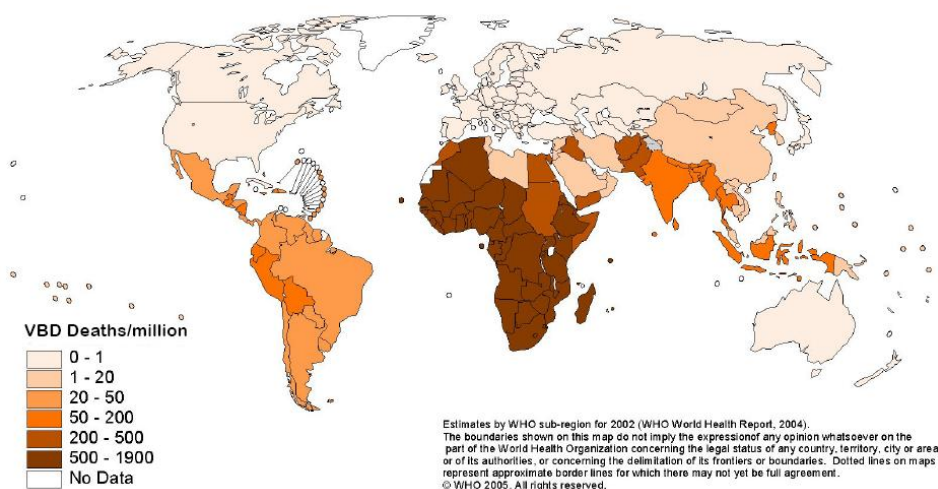
3.22- PCR invertida .....	48
3.23- Busca por seqüências de genes ortólogos de quitinase em banco de dados de EST de L. longipalpis e P. papatasi.....	50
3.24- Filogenia de genes de quitinase.....	50
3.25- PCR a partir de DNA genômico de células LL5 para amplificar seqüências codificantes para possíveis quitinases e proteínas similares a quitinases.....	51
IV- RESULTADOS.....	52
4.1- Isolamento e seqüenciamento de um clone genômico contendo o gene codificante para quitinase.....	52
4.2- Amplificação por PCR e seqüenciamento do gene contido no clone genômico Llchit1G .....	53
4.3- Possíveis seqüências reguladoras encontradas a montante do gene LlChit1 .....	57
4.4- RT-PCR a partir de RNA extraído de formas imaturas do inseto: indício da ocorrência de splicing alternativo a partir do gene LlChit1 .....	60
4.5- Clonagem e seqüenciamento das formas de splicing do gene LlChit1 .....	61
4.6- RT-PCR a partir de RNA extraído de larvas, fêmeas adultas e células LL5 .....	69
4.7- Análise do número de cópias do gene LlChit1 .....	70
4.8- Busca por seqüências de genes ortólogos de quitinase em banco de dados de EST de L. longipalpis e P. papatasi .....	72
4.9- Estudos filogenéticos de possíveis quitinases e proteínas similares a quitinases de L. longipalpis e P. papatasi .....	73
4.10- Amplificação por PCR de fragmentos gênicos possivelmente codificantes para quitinases e proteínas similares a quitinases de L. longipalpis.....	79
V- DISCUSSÃO.....	80
5.1- Promotor do gene de quitinase LlChit1.....	80
5.2- Possível mecanismo de regulação do gene LlChit1 .....	80
5.3- Processamento alternativo do gene de quitinase LlChit1.....	81
5.4- Possível função das quitinases digestivas com ou sem sítio de ligação à quitina.....	84
5.5- Possível mecanismo de regulação de atividade quitinolítica em L. longipalpis .....	85
5.6- Evolução dos genes codificantes para quitinases com ou sem sítio de ligação à quitina .....	86
5.7- Análise do número de cópias do gene de quitinase LlChit1 .....	86
5.8- Análise filogenética de possíveis genes codificantes para quitinases e proteínas similares a quitinases de L. longipalpis e P. papatasi.....	87
VI- CONCLUSÃO .....	89
VII- ANEXO I.....	90
VIII- REFERÊNCIAS .....	92

# I- INTRODUÇÃO

## 1.1- Doenças negligenciadas e transmitidas por vetores

O grupo de doenças negligenciadas é constituído pelas enfermidades infecciosas tropicais, incluindo infecções por protozoários, helmintos e doenças tais como a lepra e o tracoma. Todas ocorrem predominantemente nas populações de regiões menos desenvolvidas (áreas remotas, áreas rurais, favelas urbanas ou zonas de conflito). As doenças negligenciadas causadas por protozoários são transmitidas por insetos vetores e incluem a malária, a leishmaniose, a doença de Chagas e a tripanossomíase africana (Hotez *et al.*, 2006).

As doenças negligenciadas são fardos de populações esquecidas pelo modelo de desenvolvimento econômico excludente - doenças que afligem os mais pobres dos pobres - e geralmente não afetam países desenvolvidos. Desta forma, estas moléstias acabam sendo ignoradas pela maior parte das ciências médicas e a falta de investimentos certamente contribui para sua propagação (Beyrer *et al.*, 2007). Devido à baixa voz política das pessoas atingidas, estas doenças também assumem uma posição de pequena importância dentro das prioridades de saúde pública. Entretanto, mais de 1 bilhão de pessoas, um sexto da população do planeta, sofre de uma ou mais doenças negligenciadas. A distribuição global das mortes causadas por doenças negligenciadas transmitidas por vetores é mostrada na figura 1.1 (OMS, 2009a).



**Figura 1.1)** Distribuição das mortes por doenças transmitidas por vetores no mundo (OMS, 2009a).

## ***1.2- Controle alternativo para doenças transmitidas por vetores***

A luta contra as doenças transmitidas por insetos compartilha muitos desafios, e o controle integrado de vetores tem sido uma das abordagens mais promissoras. Nos últimos 15 anos duas novas abordagens alternativas têm ganhado destaque no âmbito da pesquisa. Estas são a produção de vacinas contra proteínas que bloqueiem a transmissão da doença e a manipulação genética de insetos vetores tornando-os refratários aos parasitos.

### **1.2.1- Vacinas contra artrópodes para bloqueio de transmissão**

Doenças transmitidas por artrópodes como a leishmaniose e a malária possuem peculiaridades que dificultam a produção de vacinas contra o parasito como, por exemplo, a multiplicidade de formas do protozoário. Nestas doenças, o agente etiológico entra no hospedeiro vertebrado sob uma forma infectiva presente no inseto e se transforma em outra com capacidade de se multiplicar dentro das células do mamífero (Carter *et al.*, 2000). Esses aspectos das doenças transmitidas por vetores estão sendo considerados na busca por uma vacina eficaz que bloqueie o desenvolvimento de mais de uma forma do parasito. Vacinas que geram imunização contra as formas infectivas para o vetor são chamadas de vacinas para bloqueio de transmissão (Carter *et al.*, 2000). No entanto, estão sendo estudadas estratégias que permitam a imunização do hospedeiro vertebrado contra moléculas do inseto que se alimenta em um indivíduo doente. Estas últimas são vacinas contra artrópodes que na última década também passaram a ser chamadas de vacinas para bloqueio de transmissão baseadas no vetor (Kay e Kemp, 1994; Lavazec e Bourgoïn, 2008). Estas vacinas visam bloquear proteínas do vetor que permitem ou facilitam a transmissão da doença ou mesmo impedir os processos fisiológicos envolvidos na alimentação sanguínea necessários para sobrevivência do inseto e/ou agente etiológico após a alimentação sanguínea. Recentemente, a imunização de camundongos através do emprego de uma proteína específica da saliva de *Lutzomyia longipalpis* conferiu a estes animais resistência contra a infecção por *Leishmania infantum chagasi* (Gomes *et al.*, 2008).

Apesar de muitos laboratórios ao redor do mundo terem conseguido demonstrar que moléculas do vetor e do parasito podem ser usadas para construção de vacinas que impedem a passagem do parasito para o vetor e com isso bloqueiam a transmissão de doenças, ainda existe uma grande dúvida a respeito de quem financiaria a produção deste tipo de vacina (Carter *et al.*, 2000).

### 1.2.2 - Mosquitos transgênicos como uma abordagem no controle de doenças transmitidas por vetores

Os grandes investimentos em pesquisas sobre malária têm impulsionado o desenvolvimento de novas abordagens para o controle desta doença, que incluem o desenho racional de novos fármacos melhores e mais baratos, a procura por vacinas comprovadamente eficazes e o desenvolvimento de mosquitos geneticamente modificados (MGM) desenhados para reduzir o tamanho das populações de vetores ou espalhar por populações selvagens genes que confirmam resistência do inseto ao parasito (Ridley, 2002; Todryk e Hill, 2007; Marshall e Taylor, 2009).

Diversos métodos para projetar mosquitos refratários estão sendo estudados e mostram resultados promissores para o controle da malária. O genoma de mosquitos já foi alterado possibilitando a criação de MGM incapazes de transmitir a malária de roedores (Ito *et al.*, 2002). A manipulação genética desses insetos foi resultado de longos anos de pesquisa que possibilitaram inicialmente a identificação dos sítios receptores necessários para a passagem do parasito pelo epitélio do tubo digestivo do vetor. Em seguida foram descobertas pequenas proteínas que podiam saturar esses receptores e bloquear o processo de infecção do inseto. Os próximos passos destes estudos focam a otimização de genes refratários para efetivamente conferirem resistência à malária humana (Marshall e Taylor, 2009).

Para obter sucesso neste tipo de estudo, são fundamentais conhecimentos específicos sobre seqüências reguladoras do genoma que hospedará o gene de resistência. Na tentativa de intervir na infecção do vetor pelo plasmódio foi muito importante conhecer a biologia do inseto algumas horas após a alimentação sanguínea. Neste momento, o plasmódio precisa atravessar a borda epitelial do intestino médio do vetor para continuar seu ciclo de vida. O conhecimento sobre uma seqüência promotora do mosquito que induz a expressão gênica no seu tubo digestivo no primeiro dia após a alimentação sanguínea foi imprescindível para a construção de um inseto refratário.

Estudos de promotores de genes como o da carboxipeptidase A permitiram a expressão heteróloga direcionada para momentos críticos da infecção do vetor por parasitos. A mesma seqüência foi comprovadamente eficaz para a manipulação genética de mais de um gênero de mosquito vetor de doenças humanas, no caso *Aedes* e *Anopheles* (Moreira *et al.*, 2000). Em 2006 a seqüência promotora do gene codificante para a carboxipeptidase A foi utilizada na construção de mosquitos *Aedes aegypti* resistentes ao vírus da dengue, pois as células epiteliais do intestino médio deste mosquito eram capazes de transcrever, após a alimentação com sangue, um RNA de interferência contra uma proteína do capsídeo viral

(Franz *et al.*, 2006). A caracterização, durante a década de 90, de genes diferencialmente expressos após a alimentação sanguínea (Edwards *et al.*, 1997) possibilitou a criação das primeiras linhagens transgênicas com capacidade vetorial reduzida no começo do século 21.

Atualmente, outros mecanismos para conferir refratariedade contra o parasito da malária envolvem o uso de anticorpos que matam o agente etiológico dentro do mosquito e a descoberta de genes importantes para resistência de populações naturais (de Lara Capurro *et al.*, 2000; Riehle *et al.*, 2006). O grande volume de contribuições sobre o sistema imune de insetos tem levado pesquisadores da área a acreditarem que um possível construto de genes capaz de reduzir a competência vetorial de mosquitos transmissores de malária não está distante (Waterhouse *et al.*, 2007). Como a infecção tem um custo para o vetor, os insetos refratários deveriam apresentar vantagem adaptativa sobre os insetos susceptíveis e transmissores do patógeno (Marrelli *et al.*, 2007).

Apesar dos avanços tecnológicos e científicos que possibilitam a produção de mosquitos transgênicos refratários a agentes etiológicos de doenças, os riscos da manipulação genética destes animais precisam ser mais bem estudados (Alphey *et al.*, 2002; Marshall e Taylor, 2009).

### **1.3- *Leishmanioses***

Leishmanioses são doenças transmitidas pela picada de insetos flebotomíneos infectados por protozoários do gênero *Leishmania*. Sua transmissão é dependente da presença de espécies específicas do vetor e ocorre em 88 países de regiões tropicais, subtropicais e temperadas (OMS, 2009b).

Peças cerâmicas de povos pré-colombianos (figura 1.2) indicam a presença da leishmaniose muco-cutânea nas Américas antes do início da colonização européia. Esse indício da existência da doença no Novo Mundo há mais de 500 anos é reforçado por crônicas do século XVI que relatam a presença de lesões deformantes no nariz e boca, parecidas com um dos quadros clínicos produzidos pela doença, em índios sul-americanos. Tal como nos mostra o trabalho de Altamirano-Enciso *et al.* (2003), podemos ver na citação do espanhol Pedro Pizarro o cenário encontrado em 1.533:

*...los que entran en los Andes les da un mal en las narices a manera de Sancto Antón, que no tiene cura, aunque hay algunos remédios para entretenelle, al fin les vuelve y los mata. Esto da a todos los indios que entran, como no sean naturales nascidos y criados en estos Andes, y aún a*

*los que nascen en ellos, les toca a algunos este mal y por esta causa hay tan pocos” (Pizarro, 1917, p. 232).*

O trabalho de Altamirano-Enciso *et al.* (2003) faz uma reflexão interessante ao mencionar que “a ampla gama de nomes populares que a moléstia possui no mundo demonstra a sua profunda história associada a atividades sociais, como por exemplo, a guerra entre Índia e Inglaterra; econômicas, como a exploração da borracha no Brasil; agrícolas, no Peru; e climáticas, como a seca do Nordeste brasileiro, de 1880 e 1883, entre outras”.

A leishmaniose possui quatro síndromes clínicas distintas que dependem da espécie do parasita e da resposta imune do hospedeiro, sendo elas: cutânea, mucocutânea, visceral (também conhecida como calazar) e dérmica-pós-calazar (figura 1.3). A leishmaniose cutânea é caracterizada por lesões na pele que geralmente abrem-se em feridas com bordas elevadas, podendo, em alguns casos, evoluir para a formação de nódulos que não fazem ulcerações. A leishmaniose mucocutânea (também conhecida como tegumentar americana) é caracterizada por lesões nas mucosas oral, nasal, com possível evolução para as mucosas da laringe e faringe. São lesões que evoluem lentamente e podem gerar deformações fisionômicas ao atingirem os demais tecidos que compõem a estrutura da cavidade bucal e nasal. Ao contrário da leishmaniose cutânea, que pode ser causada por uma grande variedade de espécies de parasita, a leishmaniose mucocutânea é ocasionada na maioria das vezes pela *Leishmania braziliensis*. Estas duas formas da doença não acarretam a morte, mas podem levar a quadros clínicos gravíssimos que limitam muito a vida do paciente (Chappuis *et al.*, 2007).

A leishmaniose visceral (LV) é caracterizada por episódios descontínuos de febre, perda acentuada de peso, anemia e hepatoesplenomegalia. Esta forma da doença é 100% fatal e pode levar ao óbito em até 2 anos se não tratada. No leste da África e Índia subcontinental a LV é causada por parasitos do complexo *Leishmania donovani* e na Europa, Norte da África e América Latina pela *Leishmania infantum*. A LV nestes continentes ocorre majoritariamente em 6 países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão (figura 1.4) (Mauricio *et al.*, 2000; Lukes *et al.*, 2007).

A leishmaniose dérmica-pós-calazar (LDPC) é caracterizada por lesões maculares, maculo-papulares ou nodulares com prurido (figura 1.5). A LDPC é uma complicação da LV mais frequentemente observada após o tratamento de pacientes do Sudão, mas também registrada em outros países do leste da África e Índia subcontinental (Zijlstra *et al.*, 2003). A ocorrência deste quadro clínico também já foi observada em pacientes imunosuprimidos de regiões endêmicas de *L. infantum* (Chappuis *et al.*, 2007). As lesões nodulares possuem grande quantidade de parasitos, sendo altamente contagiosas (Addy *et al.*, 1992), e há autores que acreditam que poderiam ser reservatórios entre surtos LV (Chappuis *et al.*, 2007).



**Figura 1.2)** Escultura em cerâmica de povo pré-colombiano que representa uma pessoa com lesões parecidas com as vistas em pacientes com quadros graves de leishmaniose tegumentar americana. Esta imagem foi reproduzida do trabalho de Altamirano-Enciso *et al.* (2003).

Forma  
cutânea



OMS

Forma  
mucocutânea



OMS

Forma  
visceral



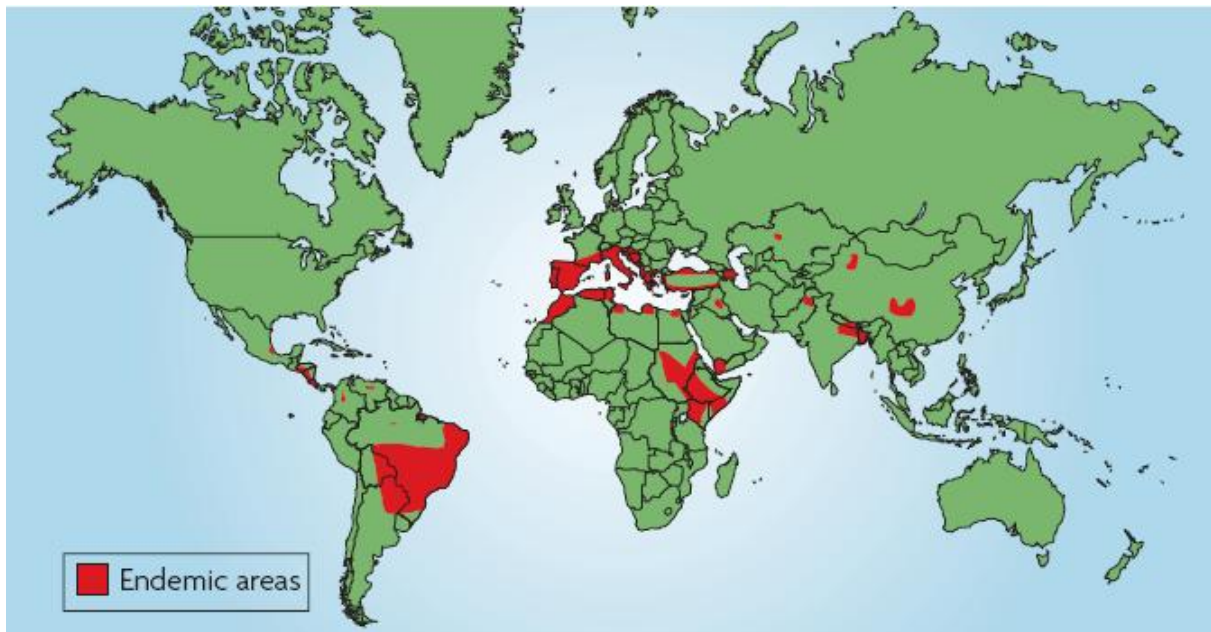
OMS

Forma  
dérmica-pós-  
calazar



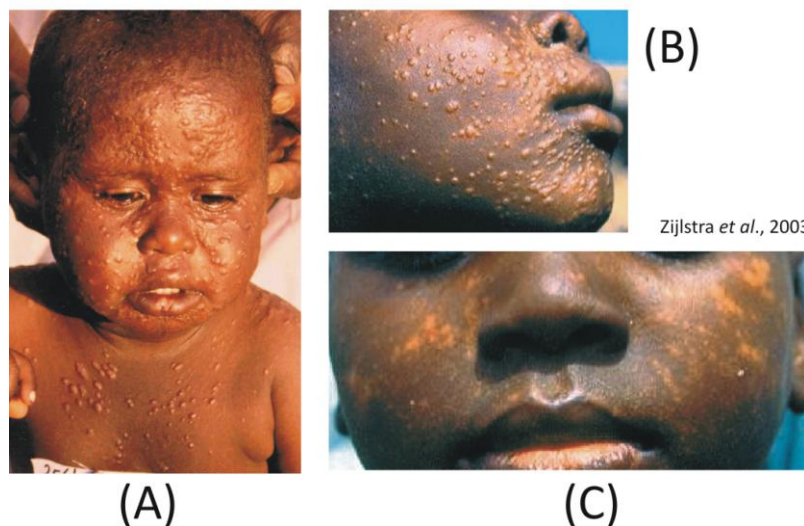
Chappuis *et al.*, 2007

**Figura 1.3)** Formas de leishmaniose. As imagens A, B e C foram reproduzidas do sítio da OMS (2009c) e a imagem D de Chappuis *et al.* (2007).



**Figura 1.4)** Distribuição da leishmaniose visceral pelo mundo (Chappuis *et al.*, 2007).

## Forma dérmica-pós-calazar



**Figura 1.5)** Manifestações clínicas da leishmaniose dérmica-pós-calazar: (A) lesões nodulares; (B) lesões papulares; (C) lesões maculares. Adaptado de Zijlstra *et al.* (2003).



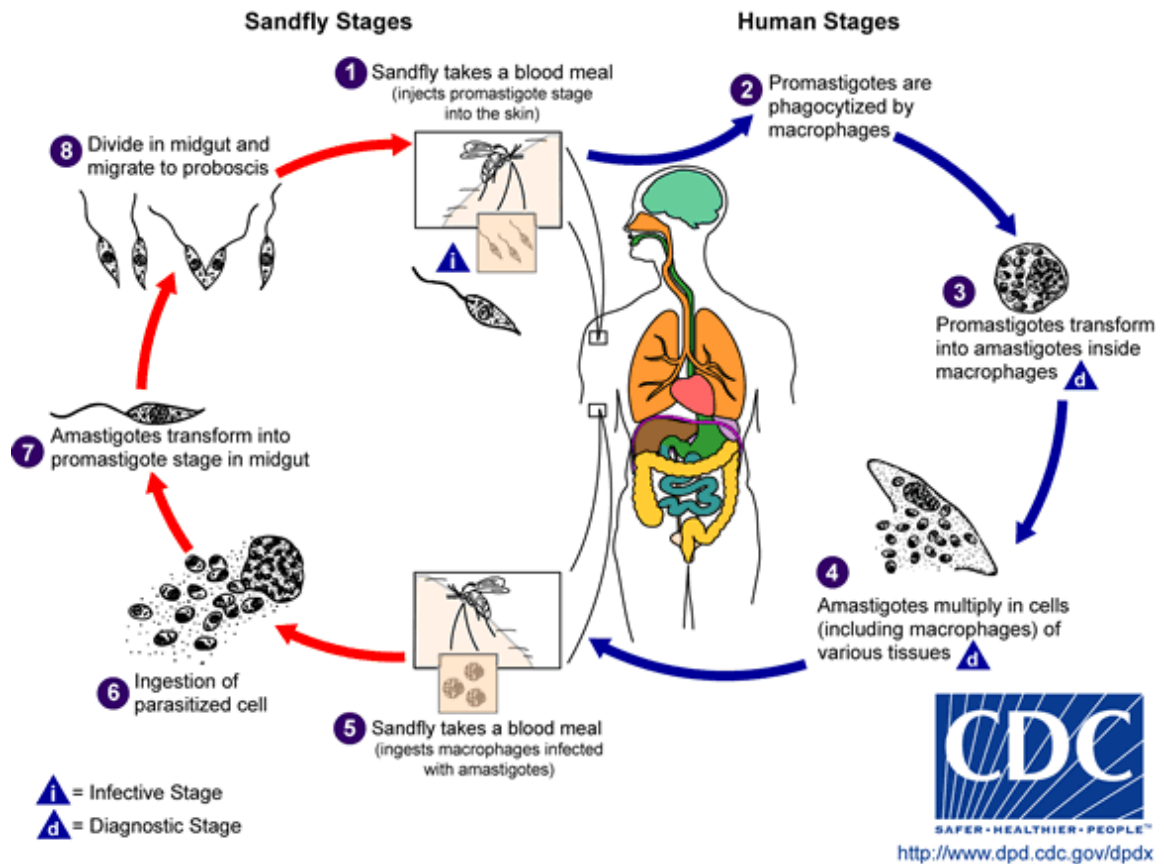
#### **1.4- Leishmanias**

Existem aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* patogênicas para humanos (Pearson e Sousa, 1996) que na maioria das vezes são hospedeiros acidentais. Estes parasitos heteroxênicos possuem duas fases no ciclo de vida, uma no hospedeiro vertebrado, que pode ser humanos, cachorros, cavalos, marsupiais, roedores, preguiças, e outra fase no hospedeiro invertebrado, o flebotomíneo (figura 1.6).

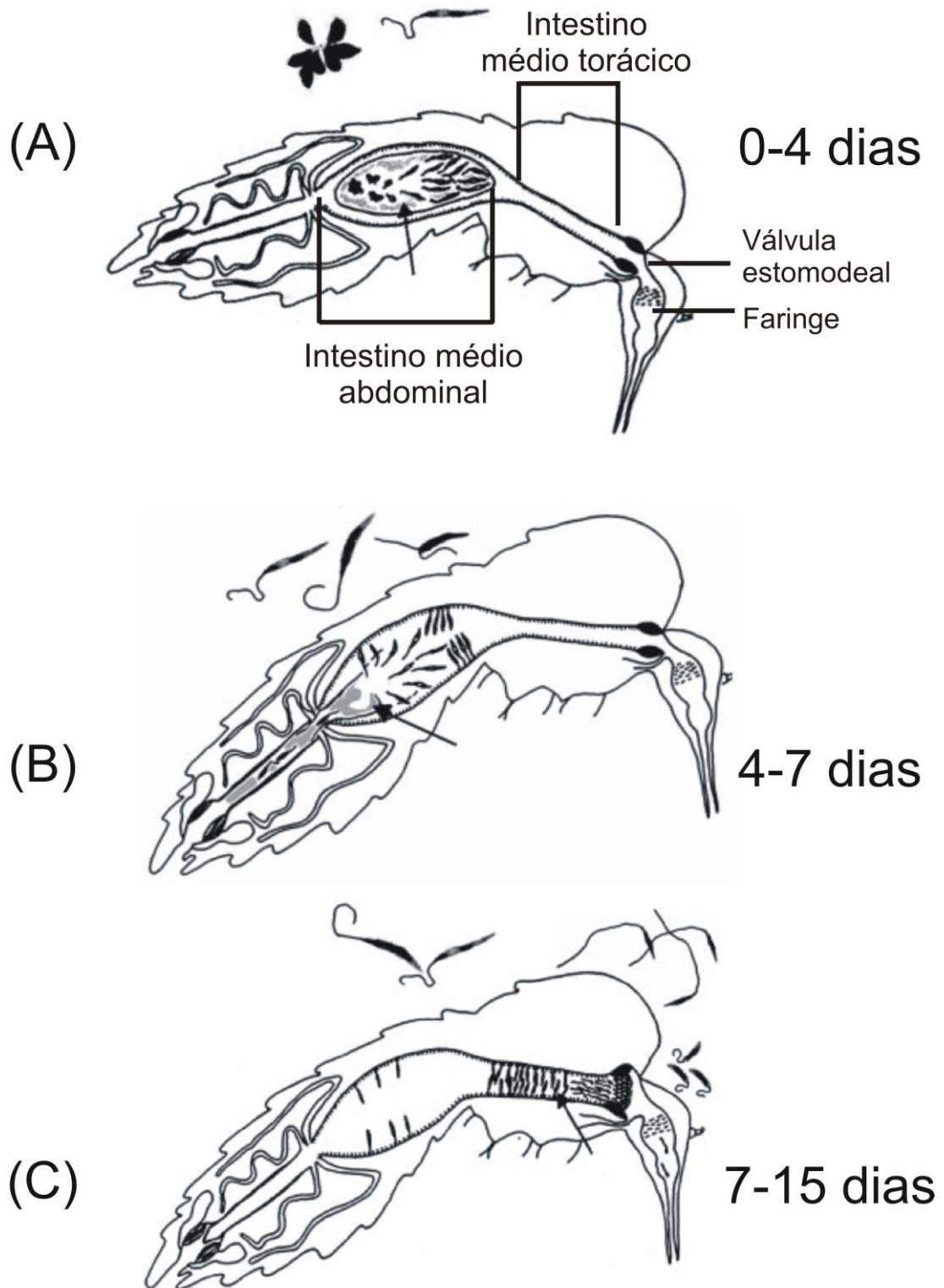
As leishmanias são ingeridas pelos flebotomíneos na forma amastigota junto com o sangue do hospedeiro vertebrado. A infecção do vetor pode ser dividida em três períodos, dos quais o primeiro é caracterizado pela presença do bolo alimentar envolto pela matriz peritrófica (figura 1.7A), o segundo pela presença de leishmanias aderidas ao epitélio do intestino médio abdominal do inseto (figura 1.7B) e o terceiro pela colonização do intestino anterior do vetor (figura 1.7C) (Sacks e Kamhawi, 2001).

Nas primeiras horas após a ingestão, os parasitos passam pelo primeiro processo de diferenciação se transformando em promastigotas procíclicos que tem capacidade de se multiplicar e se aglomerar no meio do bolo alimentar formando rosetas com os flagelos voltados para seu interior. Após 30 horas da alimentação sanguínea, já é possível encontrar o parasito na sua forma seguinte denominada de nectomonas. Esta forma apresenta um corpo mais alongado e alta mobilidade. Com o início da ruptura da matriz peritrófica, cerca de 72 horas após a alimentação, as nectomonas podem deixar o bolo alimentar e se aderirem ao glicocálice do epitélio do intestino médio. Parasitos não aderidos são excretados junto com o resíduo alimentar e até hoje não foi demonstrado nenhuma importância destes para o processo de transmissão da doença. Com aproximadamente uma semana do início da infecção, as leishmanias começam a migrar massivamente e colonizar a região anterior do tubo digestivo correspondente à porção torácica do intestino médio e à válvula estomodeal. Durante este processo, ocorre a transformação das nectomonas em haptomonas que são formas com capacidade de se dividir e que se aderem intimamente ao epitélio cuticular da válvula estomodeal via hemidesmossomos e umas às outras por meio de um material gelatinoso secretado. Ao mesmo tempo ocorre a metaciclogênese de um grande contingente dos parasitos que vão para a porção anterior do tubo digestivo. Estes passam à forma metacíclica que é infectiva para o hospedeiro vertebrado e migram além da válvula estomodeal chegando ao esôfago, faringe e prosbócide (Sacks e Kamhawi, 2001). Os parasitos secretam uma quitinase, acarretando a deformação da válvula estomodeal do inseto (Rogers *et al.*, 2008). A descaracterização estrutural deste órgão faz com que o aparelho sugador entre em colapso e as formas infectantes sejam regurgitadas no local da picada, completando assim a fase de

transmissão do ciclo de vida da leishmaniasis. O material gelatinoso secretado pelas formas haptomonas também contribui para a obstrução do trato digestivo. Este fenômeno parece induzir um comportamento diferenciado em fêmeas infectadas que procuram mais vezes o hospedeiro vertebrado para se alimentar, aumentando assim a chance de transmissão da doença (Rogers *et al.*, 2004).



**Figura 1.6)** Ciclo de vida da *Leishmania*: 1- vetor infectado inocula parasitas em um novo hospedeiro vertebrado durante o repasto sangüíneo; 2 – formas promastigotas do parasita são fagocitadas por macrófagos; 3, 4- parasitas se transformam em amastigotas e infectam células do sistema do sistema imune mononuclear; 5, 6- flebotomíneo se alimenta em hospedeiro doente e ingere os parasitas na forma amastigota; 7, 8- a *Leishmania* retorna a forma promastigota e coloniza o vetor (CDC, 2009)



**Figura 1.7)** Esquema mostrando o desenvolvimento da *Leishmania* dentro do tubo digestivo de flebotomíneos, adaptado de Sacks e Kamhawi (2001). O período de cada fase é indicado em dias e acima é mostrado um esquema das formas morfológicas do parasito.

## 1.5- *Flebotomíneos*

### 1.5.1- Importância médico veterinária

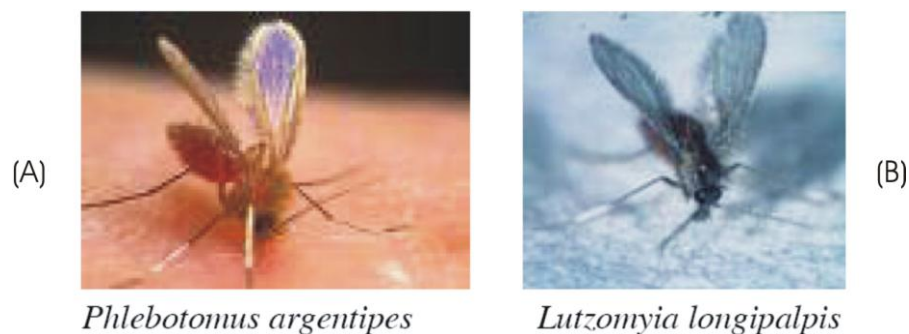
Flebotomíneos são transmissores de patógenos para o homem e animais, o que constitui o principal motivo de sua importância médico veterinária. Até onde se tem conhecimento, os vetores naturais de todas as espécies de *Leishmania* pertencem à subfamília *Phlebotominae* da família *Psychodidae* (Sacks e Kamhawi, 2001). Em regiões de grande ocorrência destes insetos é possível verificar casos em que a própria picada e sua reação alérgica característica provocam quadros críticos. Há ocorrência de pessoas que chegam a apresentar um aspecto “sarampento” devido ao grande número de picadas. Após as colonizações de flebotomíneos em laboratórios, mesmo com muitas dificuldades, estes insetos passaram a ser objeto de estudo para várias pesquisas no campo da genética, bioquímica e biologia molecular, elevando ainda mais a sua importância (Sherlocck, 2003).

Flebotomíneos são os únicos vetores de leishmaniose e outras doenças em áreas tropicais e subtropicais. Apenas o leste da Ásia e a África Sub-Saariana são relativamente livres de leishmaniose apesar de apresentarem espécies com capacidade vetorial (Munstermann, 2004). Das aproximadamente 400 espécies de flebotomíneos, apenas 50 são implicadas como vetores de leishmaniose (Sharma e Singh, 2008). Além da leishmania, já foi reportado que estes insetos também transmitem outros tripanossomatídeos para animais, dentre os quais podemos citar *Trypanosoma phyllotis*, *Trypanosoma leonidasdeanei* e *Trypanosoma tetradactyli* (Herrer, 1942; Christensen e Teoford, 1972; Williams, 1976). Os flebotomíneos são também transmissores de arboviroses causadas, na maioria das vezes, por vírus pertencentes ao gênero *Phlebovirus* (família *Bunyaviridae*). Em humanos, a infecção geralmente acarreta sintomas parecidos com os da influenza e os pacientes apresentam febre, dor retroorbital, erupção cutânea, mialgia e astenia (Sherlocck, 2003). Estes vetores também são responsáveis pela transmissão da Bartonelose que é outra doença de alta gravidade para humanos (Bass *et al.*, 1997).

A transmissão da leishmaniose no Novo Mundo (América Central e do Sul) está associada a espécies do gênero *Lutzomyia* e, no Velho Mundo, a espécies do gênero *Phlebotomus*. Morfologicamente ambos os gêneros são bastante parecidos. Nas figuras 1.8A e 1.8B são mostradas fotos de um *Phlebotomus* ao lado de um *Lutzomyia*. De modo geral, as espécies no Velho Mundo habitam regiões desérticas e semi-áridas enquanto que as espécies do Novo Mundo preferem regiões de floresta. Na tabela 1.1 são relacionadas as espécies de

*Leishmania* transmitidas por flebotomíneos destes dois gêneros com as regiões de ocorrência do parasito. (Sharma e Singh, 2008)

As espécies transmissoras são oportunistas, sendo o hospedeiro preferido aquele que está mais prontamente disponível. Esta tendência oportunista faz do homem um hospedeiro auxiliar para flebotomíneos que desenvolveram a capacidade de viver em ambientes peri-domésticos ou urbanos. A falta de especificidade no hospedeiro dificulta o desenvolvimento de sistemas modelos para a relação vetor-parasito. Uma única espécie causadora de leishmaniose cutânea pode ter uma dúzia ou mais de espécies incriminadas ou suspeitas de atuarem como vetor. Desta forma, modelos epidemiológicos apropriados para um par de espécies vetor-parasito podem ser irrelevante para outros.



**Figura 1.8)** Imagens de flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. (A) *P. argentipes*; (B) *L. longipalpis* (Sharma e Singh, 2008)

**Tabela 1.1)** Vetores comprovados ou suspeitos de transmitirem parasitos humanos do gênero *Leishmania*. Os locais de ocorrência do parasito também são indicados (Sacks e Kamhawi, 2001).

Parasito	Distribuição geográfica	Vetores comprovados ou suspeitos
<i>L. L. donovani</i>	China, Índia, Nepal, Bangladesh, África Oriental	<i>P. alexandri</i> <i>P. argentipes</i> <i>P. martini</i> , <i>P. orientalis</i>
<i>L. L. infantum chagasi</i>	Sul da Europa, Leste do Mediterrâneo, China, América Central e do Sul	<i>P. ariasi</i> , <i>P. perniciosus</i> <i>P. perniciosus</i> , <i>P. langeroni</i> <i>P. chinensis</i> , <i>P. major</i> <i>L. longipalpis</i>
<i>L. L. major</i>	Oriente Médio, Sudoeste Ásia, África	<i>P. papatasi</i> <i>P. papatasi</i> <i>P. papatasi</i> , <i>P. duboscqi</i>
<i>L. L. tropica</i>	Oriente Médio, Sudoeste Ásia, África	<i>P. sergenti</i> <i>P. sergenti</i> , <i>P. saevus</i>
<i>L. L. aethiopica</i>	África Oriental	<i>P. longipes</i> , <i>P. pedifer</i>
<i>L. L. mexicana</i>	América Central	<i>L. olmeca</i>
<i>L. L. amazonensis</i>	América Central e do Sul	<i>L. flaviscutellata</i>
<i>L. V. braziliensis</i>	América Central e do Sul	<i>L. wellcomei</i> , <i>L. carrerai</i>
<i>L. V. guyanensis</i>	América Central e do Sul	<i>L. umbratilis</i> , <i>L. anduzei</i>
<i>L. V. panamensis</i>	América Central e do Sul	<i>L. trapidoi</i>

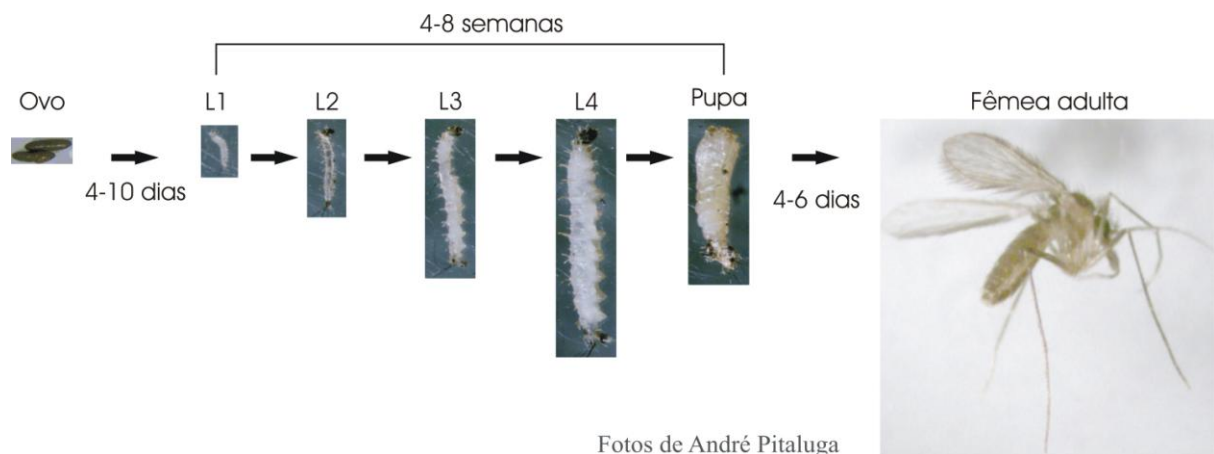
### 1.5.2- Biologia do vetor

Os flebotomíneos pertencem ao Filo Artropoda; Classe Insecta; Ordem Díptera; Família Psychodidae. São insetos relativamente pequenos possuindo de 2,5 a 3,5 mm nas aproximadamente 1.000 espécies já descritas. O seu tamanho reduzido é um dos fatores que fazem com que muitos aspectos da sua biologia ainda não tenham sido explorados com a profundidade vista para outros vetores (Munstermann, 2004). Na figura 1.9 é mostrado um flebotomíneo ao lado de um mosquito para representar a diferença de tamanho geralmente encontrada entre estes animais. A dificuldade em capturar os insetos no campo e a sua complicada manutenção em colônias também contribuem para o desânimo de pesquisadores em adotar os flebotomíneos como um organismo modelo (Munstermann, 2004).

Os estágios básicos do ciclo de vida dos flebotomíneos são típicos de insetos da subordem Nematocera. Na figura 1.10 são mostradas as fases de desenvolvimento típicas de flebotomíneos usando a espécie *L. longipalpis* como exemplo. Depois do acasalamento e alimentação com sangue, as fêmeas adultas desenvolvem os ovos e ovipõem separadamente em um substrato com fendas. Depois de quatro a dez dias os ovos eclodem e as larvas crescem passando por quatro estádios dentro de um período de quatro a oito semanas. Após o quarto estágio larval os insetos empupam e permanecem nesta forma por quatro a seis dias até se tornarem adultos. Este último estágio é relativamente curto, raramente ultrapassando três semanas, durante as quais ocorrem o acasalamento, a procura pelo hospedeiro, para a fêmea, a alimentação com sangue, procura por substrato para oviposição e oviposição de fato. Somente a fêmea necessita da alimentação sanguínea para produção dos ovos e, por conseguinte é a responsável pela transmissão de patógenos (Munstermann, 2004). Para servir como vetor de bactérias, vírus e protozoários, as fêmeas devem viver tempo suficiente para conseguirem uma segunda alimentação sanguínea e transmitirem o patógeno para um novo hospedeiro (Sherlock, 2003).



**Figura 1.9)** Comparação do tamanho de um mosquito *Aedes aegypti* com um flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*.



**Figura 1.10)** Estágios do ciclo de vida de *L. longipalpis*.

Os estágios imaturos de ovo, larva e pupa são descritos inteiramente por observações de insetos mantidos em colônias. É possível notar que as formas imaturas parecem preferir solos relativamente secos e ricos em matéria orgânica. Na tentativa de localizar onde emergem os adultos através de armadilhas para insetos emergentes só se tem obtido algum sucesso para espécies adaptadas a viver no peri-domicílio como *L. longipalpis* (Munstermann, 2004).

Devido ao seu habitat terrestre, particularmente em zonas áridas, a cutícula larval é grossa e esclerosada para prevenir a perda de água e desidratação (Fausto *et al.*, 1999). Os nutrientes para o crescimento da larva podem ser deduzidos apenas a partir de criações de laboratório. O sucesso da ração contendo fezes de coelho indica que pelo menos algumas espécies preferem solos com grande quantidade de matéria orgânica em decomposição (Tesh e Guzman, 1996).



### ***1.6- Compartimentalização da digestão em insetos***

A maior parte do alimento de insetos, que requer digestão, consiste em moléculas poliméricas como amido, celulose, hemicelulose e proteínas. Em insetos holometábolos, a compartimentalização do local de atuação das enzimas digestivas e dos fluidos do intestino médio é de grande importância para o processamento e absorção deste alimento de forma eficiente. Uma estrutura chamada de matriz peritrófica cria dois ambientes de compartimentalização da digestão: endo e exoperitrófico. Poros de tamanhos definidos nesta estrutura limitam o peso molecular das moléculas que transitam entre estes dois compartimentos (Terra e Ferreira, 1994).

Na fase inicial do processamento enzimático do alimento, polímero hidrolases, como amilases, celulases, hemicelulases e tripsinas, atuam na redução do peso molecular dos polímeros gerando oligômeros. Esta etapa da digestão parece ocorrer no espaço endoperitrófico (Terra e Ferreira, 1994).

Na fase intermediária da digestão, oligômeros são processados por polímero hidrolases (p. ex. amilase) ou digeridos por oligômero hidrolases (p. ex. aminopeptidases que atuam sobre fragmentos de proteína). Esta etapa da digestão parece ocorrer no espaço exoperitrófico e gera dímeros ou pequenos oligômeros como maltose, celobiose e dipeptídeos (Terra e Ferreira, 1994).

Na fase final do processo digestivo, os dímeros são processados em monômeros pelas dímero hidrolases como maltases, celobiasas e dipeptidases. Estas parecem ser enzimas que atuam ancoradas a membrana celular de microvilosidades do intestino do inseto, que constitui a última unidade compartimentalizadora da digestão (Terra e Ferreira, 1994).

Acredita-se que a compartimentalização pode evitar a ligação não específica de moléculas não digeridas em sítios localizados em enzimas e transportadores celulares (Terra, 1990). Esta adaptação do trato digestivo também deve diminuir a autodigestão das proteínas do próprio inseto e com isso gerar uma economia energética que aumenta a eficiência do processo digestivo.

## **1.7- *Metabolismo de quitina em insetos***

### **1.7.1- Quitina**

Quitina é um dos biopolímeros mais importantes na natureza, sendo produzida principalmente por fungos, artrópodes e nematóides (Merzendorfer e Zimoch, 2003). Em insetos, este polissacarídeo de N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina funciona como arcabouço para formação de importantes estruturas como exoesqueleto, matriz peritrófica (MP) e o revestimento cuticular do intestino anterior, posterior e traquéias (Kramer e Koga, 1986; Cabib, 1987; Kramer e Muthukrishnan, 1997; Lehane, 1997; Kramer e Muthukrishnan, 2005).

O crescimento e morfogênese dos insetos dependem estritamente da sua capacidade de remodelar estruturas quitinosas, sendo de grande importância a produção repetida e em diferentes tecidos de enzimas para síntese e degradação deste polissacarídeo. Quitina é um dos componentes majoritários da cutícula de insetos podendo chegar a 40% da massa seca de sua carapaça (Kramer *et al.*, 1995). Os filamentos de quitina funcionam como um leve e forte arcabouço que sustenta as proteínas e estas determinam as propriedades químicas e mecânicas da cutícula (Merzendorfer e Zimoch, 2003).

### **1.7.2- Composição e função da matriz peritrófica**

A matriz peritrófica é também conhecida como membrana peritrófica, que foi um termo primeiramente usado por Balbiani em 1890 quando a descreveu como um saco membranoso que envolve o bolo alimentar dentro do intestino de centopéias (*Cryptops spp.*) (Balbiani, 1890). Entretanto, a observação de um envoltório que separava o bolo alimentar já havia sido reportada anteriormente por Lyonet (1762). O termo peritrófico vem das palavras gregas *peri*, ao redor, e *trófico*, alimentar. Como a MP invariavelmente envolve o bolo alimentar, este termo nunca foi criticado. Entretanto, hoje em dia a palavra membrana faz menção a estruturas com uma bicamada lipídica o que não se verifica na MP. O termo matriz é adotado nesse trabalho justamente por não descrever uma estrutura membranosa, todavia, existem outros termos menos polêmicos como envoltório (Peters, 1992).

A matriz peritrófica geralmente é formada por 3 a 13% (p/v) de quitina (Peters, 1992). A quantidade deste polissacarídeo na MP pode variar bastante de espécie para espécie como, por exemplo, já foi reportada a presença de 40% (p/v) de quitina na MP de *Manduca sexta* (Kramer *et al.*, 1995). Somada à quitina está uma complexa mistura de glicoproteínas e

proteoglicanos. Os microfilamentos de quitina são secretados juntamente com a massa super hidratada de proteoglicanos. Os demais componentes da MP, como as peritrofinas, são secretados durante o processo de gelificação da matriz. As peritrofinas ligam-se ao arcabouço de quitina por seus múltiplos domínios de ligação ao polissacarídeo e podem mediar a interação de glicoproteínas a MP, contribuindo para o potencial elástico dessa estrutura (Lehane, 1997).

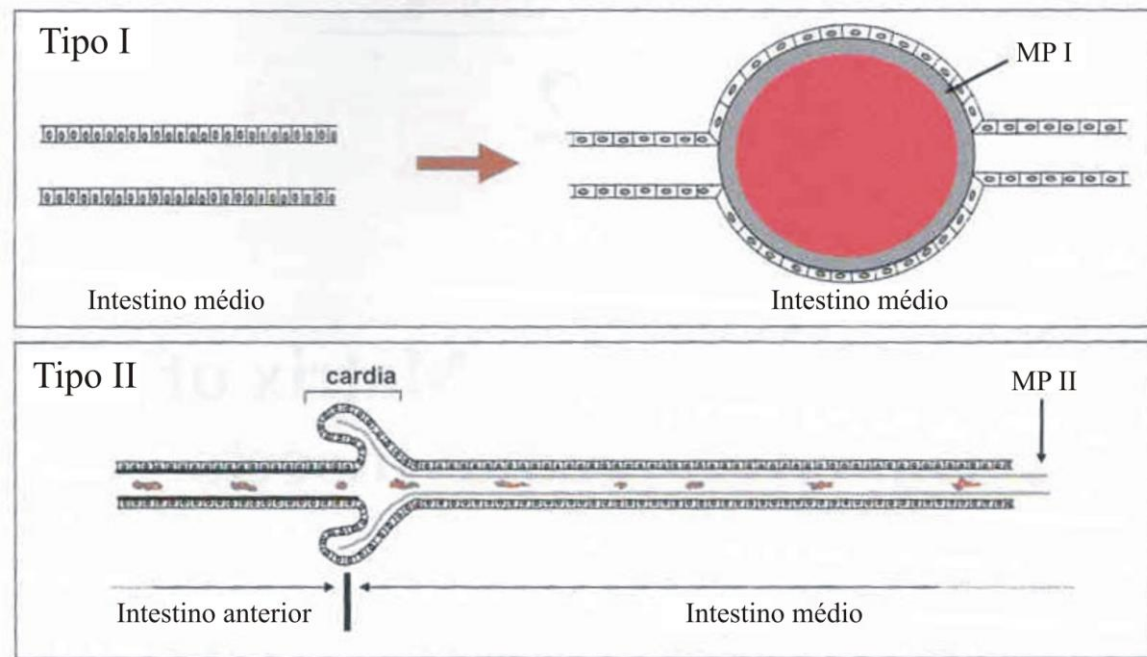
A primeira proposição de que a MP poderia desempenhar um papel na digestão foi feita por Waterhouse (1957) e a partir daí as funções atribuídas a essa estrutura foram aumentando com o passar dos anos. A MP compartimentaliza a digestão aumentando sua eficiência e protege a borda em escova desse epitélio de injúrias mecânicas e ataques de patógenos e toxinas (Tellam, 1996).

Em insetos hematófagos, a MP tem um importante papel na proteção contra a intoxicação por metabólitos da digestão, como o heme, que é um grupamento prostético liberado durante a proteólise do sangue. O heme possui grande atividade pró-oxidante e a quantidade ingerida por estes insetos seria suficiente para produzir um estresse radicalar fatal. Os insetos hematófagos desenvolveram ao longo da evolução a capacidade de degradar o heme e produzir agentes anti-oxidantes. Associado a este processo de proteção está a capacidade da MP em ligar-se intimamente a estas moléculas formando heme-agregados (Graça-Souza, 2006).

A MP de insetos pode ser classificada em dois tipos de acordo com sua forma de secreção: tipo 1 (MP1) e tipo 2 (MP2) (figura 1.11) (Peters, 1992). Cada espécie de inseto e cada forma de desenvolvimento (larva *versus* adulto) produz MP1 ou MP2, mas nunca ambas. Os dois tipos de matrizes possuem diferentes propriedades que incluem morfologia, composição e, em algumas espécies, função. A maior parte dos insetos secreta MP, entretanto ela geralmente é ausente em Hemíptera, Thysanoptera e Lepidópteras adultos.

A MP1 é encontrada em algumas ordens de insetos como Coleoptera, Ephemeroptera, Hymenoptera, Odonata, Orthoptera, Phasmida, representantes da superordem Dictyoptera, larvas de Lepidoptera, e dípteras hematófagos adultos (Waterhouse, 1957; Peters, 1992). A MP2 é encontrada em ordens primitivas (p. ex. Dermaptera e Isoptera), como também em Embiopteras (Embiodea), alguns Lepidopteras, e larvas de Diptera hematófagos (Wigglesworth, 1930; Peters, 1992).

Alguns insetos, principalmente hemípteras, produzem uma estrutura nomeada por Walter Terra em 1988 *apud* Hegedus *et al.* (2009) como membrana perimicrovilar. Essa espécie de invólucro do lúmen intestinal deve ter função análoga a MP e é originada por vesículas derivadas do complexo de golgi (Silva *et al.*, 2004).



**Figura 1.11)** Esquema mostrando a formação da MP1 e MP2, adaptado de Devenport e Jacobs-Lorena (2004). A MP1 aparece envolvendo sangue e a MP2 ao redor de partículas de comida.

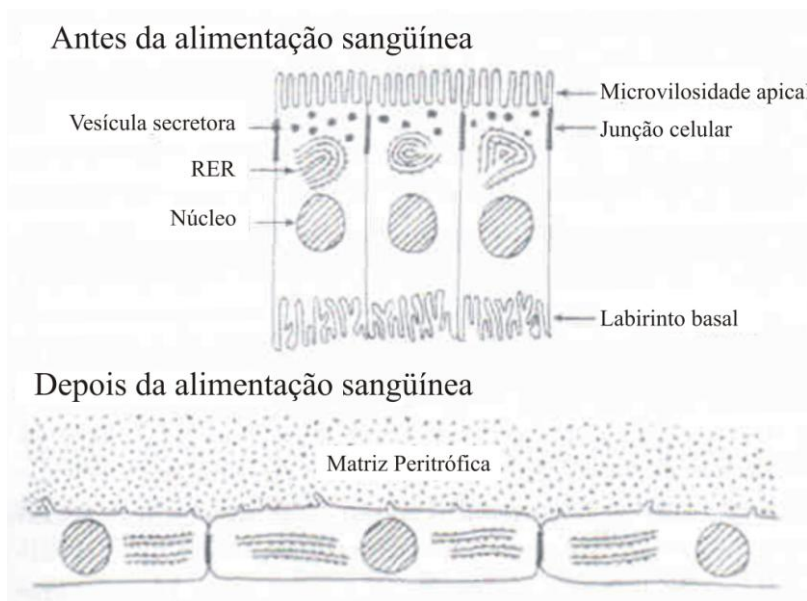
### 1.7.3- Matriz peritrófica do tipo 1 (MP1)

MP1 é o tipo de MP mais comum em insetos hematófagos adultos, como mosquitos, simulídeos e flebotomíneos. Existem algumas exceções notáveis como a mosca tsétsé e *Stomoxys calcitrans* que secretam MP2.

Em insetos não hematófagos a MP1 pode ser secretada de forma constitutiva. Nos insetos que se alimentam com sangue a MP1 é encontrada nos adultos em um tempo definido após a alimentação sanguínea. A MP1 é secretada majoritariamente por células epiteliais do intestino médio que sofrem mudanças morfológicas drásticas com a ingestão do alimento (figura 1.12). As células colunares se tornam esticadas e planas, sofrendo uma redução de número e tamanho das suas microvilosidades da membrana apical. No lado basal, essas células passam por um processo de desdobramento do labirinto membranoso ao sofrerem um estiramento. Nessa situação morfológica, a junção entre as células intestinais é mantida por suas fortes conexões laterais (tais como junções comunicantes, junções septadas e desmossomos), permitindo o armazenamento de uma quantidade de alimento muitas vezes maior que o volume do intestino médio vazio. A distensão do tubo digestivo parece ser um dos sinais para secreção da MP, uma vez que injeções de ar pelo ânus pode estimular a secreção da matriz de mosquito (Devenport e Jacobs-Lorena, 2004). Entretanto, o mecanismo

de sinalização intracelular envolvido nesse processo ainda está pouco esclarecido (Hegedus *et al.*, 2009).

Foi demonstrado que a secreção em pulsos da MP1 em *Locusta migratória*, *Periplaneta americana* e *Diabrotica undecimpunctata* produz camadas concêntricas sucessivas (Lehane, 1997; Peters, 1992; Ryerse, 1994). Por microscopia eletrônica verificou-se que o arcabouço de quitina da MP1 geralmente toma a forma de uma estrutura ortogonal altamente requisitada por proteínas (Binnington *et al.*, 1998; Harper e Hopkins, 1997)



**Figura 1.12)** Esquema mostrando estiramento das células epiteliais e secreção da MP1, adaptado de Devenport e Jacobs-Lorena (2004).

#### 1.7.4- Matriz peritrófica do tipo 2 (MP2)

A MP2 tem um formato tubular aberto nas duas extremidades e recobre todo o epitélio do tubo digestivo médio da larva. Em muitas espécies, essa estrutura, que é continuamente secretada, é excretada junto com as fezes (Devenport e Jacobs-Lorena, 2004). A MP2 é mais organizada que a MP1 e consiste de uma estrutura formada por uma a três camadas que crescem no mesmo sentido da passagem do alimento, recobrando-o a medida que vai sendo formada (Peters, 1992).

A MP2 é secretada de forma constitutiva e não necessita do estímulo do alimento para iniciar sua secreção. A MP2 é produzida exclusivamente por células especializadas da região da cárdia que fica entre o esôfago e a parte anterior do intestino médio. A cárdia é formada por uma invaginação do epitélio do tubo digestivo criando uma bolsa protegida da qual é secretada a MP2. Este órgão é variável e característico de cada espécie. Em alguns insetos

existe uma especialização tecidual nesta região permitindo a identificação por microscopia de diferentes tipos celulares. Cada camada da MP2 parece ser formada por uma região diferente da cárdia, indicando que cada tipo celular é responsável pela secreção de diferentes componentes (Devenport e Jacobs-Lorena, 2004).

## **1.8- Fisiologia do tubo digestivo de L. longipalpis**

### **1.8.1- Matriz peritrófica**

Dois dias após ingestão de sangue, o tubo digestivo de fêmeas adultas de *L. longipalpis* está com aproximadamente a metade do tamanho que possuía 30 min. após a alimentação. Com 3 dias após a ingestão este órgão já possui quase o mesmo tamanho do intestino de um inseto não alimentado. Nas primeiras horas após a ingestão sanguínea as células colunares estão bastante estiradas e as chamadas de células negras (Secundino *et al.*, 2005) parecem secretar componentes da MP1. Esta secreção começa logo após a ingestão sanguínea, sendo detectada com até uma hora após a alimentação. Quitina é um componente estrutural fundamental para a organização da MP1 (Pimenta *et al.*, 1997) e a alimentação com látex também pode induzir a secreção da MP (Secundino *et al.*, 2005).

### **1.8.2- Controle do pH do tubo digestivo**

O pH do intestino médio de fêmeas adultas de *L. longipalpis* não alimentadas é ligeiramente ácido (pH 6), podendo variar no período pós-prandial controlado por um mecanismo que parece envolver a volatilização de CO<sub>2</sub> e outro ainda desconhecido. Após a ingestão do sangue, o pH é modulado para levemente alcalino podendo chegar até 8,5 após 10 horas da alimentação. Com o decorrer da digestão sanguínea a concentração de H<sup>+</sup> no tubo digestivo médio tende a aumentar re-acidificando o lumen. (Santos *et al.*, 2008)

Em larvas de *L. longipalpis* o pH do intestino médio é controlado apresentando um gradiente que vai de aproximadamente 9 na região anterior do intestino médio a 6,5-7,0 no intestino médio posterior (Fazito do Vale *et al.*, 2007).

## 1.9- *Quitinases*

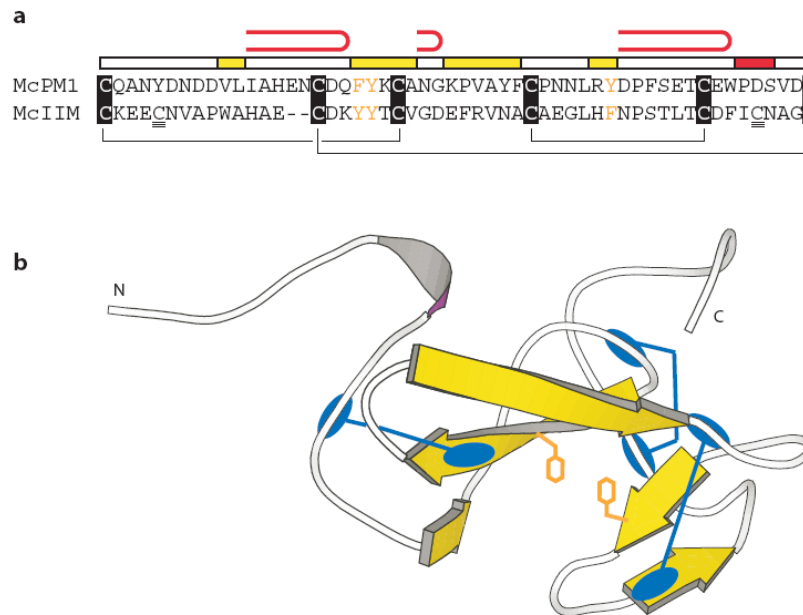
Quitinases hidrolisam posições internas do polímero de quitina diferentemente de N-acetilhexosaminidases que atuam sobre os quitooligosacarídeos produzidos pela ação das primeiras. Algumas quitinases, porém não todas, exibem atividade tipo lisozima e podem quebrar um constituinte da parede celular composto pelos dímeros de N-acetil-glicosamina e ácido N-acetil-murâmico, porém quitina é o substrato preferencial. As quitinases de insetos pertencem todas à família 18 das glicosídeo hidrolases e são comumente chamadas de quitinases 18. As quitinases destes artrópodes clivam preferencialmente ligações glicosídicas beta-1,4 internas do polímero de quitina em detrimento das ligações beta-anômero das extremidades reductoras (Arakane e Muthukrishan, 2009). Outras glicosídeo hidrolases que apresentam atividade quitinolítica são as da família 19, quitinases comumente encontradas em plantas, e da família 23, que são conhecidas como lisozimas (Fukamizo, 2000). As glicosídeo hidrolases da família 20 possuem um papel intimamente ligado à ação das quitinases, pois fazem a degradação das extremidades dos seus produtos de digestão. A ação conjunta das glicosídeo hidrolases das famílias 18 e 20 é responsável pela despolimerização dos filamentos de quitina em insetos (Fukamizo e Kramer, 1985).

### 1.9.1- *Quitinases de insetos*

Enzimas com atividade quitinolítica são de extrema importância para a biologia de insetos, uma vez que são cruciais para os processos de muda e renovação das estruturas quitinizadas (Merzendorfer e Zimoch, 2003).

As quitinases de insetos possuem os seguintes domínios conservados: peptídeo sinal, região transmembranar, domínio catalítico, domínio de ligação à quitina (chitin binding domain - CBD) e região de ligação rica em serina/treonina (Zhu *et al.*, 2008a). O domínio catalítico de quitinases da família 18, único que está sempre presente nestas enzimas em insetos, apresenta uma estrutura em barril com 8 fitas beta e 8 fitas alfa (Fukamizo, 2000). A região de ligação rica em resíduos de serina e treonina possui diversos sítios de O-glicosilação e parece contribuir para a estabilidade destas enzimas em um ambiente rico em proteases como o tubo digestivo e fluido de muda (Arakane e Muthukrishnan, 2009). O CBD possui 6 cisteínas amplamente conservadas entre moléculas que possuem a capacidade de ligação à quitina polimérica (Suetake *et al.*, 2000). Na figura 1.13 são evidenciadas as cisteínas conservadas do CBD da peritrofina A e mucina de *Mamestra configurata*. Também são mostradas a estrutura

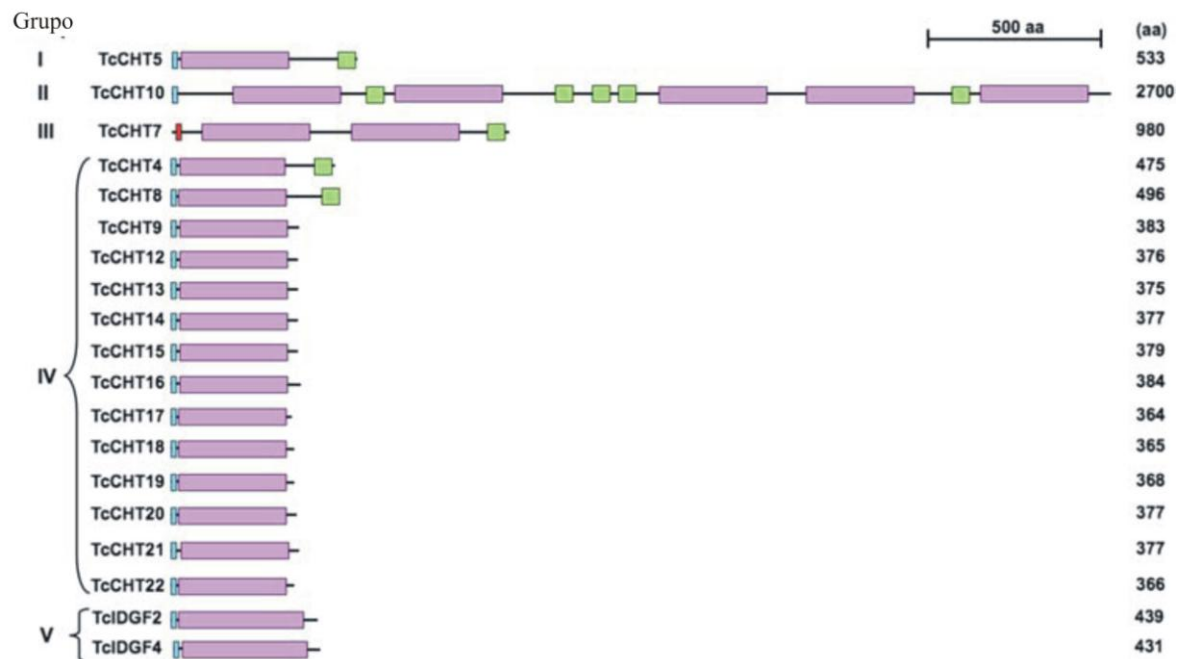
e posição das cisteínas conservadas de uma proteína antimicrobiana de *Tachypleus tridentatus*.



**Figura 1.13)** Estrutura do domínio de ligação à quitina (CBD) (Hegedus *et al.*, 2009). (A) comparação da estrutura primária e secundária do CBD da peritrofina, McPM1, e da mucina intestinal de invertebrado, McIIM, de *Mamestra configurata*. As 6 cisteínas conservadas na cadeia primária estão em destaque pelas barras pretas e possíveis pontes dissulfeto são representadas pelas linhas pretas. A estrutura secundária predita para este domínio é esquematizada logo acima do alinhamento. Barras brancas/alça vermelha: possíveis *loopings*; barra amarela: fita beta; barra vermelha: fita alfa. (B) Representação tridimensional do CBD de uma proteína antimicrobiana de *Tachypleus tridentatus*. As cisteínas conservadas presentes no CBD de peritrofina-A com suas possíveis pontes dissulfeto são representadas em azul.

Recentemente, com o advento dos genomas completos de *Drosophila melanogaster*, *Tribolium castaneum* e *Anopheles gambiae*, foi possível ver que estes artrópodes possuem mais de 10 genes codificantes para proteínas da família das quitinases (Arakane e Muthukrishnan, 2009). Um estudo filogenético baseado na seqüência de aminoácidos do domínio catalítico destas proteínas possibilitou sua classificação em 5 grupos (Zhu *et al.*, 2008a). Estas proteínas evoluíram de forma que, além das similaridades nas seqüências do domínio catalítico, possuem também uma arquitetura de domínios conservados comum a cada grupo. Na figura 1.14 é mostrado um esquema com a arquitetura de domínio de 19 proteínas codificadas pelo genoma de *T. castaneum* que estão divididas entre estes 5 grupos (Arakane e Muthukrishnan, 2009).





**Figura 1.14)** Arquitetura de domínio de possíveis quitinases e proteínas de *T. castaneum* similares a quitinase (Arakane e Muthukrishnan, 2009). Azul: peptídeo sinal; vermelho: domínio transmembranar; roxo: domínio catalítico; Verde: domínio de ligação à quitina.

As quitinases pertencentes ao grupo I (CHT5s) provavelmente desempenham papel no processo de muda, uma vez que muitas proteínas deste grupo foram obtidas a partir de fluidos de muda e/ou tegumento. Todos os genes deste grupo são muito expressos na epiderme. A arquitetura de domínios destas proteínas apresenta sempre um peptídeo sinal, um domínio catalítico, uma região de ligação rica em serina/treonina e um domínio de ligação à quitina na porção C-terminal (Zhu *et al.*, 2008a).

As quitinases do grupo II (CHT10s) são proteínas extremamente grandes com mais de 2.000 aminoácidos, quatro a cinco domínios catalíticos e quatro a sete domínios de ligação à quitina (Arakane e Muthukrishnan, 2009). Um possível papel para essas quitinases seria a quebra de microfibrilas de quitina cristalina gerando cadeias desagregadas e facilitando o acesso para outras quitinases (Zhu *et al.*, 2008a).

As quitinases do grupo III (CHT7s) apresentam dois domínios catalíticos e um sítio de ligação à quitina na porção C-terminal (Zhu *et al.*, 2008a). Algumas quitinases deste grupo apresentam também um domínio transmembranar. A quitinase TcCHT7 possui atividade estando ancorada a membrana da célula (dado não publicado, mas mencionado em Arakane e Muthukrishnan, 2009). Por interferência de RNA foi visto que estas enzimas desempenham função no processo de muda (Zhu *et al.*, 2008b). Algumas quitinases deste grupo não possuem peptídeo sinal (Zhu *et al.*, 2008a).

O grupo IV é o maior e mais variado, exibindo quitinases com e sem domínio de ligação à quitina. Estas possuem apenas um domínio catalítico e são encontradas no tubo

digestivo de insetos (Zhu *et al.*, 2008a). Possivelmente, estas enzimas devem atuar sobre a MP ou em alimentos ricos em quitina (Genta *et al.*, 2006). Em *T. castaneum*, a maior parte dos genes deste grupo parece estar ativa somente em larvas e adultos, não sendo possível detectar sua transcrição em pupa e pré-pupa (Zhu *et al.*, 2008b).

O grupo V é formado por proteínas que perderam a atividade catalítica, mas que ainda apresentam uma alta similaridade às glicosídeo hidrolase da família 18 (Zhu *et al.*, 2008b). Estas proteínas são conhecidas como IDGF (*Imaginal Disk Growth Factor*). São moléculas que não possuem o domínio de ligação à quitina, mas que podem ligar-se a este polissacarídeo pela região correspondente ao sítio catalítico e possivelmente assumem um papel na sinalização celular. A única proteína de inseto pertencente a família 18 com estrutura determinada por cristalografia é a DmIGDF2, que não possui atividade catalítica. Entretanto, ela confirma que o domínio catalítico desta família nestes artrópodes possui a estrutura em barril (Lu *et al.*, 2002).

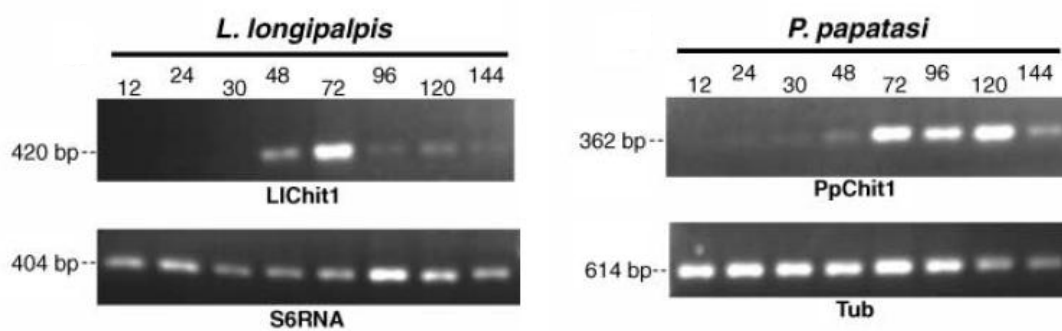
### 1.9.2- Quitinases de flebotomíneos

O controle da espessura da MP1 em dípteras parece ser o efeito da ação coordenada entre a síntese e degradação de quitina (Shao *et al.*, 2001; Filho *et al.*, 2002). Em flebotomíneos, a ação de quitinases sobre espessura da MP1 parece ter influência sobre a infecção do vetor por *Leishmania*. Pimenta *et al.* (1997) demonstram que a alimentação artificial de *P. papatasi* contendo alosamidina, um inibidor específico de quitinases, promove a formação de uma MP1 mais espessa que a normal e os parasitos ficam presos no espaço endoperitrófico. Por outro lado, a alimentação artificial contendo quitinase impede a formação da estrutura convencional da matriz e os parasitos entram em contato com as enzimas proteolíticas da digestão ainda na forma amastigota sendo eliminados.

Duas quitinases de flebotomíneos já foram descritas, uma em *L. longipalpis* (LlChit1) e outra em *P. papatasi* (PpChit1) (Ramalho-Ortigão e Traub-Csekö, 2003; Ramalho-Ortigão *et al.*, 2005). Ambas são codificadas por genes induzidos pela alimentação sanguínea e possuem um padrão de transcrição bastante semelhante, mas não igual. Na figura 1.15 é mostrado um experimento de RT-PCR no qual é possível notar que a transcrição do gene LlChit1 é máxima 72 horas após a alimentação sanguínea decaindo rapidamente. O gene PpChit1 possui um período de atividade mais duradouro que vai de 72 a 120 horas após a ingestão do sangue. Em experimentos que comparavam a transcrição destes genes em carcaça e tubo digestivo, foi demonstrado que ambos são intestino específicos (Ramalho-Ortigão *et al.*, 2005).

A atividade quitinolítica no tubo digestivo foi ensaiada em amostras destas duas espécies dissecadas de 24 a 72 horas após a alimentação com sangue. O pico de atividade foi detectado na amostra dissecada 48 horas após a ingestão do sangue e nenhuma atividade foi vista em tubos digestivos de fêmeas não alimentadas. Frente a um gradiente de pH, a atividade endoquitinolítica destas duas espécies parece diminuir com o aumento do pH acima de 8,5 (Ramalho-Ortigão *et al.*, 2005).

Experimentos de *Southern blot* sugeriram que o gene PpChit1 era cópia simples (Ramalho-Ortigão *et al.*, 2005) e que o gene LlChit1 possuía múltiplas cópias (Ramalho-Ortigão e Traub-Csekö, 2003).



**Figura 1.15)** RT-PCR mostrando perfil de transcrição dos genes LlChit1 e PpChit1 em fêmeas adultas horas após a alimentação sanguínea (Ramalho-Ortigão *et al.*, 2005).

## II- OBJETIVOS

### ***2.1- Objetivo geral***

Este trabalho tem como objetivo geral a caracterização do gene de quitinase de *L. longipalpis* LIChit1 que codifica a quitinase com possível papel na degradação da matriz peritrófica do tipo 1 em fêmeas adultas.

### ***2.2- Objetivos específicos***

1 - Isolar e seqüenciar um clone genômico contendo o gene LIChit1, com ênfase na procura por possíveis regiões a montante do gene e identificação de seqüências que interrompam a porção codificante do cDNA LIChit1A.

2 - Busca por possível seqüência promotora deste gene: aplicar técnicas de biologia molecular e computacional para seqüenciar e identificar possíveis regiões do DNA de *L. longipalpis* envolvidas na expressão gênica após a alimentação sangüínea.

3 - Elucidar aspectos relativos ao processamento da mensagem codificada por este gene: aplicar técnicas de biologia molecular e computacional para revelar aspectos relacionados ao processamento do RNA LIChit1A.

### III- MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1- Tampões e soluções

##### 3.1.1- TE 1X (Tris - EDTA)

Tris-HCl (pH 7,6) 10 mM

EDTA (pH 8,0) 1 mM

(Sambrook e Russel, 2001)

##### 3.1.2- TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA)

Tris - base 40 mM

Ácido acético 20 mM

EDTA 1 mM

(Sambrook e Russel, 2001)

##### 3.1.3- PBS (Phosphate Buffered Saline)

NaCl 132 mM

KCl 3 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM

Ajustar para pH 7,2 com NaOH (Sambrook e Russel, 2001).

##### 3.1.4- Solução SM

NaCl 100 mM

MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 15 mM

Tris-HCl 50 mM (pH7,5)

Gelatina 0,01% (p/v)

Esterilizado por autoclave à 15 psi (1,05 Kg/cm<sup>2</sup>) por 20 min. (Sambrook e Russel, 2001).

### **3.1.5- Reagentes adicionados ao meio de seleção de transformantes usados para fazer as placas de transformação**

- IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo) 0,5 M em água milli-Q.
- X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoilil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo) 250 mg/mL em dimetil-formamida.

### **3.1.6- Ampicilina**

A solução estoque de ampicilina foi feita na concentração de 50 mg/mL em água milli-Q, esterilizada por filtração e armazenada em alíquotas de 1 mL a -20°C (Sambrook e Russel, 2001). A concentração de trabalho com o antibiótico foi de 100  $\mu$ g/mL.

### **3.1.7- Marcadores de peso molecular**

#### **a) Lambda-Hind III (New England BioLabs, EUA)**

Este marcador de peso molecular é constituído por DNA de fago Lambda digerido com a enzima de restrição Hind III. Tamanhos dos fragmentos: 23.130; 9.419; 6.557; 4.371; 2.322; 2.028; 564 e 125 pb.

#### **b) $\phi$ X174 RF/Hae III (New England BioLabs)**

Este marcador de peso molecular é constituído por DNA de fago  $\phi$ X174 digerido com a enzima de restrição Hae III. Tamanhos dos fragmentos: 1.353; 1.072; 872; 603; 310; 281; 271; 234; 294; 118 e 72 pb.

#### **c) 100 pb DNA Ladder (Life Technology<sup>®</sup>)**

Este marcador de peso molecular é constituído por 15 fragmentos de finais não coesivos e tamanhos múltiplos de 100 pb, indo até 1,5 kb, e com um fragmento adicional de 2.072 pb.

**d) GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas)**

Este marcador de peso molecular é constituído por 10 fragmentos de finais não coesivos e tamanho múltiplos de 100 pb, indo até 1,0 kb.

**3.1.8- STET (Solução TRIS-NaCl-EDTA-Triton® X-100)**

NaCl	0,1 M
Tris-HCl	10 mM (pH 8,0)
EDTA	1 mM (pH 8,0)
Triton® X-100	5% (v/v)

(Sambrook e Russel, 2001)

**3.1.9- Lisozima**

Foi feita uma solução estoque de 50 mg/mL em água milli-Q e armazenada a -20°C (Sambrook e Russel, 2001).

**3.1.10- Solução de desnaturação de DNA**

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M

(Sambrook e Russel, 2001)

**3.1.11- Solução de neutralização de membranas**

NaCl	1,5 M
Tris-HCl (pH 7,4)	0,5 M

(Sambrook e Russel, 2001)

**3.1.12- SSC 20X**

NaCl	3 M
------	-----

Citrato de sódio	0,3 M
------------------	-------

Ajustar para pH 7,0 com HCl (Sambrook e Russel, 2001).

**3.1.13- Tampão de diálise**

NaCl	10 mM
------	-------

Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
-------------------	-------

MgCl <sub>2</sub>	10 mM
-------------------	-------

(Sambrook e Russel, 2001)

**3.2- Meios de cultura****3.2.1- Meio Luria-Bertani (LB)**

Triptona	10 g/L
----------	--------

Extrato de levedura	5 g/L
---------------------	-------

NaCl	10 g/L
------	--------

O pH foi ajustado a 7,2 - 7,4 e o meio esterilizado a 121°C por 15 min (Sambrook e Russel, 2001).

**3.2.2- Meio LB-ágar e LB-ágar semi-sólido**

Triptona	10 g/L
----------	--------

Extrato de levedura	5 g/L
---------------------	-------

NaCl	10 g/L
------	--------

Ágar	15 g/L (sólido) 7,0 g/L (semi-sólido)
------	---------------------------------------

O meio foi esterilizado a 121°C por 15 min a 20 min, após ter o pH ajustado a 7,2 - 7,4 (adaptado de Sambrook e Russel, 2001). Ampicilina foi adicionada a uma concentração final de 100 µg/mL no meio LB-ágar usado em plaqueamentos de bactérias transformadas. Após a solidificação do meio, as placas de transformação usadas em seleção por expressão de β-galactosidase recebiam 23 µL de x-Gal 2% (p/v) e 10 µL de IPTG 40 mM.



**3.2.3- Meio NZY**

NZ amina	10 g/L
NaCl	5 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2 g/L

O meio foi esterilizado a 121°C por 15 a 20 min, após ter o pH ajustado a 7,2 - 7,4 (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

**3.2.4- Meio L-15 suplementado**

Meio comercial L-15	1X
Streptomicina	100 U/mL
Penicilina	100 g/mL
Hepes	10 mM
Meio Triptose fosfato	10%
Soro fetal bovino inativado	10%

O soro fetal bovino foi inativado por aquecimento a 56°C durante 1 hora (Pitaluga *et al.*, 2008)

**3.2.5- Meio Triptose fosfato**

Triptose	20,0 g/L
Dextrose	2,0 g/L
Cloreto de sódio	5,0 g/L
Fosfato disódico	2,5 g/L

**3.3- Organismos utilizados****3.3.1- Insetos**

Os flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* utilizados para este estudo foram obtidos por captura realizada na Gruta da Lapinha, Sete Lagoas, MG. Os insetos trazidos do campo

foram mantidos no laboratório e apenas as primeiras gerações nascidas em colônia foram usadas para os experimentos.

### **3.3.2- Bactérias**

Neste trabalho foi utilizada a cepa de *Escherichia coli* XL1 Blue MRA (P2) (Stratagene), que foi mantida em placas de meio LB-ágar conforme recomendação da empresa Stratagene. Células competentes tratadas com CaCl<sub>2</sub> foram produzidas a partir da cepa de *E. coli* DH5α (Invitrogen<sup>®</sup>) e armazenadas a -80°C.

### **3.3.3- Células em cultura de *Lutzomyia longipalpis* (LL5)**

Para extração de DNA genômico foi utilizada a linhagem de células embrionárias de *L. longipalpis* LL5 (Tesh e Modi, 1983). As mesmas foram mantidas a 30° C em meio de cultura L-15 suplementado. Um estoque de células foi preservado a -70° C no mesmo meio contendo DMSO a 10% (v/v).

### **3.3.4- Bacteriófagos**

As bibliotecas genômicas foram feitas anteriormente em fago EMBL3 (Stratagene) (Ramalho-Ortigão, 2001) com DNA de células LL5 e estocadas em solução SM e clorofórmio a 4° C. Clones isolados da biblioteca foram mantidos da mesma forma.

## **3.4- Alimentação sangüínea de insetos**

Fêmeas de *L. longipalpis* foram colocadas em gaiolas com hamsters sadios anestesiados com 4 a 6 mg de cloridrato de cetamina (Ketalar<sup>®</sup>, Parke Davis) para se alimentarem durante 1 a 2 h. Somente os animais que possuíam sinais claros de terem ingerido sangue foram usados nos experimentos de RT-PCR. Todos os insetos nascidos na colônia, fêmeas e machos, receberam alimentação açucarada a 10% (p/v).

### ***3.5- Extração de Ácidos nucleicos de L. longipalpis***

#### **3.5.1- Extração de RNA**

##### **3.5.1.1- Preparo de material livre de RNases**

Todo o material utilizado para o trabalho com RNA, como vidraria e soluções, foi previamente tratado por 24 h com 0,1% (v/v) de dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma, EUA), seguido de autoclavação. A água milli-Q com 0,1% de DEPC, usada no tratamento de vidrarias e ponteiras, foi autoclavada e armazenada em frascos livres de RNases para posterior utilização em experimentos envolvendo RNA.

##### **3.5.1.2- Extração de RNA total**

Vinte insetos foram macerados em 500 µL de TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>) dentro de tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e o RNA foi extraído pela seguinte metodologia adaptada do protocolo do fabricante. Logo após a maceração foram adicionados mais 500 µL de TRIzol<sup>®</sup> e foi feita uma incubação de 5 min à temperatura ambiente. Em seguida as amostras receberam 1 mL de clorofórmio, foram agitadas vigorosamente por inversão, incubadas por 3 min à temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 FCR (Força Centrífuga Relativa – unidade equivalente a Gravidade) por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo evitando o carreamento de DNA genômico que se encontra na interfase aquosa/orgânica. Ao material do novo tubo foi adicionado 1 volume de isopropanol, o RNA foi precipitado por 3 min à temperatura ambiente e a decantação destes ácidos nucleicos foi feita por centrifugação a 12.000 FCR por 15 min a 4°C. O precipitado foi lavado três vezes com EtOH 75% (v/v) previamente gelado a -20°C. A cada lavagem o material foi agitado com auxílio de um vortex e centrifugado a 7.500 FCR por 5 min a 4°C. Ao final, o material foi seco à temperatura ambiente por aproximadamente 15 min e redissolvido em um volume de água que variou de 20 a 50 µL, dependendo da massa aparente do precipitado. A concentração de ácidos nucleicos foi medida em espectrofotômetro e os tubos com RNA foram armazenados a -70°C.

### **3.5.2- Extração de DNA genômico de células LL5**

DNA genômico de células LL5 de *L. longipalpis* foi extraído com o kit “illustra tissue and cells genomicPrep Mini Spin Kit” (GE Healthcare), de acordo com recomendações do fabricante.

## **3.6- Rastreamento molecular de biblioteca genômica**

### **3.6.1- Plaqueamento de população de bacteriófagos**

Bactérias XL1-Blue foram cultivadas em 50 mL de LB suplementado com 0,2% (p/v) de maltose e 10 mM de MgSO<sub>4</sub> por cerca de 16 h a 30°C. As células foram centrifugadas por 8 min a 1.000 FCR, suspensas em MgSO<sub>4</sub> 10 mM estéril e sua concentração ajustada para uma DO<sub>600</sub> de 0,5. Diferentes diluições dos sobrenadantes dos fagos foram adsorvidas a 200 µL de bactéria por 15 min a 37°C e plaqueadas com 3 mL de meio LB semi-sólido sobre placas de LB ágar previamente preparadas. Placas de lise cresceram durante 16 h a 37°C. Para fins de titulação a contagem foi feita nas placas que tinham de 30 a 300 unidades formadoras de placa (UFP). Os plaqueamentos usados para sondagem da biblioteca genômica foram feitos com cerca de 1.000 UFP por placa de Petri (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

### **3.6.2- Transferência e fixação de DNA recombinante de fagos à membrana de nitrocelulose**

Membranas de nitrocelulose umedecidas foram colocadas sobre as placas por 1 a 2 min e perfuradas assimetricamente com agulha para permitir posterior orientação. Em seguida, as mesmas foram banhadas uma vez durante 1 min em solução de desnaturação e 2 vezes durante 5 min em solução de neutralização. O DNA viral foi fixado ao suporte sólido por uma exposição a 120 mJ de luz ultravioleta em um forno Stratalinker UV - Crosslinker (Stratagene) (Ramalho-Ortigão, 2001).

### 3.6.3- Híbridações

Um fragmento de aproximadamente 420 pb foi amplificado por PCR a partir de um clone que continha a região 3' do cDNA L1chit1A (Ramalho-Ortigão, 2001). Os oligonucleotídeos empregados foram Quit His F e Quit His R (seção 3.12). O fragmento amplificado foi marcado com  $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP através do emprego de oligonucleotídeos randômicos (Kit Megaprime<sup>®</sup> DNA Labelling Systems – Amersham LifeScience). Imediatamente antes do uso, as sondas foram fervidas por 5 min e colocadas rapidamente no gelo até serem transferidas para a solução de hibridação (Ramalho-Ortigão, 2001).

As membranas contendo DNA recombinante dos fagos foram bloqueadas a 55°C com a solução de QuickHyb (Stratagene) por 1 h e a hibridação foi feita com a mesma solução e temperatura por 1,5 h. Ao final da hibridação as membranas foram lavadas 1 vez com SSC 1X – SDS 0,5% (p/v) à temperatura ambiente por 10 min, 3 vezes com a mesma solução à temperatura de 55°C por 30 min e exposta a filme radiográfico (X-OMAT XAR-5, Kodak) a -70°C (Ramalho-Ortigão, 2001).

### 3.6.4- Isolamento de clones positivos

Clones reconhecidos pela sonda de quitinase marcaram o filme radiográfico e as respectivas placas de lise foram transferidas com uma pipeta Pasteur da placa de Petri para um tubo de 1,5 mL contendo 1 mL de SM e 1 gota (aproximadamente 50  $\mu\text{L}$ ) de clorofórmio (Ramalho-Ortigão, 2001). Este material foi replaqueado e re-isolado.

## 3.7- Amplificação da população de bacteriófagos

Para amplificar as populações de fagos foram feitos plaqueamentos com um grande número de placas confluentes que permitiam somente a visualização de pequenas ilhas de bactérias remanescentes. Neste caso as placas de Petri foram colocadas a 37°C por 16 h na posição invertida (com a tampa para cima). Após o crescimento as mesmas receberam 5 mL de SM e foram postas em um agitador orbital por 4 h a 50 RPM na temperatura ambiente. O SM contendo a população de vírus foi transferido para um tubo cônico de 50 mL de polietileno e 0,1 mL de clorofórmio por placa inicial foi adicionado. Este material foi brevemente agitado em um vortex e centrifugado a 4.000 FCR, por 10 min e 4°C para a retirada do *debris* celular. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo cônico de 50 mL

de polietileno, recebeu 1 gota de clorofórmio (aproximadamente 50  $\mu\text{L}$ ) por placa inicial e foi armazenado a 4°C. As ampliações feitas por este método geralmente ficam com concentrações entre  $10^9$  e  $10^{10}$  UFP/mL. As novas populações virais foram tituladas para determinação exata da concentração de UFP (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

### **3.8- Preparação de DNA de bacteriófago em larga escala**

#### **3.8.1- Infecção com alta taxa de rendimento**

Uma colônia de XL1-blue foi inoculada em 5 mL de meio de cultura NZY sob a agitação de 200 RPM a 37°C, durante 16 h. Um mL da cultura foi transferido para um Erlenmeyer de 1 L contendo 250 mL de meio de cultura NZY previamente aquecido a 37°C. Este material foi mantido com agitação constante a 37°C por aproximadamente 3,5 h até que a  $\text{DO}_{600}$  de 0,5 fosse atingida. Neste momento foram adicionados  $10^{10}$  UFP à cultura, que em seguida foi mantida sob agitação a 37°C até aparecer *debris* celular, cerca de 3-5 h após a infecção. Por último foram adicionados 5 mL de clorofórmio para promover a lise das bactérias remanescentes (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

#### **3.8.2- Purificação de bacteriófagos por Cloreto de Césio**

A cultura lisada durante a infecção com alta taxa de rendimento (item 3.8.1) foi incubada à temperatura ambiente por 30 min com DNase 1 e RNase A em uma concentração final de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cada. Após precipitação por 1 h no gelo com NaCl na concentração de 1 M, o material foi centrifugado por 10 min a 11.000 FCR e 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado PEG 8.000 para a concentração final de 10% (p/v). Após outra precipitação de 1 h em água com gelo, o material foi centrifugado por mais 10 min a 11.000 FCR e 4°C. O novo sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo os fagos foi ressuspensão em 4 mL de SM e transferido para um tubo cônico de 15 mL de polietileno. Uma alíquota de 2,5 mL de clorofórmio foi adicionada ao material que foi então centrifugado a 3.000 FCR. A fase aquosa foi separada e colocada sobre um gradiente de CsCl previamente preparado em um tubo de polipropileno Beckman SW 41 nas concentrações de 1,45 g/mL, 1,50 g/mL e 1,70 g/mL. O material foi centrifugado a 22.000 RPM por 2 h no rotor Beckman SW 41 e os fagos foram coletados na interface 1,45 g/mL e 1,5 g/mL (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

### **3.8.3- Extração de DNA de bacteriófago**

O CsCl foi removido por diálise feita através de duas lavagens por 1 h à temperatura ambiente com 1 L de tampão em cada. O capsídeo do fago foi rompido através de uma incubação por 1 h a 56°C com 0,5% (p/v) de SDS, 20 mM de EDTA e 50 µg/mL de proteinase K. O DNA foi purificado por uma extração fenol/clorofórmio feita em 3 etapas. Após a incubação a 56°C o material recebeu 1 volume de fenol equilibrado e foi centrifugado por 5 min a 3.000 FCR. A fase aquosa foi separada, acrescida de 1 volume de fenol/clorofórmio (1:1) e centrifugada a 3.000 FCR por 5 min. A fase aquosa foi novamente separada e submetida à centrifugação de 3.000 FCR por 5 min na presença de 1 volume de clorofórmio. Por último o DNA foi precipitado da fase aquosa obtida na última centrifugação por adição de NaAc numa concentração final de 0,3 M e 2 volumes de etanol. Este material foi então centrifugado a 12.000 FCR por 10 min e o precipitado obtido foi lavado com etanol 70% (v/v). Após ser seco a temperatura ambiente, o DNA foi dissolvido em 500 µL de tampão TE pH 7,6 (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

### **3.9- PCR a partir do clone genômico de quitinase**

O DNA do clone genômico de quitinase em EMBL3 foi preparado de acordo com o protocolo de extração de DNA do bacteriófago (seção 3.8.3) e 0,3 µL foi usado como DNA molde para ampliações por PCR com Kits da Invitrogen<sup>®</sup>, Promega ou Stratagene. As condições de temperatura foram dadas em 35 ciclos nos quais a desnaturação era feita a 94°C por 30 segundos, o anelamento dos oligonucleotídeos a 55°C por 30 segundos e a extensão das moléculas a 72°C por 1 minuto. Antes do início dos ciclos, foi feita uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos e, ao término das reações, uma extensão prolongada de 7 minutos a 72°C. Na seção 3.12 são abordados os detalhes sobre a posição e seqüência dos oligonucleotídeos usados.

#### **3.9.1- PCR para amplificação da região entre os extremos codificantes do gene de quitinase LChit1**

As reações para amplificar a região entre os extremos codificantes do gene LChit1 foram realizadas com o oligonucleotídeo Quit N F pareado com o oligonucleotídeo Quit His R (figura 3.1). O primeiro se anela à região imediatamente após o códon de iniciação (ATG) e o segundo se anela à região imediatamente anterior ao códon de parada (TGA). Estas reações

foram realizadas seguindo recomendações do fabricante do kit de PCR empregado e continham tampão para Taq polimerase sem magnésio a 1X, MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM, dNTP a 0,2 mM, oligonucleotídeos a 0,5 µM, 2,5 unidades de enzima e água milli-Q em uma quantidade suficiente para 25 µL.

### **3.9.2- PCR para amplificação da região flanqueadora 5' do gene LIChit1 a partir do clone genômico**

As reações para amplificar a região flanqueadora 5' presente no clone genômico foram feitas com o oligonucleotídeo EMBL3 F, desenhado a partir do braço esquerdo do vetor EMBL3, pareado com o oligonucleotídeo Quit G R, que se anela no início do primeiro éxon do gene LIChit1 (figura 3.1).

As concentrações de quase todos os reagentes, assim como o volume reacional, foram os mesmos descritos na seção 3.9.1. A única variação foi que a concentração de MgCl<sub>2</sub> foi alterada para 4 mM.

### **3.9.3- PCR para amplificação das regiões internas do gene de LIChit1 e subcloná-lo fragmentado em vetor plasmidial**

Quatro reações para amplificar regiões internas do gene LIChit1 foram feitas com os seguintes pares de oligonucleotídeos: 1- Quit N F e Quit int 6 R; 2- Quit int 5 F e Chit 2 R; 3- Quit His F e Quit int 3 R; 4- Quit int 2 F e Quit His R (figura 3.1). Estas reações foram realizadas com oligonucleotídeos na concentração de 0,2 µM, tampão a 1X contendo 1,5 mM de Magnésio, dNTP a 0,5 µM, 1,25 unidades de Taq DNA polimerase e água milli-Q em uma quantidade suficiente para 50 µL. Os produtos foram purificados e clonados em vetor plasmidial (item 3.1).

## **3.10- PCR após transcriptase reversa (RT-PCR)**

### **3.10.1- Síntese de cDNA**

A primeira fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada com o emprego do kit SuperScript<sup>®</sup> III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen<sup>®</sup>), de acordo com recomendações do fabricante. A massa de RNA total utilizada por reação foi 1 µg e os iniciadores empregados foram oligonucleotídeos poli-T (oligo d-T). Os tubos contendo cDNA foram estocados a -20°C.



### 3.10.2- RT-PCR para amplificação dos produtos do gene *LlChit1*

As reações foram feitas com 0,4  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo, 2,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,2 a 1 mM de dNTP, 1  $\mu$ L do cDNA diluído 10 vezes, 2 U de enzima GoTaq<sup>®</sup> DNA Polimerase (Promega), tampão reacional na concentração de 1 X e água milli-Q suficiente para atingir um volume reacional de 25  $\mu$ L. Para amplificar a região 3' dos produtos do gene *LlChit1* foi utilizado o par de oligonucleotídeos Quit His F e Quit His R. Para amplificar o quadro aberto de leitura (ORF – *open reading frame*) completo dos produtos do gene *LlChit1* foi utilizado o oligonucleotídeo senso Quit N F pareado com o antisenso Quit His R (figura 3.1). As amplificações foram feitas em um termociclador programado para desnaturar a dupla fita de DNA por 45 seg a 94°C, permitir o anelamento dos oligonucleotídeos por 45 seg a 55°C e estabilizar a temperatura por 2 min a 72°C para extensão das novas fitas. Este ciclo foi repetido por 35 vezes após um aquecimento prévio de 5 min a 94°C para ativar a enzima. Em algumas reações para amplificar a região 3' dos produtos do gene *LlChit1*, foi utilizado um tempo de extensão reduzido de 45 seg. Os produtos amplificados foram visualizados em géis com um percentual de agarose que variou de 1 a 2%. A enzima Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase High Fidelity-PCR (Invitrogen<sup>®</sup>) foi empregada nas reações feitas com o intuito de amplificar o ORF completo para posterior clonagem.

Reações controles para amplificar o cDNA codificante para histona foram feitas em paralelo às reações para amplificar os produtos do gene *LlChit1*.

### 3.10.3- RT-PCR para testar atividade promotora

Com o intuito de determinar o sítio de origem de transcrição dos produtos do gene *LlChit1*, foram feitas reações com os oligonucleotídeos senso Quit prom 1 e Quit N F pareados com o oligonucleotídeo antisenso Quit cat R (figura 3.1). As condições reacionais ensaiadas foram as mesmas descritas na seção 3.10.2.

### 3.11- PCR a partir de cDNA de formas de splicing clonadas

A fim de confirmar o padrão de *splicing* dos produtos do gene *LlChit1*, foram feitas reações para amplificar a região 5'e 3' dos clones. A tentativa de amplificação da região 5' foi feita com os oligonucleotídeos senso Quit N F pareado com os oligonucleotídeos antisensos Quit RNA R2 e Quit int 6 R (figura 3.1). Para a amplificação da região 3' dos clones, as

reações foram feitas com o par de oligonucleotídeo Quit His F e Quit His R. As condições reacionais ensaiadas foram as mesmas descritas na seção 3.10.2.

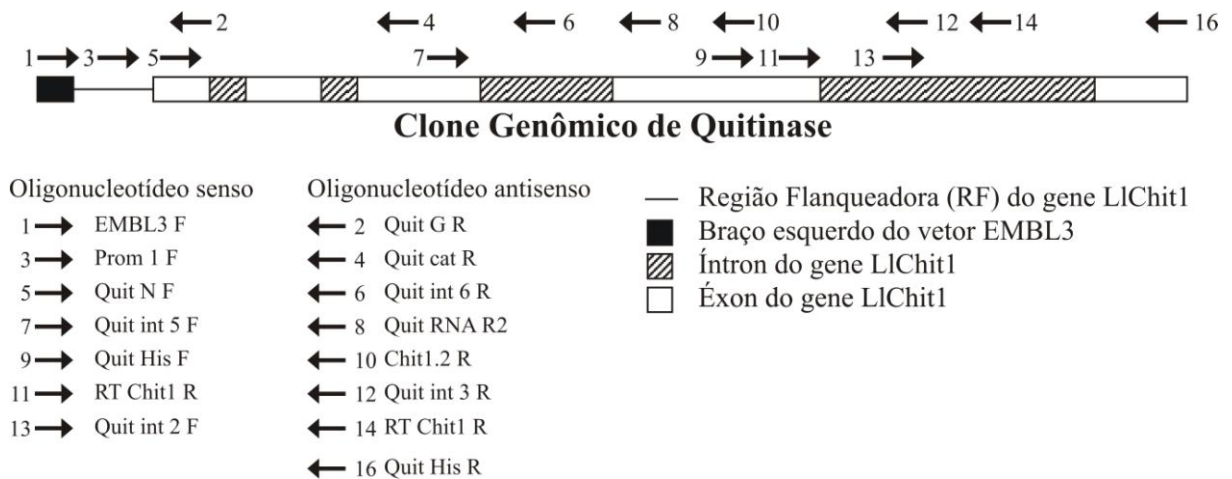
### 3.12- Oligonucleotídeos

A posição aproximada de anelamento de 15 oligonucleotídeos é mostrada na figura 3.1 e a seqüência dos mesmos é exposta nas tabelas 3.1 e 3.2.

O nome Chit1.2 R foi utilizado para o oligonucleotídeo que antes havia sido intitulado de Chit2 R (Ramalho-Ortigão, 2001). O objetivo foi diferenciá-lo do oligonucleotídeo anti-senso desenhado a partir do gene LIChit2.

Os 2 oligonucleotídeos utilizados na metodologia de PCR invertida e os 8 usados na PCR a partir de DNA genômico de células LL5 para amplificar seqüências codificantes para possíveis quitinases e proteínas similares a quitinases são abordados nas seções 3.22 e 3.25, respectivamente.

Os oligonucleotídeos desenhados para amplificar o cDNA de histona (Telleria, 2007) são mostrados na tabela 3.3.



**Figura 3.1)** Esquema mostrando a posição aproximada de anelamento dos oligonucleotídeos sobre a seqüência do clone genômico.

**Tabela 3.1** – Oligonucleotídeos senso (a numeração refere-se à legenda da figura 3.1)

Nome	Seqüência (5'-3')
1. EMBL3 F	CGT GAA AGG TAG GCG G
3. Prom 1 F	TGT TCT CTC ACT GGG GG
5. Quit N F	ATG AAG ACG TTG GTG TTT CTG
7. Quit int 5 F	CCG CTG ATG CCA CTG C
9. Quit His F	ACA AAG AAC GAT CAG T
11. RT Chit1 F	TTG TGT GGT CCA TTG AAA CAG ATG A
13. Quit int 2 F	CTA CGA AAG CAG GAA G

**Tabela 3.2** – Oligonucleotídeos anti-senso (a numeração refere-se à legenda da figura 3.1)

Nome	Seqüência (5'-3')
2. Quit G R	AAG GCG ACA CAC AGA AAC AC
4. Quit cat R	CGT TGT GCT GGA TAC TC
6. Quit int 6 R	ATC CGT GTA AAT CGT A
8. Quit RNA R2	CTC GAG CAT GAT CCG TGT AAA T
10. Chit1.2 R	ACT CCA CAA AGA ACG ATC
12. Quit int 3 R	TGC CTA AAT CCC CTA A
14. RT Chit1 R	CGC AAA GTG GTT TTA TTT TCC GTA
16. Quit His R	TCA GCA TTG CAC TAT ATG GGG CCA

**Tabela 3.3** – Oligonucleotídeos senso e anti-senso para Histona

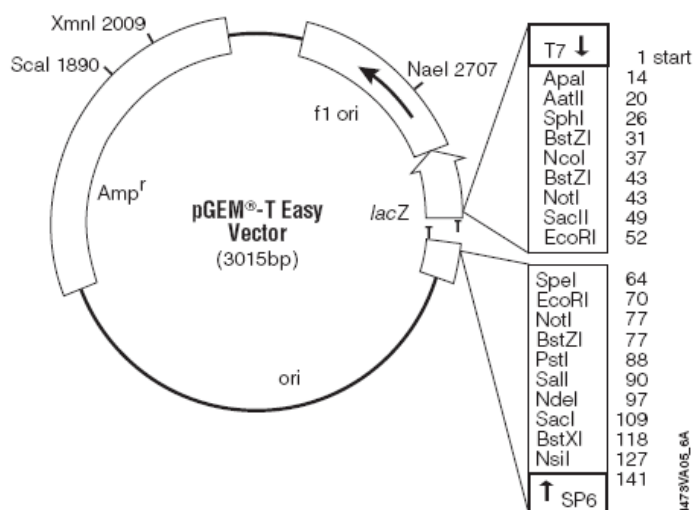
Nome	Seqüência (5'-3')
His F	GAA AAG CAG GCA AAG ACT CC
His R	GAA GGA TGG GTG GAA AGA AG

### 3.13- Purificação de produtos de PCR para posterior clonagem em vetor plasmidial ou sequenciamento direto

As extrações foram realizadas com o emprego do kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), conforme recomendações do fabricante. Aproximadamente 10 a 40% do volume reacional de cada PCR foi corrido em eletroforese para uma visualização inicial. O volume restante das reações que amplificaram produtos inesperados foi corrido em eletroforese e os fragmentos foram extraídos separadamente a partir de pedaços cortados do gel de agarose. O volume restante das reações que amplificaram produtos únicos foi diretamente purificado sem ser aplicado em gel. Quando possível, a purificação direto da PCR foi preferencialmente feita para evitar exposição do DNA amplificado à luz ultravioleta do transiluminador. Após a purificação, um décimo do volume final das amostras purificadas foi corrido em eletroforese e o DNA foi quantificado por densitometria.

### 3.14- Ligação de produtos de PCR a vetor plasmidial

Após visualização em gel de agarose, os fragmentos amplificados por PCR que seriam clonados foram purificados e ligados ao vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) (figura 3.2). As reações de ligação foram feitas de acordo com recomendações do fabricante em um volume reacional de 10  $\mu$ L.



**Figura. 3.2)** Mapa do plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega).

### ***3.15- Transformação de células competentes***

Alíquotas de 2 e 8  $\mu\text{L}$  das reações de ligação foram incubadas com células competentes DH5 $\alpha$  por 30 min no gelo. Imediatamente após esta incubação, foi feito um choque térmico em banho-maria a 42°C por 1 min. Em seguida as bactérias receberam 250  $\mu\text{L}$  de meio de cultura LB e foram agitadas a 200 RPM por 1 h a 37°C. Por último, o material foi plaqueado sobre placas de LB ágar contendo ampicilina, X-gal e IPTG.

### ***3.16- Preparação de DNA plasmidial por fervura***

Cada colônia branca das placas de transformação foi transferida para um tubo de cultura com 3 mL de meio LB com 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina e incubada com agitação de 200 RPM a 37°C por uma noite. A cultura foi centrifugada a 14.000 RPM por 1 min em microcentrífuga e ressuspensa com auxílio de um Vortex em 400  $\mu\text{L}$  da mistura de STET, lisozima a 1  $\text{mg}/\text{mL}$  e RNase A a 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O material foi fervido por 2-3 min e centrifugado a 14.000 RPM por 15 min imediatamente. O precipitado foi removido com um palito e o sobrenadante foi incubado por 2 min com 400  $\mu\text{L}$  de isopropanol à temperatura ambiente. Depois de centrifugado a 14.000 RPM por 15 min, o novo sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado com etanol 70%, seco por aproximadamente 15 min a 37°C e ressuspensão em 35  $\mu\text{L}$  de água milli-Q.

### ***3.17- Digestão com enzimas de restrição para confirmar a ligação dos produtos de PCR ao vetor plasmidial***

Alíquotas de 2  $\mu\text{L}$  dos plasmídios preparados por fervura (seção 3.16) foram submetidas a uma digestão com 4 U da enzima Eco RI (BioLab e Fermentas) por 1-2 h a 37°C, de acordo com recomendações do fabricante. O inserto foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

### ***3.18- Eletroforese em gel de agarose***

A maior parte das eletroforeses foram realizadas em gel de 11x14 cm, com 1 a 2% (p/v) de agarose e 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de brometo de etídio ( $\text{C}_{21}\text{H}_2\text{OBrN}_3$ ), em tampão TAE 1X a 50 mA. Após a corrida, os géis foram visualizados em transiluminador de luz UV e fotografados

com uma câmera digital. Os fragmentos de DNA foram comparados a marcadores de peso molecular  $\theta$ X,  $\lambda$ -Hind III e 100 pb DNA Ladder (Life Technology<sup>®</sup> e Fermentas). Sempre que necessário, as imagens dos géis foram utilizadas para uma quantificação relativa do DNA por densitometria utilizando o programa Image Processing and Analysis in Java (ImageJ) disponível no sítio do “National Institutes of Health” (NIH – EUA) (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)

### ***3.19- Seqüenciamentos***

Fragmentos amplificados por PCR e clonados em plasmídeo foram seqüenciados com os oligonucleotídeos T13 senso e antisenso que se anelam neste vetor. Fragmentos maiores que 800 pb também foram seqüenciados com oligonucleotídeos internos que se anelam diretamente na região amplificada por PCR.

Para iniciar o seqüenciamento do gene *LIChit1*, foram preparadas reações diretamente a partir do DNA do clone genômico e a partir do produto amplificado por PCR como descrito na seção 3.9.1. Nestas reações de seqüenciamento foram utilizados os oligonucleotídeos Quit N F, Quit int 5 F, Quit His F, Quit int 2 F, Quit int 6 R, Chit1.2 R, Quit int 3 R e Quit His R. Posteriormente, fragmentos amplificados como descrito na seção 3.9.3 foram clonados e seqüenciados com oligonucleotídeos que se anelam no vetor plasmidial.

Os seqüenciamentos foram realizados na Plataforma de Seqüenciamento PDTIS/FIOCRUZ, em um seqüenciador “3730 DNA Analyzer” (Applied Biosystems<sup>®</sup>).

### ***3.20- Análise de seqüências***

#### **3.20.1- Análises preliminares dos resultados do seqüenciamento**

As seqüências foram inicialmente analisadas com o emprego dos programas PHRED e VecScreen disponibilizados através dos recursos da Plataforma de Seqüenciamento PDTIS/FIOCRUZ. Após retirada das regiões de baixa qualidade ou correspondentes ao vetor usado nas clonagens, as seqüências contíguas foram montadas com o auxílio do programa CAP3 (Huang e Madan, 1999).

### **3.20.2- Análises de seqüências do gene *LlChit1*: identificação das regiões de *splicing* e possíveis seqüências regulatórias do promotor**

A identificação de íntrons e éxons do gene *LlChit1* foi feita com o emprego do programa BlastN (McGinnis e Madden, 2004) para comparar seqüências de cDNA com a seqüência do clone genômico e possíveis sinais de *splicing* foram identificados manualmente.

A análise de possíveis promotores mínimos nas regiões flangeadoras do gene *LlChit1* foi feita com o emprego do programa 1999 Neural Network Promoter Prediction (NNPP) versão 2.2, disponível no sítio do Berkeley Drosophila Genome Project ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)). A identificação de possíveis elementos reconhecidos por fatores de transcrição foi feita através da comparação das seqüências obtidas com o banco de dados TransFAC (Wingender *et al.* 1996) (Wingender, 2008).

### **3.20.3- Análises das seqüências de aminoácidos**

A tradução das seqüências obtidas a partir do gene *LlChit1* codificantes para proteína foi feita com o programa Translate Tool disponível no sítio do ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>). A análise de domínios conservados foi feita com os programas SMART (Letunic *et al.*, 2009), InterPROscan (Hunter *et al.*, 2009), sinalP 3,0 (Olof *et al.*, 2007) e CDD (Marchler-Bauer *et al.*, 2009). Alinhamentos globais de seqüências de proteína foram feitos com o programa ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007).

### ***3.21- Southern blot e PCR com DNA do clone genômico para confirmar número de cópias do gene *LlChit1****

O DNA do clone genômico foi digerido com as enzimas Bgl II, Eco RI, Hind III, Pvu II, Pst I e Sal I. Os fragmentos obtidos com a digestão foram resolvidos por eletroforese em gel 1% e submetidos à uma transferência por capilaridade com tampão SSC 10X durante 16 h (adaptado de Sambrook e Russel, 2001). Durante esta etapa o DNA foi passado a uma membrana de “nylon” (Hybond-N) e a fixação do mesmo a este suporte sólido foi feita como descrito na seção 3.6.2. A hibridação foi feita como descrito na seção 3.6.3.

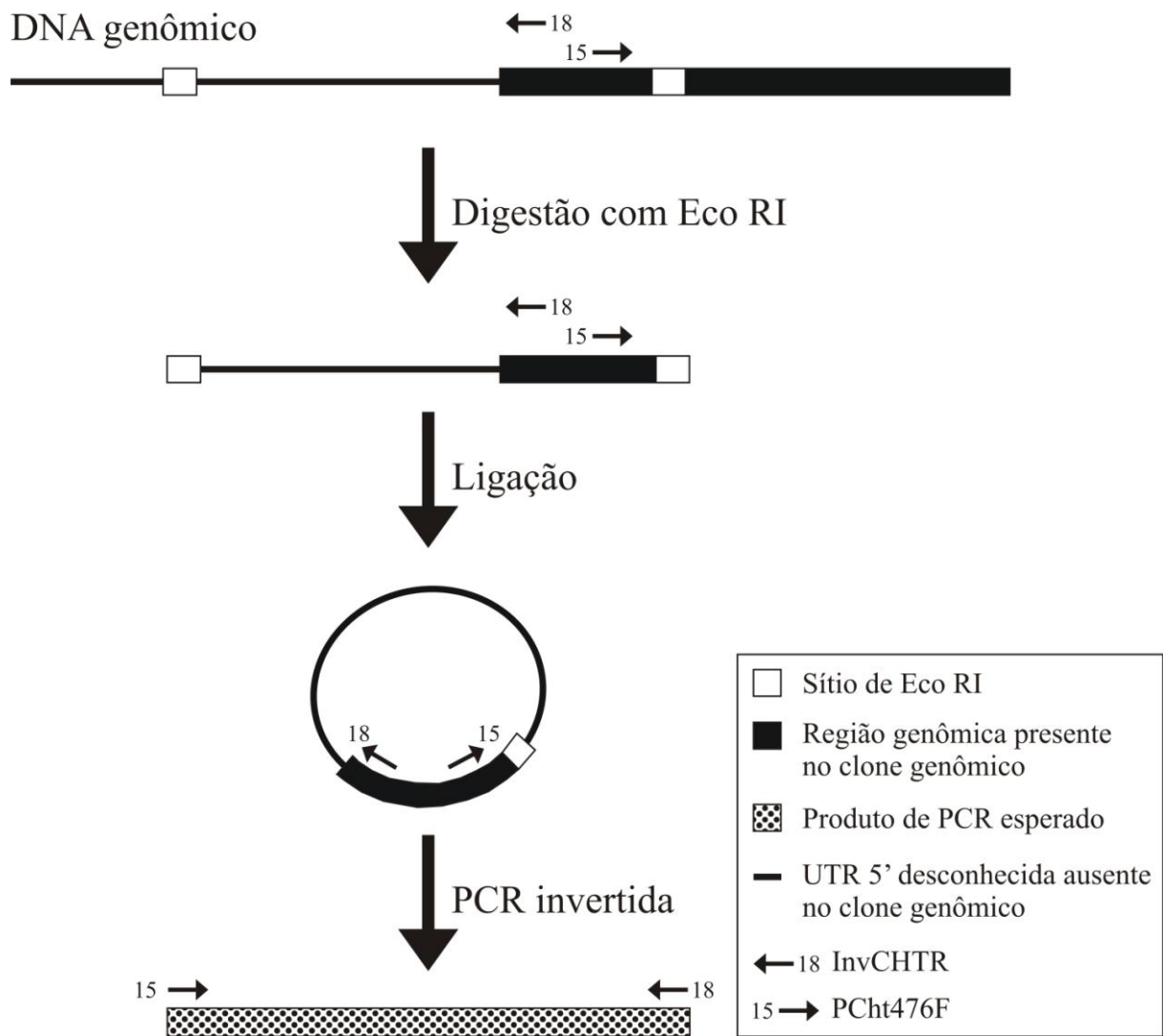
Duas PCRs foram feitas com emprego dos oligonucleotídeos RT Chit1 F e R (figura 3.1), utilizando DNA do clone genômico e de células LL5 como molde. As condições de temperatura foram dadas em 35 ciclos, onde a desnaturação foi feita a 94°C por 45 seg, o anelamento dos oligonucleotídeos foi feito 60°C por 45 seg e a extensão das novas fitas foi

feita a 72°C por 2 min. Antes do começo da reação foi realizado um aquecimento a 94°C por 5 min e ao termino a 72°C por 15 min. As reações foram feitas com 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 2 U de enzima GoTaq<sup>®</sup> DNA Polimerase (Promega), tampão reacional na concentração de 1 X e água milli-Q suficiente para atingir um volume reacional de 25 µL.

### **3.22- PCR invertida**

Após o seqüenciamento da região do clone genômico correspondente ao gene de quitinase e região flanqueadora 5', foi empregada a metodologia de PCR invertida (Takagi *et al.*, 1992) para amplificar regiões a montante do gene LlChit1 não clonadas (figura 3.2). Uma amostra de DNA genômico preparada a partir de células LL5 foi digerida com 4 unidades de EcoRI por aproximadamente 4 horas a 37°C. O DNA digerido foi empregado em uma reação de ligação na qual a sua concentração estava de acordo com a proporção de 25 ng para 100 µL de volume reacional. Nesta condição de concentração é favorecida a auto-ligação de fragmentos gerados pela digestão formando círculos de DNA em detrimento da formação de concatameros. A ligação foi feita com 3 U de T4 DNA ligase a 16°C por cerca de 16 horas. Um µL da reação de ligação foi utilizado em uma PCR com os oligonucleotídeos invCHTR (5' TTC.TAT.TGG.GTT.GTC.CTA.CAA.TG 3') e PChit476F (5' CAG.ACT.CGA.GCC.AAT.AGA.ATT.TAT.CCA.ATG.AC 3'). Estes oligonucleotídeos foram desenhados a montante de um sítio de Eco RI revelado a partir de seqüências do clone genômico (figura 3.2). As condições de temperatura foram dadas em 35 ciclos nos quais a separação de fitas foi feita a 94°C por 45 seg, o anelamento dos iniciadores foi realizado a 55°C pelo mesmo intervalo de tempo e a dupla fita foi estendida a 72°C por 2 min. Foi empregada a enzima Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase High Fidelity-PCR (Invitrogen<sup>®</sup>) em um meio reacional que continha 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM dNTP, tampão apropriado a 1 X e água milli-Q suficiente para atingir um volume final de 25 µL. Produtos amplificados foram clonados e seqüenciados.





**Figura. 3.3)** Esquema mostrando estratégia de PCR invertida baseada em sítio de Eco RI seqüenciado a partir do extremo 5' do clone genômico.

### **3.23- Busca por seqüências de genes ortólogos de quitinase em banco de dados de EST de L. longipalpis e P. papatasi**

Seqüências de cDNA de *L. longipalpis* e *P. papatasi* depositadas no GenBank (NCBI) foram baixadas e posteriormente agrupadas com o programa CAP3. Os grupos de seqüências contíguas e os “singlets” foram traduzidos com o programa transeq (EMBOSS) nas 6 possibilidades de janela de leitura, produzindo dois bancos de dados de seqüências de aminoácidos, um para cada espécie. Estes últimos foram sondados com o emprego do programa HMMER 2.3.2 (Durbin *et al.*, 1998) e o arquivo HMM-Pfam Glyco\_hydro\_18 (identificador PF00704) coletado do banco de dados de famílias de proteína do “Wellcome Trust Sanger Institute” (Finn *et al.*, 2008). Pfam é um banco de dados de alinhamentos múltiplos e “modelos escondidos de Markov” (HMM) de domínios conservados em famílias de proteína (Bateman *et al.*, 1999). Neste trabalho o termo Pfam também é utilizado para mencionar o arquivo HMM baixado deste banco de dados.

### **3.24- Filogenia de genes de quitinase**

Seqüências primárias de possíveis quitinases e a proteínas similares a quitinases de insetos foram extraídas do GenBank com base nos estudos filogenéticos feitos por Zhu *et al.* (2008a). O nome, espécie de origem e identificar no GenBank referentes a cada uma destas seqüências são mostrados no anexo I. Seqüências de possíveis quitinases e proteínas similares a quitinases de *L. longipalpis* e *P. papatasi* anotadas a partir de EST depositadas no GenBank foram adicionadas às análises.

Através da utilização do programa SMART foram selecionadas regiões destas seqüências correspondentes ao domínio catalítico de quitinases. Alinhamentos múltiplos com as seqüências correspondentes aos domínios catalíticos foram feitos com o emprego do programa ClustalW2. Árvores filogenéticas foram montadas com o emprego do programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

### 3.25- PCR a partir de DNA genômico de células LL5 para amplificar seqüências codificantes para possíveis quitinases e proteínas similares a quitinases

Quatro PCRs a partir de DNA genômico extraído de células LL5 foram feitas com oligonucleotídeos desenhados com base nas seqüências de EST de *L. longipalpis* codificantes para possíveis quitinases e proteínas similares a quitinases. A seqüência destes oligonucleotídeos é mostrada na tabela 3.4. Estas reações foram feitas com 2 U de enzima GoTaq<sup>®</sup> DNA Polimerase (Promega), 0,4  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, tampão apropriado a 1 X e água milli-Q suficiente para atingir um volume final de 25  $\mu$ L. Os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

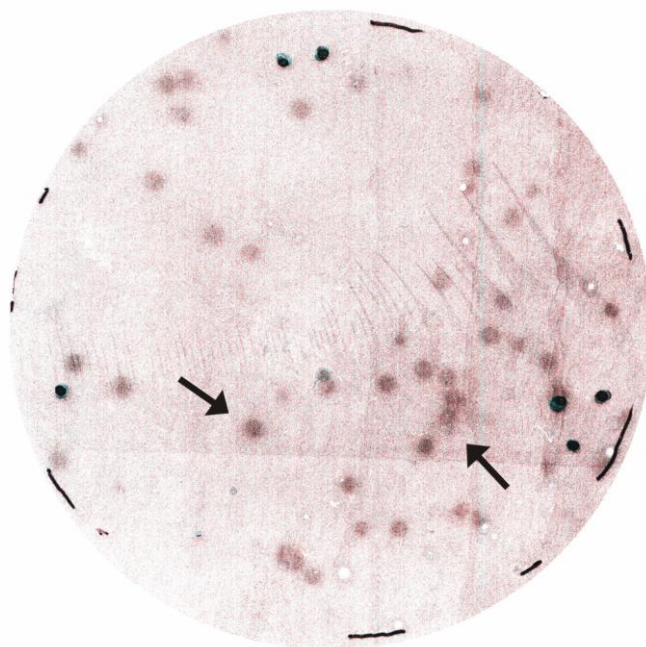
**Tabela 3.4** – Oligonucleotídeos desenhados com base nas seqüências de EST de *L. longipalpis* codificantes para proteínas similares a quitinases.

Nome do gene	Nome do Oligonucleotídeo	Seqüência (5'-3')
LlChit2	Cht2F	CCC CGA AGA ACG GAA GAT
	Chit2R	GCA GCC TTC CCT TGA CAT A
LlChit3	Cht3F	AGG GTG GCT GGA CTA CTG T
	Chit3R	CGG GCA TAT CCG GTC TTT
LlIGDF	IGDFF	CGA GGA GCA CAA GGA GGA A
	IGDFR	CCC AGT GAT GCC CGA AT
LlChit10	Cht10F	CAC GGG CAT TGG GAT AA
	Chit10R	TTC CTG CGG ACT TCA CTC A

## IV- RESULTADOS

### ***4.1- Isolamento e seqüenciamento de um clone genômico contendo o gene codificante para quitinase***

Com o intuito de estudar seqüências envolvidas no mecanismo de controle gênico que regula a expressão da quitinase em fêmeas adultas após a alimentação sanguínea, foi inicialmente feita uma sondagem de uma biblioteca genômica de *L. longipalpis*. Esta biblioteca foi feita anteriormente com DNA de células LL5 durante a tese de doutorado de Ramalho-Ortigão (2001). Um fragmento de PCR com aproximadamente 430 pb, correspondente ao extremo 3' do cDNA de quitinase LIChit1A, codificante para a quitinase encontrada em fêmeas adultas alimentadas com sangue (Ramalho-Ortigão e Traub-Csekö *et al.* 2003), foi marcado radioativamente e utilizado como sonda. Isso possibilitou o isolamento do clone BGL1 5.1.3 que continha o gene de interesse. Esse clone, posteriormente renomeado para LIChit1G, foi re-isolado três vezes até que todos os “plaques” transferidos para a membrana de nitro-celulose foram reconhecidos pela sonda usada na hibridação (figura 4.1).

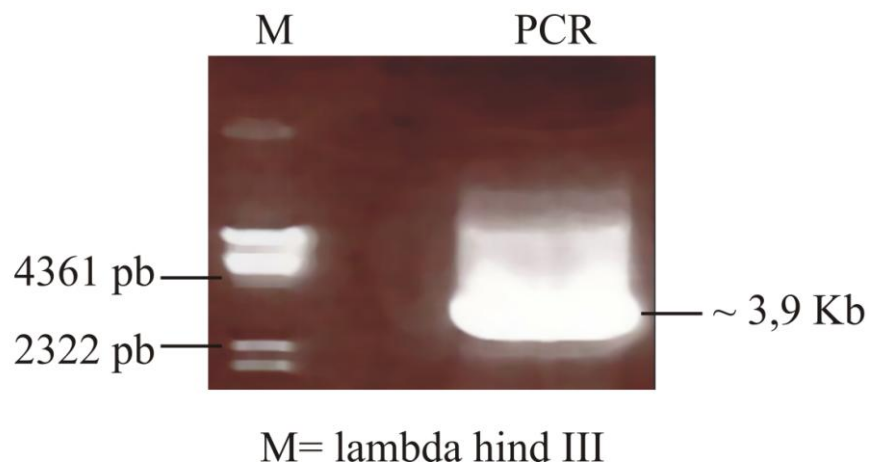


**Figura. 4.1)** Auto-radiografia do experimento de hibridação que possibilitou o isolamento do clone genômico de quitinase – LIChit1G.

#### 4.2- Amplificação por PCR e seqüenciamento do gene contido no clone genômico *Llchit1G*

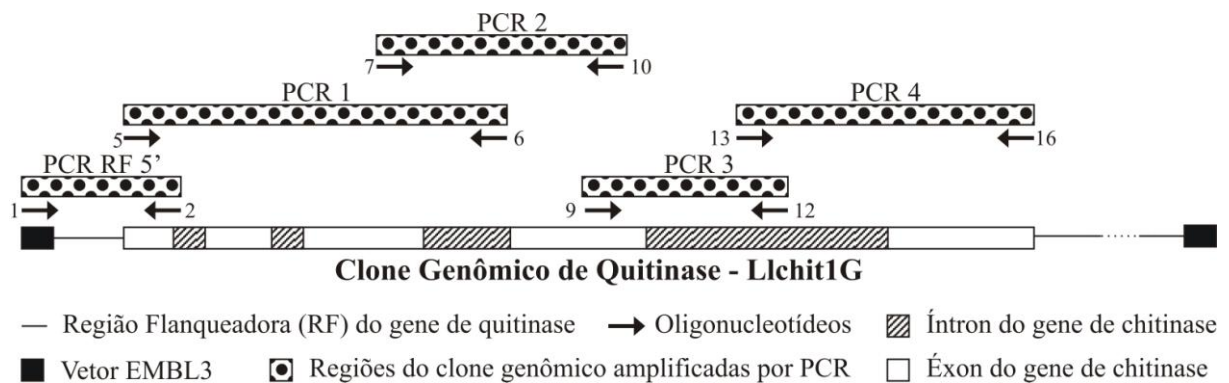
Um fragmento de 3.867 bp foi amplificado a partir do clone LlChit1G usando oligonucleotídeos que se anelam nos códons de iniciação e de parada do cDNA. Na figura 4.2 é mostrado um gel de agarose 1% (p/v) com o produto amplificado a partir do LlChit1G. Comparando o tamanho deste fragmento com os 1.422 pb do cDNA LlChit1A, foi possível prever a existência de íntrons antes de se iniciarem os seqüenciamentos (figura 4.2). Aproximadamente, 75% da região entre os extremos codificantes foram seqüenciados a partir deste fragmento amplificado por PCR. Todas as tentativas de seqüenciamento com reações feitas diretamente a partir do DNA do clone genômico não foram bem sucedidas.

#### PCR para amplificar todo o gene LlChit1



**Figura 4.2)** Amplificação por PCR do gene de quitinase a partir do clone genômico LlChit1G.

Para finalizar os seqüenciamentos, quatro regiões do gene de quitinase foram amplificadas por PCR a partir do clone LlChit1G (figura 4.3), sub-clonadas em vetor pGEM T-easy e seqüenciadas com oligonucleotídeos que se anelam no plasmídeo. Com a seqüência completa do gene (figura 4.3) foi possível identificar 4 íntrons que interrompem a região codificante do cDNA LlChit1A. A região flanqueadora 5' presente no clone genômico foi amplificada utilizando-se oligonucleotídeos que se anelam no vetor da biblioteca genômica e no primeiro éxon do gene (figura 4.4). Esta reação amplificou um fragmento de 550 pb que também foi clonado e seqüenciado, indicando a existência de regiões reguladoras logo a montante do primeiro éxon (item 4.3). Este fragmento contém 499 pb correspondentes a região flanqueadora 5' e 51 pb a jusante do códon de iniciação do gene.



**Figura 4.3)** Esquema mostrando os fragmentos amplificados por PCR para subclonar em vetor plasmidial o gene de quitinase LlChit1 e sua região flanqueadora 5'. A numeração dos oligonucleotídeos corresponde à usada na figura 3.1.

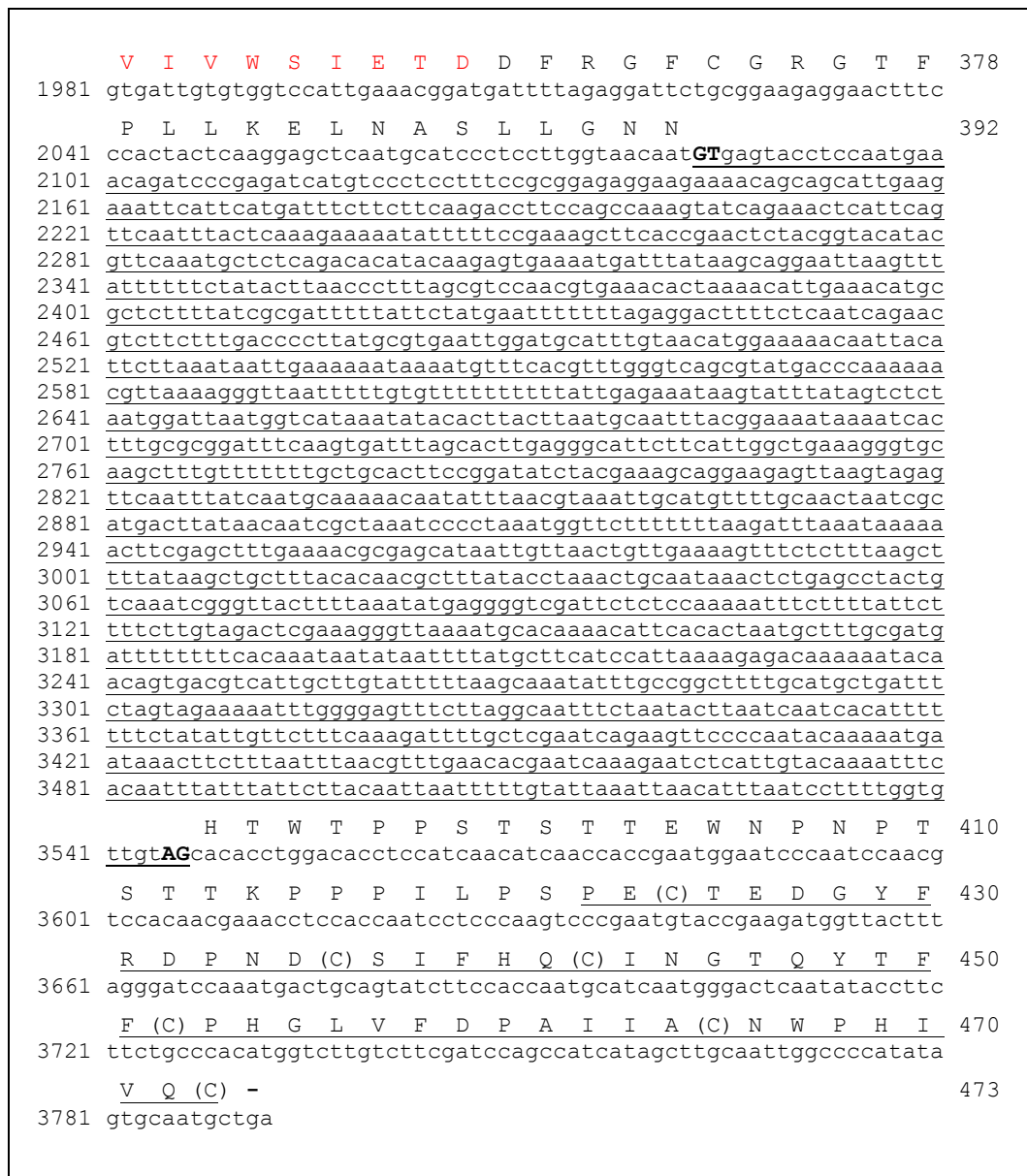
Na figura 4.4 é mostrada a seqüência dos 5 éxons que codificam a cadeia primária de aminoácidos do LlChit1A e os 4 respectivos íntrons. No início e final de cada íntron foram encontrados os dois pares de nucleotídeos que são amplamente conservados na sinalização de *splicing*: GT no sítio doador e AG no sítio aceptor.

O primeiro éxon do gene de quitinase codifica para uma seqüência de 20 aminoácidos que, de acordo com o programa sinalP 3,0, possui uma probabilidade de 0,998 de ser um peptídeo sinal. Conforme análises feitas com o mesmo programa, a ligação entre os aminoácidos 19 e 20 tem uma probabilidade de 0,618 de ser um sítio de clivagem permitindo a retirada do peptídeo sinal da proteína madura.

Como evidenciado na figura 4.4, o domínio catalítico da família 18 de glicosídeo hidrolases, característico das quitinases de insetos, é codificado pelos éxons 2, 3 e 4. Essa família de proteínas possui um núcleo catalítico definido por 9 aminoácidos (PROSITE acesso PS01095) que correspondem ao padrão: [LIVMFY]-[DN]-G-[LIVMF]-[DN]-[LIVMF]-[DN]-x-E (onde x corresponde a qualquer um dos 20 aminoácidos naturais). No gene LlChit1 este núcleo catalítico é representado pelos aminoácidos F, N, G, L, D, V, D, W e E (posição 138 a 146) codificados pelo terceiro éxon.

O quinto e último éxon do gene de quitinase codifica para a seqüência da proteína correspondente ao domínio de ligação à quitina (figura 4.4). Essa região é separada da porção codificante para o domínio catalítico de glicosídeo hidrolase pelo maior dos quatro íntrons, que possui 1464 pb. Na seqüência de aminoácidos codificada por este éxon podemos identificar 6 cisteínas conservadas pertencentes ao domínio de ligação à quitina. A análise destes resíduos conservados é abordada no item 4.6.

	M K T L V F L C V A L S I L G L A V T* E	20
1	atgaagacgttgggtgtttctgtgtgctgccttatcaattttgggcttggcagtaactgaa	
61	a <b>GT</b> gagagtgttttttttttctctcgtgtgatatataattttgtgacgcaaattcttcattt	
	K K I V C Y H G T W S Y Y R Q G	36
121	ttttacgtat <b>AG</b> aaaaaattgtctgctatcacggtacgtggctcctactaccggcagggaa	
	N G K F G V A Q I D P F L C T H L V Y T	56
181	atggaaaattcggagtagcacaattgatccattcctctgtacgcatttggtttatacgt	
	F F G I S S D G G I R N L D P Y L D L D	76
241	ttttcgggatttcttccgagggtgggattagaattctcgatccttacttggatctcogatg	
	E N Y G L G N I R K F N E L K K V N P K	96
301	agaactacggccttgggaatataagaaaattcaatgaactcaagaaagttaatcccaaat	
	L K T I A G V G G W N E G S V T F S Q	115
361	tgaagacaatcgccggtgttggaggatggaatgaaggaagtgttacattttctcag <b>GT</b> ca	
421	gtgaaacagatctcacgatttttaagaagatttcattttgagactttttcctctatt <b>AG</b> g	
	V V N D P R K R Q N F V K N S L E F L K	135
481	tcgtcaatgatccacgcaagaggcagaatttcgtgaagaattcgttggaaatttttgaaaa	
	K Y N <b>F N G L D V D W E</b> Y P A Q R G G N	155
541	aatacaattttaatggtcttgacgttgactgggagtatccagcacaacgtggagggaaatc	
	Q D K D K E A Y T L L L K E L S E F L H	175
601	aggataaggataaggaagcctacactctcctcctcaaggaactctcggaaattcctacatc	
	P K G Y S L S A A V A S A E F S A K I S	195
661	ctaaaggctacagcctctccgctgctgtagcatcagcggaaattttcagctaagatctctt	
	Y N I A E V S K	203
721	acaacatcgctgaggtttcaaa <b>GT</b> aagttcaaaggaatttttttagggaagattgggctaa	
781	agctattcfaatgagtatgaaaaatggaaaattaattaaaatttgcttttaaaacattt	
841	tttgcaaggtttgagaacgtttttgttcaaaaatttaagatctaaagaccgtaaaaaat	
901	caaaatcccaataattaataaatttgggaaagtaattttattcataaaaaacttaattttac	
961	actcaaagctttcttaataaattcattttttcccttaatttttttccaactcaaacat	
1021	tgaaaaggacgcttgcgaattttttcacaaagatttgtttccacaaattttaaattttc	
1081	cggttatattgaaagctaaaattatcaataactaaaacttacttttctctatgtgttttgag	
1141	agttaataggtcaggcacaaaaactcttactgataatgaaaattccctttaatccaatg	
1201	ccaacaatgctaagtcaagtggcaccatcttattgaacttgacacaaatttaaatcaaa	
1261	tattacacaaagggggcgctaattgtaccaaagcgcaaatggattgaattttaaaagaa	
1321	acgaataattataacgcccagaagtaacaagaacagaaactttctcaagaatttcccgatt	
1381	tccttttgaaaatcaatttttgtgctgcaataacttccagctcttcttatcttctca	
1441	agttcaagattaatatcaagagtcttggggattgtcttgtctgcaaaaatatgactgaag	
	Y L D F I G V M T Y D L H G S	218
1501	cacctctcttgc <b>AG</b> atatctggatttcattggggtaatgacgtatgatttacacggatca	
	W D P K I G N N A P L Y A G S W E Q T E	238
1561	tgggatccaaagattgggaataatgcgccattgtatgcaggatcgtgggaacaaacggag	
	L E K Q L N V D A A I K Y W L S N G G A	258
1621	cttgagaagcaattaatggtgacgcccgtataaagtactggctcagcaatggagggtgcc	
	P E K L L L G V P L Y G R G F R M V N G	278
1681	cctgagaagctcctcctgggcttccactgtacggctcgtggcttccgcatggttaatggt	
	Q S K P G S V H G G P C Q A G P Y T Q T	298
1741	cagagtaaacaggatccgttcacggaggccttgtcaggctgggcccactactcaaac	
	P G M M G F N E L C E K R R N E K W I D	318
1801	cccggcatgatgggcttcaatgagctctgcgagaagcgtcggaatgaaaaatggattgat	
	F W D D E Q F V P Y S T K N D Q W I G F	338
1861	ttctgggatgatgagcaatttgttccgtactccacaaagaacgatcagtgattggattt	
	D D E K S I K F K S N Y V N S H N L G G	358
1921	gatgatgagaagagtataaaattcaaatcaaacactacgtcaacagccacaatcttgggtgg	



**Figura 4.4)** Gene de quitinase LlChit1 seqüenciado a partir do clone genômico. Números do lado esquerdo indicam a posição dos nucleotídeos e números do lado direito indicam a posição dos aminoácidos codificados pelo RNA Llchit1A. \*: possível sítio de clivagem do peptídeo sinal. Caracteres sublinhados: íntrons. Caracteres em maiúscula: dois nucleotídeos potencialmente implicados em *splicing*. Aminoácidos em vermelho: domínio catalítico conservado em glicosídeo hidrolases da família 18. Retângulo: núcleo catalítico deste domínio. Aminoácidos sublinhados: sítio de ligação à quitina. Parênteses: seis cisteínas conservadas.



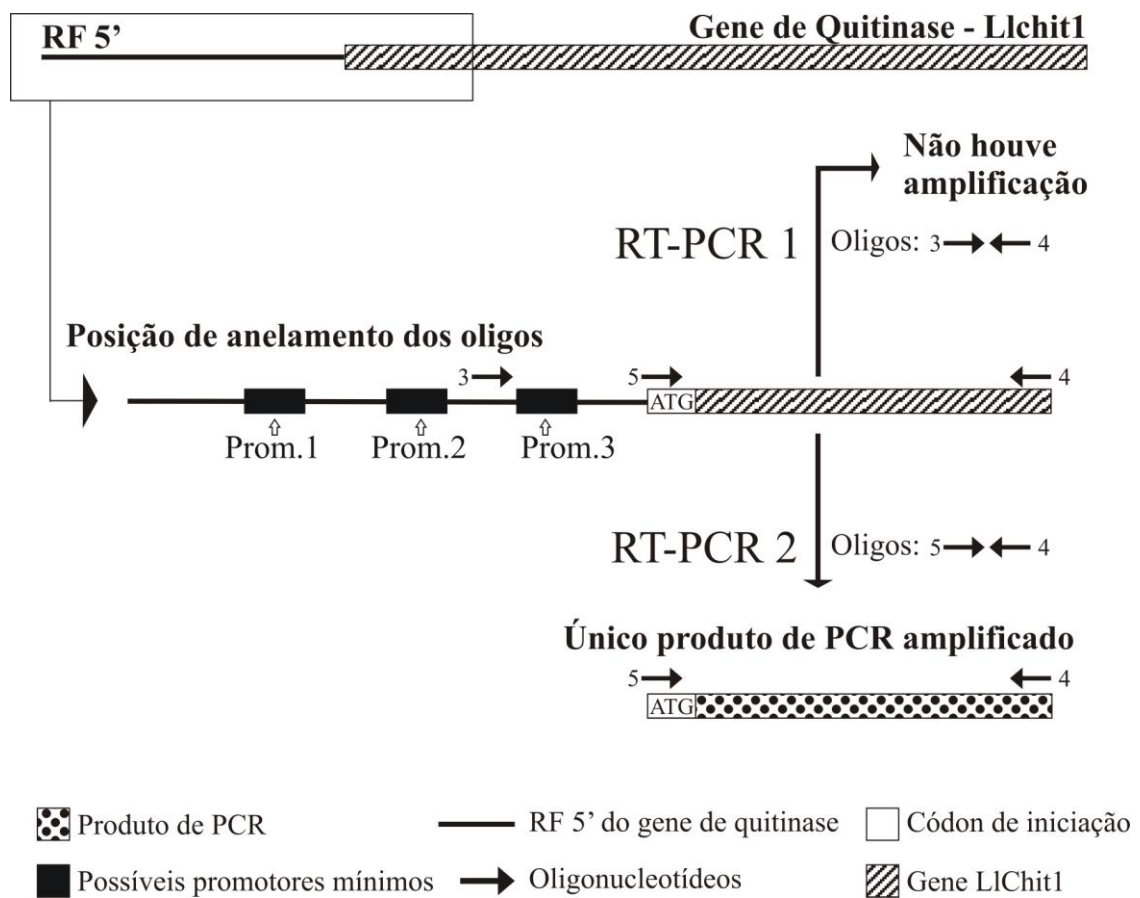
### ***4.3- Possíveis seqüências reguladoras encontradas a montante do gene LlChit1***

A metodologia de PCR invertida possibilitou a amplificação de um fragmento com 1.134 pb que foi clonado e seqüenciado. Através deste procedimento foram revelados 771 pb à montante dos 499 pb da região flanqueadora 5' presente no clone genômico LlChit1G. Ao todo foram seqüenciados 1.270 pb que antecedem o códon de iniciação do gene LlChit1.

Por análise com o programa NNPP 2.2 foram encontrados 3 possíveis promotores mínimos que antecedem este gene. O termo “promotor mínimo” é empregado para mencionar a região que poderia servir de ancoradouro para a RNA polimerase começar a transcrição, pois possui elementos como TATA-box, GC-box, CAAT-box e sítio de início de transcrição. Para averiguar quais promotores mínimos eram ativos, foram feitos experimentos de RT-PCR com 2 oligonucleotídeos senso (figura 4.5, números 3 e 5), pareados com um único oligonucleotídeo antisense (figura 4.5, número 4). Os oligonucleotídeos 3 e 5 se anelam logo após o sítio de início de transcrição do segundo e terceiro promotores, respectivamente. O oligonucleotídeo 4 se anela dentro do núcleo catalítico da enzima, justamente a região com menor probabilidade de ser retirada do RNAm durante um *splicing* alternativo. Apenas a RT-PCR com o oligonucleotídeo senso que se anela após sítio de início de transcrição do promotor 3 gerou produto, indicando a possível ausência de transcritos iniciados a partir dos promotores mínimos 1 e 2 em larvas do estágio L3 e fêmeas adultas 48 e 72 horas após a alimentação sanguínea (figura 4.5). A seqüência e posição destes promotores dentro da região flanqueadora 5' seqüenciada são expostas na figura 4.6.

Por comparação da seqüência desta região flanqueadora com o banco de dados TransFAC, foram identificados 8 possíveis elementos de transcrição (figura 4.6). Dois deles apresentam similaridade ao elemento reconhecido pelo fator E74 em *Drosophila melanogaster* (Urness e Thummel, 1990), que é induzido pela resposta à sinalização por ecdisona. Os seis demais apresentaram similaridade ao elemento reconhecido pelo fator Kr (Stanojević *et al.*, 1989), também descrito em *D. melanogaster*.

Na figura 4.7 é mostrada uma região de 53 pares de bases imediatamente a jusante do promotor mínimo 3 que é consenso no início da UTR 5' do RNA Llchit1A e do RNA codificante para uma quitinase ortóloga em *Phlebotomus papatasi* (Ppchit1) (Ramalho-Ortigão *et al.*, 2005).



**Figura 4.5)** Esquema mostrando o resultado das duas RT-PCR utilizadas para checar atividade dos promotores. Apenas a RT-PCR 2 gerou produto, demonstrando que não há transcritos iniciados nos promotores 1 e 2. A numeração dos oligonucleotídeos corresponde à figura 3.1.

```

                                Kr
1  gaattcttcgtacaagatTTTgtaagaagatTTtagattaaagcctttcaaagtTcatcga
61  actattctgctTTTgtagTTTTatTTatacaataaagTTtagaaagagatgaaagcagcaa
121 agttctgctgggctaaattgcagatagatgatatcagactTTTgtgattcacattgcctTTg
181 aatgacgccaaagctcTTatcaaagtagagTTccttcgtgcatTTTgcaagactctcgtc
241 tctcTTTctcTTTattTgtgactgagaagatgaattactctgcccAAAaggagTTTattcat

                                E74
301 tTTaacggaaaattgTTTgggaagcattTaatagattTaaaagaaaattaggaagTcat
361 aaaacattTTTTTTTaaatcaaagagaagTTTTatgTTcgtTtacctgggacaaactTTTgaa
421 cTTTTTaaaattgTTTTTaaaaaattTaatTTTTcattTatcaagTaaaaataaattca
481 aaaccgaaaatatgaaattTcattgaaatTTTgacctcTTaatgagaaaaacaagaaaaa

                                Kr                                Prom. 1
541 ttctacattTTTTTgTTcaaaaattggctttcaaatcactaaaaagaaaaaaaTCCATAA

                                Kr                                *
601 TTTTTTAAATATCCCCTATTTTCGCATCCTGAACAGAATCGATTgaagcatatgcttctta
661 aaattTgtggaaaaaatctaactatacaaacctTaaattatcttcctTgatctataaata
721 aattcaattTaaactTtaactaacaagatTTTTTgatctTTaatatgagaaaagatctTtaa

                                Kr
781 cattgtaggacaaccaatagaattTatccaatgacatcacaacaatagtatcaaaatga
841 ataaactcTTTTcattTctcTTcagatatataacgaatgattTcattcaaagcaaaa

                                Kr
901 gactTTTcaaagcggattttgtacagaattagagaaaataaaaaaaataattTgggaat

                                E74
961 tTTTgCGgatggtgTgataagactaaattTagaagatTTTTTTaaagaaatttctctgga
1021 agtttgcacagttTtagaggcattTaatattTggctcTctatgagTggactaaaactaaatat

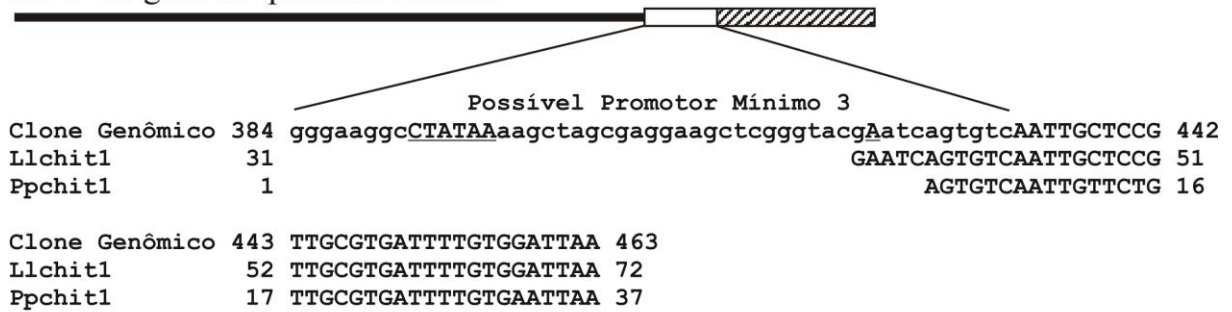
                                Prom. 2                                *                                Kr
1081 ttacTCAGATTGCCAATAAAAGCGCGATTTGATAAGAAAATCACTGAATTCCCTcatttc

                                Prom. 3                                *
1141 ttattgTtctcTcactgGGGGAAGGCCTATAAAAGCTAGCGAGGAAGCTCGGGTACGAAT
1201 CAGTGTcaattgctcggTTgctgattTTTgtggattTaaagaaattTgcaaagtgtggga
1261 gttattaaag[atg]

```

**Figura 4.6)** Seqüência da região flanqueadora 5' do gene LIChit1. Caracteres em maiúscula: possíveis promotores mínimos com sítios de início de transcrição destacados com \*; Caracteres sublinhados: elementos de transcrição; **atg** : códon de iniciação.

## RF 5' do gene de quitinase LlChit1

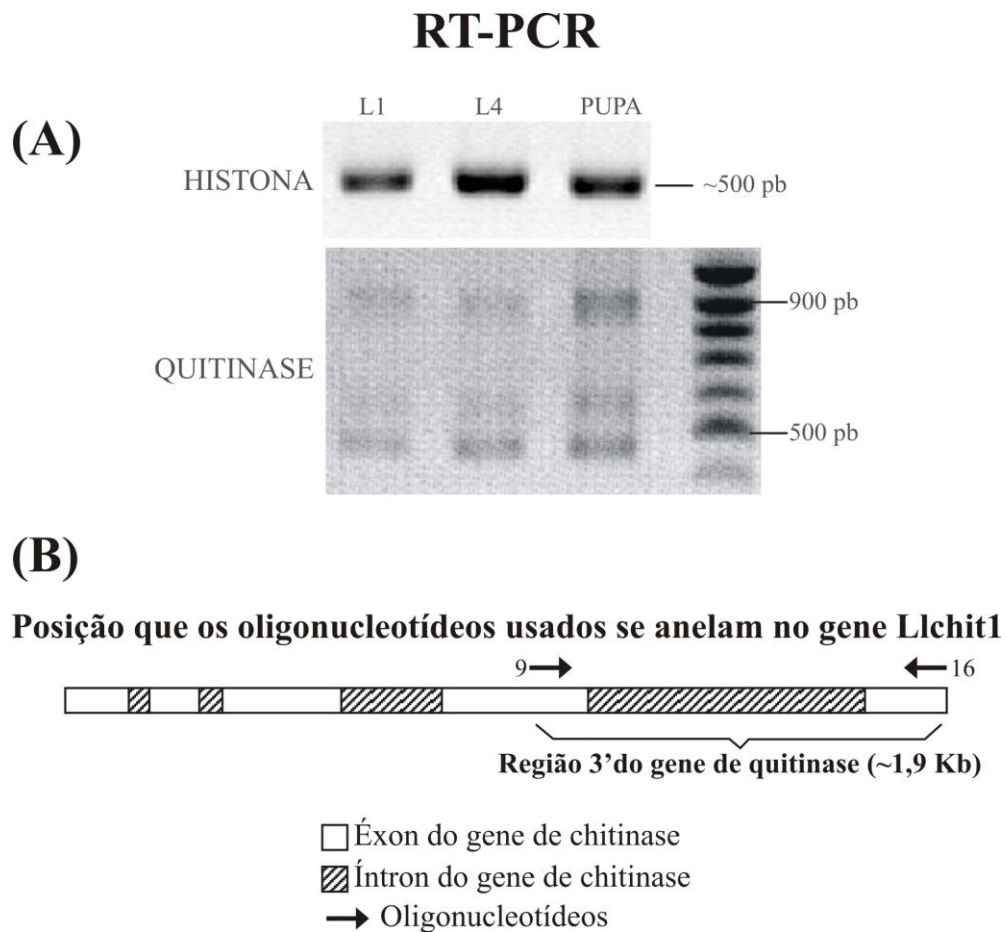


— Região Flanqueadora (RF) do gene LlChit1    ▨ Primeiro exon do gene de quitinase    □ Possível promotor mínimo

**Figura 4.7)** Esquema mostrando seqüência imediatamente a jusante do promotor 3 conservada em gene ortólogo de *P. papatasi* (Ppchit1). Letras minúsculas: seqüência do promotor mínimo; letras maiúsculas sublinhadas: TATA-BOX e sítio de início de transcrição.

#### ***4.4- RT-PCR a partir de RNA extraído de formas imaturas do inseto: indício da ocorrência de splicing alternativo a partir do gene LlChit1***

Através de um experimento de RT-PCR com RNA extraído de larvas de *L. longiplapis* nos estádios L1 e L4 e pupa, foi amplificada uma banda de aproximadamente 420 pb correspondente a região 3' do RNA LlChit1 e outras duas bandas não esperadas de 620 e 867 pb (figura 4.8). Como os oligonucleotídeos usados nas reações se anelam ao redor do quarto íntron do gene de quitinase, este resultado indicou uma possível ocorrência de processamento alternativo da porção 3' do gene. A banda de aproximadamente 900 pb, que pode ser visualizada no gel exposto na figura 4.8, foi extraída, clonada e seqüenciada, provando a ocorrência de *splicing* alternativo.



**Figura 4.8)** RT-PCR a partir de RNA extraído de formas imaturas do inseto: indício de processamento alternativo da região 3' do gene LlChit1. (A) Géis de agarose 1,5% com produtos amplificados. (B) Esquema mostrando a posição em que os oligonucleotídeos para quitinase se anelam no gene LlChit1. A numeração dos oligonucleotídeos corresponde à figura 3.1.

#### **4.5- Clonagem e seqüenciamento das formas de splicing do gene LlChit1**

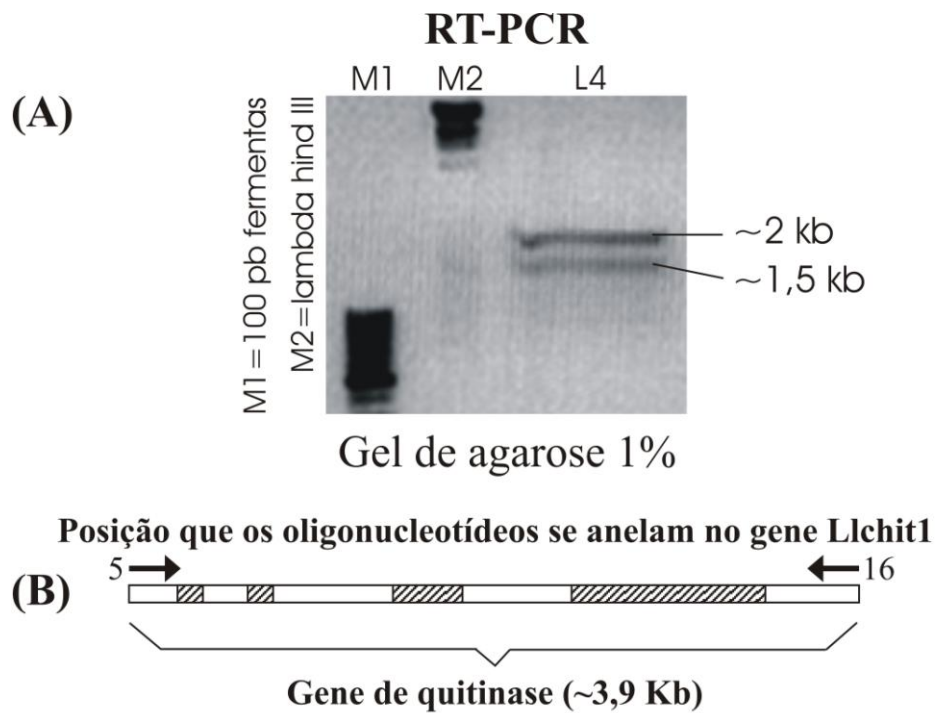
Foram amplificadas duas bandas com aproximadamente 1,5 e 2 kb a partir de cDNA feito com RNA extraído de larvas L4. Estas reações foram feitas com o emprego de oligonucleotídeos que se anelam no códon de iniciação e de parada do gene de quitinase Llchit1 (figura 4.9). Estas bandas foram extraídas do gel de agarose, clonadas em vetor TA e seqüenciadas com oligonucleotídeos que se anelam no plasmídeo e no gene de quitinase. Através do seqüenciamento de mais de um clone de cada uma das bandas, foi visto que a menor, que possuía cerca de 1,5 kb, correspondia a dois fragmentos distintos não resolvidos no gel e que a maior, que possuía cerca de 2 kb, correspondia a um único fragmento. Cada um destes 3 fragmentos correspondia a uma forma diferente de *splicing* do gene LlChit1.

Para confirmar esses resultados e verificar quantos clones de cada forma de *splicing* possuíamos, foram realizadas reações para amplificar a região 5' e 3' dos insertos. A amplificação por PCR da região que vai do códon de iniciação até o quarto éxon confirmou a ocorrência de um padrão comum de processamento para região 5' do gene (figura 4.10). O perfil de amplificação por PCR da região 3' dos clones correspondeu aos resultados do seqüenciamento que indicavam a existência de 3 formas de *splicing* (figura 4.11).

Todas as alterações entre estas formas de processamento do gene estavam dentro da região considerada até então como íntron 4. Uma delas corresponde ao RNA LlChit1A, também encontrado em fêmeas adultas após a alimentação sanguínea. As duas novas moléculas de RNA foram nomeadas de Llchit1B e Llchit1C. Ao total foram obtidos 7 clones da Llchit1A, 4 clones da Llchit1B e 6 clones da Llchit1C, dos quais 4 clones de cada uma foram usados nos seqüenciamentos (figura 4.1).

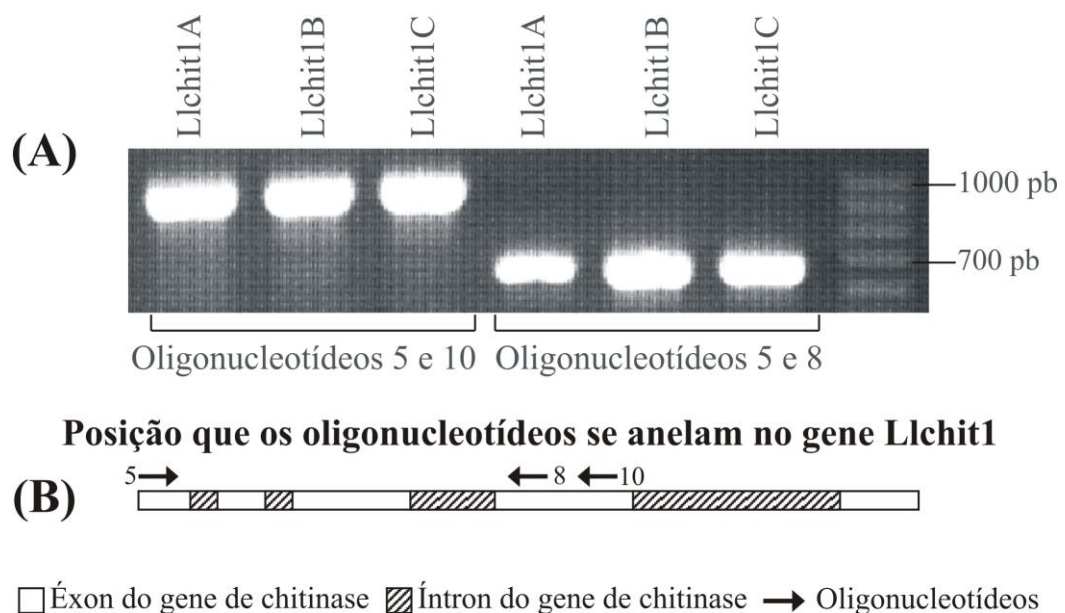
As seqüências das formas de *splicing* A, B e C são mostradas nas figuras 4.12, 4.13 e 4.14. Todas as formas de RNA encontradas codificam igualmente para o domínio catalítico, entretanto somente a LlChit1A possui domínio de ligação à quitina. Nas formas de *splicing* B e C, são introduzidos códons de parada recentes que impedem a tradução da região codificante para o domínio de ligação à quitina. Nas figuras 4.13 e 4.14 é evidenciado a região seqüenciada destas duas moléculas que não é traduzida fazendo parte da UTR 3'. O último éxon do gene LlChit1 continua presente, mas os códons de parada recentes fazem com que ele faça parte da UTR.

Na figura 4.15 é mostrado a porção correspondente à região C-terminal de 12 quitinases alinhadas com o emprego do programa ClustalW. Todas as enzimas que possuem o domínio de ligação à quitina apresentam 6 cisteínas conservadas. No caso das quitinases possivelmente codificadas pelo gene LlChit1, estas cisteínas só são verificadas na possível proteína LlChit1A.



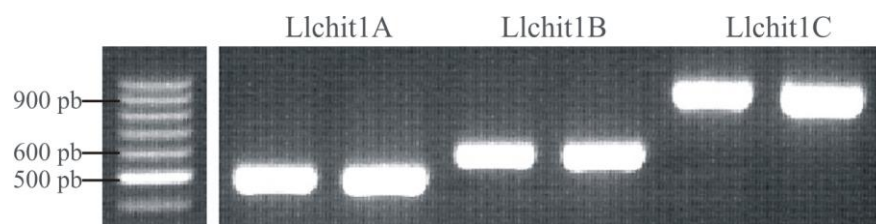
□ Éxon do gene de chitinase    ▨ Íntron do gene de chitinase    → Oligonucleotídeos

**Figura 4.9)** RT-PCR para amplificar toda a extensão dos produtos do gene LlChit1 presentes em larvas L4. (A) Gel de agarose com bandas que foram clonadas. (B) Esquema mostrando a posição em que os oligonucleotídeos utilizados se anelam no gene LlChit1. A numeração dos oligonucleotídeos corresponde à figura 3.1.



□ Éxon do gene de chitinase    ▨ Íntron do gene de chitinase    → Oligonucleotídeos

**Figura 4.10)** Amplificação por PCR do extremo 5' das formas de *splicing* clonadas. (A) Produtos amplificados com dois pares de oligonucleotídeos e um clone de cada forma de *splicing*. (B) Esquema mostrando a posição em que os oligonucleotídeos utilizados se anelam no gene LlChit1. A numeração dos oligonucleotídeos corresponde à figura 3.1.



**Figura 4.11)** Amplificação por PCR do extremo 3' das formas de *splicing* clonadas. Foram utilizados dois clones de cada forma de *splicing*. A posição que estes oligonucleotídeos se anelam no gene LChit1 é mostrada na figura 4.8 (B).

**Tabela 4.1)** Clones das formas de *splicing* do gene Lchit1

	Total de clones de cada forma de <i>splicing</i>	Total de clones seqüenciados de cada forma de <i>splicing</i>	Tamanho do inserto
Lchit1A	7	4	1.422pb
Lchit1B	4	4	1.513pb
Lchit1C	6	4	1.866 pb



	M K T L V F L C V A L S I L G L A V T E	20
1	atgaagacggttggtgtttctgtgtgctgccttatcaatgttggttggtgagcagtaactgaa	
	K K I V C Y H G T W S Y Y R Q G N G K F	40
61	aaaaaaattgtctgctatcacggtacgtggtcctactaccggcagggaaatggaaaattc	
	G V A Q I D P F L C T H L V Y T F F G I	60
121	ggagtagcacaaaatgatccctttctctgtacgcatttggtttatacgtttttcgggatt	
	S S E G G I R I L D P Y L D L D E N Y G	80
181	tcttccgaggggtgggattagaattctcgatccttacttggatctcgatgagaactacggc	
	L G N I R K F N E L K K V N P K L K T I	100
241	cttgggaatataagaaaattcaatgaactcaagaaagttaatccaaaattgaagacaatc	
	A G V G G W N E G S V T F S Q V V S D P	120
301	gccggtggttgaggatggaatgaaggaagtgttacatgtttctcaggtcgtcagtgatcca	
	R K R Q N F V K N S L E F L K K Y N F N	140
361	cgcaagaggcagaatctcgtgaagaattcgttggaaatgttttgaaaaatacaattttaat	
	G L D V D W E Y P A Q R G G N Q D K D K	160
421	ggtcttgacgttgactgggagatccagcacaacgcggagggaatcaggataaggataaa	
	E A Y T L L L K E L S E F L H P K G Y S	180
481	gaagcctacacgctccttctcaaggaactctcggaattcctacatcctaaaggctacagt	
	L S A A V A S A E F S A K I S Y N I A E	200
541	ctctccgctgctgtagcatcagcgaatgtttcagctaaaatctcttacaacatcgctgag	
	V S K Y L D F I G V M T Y D L H G S W D	220
601	gtttcaaaaatctggtttcattggggtaatgacgtacgatttacacggatcatgggat	
	P K I G N N A P L Y A G S W E Q T E L E	240
661	ccaagattgggaataatgcccattgtatgcgggatcgtgggagcaaacggagcttgag	
	K Q L N V D A A I K Y W L S N S G A P E	260
721	aagcaattaaatgttgacgctgctataaagtactggctcagcaatagcggggctcctgag	
	K L L L G V P L Y G R G F R M V N G Q S	280
781	aagctcctcctggcggttccactgtacggctcgtggcttccgcattggttaatggtcagagt	
	K P G S V H G G P C Q A G P Y T Q T P G	300
841	aaaccaggatccgttcatggaggtccttgtcagggtgggcccctacactcaaactcccggc	
	M M G F N E L C E K R Q N E K W I D F W	320
901	atgatgggcttcaatgagctctgcgagaagcgtcagaatgaaaaatggattgatttctgg	
	D D E Q F V P Y S T K N D Q W I G F D D	340
961	gatgatgagcaatgttccctactccacaaagaacgatcagtggttgattgattgatgat	
	E K S I K F K S N Y V N S H N L G G V I	360
1021	gagaagagtataaaattcaaatcaaatcagtcacagccacaatccttggtggtgtgatt	
	V W S I E T D D F R G F C G R G T F P L	380
1081	gtgtggtccattgaaacagatgatttttagaggattctgcggaagaggaaccttcccactt	
	L K E L N A S L L G N N H T W T P P S T	400
1141	ctcaaggagctcaatgcatccctccttggttaacaatcacacctggacacctccatcaaca	
	S T T E W N P N P T S T T K P P P I L P	420
1201	tcaaccaccgaatggaatcccaatccaacgtccacaacgaaacctccaccaatcctccca	
	S P E C T E D G Y F R D P N D C S I F H	440
1261	agtccccgaatgtaccgaagatggttacttttagggatccaaatgactgcagtatcttccac	
	<u>Q C I N G T Q Y T F F C P H G L V F D P</u>	460
1321	caatgcatcaatgggactcaatatacattcttctgcccacatggtcctgtcttcgatcca	
	<u>A I I A C N W P H I V Q C</u> -	473
1381	gccatcatagcttgcaattggccccatatagtgcaatgctga	

**Figura 4.12)** Seqüência da forma de *splicing* LlChit1A. Números do lado esquerdo indicam a posição dos nucleotídeos e números do lado direito indicam a posição dos aminoácidos. Caracteres vermelhos: domínio catalítico. Caracteres sublinhados: sítio de ligação à quitina.

```

M K T L V F L C V A L S I L G L A V T E 20
1 atgaagacggttggtgtttctgtgtgtcgccttatcaatnttgggcttggcagtaactgaa
K K I V C Y H G T W S Y Y R Q G N G K F 40
61 aaaaaaattgtctgctatcacggtacgtggctcctactaccggcagggaaatggaaaattc
G V A Q I D P F L C T H L V Y T F F G I 60
121 ggagtagcacaaaatgatccctttctgtacgcatttggtttatacgtttttcgggatt
S S E G G I R I L D P Y L D L D E N Y G 80
181 tcttccgaggggtgggattagaattctcgatccttacttggatctcgatgagaactacggc
L G N I R K F N E L K K V N P K L K T I 100
241 cttgggaatataagaaaattcaatgaactcaagaaagttaatcccaaattgaagacaatc
A G V G G W N E G S V T F S Q V V N D P 120
301 gccggtgttgggggatggaatgaaggaagtgttacatnttctcaggtcgtaacgatcca
R K R Q N F V K N S L E F L K K Y N F N 140
361 cgcaagagggcagaatnttgtgaagaattcgttggaaatnttggaaaaatacaatntttaat
G L D V D W E Y P A Q R G G N Q D K D K 160
421 ggtcttgacgttgactgggagtatccagcacacgtggaggggaatcaggataaggataaa
E A Y T L L L K E L S E F L H P K G Y T 180
481 gaagcctacacgctccttctcaaggaactctcggaattcctacatcctaaaggctacact
L S A A V A S A E F S A K I S Y N I A E 200
541 ctctccgctgctgtagcatcagcgaatnttccagctaaaatctcttacaacatcgctgag
V S K Y L D F I G V M T Y D L H G S W D 220
601 gttcaaaaatatctggatttcattggggaatgacgtatgatttacacggatcatgggat
P K I G N N A P L Y A G S W E Q T E L E 240
661 ccaagattgggaataatgcgcttctgtatgctgggatcgtgggagcaaacggagcttgag
K Q L N V D A A I K Y W L S N S G A P E 260
721 aagcaattaaatgttgacgctgctataaagtactggctcagcaatagcggggctcctgag
K L L L G V P L Y G R G F R M V N G Q S 280
781 aagctcctcctggcggttccactgtacggctcgtggcttccgcacatggttaatggtcagagt
K P G S V H G G P C Q A G P Y T Q T P G 300
841 aaaccaggatccgttcatggaggtccttgtcaggctgggcccctacactcaaactcccggc
M M G F N E L C E K R Q N E K W I D F W 320
901 atgatgggcttcaatgagctctgcgagaagcgtcagaatgaaaaatggattgatttctgg
D D E Q F V P Y S T K N D Q W I G F D D 340
961 gatgatgagcaatnttgttccgtactccacaaagaacgatcagtggttggatttgatgat
E K S I K F K S N Y V N S H N L G G V I 360
1021 gagaagagtataaaattcaaatacaattacgtcaacagccacaatcttgggtggtgtgatt
V W S I E T D D F R G F C G R G T F P L 380
1081 gtgtgggtccattgaaacagatgattttagaggattctgcggaagaggaaccttcccactt
L K E L N A S L L G N N - 392
1141 ctcaaggagctcaatgcacccctccttggtaacaattgatttagcacttgaggcattct
1201 tcattggctgagaggggtgcgagcttnttctgtcacttccggatatctacgaaagc
1261 aggaagacacacctggacacctccatcaacatcaaccacgaatggaatcccaatccaac
1321 gtccacaacgaaacctccaccaatcttccaagtcccgaatgtaccgaagatggttactt
1381 tagggatccaaatgactgcagtatcttccaccaatgcatcaatgggactcaatataat
1441 cttctgcccacatggtccttctcgtatccagccatcatagcttgcgaatggccccatat
1501 agtgcaatgctga

```

**Figura 4.13)** Seqüência da forma de *splicing* Llchit1B. Números do lado esquerdo indicam a posição dos nucleotídeos e números do lado direito indicam a posição dos aminoácidos. Caracteres vermelhos: domínio catalítico. Nucleotídeos sem respectiva seqüência de proteína: UTR 3' seqüenciada.

	M K T L V F L C V A L S I L G L A V T E	20
1	atgaagacggttggtggttctgtgtgctgccttatcaatgttgggcttggcagtaactgaa	
	K K I V C Y H G T W S Y Y R Q G N G K F	40
61	aaaaaaattgtctgctatcacggtagctggctcctactaccggcagggaaatggaaaattc	
	G V A Q I D P F L C T H L V Y T F F G I	60
121	ggagtagcacaattgatcccttctctgcacgcatttggtttatacgttttccgggatt	
	S S E G G G I R I L D P Y L D L D E N Y G	80
181	tcttccgaggggtggattagaattctcgatccttacttggatctcgatgagaactacggc	
	L G N I R K F N E L K K V N P K L K T I	100
241	cttgggaatataagaaaattcaatgaactcaagaaagtaatccaaaattgaagacaatc	
	A G V G G W N E G S V T F S Q V V S D P	120
301	gccggtggttgaggatggaatgaaggaagtgttacatgttctcaggtcgatcagtgatcca	
	R K R Q N F V K N S L E F L K K Y N F N	140
361	cgcaagagcagaatttctgtagaattcgttggaaatttggaaaaatacattttaa	
	G L D V D W E Y P A Q R G G N Q D E D K	160
421	ggtcttgacgttgactgggagatccagcacaacgtggaggggaatcaggatgaggataaa	
	E A Y T L L L K E L S E F L H P K G Y T	180
481	gaagcctacacgctccttctcaaggaactctcggaaatcctacatcctaaaggctacact	
	L S A A V A S A E F S A K I S Y N I A E	200
541	ctctccgctgctgtagcatcagcggaaatttccagctaaaatctcttacaacatcgctgag	
	V S K Y L D F I G V M T Y D L H G S W D	220
601	gtttcaaaaatctggatttcttgggtaatgacgtatgatttacacggatcatgggat	
	P K I G N N A P L Y A G S W E Q T E L E	240
661	ccaagattgggaataatgctgccttctgtatgctgggatcgtgggagcaacggagcttgag	
	K Q L N V D A A I K Y W L S N S G A P E	260
721	aagcaattaaatgttgacgctgctataaagtactggctcagcaatagcggggctcctgag	
	K L L L G V P L Y G R G F R M V N G Q S	280
781	aagctcctcctggcgcttccactgtacggctcgtggcttccgcatggttaatggtcagagt	
	K P G S V H G G P C Q A G P Y T Q T P G	300
841	aaaccaggatccgttcatggaggtccttctcaggtcggccctacactcaaactcccggc	
	M M G F N E L C E K R Q N E K W I D F W	320
901	atgatgggcttcaatgagctctgcgagaagcgtcagaatgaaaaatggattgatttctgg	
	D D E Q F V P Y S T A K N D Q W I G F D D	340
961	gatgatgagcaatttgttccctactccacaagaacgatcagtgattggattggattgatgat	
	E K S I K F K S N Y V N S H N L G G V I	360
1021	gagaagagtataaaattcaaatacaattacgtcaacagccacaatcttgggtggtgtgatt	
	V W S I E T D D F R G F C G R G T F P L	380
1081	gtgtggtccattgaaacagatgatttagaggattctgcggaagaggaaccttcccactt	
	L K E G L N A S L L G N N V S T S N E T D	400
1141	ctcaaggagctcaatgcatccctccttggtaacaatgtgagtacctccaatgaaacagac	
	P E I M S L L S A E K K K T A A L K K F	420
1201	cccagatcatgtccctccttccgcggaagaagaaaacagcagcattgaagaaattc	
	I H D F F F K T F Q P K Y Q K L I Q F N	440
1261	atcatgatttcttcttcaagaccttccagccaaagtatcagaaaactcattcagttcaat	
	L L K E K Y F S E S F T E L Y G T Y V Q	460
1321	ttactcaaagaaaaatatttttctgaaagcttaccggaactctacggtacatacgttcaa	
	M L S D T Y K S E N D I -	472
1381	atgctctcagacacatacaagagtgaaaatgatataataagcaggaattaagtttattttc	
1441	tcttaatttttgtgttttttttttattgagaaataataagtatattaatgcaatttacgga	
1501	aaataaaaccactttgctgagatttcaagtgatttagcacttgagggcatttcttcatgg	
1561	ctgagaggggtgcgagctttgtttctgctgcacttccggatatctacgaaagcaggaaga	
1621	cacacctggacacctccatcaacatcaaccaccggaatggaatcccaatccaacgtccaca	
1681	acgaaaccaccaccaatcctcccaagtctgaatgtactgaagatggttacttttagggat	
1741	ccaaatgactgcagtatcttccaccaatgcatcaatgggactcaatatacattcttctgc	
1801	ccacatggtccttcttctgatccagccatcatagcttgcaattggccccatatagtgcaa	
1861	tgctga	

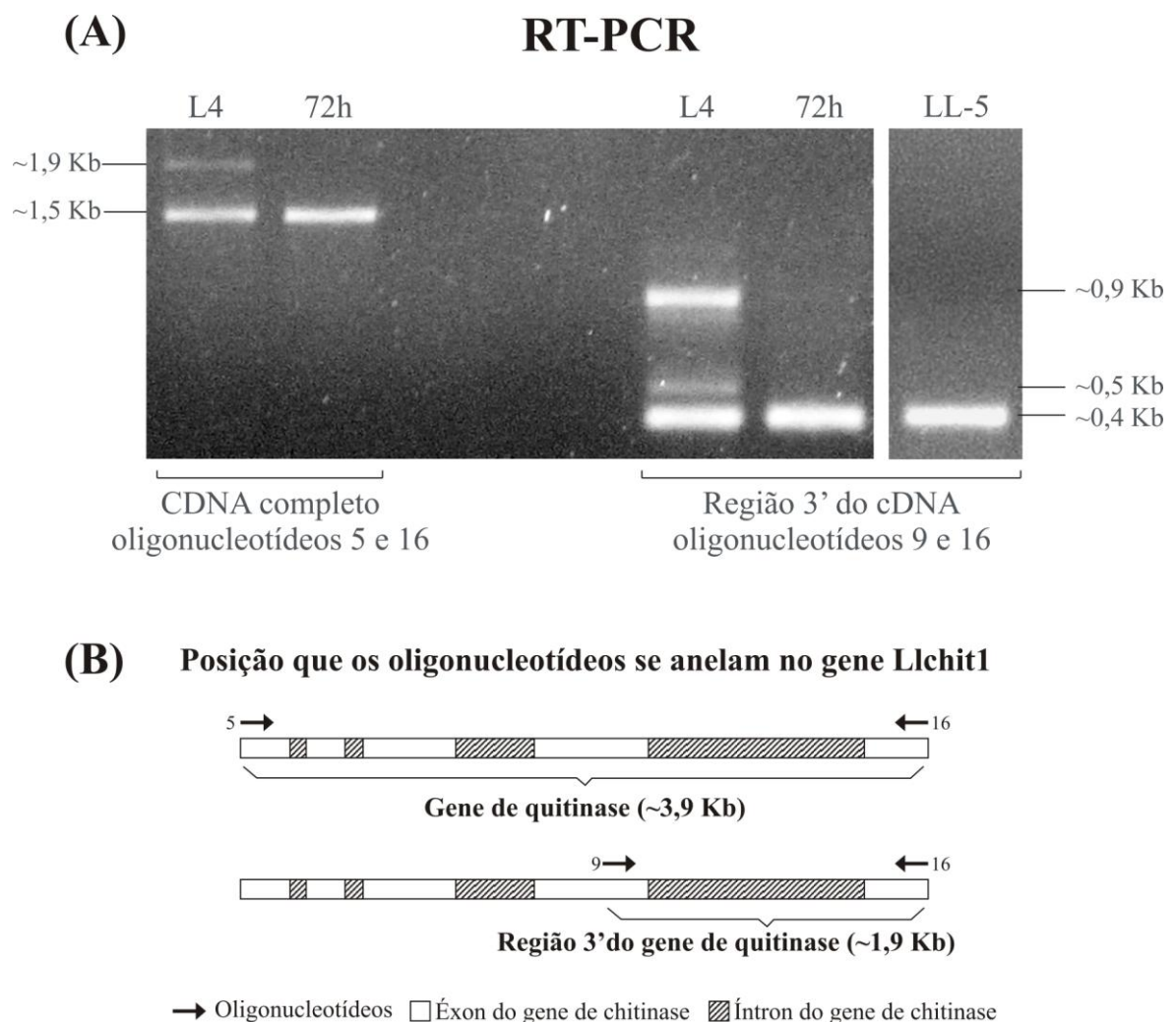
**Figura 4.14)** Sequência da forma de *splicing* LIChit1C. Números do lado esquerdo indicam a posição dos nucleotídeos e números do lado direito indicam a posição dos aminoácidos. Caracteres vermelhos: domínio catalítico. Nucleotídeos sem respectiva seqüência de proteína: UTR 3' seqüenciada.

	: : : . * : * * * : : * : . *	
DmCht8	PYAYRQR-----QWVGIEDPRSLALKAQYVMDNHLGGIMIWSLESDDFRGTCGQQPYP	391
<i>A. gambiae</i>	PYAVRNN-----QWVGYYDLRLSRVQLKVKYLLDQGLGGAMVWSLETDDFLGVCGGGRYP	390
LlChit1A	PYSTKND-----QWIGFDDEKSIKFKSNYVNSHNLLGGVIVWSIETDDFRGFCGRGTFP	379
LlChit1B	PYSTKND-----QWIGFDDEKSIKFKSNYVNSHNLLGGVIVWSIETDDFRGFCGRGTFP	379
LlChit1C	PYSTKND-----QWIGFDDEKSIKFKSNYVNSHNLLGGVIVWSIETDDFRGFCGRGTFP	379
DmCht4	PYAFQGD-----QWIGYDNPESIQKMLQVSRNLGGAMWSIETDDFRGLCG-ESYP	362
DmCht9	PYAYSGD-----QWVSFDNVLSVQYKMDFALSGLAGAMIWSLETDDYRQCG-ETYP	357
<i>G. morsitans</i>	PYKYKND-----QWIGYDDERSIALKIDLLKSLNLAGAMLWSIEMDDFRGICG-MKYP	375
<i>T. molitor</i>	PYKYDGS-----NWVSYDDAESIGLTKFAVDNGLAGVAVWSIDTDDFLSTCG-VHDP	356
DmCht2	VLAKSERNVFTQEIINVVTYDSSRSIANKVLFAMSKRLAGVMVWSVDTDDFLGNCKLDEDT	401
<i>M. Sexta</i>	PYAYKGT-----QWVGIEDPRSVIEIKMNWIKQKGYLGAMTWAIDMDDFQGLCG-EKNP	386
<i>A. gambiae</i>	PYTYKGT-----QVVGIEDERSLQHKMDWIKQKGYAGAMTWAIDMDDFHGLCG-PENA	366
DmCht8	LLHEINRVLFGGN-----	404
<i>A. gambiae</i>	LMHEIRSLVNGGTPSTTTMPPSV-----	413
LlChit1A	LLKELNASLLGNN-----	392
LlChit1B	LLKELNASLLGNN-----	392
LlChit1C	LLKELNASLLGNN-----	392
DmCht4	LLKTMNRALGREVSGGSG-----	380
DmCht9	LLKTINRKLRW-----	368
<i>G. morsitans</i>	LLSTINSKLGDIN-----	389
<i>T. molitor</i>	LLQAIKDNLSA-----	367
DmCht2	YEDFQKVTAAPKR-----	414
<i>M. Sexta</i>	LKILLHKHMSSYTVPPHTENTT-----PTPEWARPPSTPSDP	424
<i>A. gambiae</i>	LMKVLVDGMKDYVVEPTVTTTTPRVSVRKREPKTS PFQNGIFHLFPAGMNRPPSTMSSD	426
DmCht8	-----TPS---GLTTESNRESP-----	418
<i>A. gambiae</i>	-----APTSTVAPGTTTTTPTGANPGTTQPPTSDAPNHTTTST	453
LlChit1A	-----HTWTPPSTSTTEWNPNTST	412
LlChit1B	-----	
LlChit1C	-----VSTS---NETDPEIMSLLS	408
DmCht4	-----GGGGGGEGSVTPAPTAAPTSSPTPAP	407
DmCht9	-----	
<i>G. morsitans</i>	-----QLPSNPIQTSTVSPSLR-	406
<i>T. molitor</i>	-----	
DmCht2	-----SSQNYPLLRTINEATMLA	432
<i>M. Sexta</i>	SE---GDPIPTTTTAKPASTTKTKVTKTTTTTAKPPQSVIDEENDINVRPEPKPEPQPEP	481
<i>A. gambiae</i>	GEQTTARPATTTTTYKPRPTT-TVAPTRTTTAR--RTTTRKPTTILPPDTDSEEDREE	483
DmCht8	SEGFSCPADAPAG-----YIRDPDNC SKFYC SGGKT-HNFD C P SGLNFDDLDTKS	467
<i>A. gambiae</i>	TEGNPGTTRPPSGDGP CAGGRYGFVPHPTNCARYIICLTADTYEFTCPPGLTFDPALHI	513
LlChit1A	TKPPILPSP ECTED-----GYFR- DPND C S I F H Q C I N G T Q - Y T F F C P H G L V F D P A I I A	464
LlChit1B	-----	
LlChit1C	AEKKKTAALKKFIHD-----FFFKTFQPKYQKLIQFNLLKE-KYFSESFTELYGYTVQM	461
DmCht4	TPGGGSGGNECAODG-----FFVLESD C N K F Y C V G G V R - Y D F O C G A G L C F N T I T L N	458
DmCht9	-----	
<i>G. morsitans</i>	-----D C P S D G -----LYANPKD C S R F Y O C L K G V R - F D F T C P P G L L Y D A K N A L	448
<i>T. molitor</i>	-----	
DmCht2	VDELAVPEPQDDSE-----NEIPHGSIADRKNAGASMVSLGLGVTAVFMLLHRL	482
<i>M. Sexta</i>	EVEVPPTENEVDGSEI- C N S D Q D Y I P D K K H C D K Y W R C V N G E A - M Q F S C Q H G T V F N V E L N V	539
<i>A. gambiae</i>	PAMPAPAPEREDSEID C S G Y K D F V P S - V D C T K Y Y R C V H G Q P - V E F V C K P G T V F H T A L N V	541
DmCht8	CNYSGSVKC-----	476
<i>A. gambiae</i>	CNWARDQVKCPNE-----	525
LlChit1A	CNWP HIVQC-----	474
LlChit1A	CNWP HIVQC-----	473
LlChit1B	-----	
LlChit1C	LSDTYKSENDI-----	472
DmCht4	CDWP-----	462
DmCht9	-----	
<i>G. morsitans</i>	CNWPQTVKCNVV-----	460
<i>T. molitor</i>	-----	
DmCht2	AQ-----	484
<i>M. Sexta</i>	CDWPSNATRE C Q Q P-----	554
<i>A. gambiae</i>	CDW PENADRPE CRTKAKLIESPTAY	566

Figura 4.15) Alinhamento da porção C-terminal de diversas quitinases de inseto. No topo são apontados os últimos aminoácidos conservados do domínio catalítico. As 6 cisteínas conservadas comuns ao sítio de ligação à quitina estão destacadas por retângulos.

#### 4.6- RT-PCR a partir de RNA extraído de larvas, fêmeas adultas e células LL5

O RT-PCR com RNA extraído de larvas do estágio L4, fêmeas adultas 72 horas após a alimentação sanguínea e células LL5 indicou que o promotor da quitinase está ativo em células de cultura e que o processamento alternativo do gene *LlChit1* não ocorre em insetos adultos (figura 4.16). As moléculas de 1.422 e 1.513 pb, correspondentes às formas de *splicing* *LlChit1A* e B, não foram resolvidas no gel de agarose 1,5% e formaram uma banda única com aproximadamente 1,5 Kb.

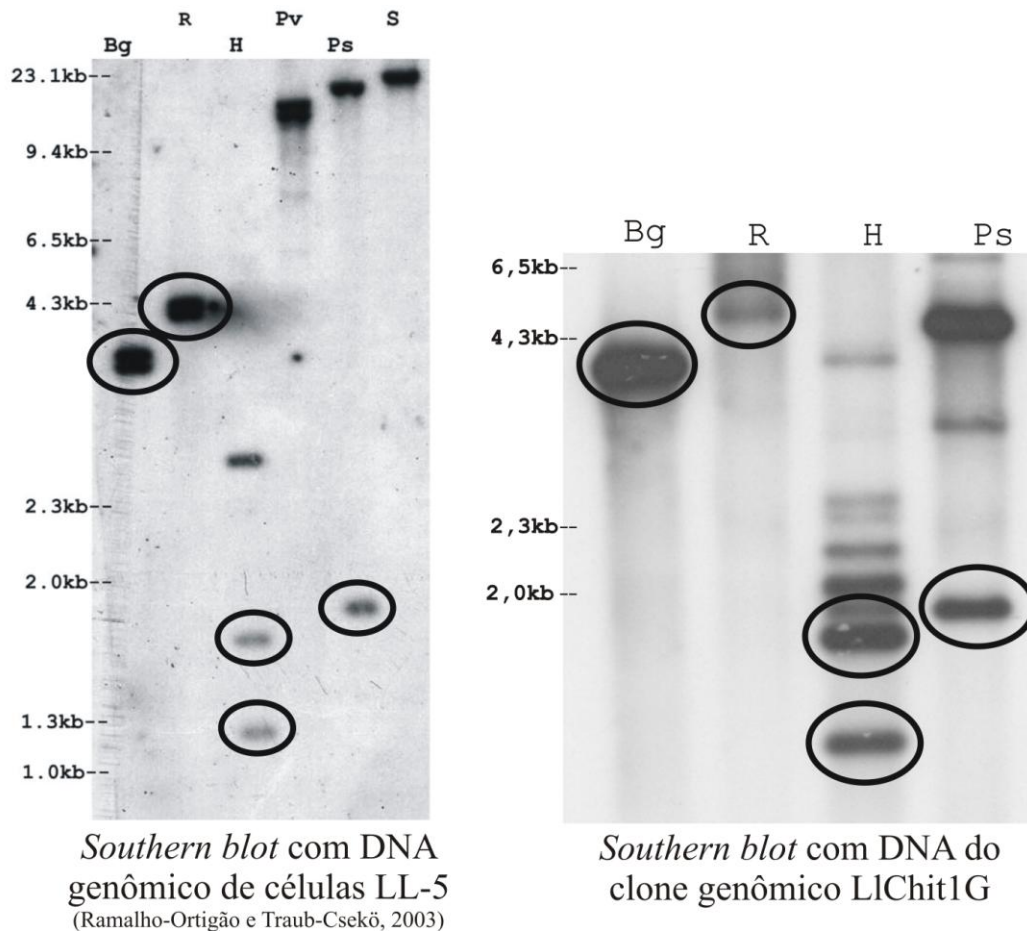


**Figura 4.16)** RT-PCR a partir de RNA extraído de larvas estádios L4, fêmeas adultas 72 horas após a alimentação sanguínea e células LL5. (A) Géis de agarose com produtos amplificados. (B) Posição de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados no gene *LlChit1*. A numeração dos oligonucleotídeos corresponde à figura 3.1.

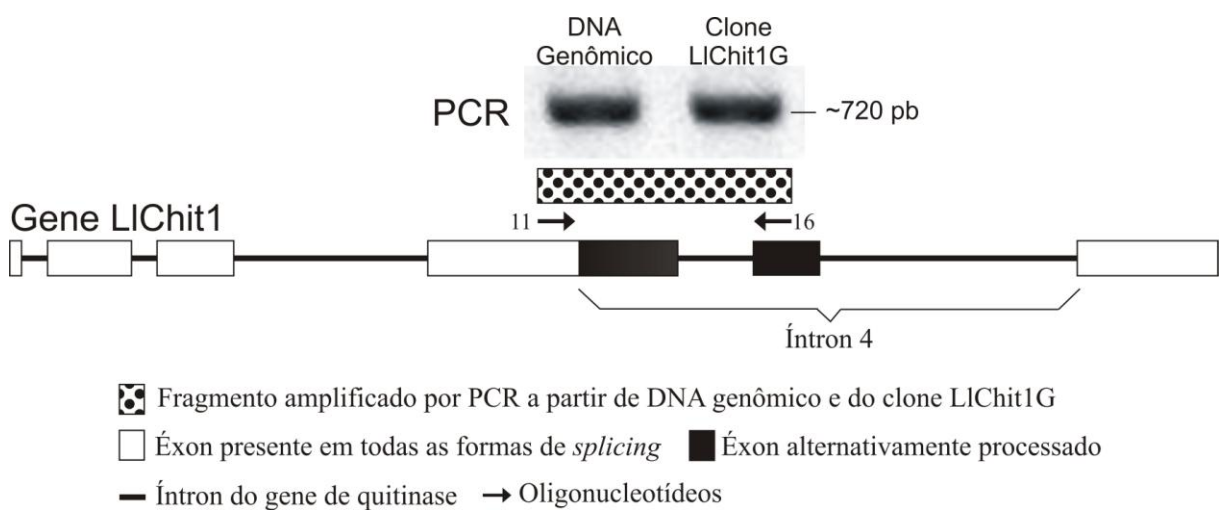
#### ***4.7- Análise do número de cópias do gene LlChit1***

A digestão do clone genômico LlChit1G com as enzimas Bgl II (Bg), Eco RI (R), Hind III (H), Pvu II (Pv), Pst I (Ps) e Sal I (S) gerou um padrão de bandas semelhante ao encontrado anteriormente com o *Southern blot* usando DNA genômico de células LL5 (Ramalho-Ortigão e Traub-Csekö, 2003), sugerindo que o gene LlChit1 era cópia simples (figura 4.17).

Para verificar se havia alguma diferença entre os alelos do gene Llchit1 que pudesse estar relacionada com as formas de *splicing* clonadas, a região do íntron 4 que é diferencialmente processada foi amplificada por PCR a partir de DNA genômico de células LL5 e a partir do DNA do clone genômico. A amplificação dessa região a partir de DNA genômico originou um fragmento único e de mesmo tamanho que a amplificação a partir do clone LlChit1G (figura 4.18). A clonagem e seqüenciamento do fragmento amplificado a partir do DNA de células comprovaram que sua seqüência era igual a do clone genômico.



**Figura 4.17)** Comparação dos padrões eletroforéticos obtidos por *Southern blot* feito com DNA genômico de células LL5 (Ramalho-Ortigão e Traub-Csekö, 2003) e com DNA do clone LIChit1G. As digestões foram feitas com as enzimas Bgl II (Bg), Eco RI (R), Hind III (H), Pvu II (Pv), Pst I (Ps) e Sal I (S).



**Figura 4.18)** PCR para amplificar a região que é alternativamente processada a partir de DNA genômico de células LL5 e do clone genômico. A numeração dos oligonucleotídeos corresponde à figura 3.1.

#### ***4.8- Busca por seqüências de genes ortólogos de quitinase em banco de dados de EST de L. longipalpis e P. papatasi***

Um total de 33.123 seqüências de EST de *L. longipalpis* foram baixadas do GenBank por intermédio do explorador taxonômico (“taxonomy browser”) e agrupadas através do emprego do programa CAP3 resultando em 3.595 contíguos de seqüências (*contigs*) e 14.640 seqüências não agrupadas (*singlets*). Todos os *contigs* e *singlets* foram traduzidos nas 6 possibilidades de leitura formando um banco de dados de seqüências de aminoácidos. Este foi sondado com um Pfam correspondente ao domínio catalítico de quitinases, permitindo a identificação de 5 fragmentos de cDNA diferentes codificantes para possíveis quitinases e proteínas similar a quitinase (figura 4.2). Um deles é codificado pelo gene LIChit1 e outros 4 por genes ainda não descritos. Dois destes últimos foram nomeados aleatoriamente de LIChit2 e LIChit3. Um deles foi nomeado de LIIGDF por apresentar alta similaridade com um HMM do banco de dados PHANTER (identificador: PTHR11177:SF25) (Thomas PD *et al.* 2003) correspondente a um alinhamento de proteínas tipo IGDF. O último foi intitulado de LIChit10 com base nas análises filogenéticas.

A seqüência de nucleotídeo dos quatro novos cDNAs foi utilizada em uma busca com o programa BlastN para identificar ESTs que flanqueassem a região identificada com o HMMER. Todas as ESTs encontradas foram novamente agrupadas com o programa CAP3, sendo que em alguns casos foi necessário retirar trechos das extremidades destas seqüências que provavelmente impediam a sobreposição das EST pela baixa qualidade dos seqüenciamentos. Os novos *contigs* e *singlets* foram traduzidos na moldura correspondente à proteína de interesse e possíveis erros na moldura de leitura foram manualmente corrigidos. Como base para identificação do quadro de leitura correto foi utilizado o alinhamento de buscas no GenBank com o emprego do programa BlastX (McGinnis e Madden, 2004). Fragmentos da seqüência de aminoácido correspondentes ao domínio catalítico, ou equivalente, foram extraídos com o emprego do programa SMART e usados para fazer estudos filogenéticos. O tamanho em aminoácidos destes fragmentos está indicado na tabela 4.2. De acordo com análises feitas com o programa CDD, não foi possível obter a seqüência completa do domínio catalítico dos genes LIChit3 e LIChit10.

Um total de 42.778 seqüências de EST de *P. papatasi* foram baixadas do GenBank e agrupadas com o programa CAP3 resultando em 4.847 *contigs* e 4.790 *singlets*. A sondagem utilizando o programa HMMER e o arquivo Pfam Glyco\_hydro\_18 (PF00704) possibilitou a localização de 6 cDNAs codificantes para possíveis quitinases e 1 para uma possível proteína similar a quitinase. Estas seqüências foram nomeadas com base nos estudos filogenéticos.



Dois dos cDNAs codificantes para possíveis quitinases parecem ser provenientes de um ortólogo dos genes Chit10 e podem corresponder a domínios catalíticos diferentes de um mesmo gene. Estes cDNAs foram chamados de PpChit10C e PpChit10D. Um dos cDNAs encontrados corresponde ao gene PpChit1 já descrito na literatura e os demais ainda não foram publicados. O nome dado ao gene, tamanho da seqüência de aminoácido correspondente ao domínio catalítico, cobertura sobre este domínio e identificador das seqüências no GeneBank são mostrados na tabela 4.1.

#### ***4.9- Estudos filogenéticos de possíveis quitinases e proteínas similares a quitinases de L. longipalpis e P. papatasi***

Seqüências de possíveis quitinases e proteínas similares a quitinases de insetos foram baixadas do GenBank e as porções referentes aos domínios catalíticos foram extraídas com o programa SMART. A região das seqüências correspondentes a este domínio foram alinhadas através do programa ClustalW às seqüências correspondentes de *L. longipalpis* e *Phlebotomus papatasi*. Este alinhamento foi utilizado para construir árvores filogenéticas com o programa MEGA. Para o gene LIChit1, foram usadas as seqüências obtidas no laboratório a partir do cDNA clonado e seqüenciado LIChit1A. A seqüência de quitinases com mais de um domínio catalítico são identificadas por uma letra após o nome do gene, indo de A a E de acordo com sua posição na seqüência da proteína.

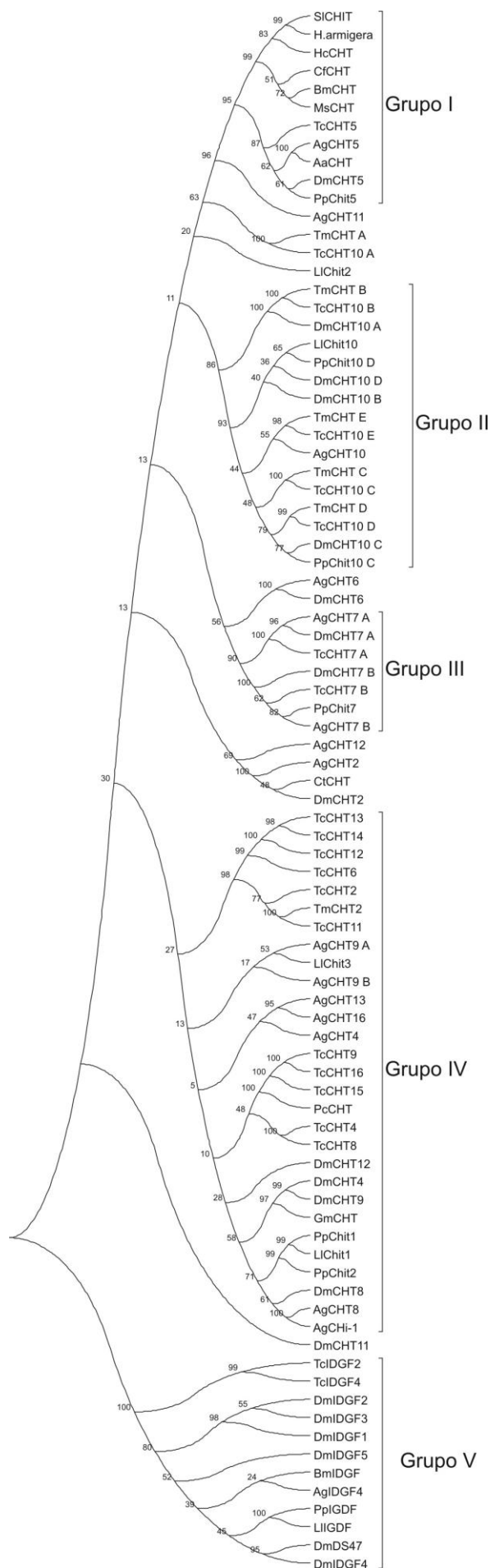
Como já reportado anteriormente (Zhu *et al.*, 2008a), as quitinases de insetos podem ser divididas em 5 grupos filogenéticos com base no modelo de evolução mínima (Nei e Nei, 1992). Na figura 4.19 é mostrada uma árvore filogenética consenso inferida através de uma análise de *bootstrap* com 5.000 replicatas. A distância evolutiva foi computada pelo método correção de Poisson (Zuckerandl e Pauling, 1965). Ampliações de ramificações desta árvore são expostas nas figuras 4.19, 4.20 e 4.21.

**Tabela 4.2)** ESTs de *L. longipalpis* codificantes para possíveis quitinases e proteínas similares a quitinases

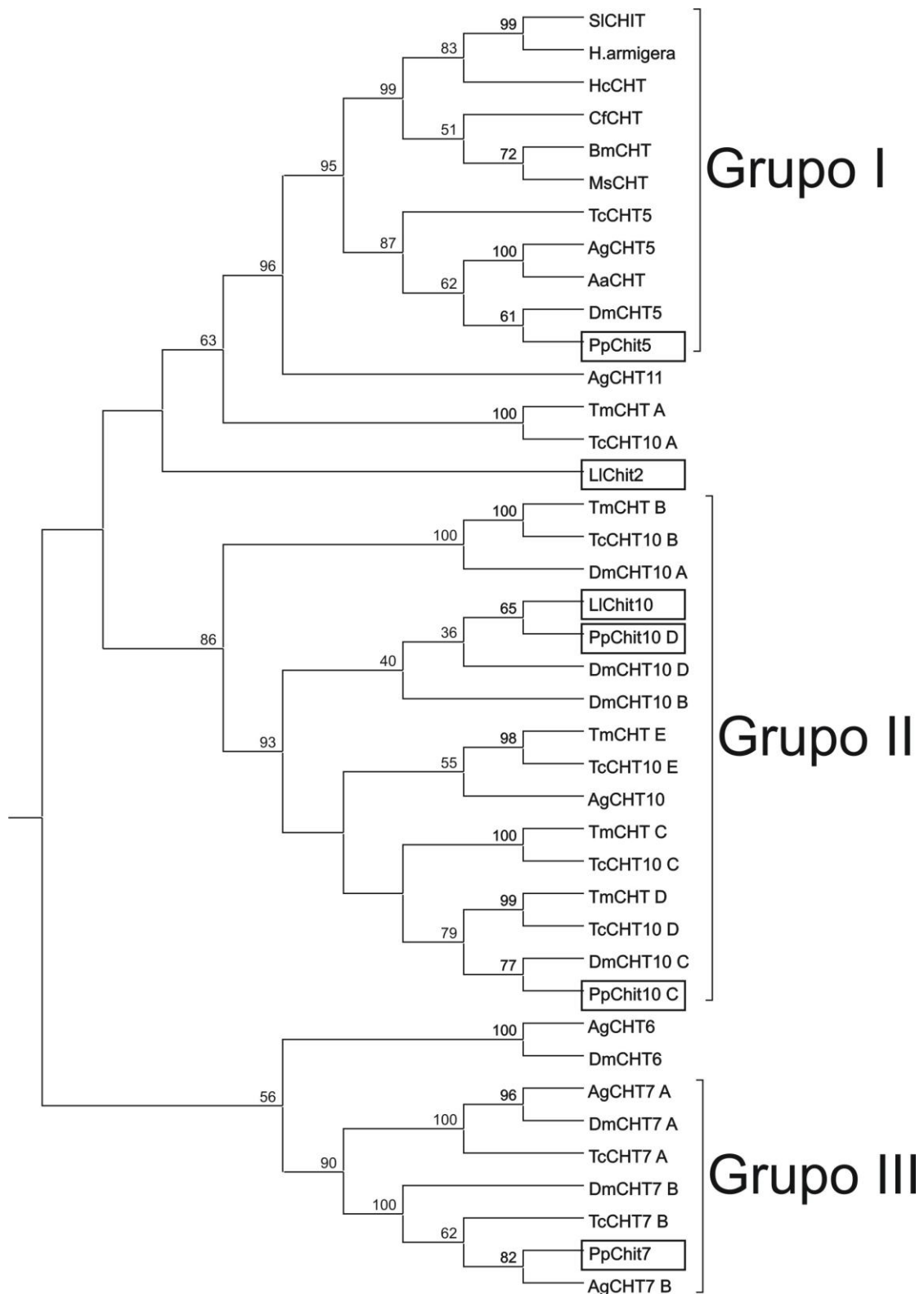
Nome do gene	Tamanho da sequência encontrada correspondente ao domínio catalítico (Aa)	Cobertura do domínio conservado	Identificador (GenBank) das sequências correspondentes ao cDNA analisado
LIChit1	-	-	AM091076; EW990674
LIChit2	308	completa	AM102064; AM102065; AM102066
LIChit3	217	incompleta	AM094382
LIIGDF	395	completa	AM108551; AM108549; AM108552; AM108547; AM108554; AM108550; AM108553; EW994976; AM108546; EX210729; AM108555
LIChit10	269	incompleta	AM094513

**Tabela 4.3)** ESTs de *P. papatasi* codificantes para possíveis quitinases e proteínas similares a quitinases

Nome do gene	Tamanho da sequência encontrada correspondente ao domínio catalítico (Aa)	Cobertura do domínio conservado	Identificador (GenBank) das sequências correspondentes ao domínio conservado
PpChit1	309	incompleto	ES347593; ES347753; ES347987; ES347416; ES347565; FK812001; EX474506; FG112344
PpChit2	345	completo	FG108464; FK813792; FG107314;
PpChit5	228	incompleto	FG109512; EY211327; EY217847
PpChit7	206	incompleto	EY204135
PpChit10C	132	incompleto	FG109449
PpChit10D	196	incompleto	FG113094; FG111300; FG113165
PpIGDF	395	completo	EY215515; EY204608; EY207035; EY213084; EY213813; EY208814; EY219037; EY215322; EY213787; FK815431; FG113539; EY202851; FG111798; EY214541; FG117251; FG110754; EY213009; FG109999; FG117423; FG119151; FG118317; FG109071; FG116242; FG115382; EY210625; EY218455; EY212784; EY206638; FG114845; FG114085; EX474349; EY210790; FG116689; EY208210; EY217436; FG112832; FG115215; EY214839; FG116027; EX473708; EY210634; EY218529; FG114974; EY209408; FG110267; FG118857; EY210965; FG107881; EY210154; EY214230



**Figura 4.19)** Análise filogenética usando seqüências dos domínios catalíticos de possíveis quitinases e proteínas similares a quitinases. Uma análise de 5.000 replicatas foi realizada em árvores inferidas pelo método de evolução mínima.



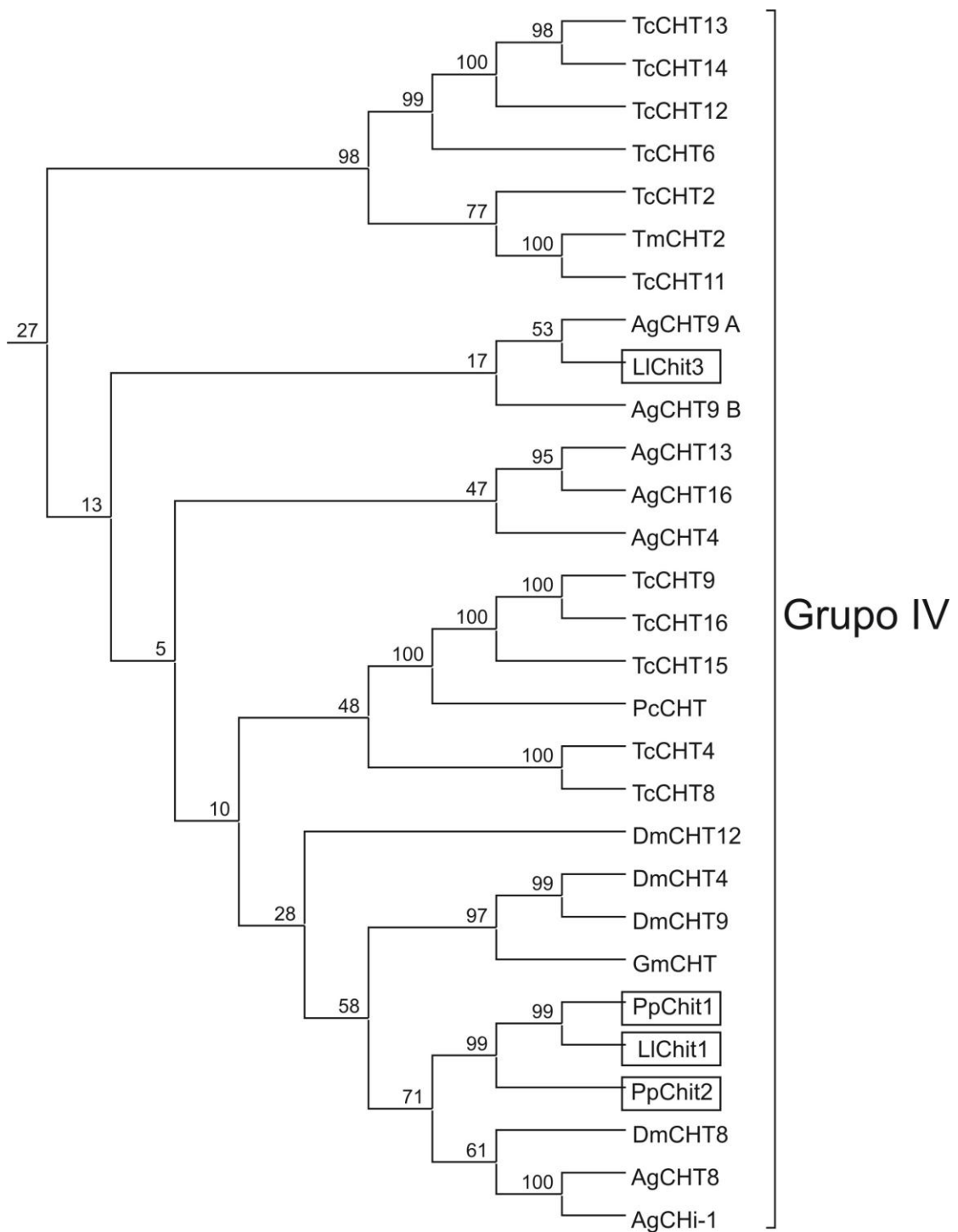
**Figura 4.20)** Ramificação da correspondente aos grupos I, II e III. Sequências das possíveis quitinases de flebotomíneos estão destacadas.

De acordo com a ramificação exposta na figura 4.20, a possível proteína codificada pelo gene PpChit5 deve pertencer ao grupo I. As seqüências nomeadas de PpChit10C e PpChit10D devem fazer parte do grupo II e provavelmente são provenientes de um único gene. O LIChit10 parece ser ortólogo do PpChit10, codificando para proteínas seqüência

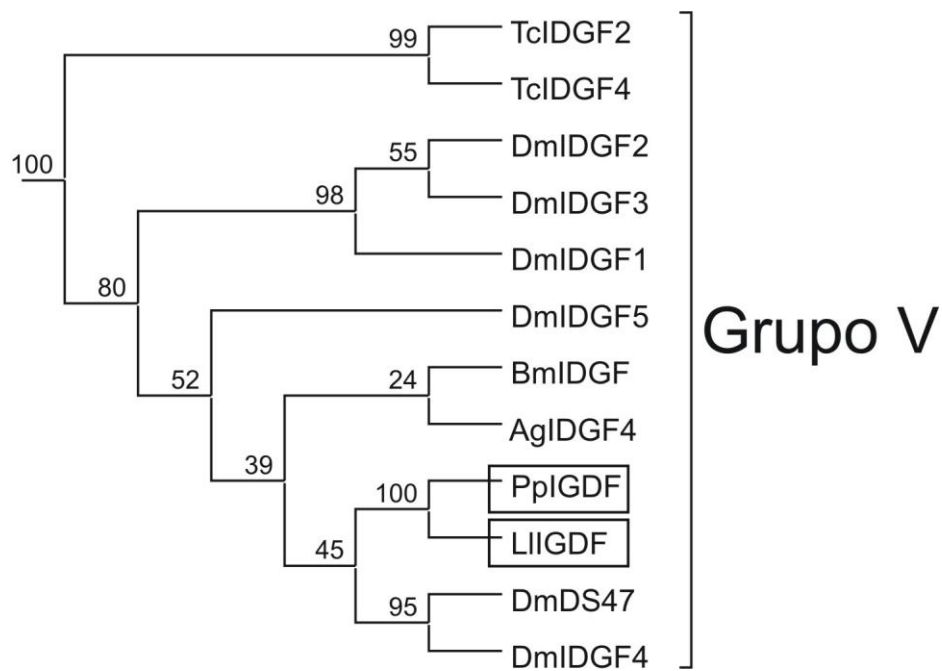
protéica que também é classificada como integrante do grupo II. Pelo método utilizado não foi possível prever com confiabilidade o grupo que a possível quitinase LIChit2 pertence.

Na figura 4.21 é mostrada a ramificação corresponde ao grupo IV que parece compreender as possíveis quitinases LIChit3, PpChit1, LIChit1 e PpChit2.

Na figura 4.22 é mostrada a ramificação composta por proteínas similares a quitinases, conhecidas como IGDFs. Nas ESTs de *L. longipalpis* e *P. papatasi* foram encontradas diversas seqüências provenientes de dois possíveis genes deste grupo, o LIIGDF e PpIGDF.



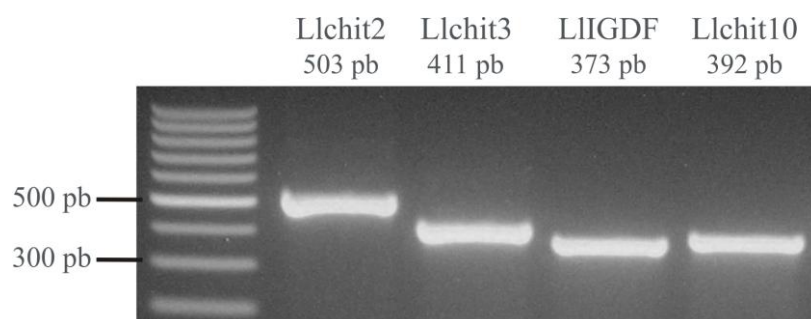
**Figura 4.21)** Ramificação correspondente ao grupos IV. Seqüências das possíveis quitinasas de flebotomíneos estão destacadas.



**Figura 4.22)** Ramificação correspondente ao grupos IV. Sequências das possíveis proteínas similar a quitinase de flebotomíneos estão destacadas.

#### **4.10- Amplificação por PCR de fragmentos gênicos possivelmente codificantes para quitinases e proteínas similares a quitinases de *L. longipalpis***

Com oligonucleotídeos desenhados a partir de ESTs codificantes para possíveis quitinases e proteínas similares a quitinases de *L. longipalpis*, foram amplificados fragmentos dos tamanhos esperados usando DNA de células LL5 como molde (figura 4.23).



**Figura 4.23)** Amplificação por PCR de fragmentos gênicos possivelmente codificantes para quitinases de *L. longipalpis*

## V- DISCUSSÃO

### 5.1- Promotor do gene de quitinase *LlChit1*

Ainda não foi reportada transgenia em flebotomíneos. Entretanto, quando esta tecnologia for dominada, ferramentas que permitam controlar a expressão heteróloga nestes insetos serão imprescindíveis. O promotor do gene *LlChit1* é um candidato interessante para induzir a expressão de genes de resistência em flebotomíneos, pois está ativo em um momento crítico da vida do parasito dentro do vetor, exatamente quando a MP se desfaz e as leishmanias escapam do bolo alimentar e se aderem ao epitélio do intestino médio.

O promotor do gene da carboxipeptidase A de *A. gambiae* induz a expressão heteróloga em *A. aegypti*, mostrando-se uma poderosa ferramenta para expressão de genes de resistência em mais de um gênero de mosquito (Moreira *et al.* 2000). Curiosamente, um gene ortólogo de *Phlebotomus papatasi* (*Ppchit1*) (Ramalho-Ortigão *et al.*, 2005) contém o começo da seqüência UTR 5' idêntico ao começo do RNA da quitinase de *L. longipalpis* (*LlChit1A*), o que pode ser um indício de um possível sistema regulador conservado entre flebotomíneos. A expressão de genes que bloqueiem a motilidade ou ligação do parasito no momento em que o gene *LlChit1* está ativo talvez possa conferir refratariedade de espécies vetoras de leishmaniose visceral como *L. longipalpis* e *P. papatasi*.

Por experimentos de RT-PCR foi visto que o promotor do gene *LlChit1* é ativo em células LL-5, o que faz desta linhagem um excelente modelo para estudo. Devido à grande dificuldade em se obter insetos *L. longipalpis* suficientes para experimentos envolvendo interação proteína DNA, a possibilidade de usar células em cultura para caracterização bioquímica do promotor desta quitinase é bastante promissora.

### 5.2- Possível mecanismo de regulação do gene *LlChit1*

O clone genômico *LlChit1G* parcialmente seqüenciado continha uma região flanqueadora 5' pequena, com aproximadamente 500 pb, mas que possibilitou o desenho experimental da PCR invertida com sucesso.

A região seqüenciada à montante do gene *LlChit1* possui informações que sugerem a participação de um controle hormonal por ecdisona na regulação do promotor desta quitinase através de elementos de possível reconhecimento por E74A (Urness e Thummel, 1990). Este



tipo de controle hormonal envolvendo E74 já foi descrito para a indução da expressão de outros genes específicos do período pós-prandial em insetos hematófagos.

O controle de expressão do gene codificante para a enzima glucosamina:frutose-6-fosfato aminotransferase (GFAT) de *A. aegypti* parece ser um exemplo deste tipo de regulação. GFAT catalisa a etapa lenta da rota biossintética de UDP-N-acetil-glicosamina que é o precursor ativo de inúmeras macromoléculas contendo aminoaçúcares em artrópodes e fungos como, por exemplo, quitina. O gene codificante para GFAT de mosquito possui elementos responsivos a E74 e Br-C (*Broad-Complex*) na sua região flanqueadora 5' e é regulado positivamente após a ingestão de sangue por uma via aparentemente induzida por 20-hidroxi-ecdisona (Kato *et al.*, 2002). A produção de quitina nestes insetos também é regulada por retro-alimentação negativa por UDP-N-acetil-glicosamina sobre GFAT e mediante o controle de expressão da quitina-sintase que catalisa a última etapa desta via biossintética (Kato *et al.*, 2006). A secreção da MP de mosquitos parece ser regulada por um complexo mecanismo que sofre indução por ecdisona.

Curiosamente, o gene *Llchit1* de *L. longipalpis*, que deve degradar a MP em fêmeas adultas, parece sofrer um processo de regulação também envolvendo ecdisteróides. Ainda não foi demonstrada a participação destes hormônios na regulação da expressão de quitinases digestivas (grupo IV). O estudo da via de sinalização que controla a expressão do gene *LlChit1* pode ser um exemplo bastante esclarecedor de como ocorre a regulação dos genes envolvidos na fisiologia da digestão em flebotomíneos e talvez até sirva como modelo para o trabalho com insetos. Aparentemente, a sinalização por ecdisona parece regular a expressão de genes envolvidos na síntese e degradação da MP o que leva a suposição da existência de mensageiros intracelulares diferenciados que participam da transdução do sinal hormonal, possibilitando respostas fisiológicas antagônicas.

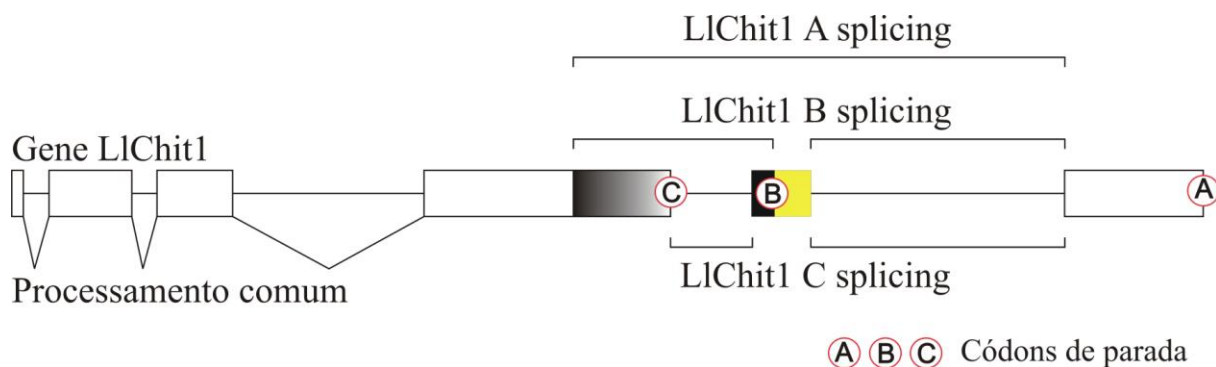
### ***5.3- Processamento alternativo do gene de quitinase LlChit1***

O seqüenciamento dos íntrons do gene de quitinase foi de grande importância para interpretação dos dados de RT-PCR que indicavam a presença de *splicing* alternativo em formas imaturas do inseto. Encontrar um padrão de amplificação de múltiplas bandas com oligonucleotídeos que se anelam ao redor de um íntron de 1464 pb foi um forte indicativo de processamento alternativo que se confirmou com clonagem e seqüenciamento das mesmas. O seqüenciamento do clone genômico possibilitou uma abordagem interpretativa diferenciada na era pré-genômica em que se encontra o estudo do vetor *L. longipalpis*.

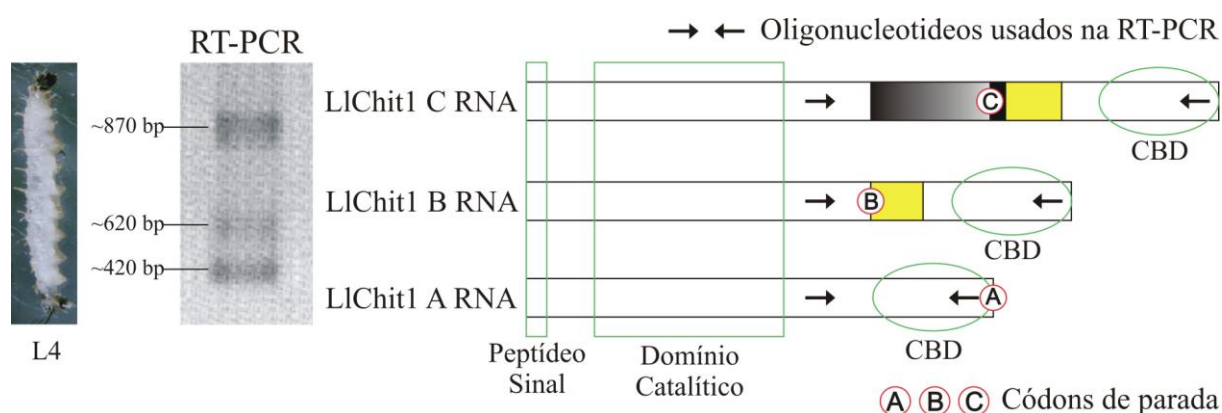
Os três íntrons presentes na porção 5' do gene de quitinase são retirados igualmente durante o processamento de todas as formas de *splicing* encontradas. O processamento alternado ocorre somente na região considerada como íntron 4 por comparação à forma de *splicing* LlChit1A encontrada em fêmeas adultas. Na figura 5.1 é exibido um esquema mostrando o padrão de *splicing* comum na região 5' e os três padrões diferentes de processamento da porção 3' do gene LlChit1.

Nas duas novas formas de *splicing* encontradas, acontece um processo de antecipação do término da tradução por introdução de códons de parada alternativos. Desta forma, a região final do RNA, justamente a que codifica o domínio de ligação à quitina, não é decodificada em proteína e dois tipos diferentes de quitinases sem este domínio são produzidos. Na figura 5.2 são mostrados um esquema das 3 moléculas de RNA produzidas a partir do gene LlChit1 em larvas e a eletroforese da RT-PCR que originou a suspeita de processamento alternativo em formas imaturas.

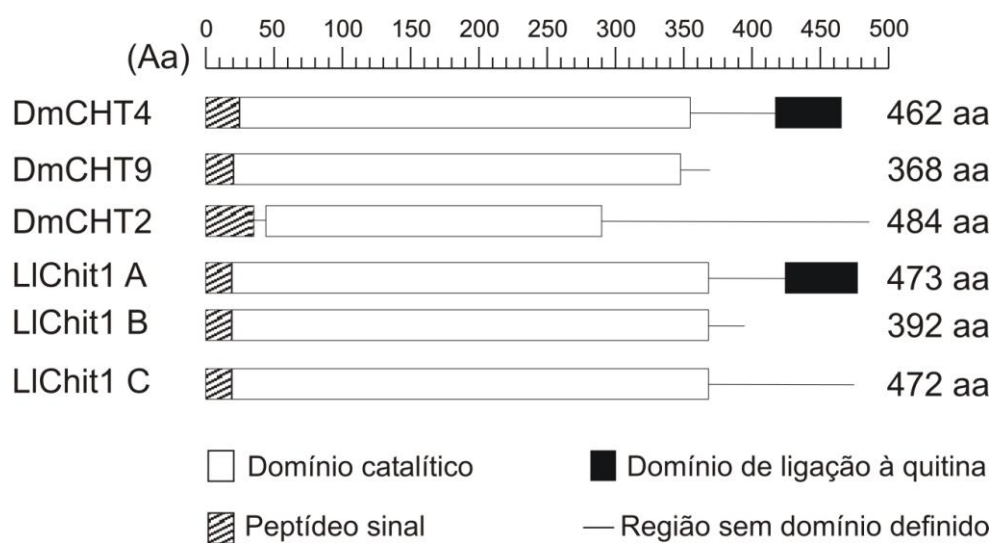
Este tipo de processamento alternativo com introdução de códons de parada recentes já é canônico na literatura e um dos exemplos mais clássicos é o da diferenciação sexual em *D. melanogaster* (Schütt e Nöthiger, 2000). Neste, a introdução de um códon de parada a partir do primeiro intron do gene *transformer* bloqueia a expressão da forma ativa da proteína e é iniciada uma cascata de eventos que leva à formação no fenótipo masculino (Sánchez, 2008). As possíveis proteínas traduzidas pelas moléculas de RNA alternativamente processadas a partir do gene LlChit1 possuem o domínio catalítico completo e provavelmente apresentam atividade enzimática. Entretanto, a perda do domínio de ligação à quitina deve reduzir a afinidade da proteína pelo substrato insolúvel. Llchit1C, apesar de possuir uma seqüência peptídica que alinha com a região correspondente ao CBD de outras quitinases, não possui as 6 cisteínas características do domínio de ligação à quitina presente em peritrofinas. Estas cisteínas são caracterizadas pelo padrão correspondente ao *carbohydrate-binding module* 14 (CBM14 family; <http://www.cazy.org/fam/CBM14.html>): CX11–24CX5–6CX9–19CX10–17CX4–14C. Como evidenciado na figura 4.15, a forma de *splicing* LlChit1C não dispõe de nenhuma das cisteínas conservadas. Esta forma de *splicing* assemelha-se por arquitetura de domínios a DmCHT2 que também parece não ter CBD. Llchit1B assemelha-se por arquitetura de domínios a DmCHT9, que já foi analisada por expressão heteróloga e apresenta baixíssima afinidade à quitina coloidal (Zhu Q *et al.* 2008 B). LlChit1A possui tanto domínio catalítico como CBD, assemelhando-se por arquitetura de domínio a DmCHT4. Na figura 5.3 é apresentado um esquema comparativo dos domínios dessas possíveis proteínas de *L. longipalpis* e suas equivalentes estruturais em *D. melanogaster*. O identificador no GenBank destas seqüências de *D. melanogaster* é mostrado no anexo I.



**Figura 5.1)** Esquema mostrando o padrão de *splicing* comum na região 5' e os três padrões diferentes na porção 3' do gene LIChit1. Cada uma das três formas de *splicing* possui um códon de terminação diferente.



**Figura 5.2)** Esquema mostrando as três formas de RNA codificadas pelo gene de quitinase. As formas de *splicing* B e C codificam proteínas sem o domínio de ligação à quitina (CBD), pois possuem códons de parada antecipados que impedem a tradução do último éxon.



**Figura 5.3)** Arquitetura de domínios de possíveis quitinases. Esquema das quitinases de *D. melanogaster* que mais se assemelham por arquitetura de domínios às formas de *splicing* do gene LIChit1 de *L. longipalpis*.

O processamento alternativo de genes de quitinase de outras espécies já foi descrito, mas a arquitetura de domínio das formas de *splicing* permanece constante (Abdel-Banat e Koga, 2002). Um gene de quitinase de *Bombyx mori* origina quatro diferentes transcritos que apresentam domínio catalítico e domínio de ligação à quitina. Todas foram expressas em sistemas heterólogos e apresentaram atividade catalítica.

#### **5.4- Possível função das quitinases digestivas com ou sem sítio de ligação à quitina**

O gene LIChit1 codifica proteínas que, por análise filogenética, são classificadas como pertencentes ao grupo IV, composto por várias quitinases encontradas em tubo digestivo de diversos insetos. As enzimas deste grupo provavelmente participam do controle da espessura da MP e do processo de digestão de alimentos ricos em quitina. Larvas precisam digerir a quitina presente no alimento para poder usar N-acetil-glicosamina na síntese de um novo exoesqueleto durante a muda. O gene LIChit1 de *L. longipalpis* parece ter características peculiares em relação ao que já foi descrito sobre genes codificantes para quitinases e proteínas similar a quitinase.

Como já reportado anteriormente (Ramalho-Ortigão e Traub-Csekö 2003), o transcrito LIChit1A possui domínio catalítico e domínio de ligação à quitina e está presente no tubo digestivo de fêmeas adultas 72 horas após a alimentação sanguínea. Este é justamente o momento em que a MP está sendo degradada, o que sugere que esta forma de *splicing* é capaz de quebrar os filamentos de quitina da matriz. Apesar da quitina ser um componente estrutural importantíssimo da MP, ela não é majoritária e encontra-se altamente recrutada por proteínas contendo domínio de ligação à quitina e por glicoproteínas. O acesso da quitinase até os polímeros de seu substrato pode ser um fator limitante para a ação enzimática. A baixa disponibilidade da quitina na MP talvez torne necessária a presença do domínio de ligação à quitina para uma ação hidrolítica eficaz e determinante para a degradação da matriz.

Insetos como *L. longipalpis*, que se alimentam de matéria orgânica em decomposição enquanto formas imaturas, têm uma dieta extremamente rica em fungos. Estes microorganismos possuem alta concentração de quitina na sua parede celular e podem fornecer grande quantidade de N-acetil-glicosamina para a larva em crescimento. No entanto, é um grande desafio bioquímico ter que digerir a quitina do alimento sem danificar a MP2 que possui papel fundamental na compartimentalização da digestão. Quitinases sem o sítio de ligação à quitina poderiam atender a este fino trabalho de digerir a quitina prontamente disposta da parede celular de microorganismos presentes na dieta sem destruir a estrutura

compartimentalizadora, que é fundamental para a fisiologia digestiva. De fato existem duas formas de RNA em larvas de *L. longipalpis* que codificam enzimas sem o sítio de ligação à quitina e que talvez tenham papel similar ao discutido por Genta *et al.* (2006) para a quitinase sem este domínio em *Tenebrio molitor*.

Concomitantemente, o RNA codificante para a LIChit1A, que possui sítio de ligação à quitina, é produzido em formas imaturas. Talvez em larvas, esta possível quitinase atue no controle da espessura e degradação da MP2 diminuindo a perda de quitina excretada junto com o resíduo da digestão.

### **5.5- Possível mecanismo de regulação de atividade quitinolítica em *L. longipalpis***

A quitinase DmCHT4, que possui a mesma arquitetura de domínio da possível proteína LIChit1A, apresenta maior atividade enzimática em pH 6, diminuindo bastante a sua atividade em valores de pH iguais ou superiores a 8 (Zhu *et al.*, 2009c). A atividade quitinolítica de extrato de tubo digestivo de *L. longipalpis* 48 horas após a alimentação com sangue parece ser máxima frente a um pH em torno de 6,5 com redução significativa em pH 9. Como demonstrado por Fazito do Vale *et al.* (2007) para o modelo *L. longipalpis*, um fino controle da acidez no intestino médio de larvas garante um gradiente de pH que vai de 9 na porção anterior a 6,5 na porção posterior. Já em insetos adultos desta espécie, o pH do tubo digestivo de fêmeas após a alimentação sanguínea tende a diminuir com o passar das horas (Santos *et al.*, 2008). Seria compatível com estes modelos supor que a possível enzima LIChit1A tivesse um perfil de atividade enzimática parecido com o da DmCHT4, o que condiz com a acidificação do lúmen intestinal com a progressão da digestão sanguínea e diminuição do pH na região posterior do tubo digestivo da larva. Estes são justamente os momentos e locais onde a MP1 (Secundino *et al.*, 2005) e MP2 de *L. longipalpis* parece ser degradada. A caracterização da degradação da MP2 em larvas desta espécie não foi explicitamente reportada, sendo somente descrito que não há indícios da sua presença no intestino posterior de larvas. Com base no modelo descrito por Fazito do Vale *et al.* (2007) podemos crer que a degradação da matriz antes da região suposta como secretora de água em tubo digestivo de larvas, que fica na porção terminal do intestino médio, seria catastrófica para o processo digestivo. Caso isso acontecesse, o espaço ectoperitrófico seria desfeito, impedindo o transporte de enzimas e produtos da digestão que devem seguir em contrafluxo ao alimento que progride pela luz do espaço endoperitrófico. Caso a possível proteína LIChit1A tenha um perfil de catálise parecido com o encontrado para a DmCHT4 a baixa

concentração de prótons da região anterior do intestino médio da larva pode ter um papel protetor sobre a MP2.

A análise do padrão de expressão do gene *LlChit1* ao longo do tubo digestivo de larvas, bem como a caracterização da atividade enzimática dos produtos deste gene em adultos e formas imaturas, podem elucidar importantes aspectos da fisiologia digestiva de *L. longipalpis*. Talvez a regulação da atividade quitinolítica desempenhada pelo gene *LlChit1* possa estar relacionada com a determinação do seu padrão de processamento e expressão, como também pela atividade enzimática dos seus produtos frente às diferentes condições de pH presentes no tubo digestivo de larvas e adultos da espécie *L. longipalpis*.

### ***5.6- Evolução dos genes codificantes para quitinases com ou sem sítio de ligação à quitina***

Em outros insetos ainda não foi descrito um gene que sofra *splicing* alternativo codificando ao mesmo tempo enzimas com ou sem domínio de ligação à quitina. Um mecanismo de evolução diferenciado pode ter ocorrido em *L. longipalpis*, no qual a multiplicação gênica foi substituída pela ocorrência de processamento alternativo. Este tipo de análise para o nosso modelo é bastante limitado pela ausência de dados disponíveis do projeto genômico em andamento. Nos próximos anos, já com genomas de flebotômíneos seqüenciados, será possível elucidar estes questionamentos por genômica comparativa associada à análise de transcrição para verificar a ocorrência de processamento alternativo.

### ***5.7- Análise do número de cópias do gene de quitinase LlChit1***

O seqüenciamento do clone genômico de quitinase permitiu uma re-análise de resultados anteriores que sugeriam a multiplicidade de cópias do gene *Llchit1* no genoma de *L. longipalpis* (Ramalho-Ortigão e Traub-Csekö 2003). Os resultados dos experimentos de *Southern blot* e PCR obtidos com DNA do clone *LlChit1G*, comparados com os obtidos com DNA genômico de células LL-5, sugerem que este gene é de cópia simples. Isto está de acordo com as análises de genes de quitinase presentes em diferentes espécies com genoma já seqüenciado. Estas demonstram a ocorrência de diversos genes codificantes para proteínas similares a quitinases, mas todos são cópia simples. A re-análise de experimentos de *Southern blot*, após o seqüenciamento de genomas, também já foi reportada (Zhu *et al.*, 2008 a). No caso do gene *LlChit1*, a re-interpretação dos dados foi gerada pela descoberta de um íntron de 1464 pb interrompendo a região codificante para a sonda. Este intron possuía sítios de

clivagem pelas enzimas empregadas no experimento de *Southern blot* com DNA genômico. A obtenção de um perfil eletroforético semelhante, usando DNA do clone LIChit1G digerido com as mesmas enzimas, confirmou a suposição feita com base nas seqüências genômicas.

### ***5.8- Análise filogenética de possíveis genes codificantes para quitinases e proteínas similares a quitinases de L. longipalpis e P. papatasi***

O trabalho publicado por Zhu *et al.* (2008 a) demonstra que proteínas similar a quitinase codificadas por genomas já seqüenciados de insetos podem ser divididas em 5 grupos filogenéticos com base no modelo matemático evolução mínima. Em outubro de 2009, Aracane e Muthukrishnam (2009) apresentaram a anotação de novos genes de quitinase possibilitando a distinção de mais três grupos filogéticos utilizando o modelo matemático UPGMA. Estes últimos grupos foram identificados pelos números VI, VII e VIII, compreendendo as quitinases com nome CHT6, CHT2 e CHT11, respectivamente. Os grupos I, II, III, IV e V permanecem os mesmos descritos em 2008.

Pelas análises feitas com o emprego do método de evolução mínima, foi visto que a metodologia empregada na busca por ortólogos de quitinase em flebotomíneos permitiu a identificação de pelo menos uma possível proteína integrante de cada um dos 5 grupos propostos por Zhu *et al.* (2008a). A proteína codificada pelo gene PpChit5 pertence ao grupo I e apresenta grande similaridade a DmChit5. Cada espécie de inseto parece ter apenas um gene codificante para proteínas do grupo I, II e III.

O gene LIChit10 deve pertencer ao grupo II que possui quitinases com 4 a 5 domínios catalíticos (Zhu *et al.*, 2008a). Dois cDNAs que codificam para domínios parecidos com os deste grupo foram encontrados nas ESTs de *P. papatasi*. Eles apresentam grande similaridade com o terceiro e quarto domínio da CHT10 de *D. melanogaster*. Um cDNA codificante para para um domínio deste grupo foi encontrado nas ESTs de *L. longipalpis* e este apresenta grande similaridade ao PpChit10D e ao DmCHT10D. Talvez, os genes LIChit10 e PpChit10 possuam uma arquitetura de domínio igual a do DmChit10 com 4 domínios de ligação à quitina e 4 domínios catalíticos. Esta arquitetura para proteínas deste grupo também é vista em outro díptera, *A. gambiae*.

O cDNA nomeado de PpChit7 codifica para uma proteína do grupo III, que possui integrantes com dois domínios catalíticos. O domínio encontrado nas ESTs de *P. papatasi* apresentou alta similaridade com o segundo domínio da AgCHT7, TcCHT7 e DmCHT7, tendo grandes chances de corresponder ao domínio C-terminal codificado pelo gene PpChit7. Nas quitinases deste grupo existe uma semelhança maior entre domínios de espécies

diferentes do que entre domínios de uma mesma proteína, sugerindo uma especialização destas regiões da molécula (Aracane e Muthukrishnam, 2009).

O gene LIChit3 pode codificar para uma quitinase que deve pertencer ao grupo IV assim como os produtos do gene LIChit1. Entretanto, os valores de *bootstrap* da árvore construída não estão evidenciando uma similaridade muito grande deste gene LIChit3 com outras quitinases deste grupo, como acontece para o LIChit1. O fato de ter sido usado nas análises uma seqüência parcial do domínio catalítico do LIChit3 pode estar sendo determinante para os baixos valores de *bootstrap*. Entretanto, em 53% das árvores construídas o domínio encontrado para o gene LIChit3 aparece em um agrupamento com uma quitinase de mosquito AgCHT9. As possíveis quitinases de *P. papatasi* PpChit1 e PpChit2 estão muito próximas filogeneticamente da LIChit1.

Os genes LIIDGF e PpIDGF parecem pertencer ao grupo V composto por proteínas similar a quitinase que apresentam habilidade de ligação à quitina, mas que não possuem atividade catalítica (Zhu *et al.*, 2008b). Pelo número de seqüências encontradas codificantes para estas proteínas, estes genes parecem ser os mais ativos dentre os demais genes da família de quitinase encontrados no GeneBank.

Amplificações por PCR de fragmentos dos genes encontrados nas EST foram realizadas para confirmar que as seqüências utilizadas nas análises são provenientes do genoma da espécie *L. longipalpis*. O tamanho dos fragmentos amplificados a partir de DNA genômico de células LL-5 estava de acordo ao esperado com base na seqüência de cDNA, o que é um indício da ausência de íntrons interrompendo a região codificante para as seqüências encontradas no GenBank.



## VI- CONCLUSÃO

- O seqüenciamento do clone genômico LlChit1G contendo um gene de quitinase de *L. longipalpis*, revelou 4 regiões intrônicas que interrompem as porções codificantes do RNA LlChit1A. A seqüência à montante do gene LlChit1 evidenciou um possível promotor mínimo ativo em fêmeas adultas após a alimentação sangüínea e elementos compatíveis com uma via de sinalização envolvendo ecdisona.
- A clonagem e seqüenciamento de fragmentos amplificados por RT-PCR demonstraram que o gene LlChit1 sofre processamento alternativo em formas imaturas de *L. longipalpis* e pode codificar possíveis quitinases com e sem domínio de ligação à quitina e com funções potencialmente distintas.
- Por análises computacionais de seqüências de EST, foi visto que a família 18 de glicosídeo hidrolases de flebotomíneos parece ser multigênica como descrito para outros insetos. As análises filogenéticas indicaram que a seqüência do domínio catalítico codificada pelo gene Llchit1 possui maior similaridade com a seqüência de quitinases tidas como digestivas.

## VII- ANEXO I

Identificador no GeneBank das seqüências de insetos utilizadas nas análises filogenéticas.

Nome	Espécie	Identificador
<i>AaCHT</i>	<i>Aedes aegypti</i>	AAB81849
<i>AgCHI-1</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	AAB87764
<i>AgCHT2</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	XP_315650
<i>AgCHT4</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	XP_315351
<i>AgCHT5</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	AGAP002457
<i>AgCHT6</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	XP_310937
<i>AgCHT7</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	XP_308858
<i>AgCHT8</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	XP_316448
<i>AgCHT9</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	XP_307732
<i>AgCHT10</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	XP_001238192
<i>AgCHT11</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	XP_001237469
<i>AgCHT12</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	XP_316142
<i>AgCHT13</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	XP_314312
<i>AgCHT16</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	XP_319801
<i>AgIDGF4</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	XP_317398
<i>BmCHT</i>	<i>Bombyx mori</i>	AAB47538
<i>BmIDGF</i>	<i>Bombyx mori</i>	BAF73623
<i>CfCHT</i>	<i>Choristoneura fumiferana</i>	AAM43792
<i>ClCHT</i>	<i>Spodoptera litura</i>	BAB12678
<i>CtCHT</i>	<i>Chironomus tentans</i>	CAA73685
<i>DmCHT2</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_477298
<i>DmCHT4</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_524962
<i>DmCHT5</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_650314
<i>DmCHT6</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_572598
<i>DmCHT7</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_647768
<i>DmCHT8</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_611542
<i>DmCHT9</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_611543
<i>DmCHT10</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_001036422
<i>DmCHT11</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_572361
<i>DmCHT12</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_726022
<i>DmDS47</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_477081
<i>DmIDGF1</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_477258
<i>DmIDGF2</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_477257
<i>DmIDGF3</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_477256
<i>DmIDGF4</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_511101

<i>DmIDGF5</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_611321
<i>GmCHT</i>	<i>Glossina morsitans</i>	AAL65401
<i>HaCHT</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>	AAQ91786
<i>HcCHT</i>	<i>Hyphantria cunea</i>	AAB47539
<i>MsCHT</i>	<i>Manduca sexta</i>	P36362
<i>PcCHT</i>	<i>Phaedon cochleariae</i>	CAA77014
<i>SlCHT</i>	<i>Spodoptera litura</i>	BAB12678
<i>TcCHT2</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	NP_001034516
<i>TcCHT4</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	NP_001073567
<i>TcCHT5</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	AAV74190
<i>TcCHT6</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	AY873916
<i>TcCHT7</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	NP_001036035
<i>TcCHT8</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	NP_001038094
<i>TcCHT9</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	XP_307732
<i>TcCHT10</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	NP_001036067
<i>TcCHT11</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	NP_001038095
<i>TcCHT12</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	XP_972802
<i>TcCHT13</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	NP_001036034
<i>TcCHT14</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	XP_973005
<i>TcCHT15</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	XP_973077
<i>TcCHT16</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	AAW67571

## VIII-REFERÊNCIAS

- Abdel-Banat BMA, Koga D. (2002) Alternative splicing of the primary transcript generates heterogeneity within the products of the gene for *Bombyx mori* chitinase. *J Biol Chem.* 277(34):30524–34.
- Addy M, Nandy A. (1992) Ten years of kala-azar in west Bengal, Part I. Did post-kala-azar dermal leishmaniasis initiate the outbreak in 24-Parganas? *Bull. World Health Organ.* 70:341–6.
- Alphey L, Beard CB, Billingsley P, Coetzee M, Crisanti A, Curtis C, *et al.* (2002) Malaria control with genetically manipulated insect vectors. *Science.* 298(5591):119-21.
- Altamirano-Enciso AJ, Marzochi MCA, Moreira JS, Schubach AO, Marzochi KBF. (2003) Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. *Hist cienc saude-Manguinhos.* 10(3): 853-82.
- Arakane Y, Muthukrishnan S. (2009) Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cell Mol Life Sci.* Epub 09 Out 2009.
- Balbiani EG. (1890) Études anatomiques et histologiques sur le tube digestif des Crytops. *Arch Zool Exp Gen.* 8:1-82.
- Bass JW, Vincent JM, Person DA. (1997) The expanding spectrum of *Bartonella* infections: II. Cat-scratch disease. *Pediatr Infect Dis J.* 16(2):163-79.
- Bateman A, Birney E, Durbin R, Eddy SR, Finn RD, Sonnhammer EL. (1999) Pfam 3.1: 1313 Multiple Alignments and Profile HMMs Match the Majority of Proteins. *Nucleic Acids Res.* 27:260-262.
- Beyrer C, Villar JC, Suwanvanichkij V, Singh S, Baral SD, Mills JE. (2007) Neglected diseases, civil conflicts, and the right to health. *Lancet Infect Dis.* 370:619-627.

- Binnington KC, Lehane MJ, Beaton CD. (1998) The peritrophic membrane. IN: Harrison FW, Locke M (Eds), *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. v. 11B: Insecta, New York:Wiley. p. 747–58.
- Cabib E. (1987) The synthesis and degradation of chitin. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 59:59–101.
- Carter R, Mendis KN, Miller LH, Molineaus L, Saul A. (2000) Malaria transmission-blocking vaccines—how can their development be supported? *Nature Medicine*. 6(3):241-4.
- Centers for Disease Control and Prevention CDC [homepage na Internet]. National Center for Health Marketing [atualizada em 20 Jul 2009; acesso em 10 Nov 2009]. Leishmaniasis; [aproximadamente 1 tela]. Disponível em: [www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis_il.htm)
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW *et al.* (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*. 5:873-82.
- Christensen HA, Teoford SR. (1972) *Trypanosoma thecadactyli* sp. n. from forest geckoes in Panama, and its development in the sand fly *Lutzomyia trinidadensis* (Newstead) (Diptera: psychodidae). *J Protozoology*. 19:403-406.
- Devenport M, Jacobs-Lorena M. (2004) The peritrophic matrix of hematophagous insects. In: Marquardt WC, editor. *Biology of Disease Vectors*. 2 ed. Amsterdam: Elsevier academic press. p. 298-299.
- Durbin R, Eddy S, Krogh A, Mitchison G. (1998) *Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids*. Cambridge University Press. 356 p.
- Edwards MJ, Lemos FJ, Donnelly-Doman M, Jacobs-Lorena M. (1997) Rapid induction by a blood meal of a carboxypeptidase gene in the gut of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol*. 27(12):1063-72.

- Fazito do Vale V, Pereira MH, Gontijo NF. (2007) Midgut pH profile and protein digestion in the larvae of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Insect Physiol.* 53(11):1151-9.
- Fausto AM, Taddei AR, Mazzini M, Maroli M. (1999) Morphology and ultrastructure of spiracles in phlebotomine sandfly larvae. *Med Veterin Entomol.* 13:101-9.
- Franz AWE, Sanchez-Vargas I, Adelman ZN, Blair CD, Beaty BJ, James AA, *et al.* (2006) Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(11):4198–203.
- Filho BP, Lemos FJ, Secundino NF, Pascoa V, Pereira ST, Pimenta PF. (2002) Presence of chitinase and beta-acetylglucosaminidase in the *Aedes aegypti*. a chitinolytic system involving peritrophic matrix formation and degradation. *Insect Biochem Mol Biol.* 32(12):1723–9.
- Finn RD, Tate J, Mistry J, Coghill PC, Sammut SJ, Hotz HR *et al.* (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 36(Database issue):D281–8.
- Fukamizo T, Kramer KJ. (1985) Mechanism of chitin oligosaccharide hydrolysis by the binary enzyme chitinase system in insect moulting fluid. *Insect Biochem.* 15:1–7.
- Fukamizo T. Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. *Curr Protein Pept Sci.* Jul 2000;1(1):105-24. Review.
- Genta FA, Blanes L, Cristofolletti PT, do Lago CL, Terra WR, Ferreira C. (2006) Purification, characterization and molecular cloning of the major chitinase from *Tenebrio molitor* larval midgut. *Insect Biochem Mol Biol.* 36(10):789-800.
- Gomes R, Teixeira C, Teixeira MJ, Oliveira F, Menezes MJ, Silva C, *et al.* (2008) Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(22):7845-50.

- Graça-Souza AV, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GA, Braz GRC, Paes MC, Sorgine MHF *et al.* (2006) Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Ins Biochem Mol Biol.* 36(4):322-35.
- Harper MS, Hopkins TL. (1997) Peritrophic membrane structure and secretion in European corn borer larvae (*Ostrinia nubilalis*). *Tissue Cell* 29:463–75.
- Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U. (2009) New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu Rev Entomol.* 54:285-302.
- Herrer A. (1942) *Trypanosoma phyllotis* n. sp. E infecciones asociales em uma titiru, el *Phlebotomus noguchii*. *Rev Med Exp Lima.* 2:354-61.
- Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Ottesen E, Sachs SE, Sachs JD. (2006) Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria - A comprehensive pro-poor health policy and strategy for the developing world. *PLoS Med.* 3:576-84.
- Huang X, Madan A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9:868-77.
- Hunter S, Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Bateman A, Binns D *et al.* InterPro: the integrative protein signature database; *Nucleic Acids Res.* Jan 2009;37(Database issue):D211-5. Epub 21 Out 2008.
- Ito J, Ghosh A, Moreira LA, Wimmer EA, Jacobs-Lorena M. (2002) Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature.* 417(6887):387-8.
- Kato N, Dasgupta R, Smartt CT, Christensen BM. (2002) Glucosamine:fructose-6-phosphate aminotransferase: gene characterization, chitin biosynthesis and peritrophic matrix formation in *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* 11(3):207-16.
- Kato N, Mueller CR, Fuchs JF, Wessely V, Lan Q, Christensen BM. (2006) Regulatory mechanisms of chitin biosynthesis and roles of chitin in peritrophic matrix formation in the midgut of adult *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 36(1):1-9.

- Kay BH, Kemp DH. (1994) Vaccines against arthropods. *Am J Trop Med Hyg.* 50(6 Suppl):87-96.
- Kramer KJ, Koga D. (1986) Insect chitin: physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. *Insect Biochem.* 16:851–877.
- Kramer KJ, Hopkins TL, Schaefer J. (1995) Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures. *Insect Biochem & Mol Biol.* 25(10):1067-80.
- Kramer KJ, Muthukrishnan S. (1997) Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem & Mol Biol.* 27(11):887-900.
- Kramer KJ, Muthukrishnan S. (2005) Chitin metabolism in insects. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. New York: Elsevier, 4. p. 111–144.
- de Lara Capurro M, Coleman J, Beerntsen BT, Myles KM, Olson KE, Rocha E, *et al.* (2000) Virus-expressed, recombinant single-chain antibody blocks sporozoite infection of salivary glands in *Plasmodium gallinaceum*-infected *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 62:427-433.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0; *Bioinformatics.* 23(21):2947-8.
- Lavazec C, Bourgouin C. (2008) Mosquito-based transmission blocking vaccines for interrupting *Plasmodium* development. *Microbes Infect.* 10(8):845-9.
- Lehane MJ. (1997) Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol.* 42:525-50.
- Letunic I, Doerks T, Bork P. (2009\* SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* 37(Database issue):D229-32.



- Lu Y, Zen KC, Muthukrishnan S, Kramer KJ. (2002) Site-directed mutagenesis and functional analysis of active site acidic amino acid residues D142, D144 and E146 in *Manduca sexta* (tobacco hornworm) chitinase. *Insect Biochem Mol Biol.* 32:1369–82.
- Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, *et al.* (2007) Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(22):9375-80.
- Lyonet P. (1762) *Traité Anatomique de la Chenille qui ronge le bois de Saule.* La Haye: Gosse Pinet. *apud* Lehane (1997).
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH *et al.* (2009) CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res.*37(Database issue):D205-10.
- Marrelli MT, Li C, Rasgon JL, Jacobs-Lorena M. (2007) Transgenic malaria-resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on *Plasmodium*-infected blood. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(13):5580-3.
- Marshall JM, Taylor CE. (2009) Malaria control with transgenic mosquitoes. *PLoS Med.* 6(2):164-8.
- Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. (2000) The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today.* 16:188–9.
- McGinnis S, Madden TL. (2004) BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 32(Web Server issue):W20-5.
- Merzendorfer H, Zimoch L. (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol.* 206(Pt 24):4393-412. Review.
- Moreira LA, Edwards MJ, Adhami F, Jasinskiene N, James AA, Jacobs-Lorena M. (2000) Robust gut-specific gene expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(20):10895-8.

- Munstermann LE. (2004) Phlebotomine sand flies, the *Psychodidae*. In: Marquardt WC, editor. *Biology of Disease Vectors*. 2 ed. Amsterdam: Elsevier academic press; p. 141-51.
- Olof E, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nat Protoc*. 2(4):953-71.
- Organização Mundial de Saúde [homepage na Internet]. © Copyright World Health Organization (WHO), 2009a [atualizada em 22 Set 2009; acesso em 22 Set 2009]. Neglected tropical diseases; [aproximadamente 1 tela]. Disponível em: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/en](http://www.who.int/neglected_diseases/en).
- Organização Mundial de Saúde [homepage na Internet]. © Copyright World Health Organization (WHO), 2009b [atualizada em 22 Set 2009; acesso em 22 Set 2009]. Vector-borne disease; [aproximadamente 1 tela] Disponível em: <http://www.who.int/heli/risks/vectors/vector/en/index.html>
- Organização Mundial de Saúde [homepage na Internet]. © Copyright World Health Organization (WHO), 2009c [atualizada em 22 Set 2009; acesso em 22 Set 2009]. The disease and its epidemiology; [aproximadamente 1 tela]. Disponível em: [http://www.who.int/leishmaniasis/disease\\_epidemiology/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html)
- Peters W. (1992) Peritrophic membranes. In: Bradshaw DW, Heller HC, Burggren W, Ishii S, Langer H, Neuweiler G, Randall DJ (Eds), *Zoophysiology*. Berlin: Springer. 30. p. 1-238.
- Pimenta PF, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL (1997) A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* 115(Pt4):359–69.
- Pitaluga AN, Mason PW, Traub-Csekö YM (2008) Non-specific antiviral response detected in RNA-treated cultured cells of the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*; *Developmental and Comparative Immunology*;y 32, 191–197

- Pizarro P. (1917) Relación del descubrimiento y conquista de los reinos del Perú etc. In: Navarrete MF (org.), *Colecciones de documentos inéditos para la historia de España*. Madrid, tomo V, p. 232. 1917 (1571); apud Altamirano-Enciso et al. (2003).
- Ramalho-Ortigão JM. (2001) *Estudos de interação molecular Leishmania-Flebotomíneos: caracterização parcial de cDNAs diferencialmente expressos por Lutzomyia longipalpis*; Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular; Instituto Oswaldo Cruz; Rio de Janeiro.
- Ramalho-Ortigão JM, Traub-Csekö YM. (2003) Molecular characterization of Llchit1, a midgut chitinase cDNA from the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*; *Insect Biochem Mol Biol*. 33(3):279-87.
- Ramalho-Ortigão JM, Kamhawi S, Joshi MB, Reynoso D, Lawyer PG, Dwyer DM *et al.* (2005) Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Insect Mol Biol*. 14(6):703-12.
- Ridley RG. (2002) Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*. 415:686-93.
- Riehle MM, Markianos K, Niare O, Xu J, Li J, Touré AM, *et al.* (2006) Natural malaria infection in *Anopheles gambiae* is regulated by a single genomic control region. *Science*. 312(5773):577-9.
- Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA. (2004) Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*. 430(6998):463-7.
- Rogers ME, Hajmová M, Joshi MB, Sadlova J, Dwyer DM, Volf P, *et al.* (2008) *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cell Microbiol*. 10(6):1363-72.

- Ryerse JS, Purcell JP, Sammons RD. (1994) Structure and formation of the peritrophic membrane in the larva of the southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata*. *Tissue Cell Res.* 26(3):431–7.
- Rzhetsky A, Nei M. (1992) A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. *Mol Biol Evol.* 9:945-967.
- Sacks D, Kamhawi S. (2001) Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.* 55:453-83.
- Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Habor, NY, 3<sup>a</sup> edição.
- Sánchez L. (2008) Sex-determining mechanisms in insects. *Int J Dev Biol.* 52(7):837-56.
- Santos VC, Araujo RN, Machado LAD, Pereira MH, Gontijo NF. (2008) The physiology of the midgut of *Lutzomia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. *J Exp Biol.* 211(17):2792-8.
- Schütt C, Nöthiger R. (2000) Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development.* 127(4):667-77.
- Secundino NFC, Eger-Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PF. (2005) *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *J Med Entomol.* 42(6):928-38.
- Shao L, Devenport M, Jacobs-Lorena M. (2001) The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Arch Insect Biochem Physiol* 47:119–25.
- Sharma U, Singh S. (2008) Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis.* 45(4):255-72.
- Sherlocck IA. (2003) Importância médico-veterinária. In: Rangel EF, Lainson R, organizadores. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz. p. 15-21.

- Silva CP, Silva JR, Vasconcelos FF, Petretski MDA, DaMatta RA, Ribeiro AF, *et al.* (2004) Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneopteran insect orders with comments on their function and evolutionary significance. *Arthropod Struct Dev.* 33(2):139–48.
- Stanojević D, Hoey T, Levine M (1989) Sequence-specific DNA-binding activities of the gap proteins encoded by hunchback and Krüppel in *Drosophila*; *Nature.* 341(6240):331-5.
- Suetake T, Tsuda S, Kawabata S, Miura K, Iwanaga S, Hikichi K, Nitta K, Kawano K (2000) Chitin-binding proteins in invertebrates and plants comprise a common chitin-binding structural motif. *J Biol Chem.* 275:17929–32.
- Takagi S, Kimura M, Katsuki M. (1992) A rapid and efficient protocol of the inverted PCR using two primer pairs; *Biotechniques.* 13(2):176-8.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S; (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24(8):1596-9.
- Tellam RL. (1996) The peritrophic matrix. In: Lehane MJ e Billingsley PF (Eds.), *Biology of the Insect Midgut.* Cambridge: Chapman and Hall; p. 86-114.
- Telleria EL. (2007) *Caracterização de tripsinas em Lutzomyia longipalpis – principal vetor da leishmaniose visceral no Brasil.* Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular; Instituto Oswaldo Cruz; Rio de Janeiro.
- Terra WR. (1990) Evolution of digestive systems of insects. *Annu Rev Entomol.* 35:181-200.
- Terra WR, Ferreira C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp Biochem Physiol.* 109B(1):1-62.
- Tesh RB, Modi GB. (1983) Development of a continuous cell line from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), and its susceptibility to infection with arboviruses. *J Med Entomol.* 20(2):199-202.

- Tesh RB, Guzman H. (1996) Sand flies and the agents they transmit. In: Beaty B, Marquardt W (Eds.), *The biology of disease vectors*. Amsterdam: Elsevier academic press. p. 117-27.
- Thomas PD, Kejariwal A, Campbell MJ, Mi H, Diemer K, Guo N *et al.* (2003) PANTHER: a browsable database of gene products organized by biological function, using curated protein family and subfamily classification. *Nucleic Acids Res.* 31(1):334-41.
- Todryk SM, Hill AVS. (2007) Malaria vaccines: the stage we are at. *Nat Rev Microbiol.* 5:487-90.
- Waterhouse DF. (1957) Digestion in insects. *Annu Rev Entomol.* 2:1–18.
- Waterhouse RM, Kriventseva EV, Meister S, Xi Z, Alvarez KS, Bartholomay LC, *et al.* (2007) Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science.* 316(5832):1738-43.
- Wigglesworth VB. (1930) The formation of the peritrophic membrane in insects, with special reference to the larvae of mosquitoes. *Q J Microsc Sci.* 73:583–616.
- Wingender E. (2008) The TRANSFAC project as an example of framework technology that supports the analysis of genomic regulation. *Brief Bioinform.* 9(4):326-32.
- Wingender E, Dietze P, Karas H, Knüppel R. (1996) TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites. *Nucleic Acids Res.* 24(1):238-41.
- Williams P. (1976) Flagellate infections in cave-dwelling sandflies (*Díptera: Psychodidae*) in Belize, Central América. *Bulletin of Entomological Research.* 65:615-29.
- Urness LD, Thummel CS. (1990) Molecular interactions within the ecdysone regulatory hierarchy: DNA binding properties of the *Drosophila* ecdysone-inducible E74A protein. *Cell.* 63(1):47-61.
- Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EA, El-Hassan IM, El-Hassan AM. (2003) Post kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 3:87–98.

- Zhu Q, Arakane Y, Banerjee D, Beeman RW, Kramer KJ, Muthukrishnan S. (2008a) Domain organization and phylogenetic analysis of the chitinase-like family of proteins in three species of insects. *Insect Biochem Mol Biol.* 38:452–66.
- Zhu Q, Arakane Y, Beeman RW, Kramer KJ, Muthukrishnan S. (2008b) Characterization of recombinant chitinase-like proteins of *Drosophila melanogaster* and *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem Mol Biol.* 38(4):467-77.
- Zhu Q, Arakane Y, Beeman RW, Kramer KJ, Muthukrishnan S. (2008c) Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference; *Proc Natl Acad Sci USA.*105(18):6650-5.
- Zuckerkindl E, Pauling L. (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. IN: Bryson V, Vogel HJ (Eds) *Evolving Genes and Proteins*, Academic Press, New York. p. 97-166.