

**Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**Instituto de Bioquímica Médica**



**HMGB1 de *Aedes aegypti*: Clonagem, Expressão e  
Atividade**

**Fabio Schneider Ribeiro**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação de Química  
Biológica, Instituto de Bioquímica Médica,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, como  
parte dos requisitos necessários à obtenção  
do título de Mestre em Química Biológica.

Orientador: **Marcelo Rosado Fantappié**

Rio de Janeiro

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**RIBEIRO, Fabio Schneider**

HMGB1 de *Aedes aegypti*: Clonagem, Expressão e Função / Fabio Schneider Ribeiro – 2009.  
87fl.

Dissertação (Mestrado em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Rio de Janeiro, 2009.

Orientador: Marcelo Rosado Fantappié.

1.High Mobility Group Box 1. 2. *Aedes aegypti* 3. Metabolismo de DNA. – Dissertações.

I.Fantappié, Marcelo Rosado (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-Graduação em Química Biológica. III. Título

O seguinte trabalho foi realizado no Instituto de Bioquímica Médica, no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Helmintos e Artrópodes da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, sob orientação do professor Marcelo Rosado Fantappié e financiado pelo CNPQ, CAPES e FAPERJ.

HMGB1 de *Aedes aegypti*: Clonagem, Expressão e Função.

**Fabio Schneider Ribeiro**

Orientador: Marcelo Rosado Fantappié

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Aprovada em 31 de agosto de 2009 por:

---

Orientador: Marcelo Rosado Fantappié  
Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

---

Dr<sup>a</sup>. Yara Maria Traub-Cseko  
Pesquisadora Titular da Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr<sup>a</sup>. Rafaela Vieira Bruno  
Pesquisadora da Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr<sup>a</sup>. Gabriela de Oliveira Paiva e Silva  
Prof<sup>a</sup>. Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

---

Suplente Externo: Dr. Marcelo Alex Carvalho  
Pesquisador Visitante do Instituto Nacional de Câncer – INCa.

---

Revisor/Suplente Interno: Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine  
Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

“Dedico este trabalho aos grandes amores da minha vida: minha mãe Alaide,  
meu irmão Felipe, minha família e meus amigos.”

## AGRADECIMENTO

A Deus por todas as bênçãos e por permitir desfrutar de momentos singulares em minha vida, como este.

Ao meu orientador, prof. Marcelo Rosado Fantappié, por abrir as portas do seu laboratório num momento muito delicado, por todo apoio e incentivo, que contribuiu para o enriquecimento na minha formação.

Ao meu revisor, prof. Marcos Henrique Ferreira Sorgine, por todo o incentivo, compreensão e por ter sido tão presente nesta trajetória.

Ao prof. Mário Alberto Neto, pela excelente colaboração.

Aos membros e suplentes da banca de defesa da dissertação, pela disponibilidade em participar deste importante passo em minha vida profissional.

Aos meus amigos do laboratório, Amanda Vicentino, Isabel Caetano, Vitor Coutinho, Renata Moraes, pela presença, atenção, carinho e aprendizado. Sem vocês essa etapa seria inviável. Obrigado!!!

Ao Felipe Gazzos, pela atenção, compreensão, por todo o incentivo e pela paciência nas inúmeras dissecções de mosquito.

Aos meus novos amigos, Nivea Amoedo, Paula Pezzuto e Mariana pelo carinho e incentivo principalmente em momentos difíceis durante esta caminhada.

A Kátia e ao Júnior, pela excelente assistência nos trabalhos técnicos na colônia de mosquito.

A meus amigos e colegas Mariana Nigro, Luiza Ketzer, José, André Elias por terem me recebido e incentivado nesta caminhada.

Aos meus grandes amigos Cristiano Ponte, Rita de Cássia, Mauro Marins, Cyntia Oliveira, Juliana Jardim, Nivea Ferreira, Magno Gonçalves, Almir Fernandes por me ensinarem tanto, por estarem presentes em minha vida.

Aos meus familiares Roberto Schneider, Danieli Schneider, Aparecida Schneider, Renan Schneider, Bruno Schneider, Adriana Ribeiro, Benildes Schneider, Maria das Graças Schneider, Miguel Schneider, Salete Lucas, Diogo Rocha, Sara Valentin, João Batista Schneider por todo o amor que vocês me deram.

Ao meu irmão Felipe, por garantir momento de alegria em etapas difíceis, por todo estímulo e amor.

Por minha mãe, por todo o amor, carinho, ensino, compreensão, enfim por me transformar em quem eu sou.

## RESUMO

RIBEIRO, Fabio Schneider. HMGB1 de *Aedes aegypti*: Clonagem, Expressão e Função. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

As proteínas do tipo “High Mobility Group” (HMGs) estão entre as mais abundantes e ubíquas em eucariotos. Em vertebrados, elas são divididas em três grupos (HMGB, HMGA e HMGN) de acordo com seus domínios de ligação ao DNA. As proteínas HMGB estão envolvidas na transcrição, replicação, recombinação e reparo de DNA. A proteína HMGB1 de vertebrados contém dois domínios homólogos de ligação ao DNA, os HMG “boxes” A e B, cada um com cerca de 75 aminoácidos. A porção C-terminal da proteína é carregada negativamente, sendo constituída por uma seqüência contínua de resíduos de aminoácidos ácidos. Essas proteínas são capazes de reconhecer e ligar-se preferencialmente a moléculas de DNA distorcidas ou dobradas, além de promover o superenovelamento e a dobra de moléculas de DNA. Apesar da proteína HMGB1 ser descrita em muitos organismos, poucos trabalhos descrevem seu papel em insetos dípteros, como o *Aedes aegypti*. O cDNA que codifica a proteína HMGB1 em *Aedes aegypti* (AaHMGB1) foi clonado partir de uma busca realizada em banco de dados (Vector base). Apesar da alta identidade entre os “box” A e “box” B da proteína AaHMGB1 e seus ortólogos, a AaHMGB1 apresenta apenas 13 resíduos de aminoácidos ácidos na sua porção C-terminal (C), além da presença de uma região rica em resíduos de aminoácidos de alanina e glutamina (poliAQ), ausente em mamíferos. Foram geradas proteínas recombinantes correspondendo à proteína inteira ou suas formas truncadas sem a cauda ácida ou sem a região poliAQ ( $\Delta C$  ou  $\Delta AQ$ , respectivamente). Ensaio *in vitro* de superenovelamento de DNA revelaram que a AaHMGB1 é capaz de superenovelar um DNA plasmidial de forma mais eficiente quando comparada a proteína humana. O mesmo foi observado na promoção de dobras em um fragmento de DNA de 123 pares de bases. Verificou-se ainda, que a proteína AaHMGB1 $\Delta C$  parece favorecer as interações DNA-proteína tanto na promoção de superenovelamento quanto na dobradura do DNA. Sendo as HMGs alvos de modificações pós traducionais, realizamos ensaios de fosforilação *in vitro* e demonstramos que a proteína AaHMGB1 é fosforilada pela Proteína Cinase C, mas não pela CK2. Através de ensaios de RT-PCR, verificamos que o gene da AaHMGB1 é transcrito em todos os estágios do ciclo de vida do mosquito. Verificamos ainda, que a transcrição é aumentada 48h após a alimentação por sangue, quando comparada com o período de 24h e fêmea não alimentada. Este aumento também foi observado nos tecidos (ovário, corpo gorduroso e intestino médio). Estes resultados podem sugerir que a proteína AaHMGB1 pode estar envolvida em alguns processos fisiológicos do mosquito como a vitelogênese, o sistema imune (infecção pelo vírus da dengue) e resistência a inseticidas. No entanto, estudos posteriores são necessários para um melhor esclarecimento do papel fisiológico da AaHMGB1 no *Aedes aegypti*.

## ABSTRACT

Ribeiro, Fabio Schneider. *Aedes aegypti* HMGB1: Cloning, Expression and Activity. Dissertation (Master Degree in Biological Chemistry). Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

The High Mobility Group (HMGs) proteins are among the most abundant ubiquitous proteins in eukaryotes. In vertebrates they are organized in three groups, according to its DNA binding domains: HMGB, HMGA and HMGN. The HMGBs are involved in DNA transcription, recombination, replication and repair. The vertebrate HMGB1 contains two homologous DNA binding domains, the HMG boxes A and B. Each domain contains approximately 75 amino acid residues. The C-terminal portion of the protein is negatively charged. It is composed of a continuous sequence of acidic amino acid residues. These proteins recognize, and preferentially bind, to distorted or bent DNA molecules, also promoting DNA supercoiling and bending. Although the HMGB1 protein has been described in many organisms, few works describe their role in dipteran insects like *Aedes aegypti*. The cDNA that translates the *Aedes aegypti* HMGB1 protein (AaHMGB1) was cloned based on the sequence obtained through a database query (Vector base). Despite the high identity between boxes A and B of AaHMGB1 and their orthologues, there are only 13 acidic amino acid residues in the C-terminal portion of the protein (C) and it presents a region which is rich in alanine and glutamine residues (poliAQ), absent in mammals. Recombinant proteins were produced either with the entire AaHMGB1 sequence or deleted regions such as the acidic tail and the poliAQ region ( $\Delta C$  and  $\Delta AQ$ , respectively). *In vitro* assays of DNA supercoiling showed that AaHMGB1 is more efficient in plasmidial DNA supercoiling compared to the human protein. The same result was observed on the bending promotion of a 123bp DNA fragment. Considering that the HMGs undergo post-translational modifications, *in vitro* phosphorylation assays were performed, showing that the AaHMGB1 protein is phosphorylated by Protein Kinase C, but not by CK2. By the means of RT-PCR analysis we found that the AaHMGB1 gene is transcribed throughout the mosquito development. We could also note that transcription is increased 48 hours after blood ingestion, when compared to a 24 hours period on unfed females. This increase was also observed on different tissues, including the ovaries, fat body and midgut. These results suggest that the AaHMGB1 could be involved in physiological roles in mosquitoes, like vitellogenesis, the immune system response to viral infections and resistance to insecticides. Further studies will be needed to increase our understanding of the physiological roles of AaHMGB1 in *Aedes aegypti*.

## LISTA DE FIGURAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1</b> - <i>Aedes aegypti</i> -----   | <b>18</b> |
| <b>Figura 2</b> - Morfologia do <i>Aedes aegypti</i> -----   | <b>19</b> |
| <b>Figura 3</b> - Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> -----  | <b>20</b> |
| <b>Figura 4</b> - Esquema da ativação da vitelogêneses pelo a alimentação de sangue  | <b>24</b> |
| <b>Figura 5</b> - Esquema da regulação direta ou indireta da Vitelogenina por 20E -----  | <b>25</b> |
| <b>Figura 6</b> - Esquema do nucleossomo -----   | <b>27</b> |
| <b>Figura 7</b> - DNA plasmidial relaxado e superenovelado -----   | <b>29</b> |
| <b>Figura 8</b> - Modelo ilustrativo da estrutural toroidal e da estrutura plectonêmica ----   | <b>30</b> |
| <b>Figura 9</b> - Esquema representativo das proteínas da família das HMGs e seus respectivos motivos de ligação ao DNA -----                  | <b>34</b> |
| <b>Figura 10</b> - Esquema representativo das modificações que as proteínas da família das HMGs fazem na estrutura da cromatina -----          | <b>35</b> |
| <b>Figura 11</b> - Esquema representativo da estrutura da proteína HMGB de vertebrado -<br>-----   | <b>36</b> |
| <b>Figura 12</b> - Complexo de proteínas envolvidas na ativação transcricional de genes eucarióticos mediante dobra do DNA pela HMGB1 -----    | <b>37</b> |
| <b>Figura 13</b> - Esquema do reconhecimento da proteína HMGB1 por modificações induzidas pela cisplatina -----                                | <b>39</b> |
| <b>Figura 14</b> - Esquema da HMGB1 como citocina -----  | <b>41</b> |
| <b>Figura 15</b> - Estrutura do receptor de esteróides -----   | <b>42</b> |
| <b>Figura 16</b> - Mecanismo proposto para o aumento da afinidade de ligação dos receptores de progesterona a regiões específicas do DNA ----- | <b>43</b> |
| <b>Figura 17</b> - Vetor de Expressão pQE-80L -----  | <b>53</b> |
| <b>Figura 18</b> - Modelo sumarizando o ensaio de Circularização de DNA mediado por T4 DNA ligase -----  | <b>55</b> |
| <b>Figura 19</b> - Modelo sumarizando o ensaio de superenovelamento de DNA -----   | <b>57</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 20</b> - Esquema ilustrativo da proteína HMGB1 de <i>A. aegypti</i> (AaHMGB1) ---  | <b>61</b> |
| <b>Figura 21</b> - Alinhamento das sequências de aminoácidos de AaHMGB1 -----  | <b>61</b> |
| <b>Figura 22</b> - Esquema das proteínas recombinantes produzidas -----  | <b>63</b> |
| <b>Figura 23</b> – Resultado do ensaio de circularização de DNA linear mediado por T4 DNA ligase -----   | <b>66</b> |
| <b>Figura 24</b> – Resultado do ensaio de superenovelamento de DNA -----   | <b>68</b> |
| <b>Figura 25</b> – Fosforilação da proteína AaHMGB1 -----  | <b>70</b> |
| <b>Figura 26</b> – Resultado da expressão de AaHMGB1 ao longo do ciclo de vida do <i>A. aegypti</i> -----  | <b>71</b> |
| <b>Figura 27</b> – Resultado da expressão de AaHMGB1 em fêmeas de <i>A. aegypti</i> alimentadas com sangue e não-alimentadas com sangue -----            | <b>72</b> |
| <b>Figura 28</b> – Resultado da expressão de AaHMGB1 em tecidos de fêmeas de <i>A. aegypti</i> alimentadas com sangue e não-alimentadas com sangue ----- | <b>73</b> |

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Características das Proteínas High Mobility Group Box de *Drosophila* e *Chironomus* ----- **47**

**Tabela 2** - Sequências de oligonucleotídeos utilizadas para RT-PCR e Clonagem- **50**

**Tabela 3** - Análise da AaHMGB1 no programa NetPhosK 1.0 Server ----- **69**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|            |   |
|------------|---|
| °C         | Graus Celsius   |
| 20E        | 20-hidroxiecdisona                                      |
| Å          | Ångström  |
| AaHMGB1    | HMGB1 de <i>Aedes aegypti</i>                           |
| AaHMGB1ΔAQ | HMGB1 na ausência da região poliAQ                      |
| AaHMGB1ΔC  | HMGB1 na ausência da cauda ácida C-terminal             |
| ATP        | Adenosina Tri-Fosfato                                   |
| CBV        | Catepsina B Vitelogênica                                |
| cDNA       | Ácido desoxirribonucléico complementar                  |
| CK2        | Caseína Cinase 2  |
| CpV        | Carboxipeptidase Vitelogênica                           |
| CTE        | Extensão C-Terminal ( <i>C-terminal extension</i> )     |
| C-terminal | Carboxi-terminal  |
| D.O.       | Densidade Ótica   |
| DBD        | Domínio de Ligação ao DNA ( <i>DNA Binding Domain</i> ) |
| DLN        | Domínio de Ligação a Nucleossomos                       |
| DNA        | Ácido desoxirribonucléico                               |
| dNTPs      | Deoxiribonucleosídeos trifosfatados                     |
| DTT        | Ditiotreitol  |
| EDTA       | Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético                     |
| ESH        | Elementos Sensíveis a Hormônios                         |
| ExoIII     | Exonuclease III   |
| FHD        | Febre Hemorrágica da Dengue                             |
| FUSE       | <i>Far UpStream Element</i>                             |
| h          | horas   |

|                   |   |
|-------------------|---|
| HEO               | Hormônio Ecdisteroidogênico Ovariano  |
| Hg                | Mercúrio  |
| hHMGB1            | Proteína de Alta Mobilidade como domínio box de humano ( <i>human High Mobility Group Box 1</i> ) |
| HMG               | Proteínas de Alta Mobilidade ( <i>High Mobility Group</i> )                                       |
| HMGB1             | Proteína de Alta Mobilidade com domínio box ( <i>High Mobility Group Box 1</i> )                  |
| Kb                | Quilobases  |
| KDa               | Quilodaltons  |
| LBD               | Domínio Dependente de Ligante ( <i>Ligand Binding Domain</i> )                                    |
| Lp                | Lipoforina  |
| MAPK              | Proteína Cinase Mitogênica-Ativada  |
| mg                | Miligrama   |
| MgCl <sub>2</sub> | Cloreto de Magnésio   |
| MgSO <sub>4</sub> | Sulfato de Magnésio   |
| mL                | Mililitros  |
| mm                | Milímetros  |
| mM                | Milimolar   |
| ng                | Nanograma   |
| nm                | Nanômetros  |
| nM                | Nanomolar   |
| NS                | Não Estrutural  |
| N-terminal        | Amino-terminal  |
| °                 | Graus   |
| pb                | Pares de Bases  |
| PCR               | <i>Polymerase Chain Reaction</i>  |
| PKC               | Proteína Cinase C   |

|        |  |
|--------|--|
| poliAQ | Região rica em resíduos de alanina e glutamina         |
| PPY    | Precursor da Proteína Yolk                             |
| REc    | Receptor de Ecdisona                                   |
| REN    | Reparo por Excisão de Nucleotídeos                     |
| RNA    | Ácido ribonucléico                                     |
| RNAr   | Ácido ribonucléico ribossômico                         |
| RP49   | Proteína Ribossomal 49                                 |
| RT-PCR | <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> |
| RXR    | Receptores X Retinóides                                |
| SCD    | Síndrome de Choque da Dengue                           |
| SDS    | Dodecil Sulfato de Sódio                               |
| SIDD   | <i>Stress Induced Duplex Destabilization</i>           |
| SV40   | <i>simian vírus 40</i>                                 |
| TBE    | Tampão Tris- Ácido Bórico-EDTA                         |
| TE     | Tampão Tris-EDTA                                       |
| TLR    | Receptores toll ( <i>Receptor Toll</i> )               |
| Topo I | Topoisomerase I  |
| Tris   | 2-Amino-2-Hidroximetilpropano-1,3-diol                 |
| U      | Unidade  |
| USP    | Ultraespiráculo (Ultraspiracle)                        |
| V      | Volts  |
| Vg     | Vitelogenina   |
| γ      | Gama   |
| μCi    | Microcurie   |
| μg     | Micrograma   |
| μL     | Microlitro   |
| μM     | Micromolar   |

## SUMÁRIO

|  |             |
|--|-------------|
| <b>AGRADECIMENTOS</b> .....  | <b>vi</b>   |
| <b>RESUMO</b> .....  | <b>viii</b> |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>ix</b>   |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....  | <b>x</b>    |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....  | <b>xii</b>  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....  | <b>xiii</b> |
| <b>SUMÁRIO</b> .....   | <b>xvi</b>  |
| <br>   |             |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>18</b>   |
| <b>1.1 <i>Aedes aegypti</i></b> .....  | <b>18</b>   |
| 1.1.1 Desenvolvimento do <i>Aedes aegypti</i> .....  | <b>19</b>   |
| 1.1.2 A influência da Hematofagia em <i>Aedes aegypti</i> .....                                      | <b>21</b>   |
| 1.1.3 Vitelogênese .....   | <b>23</b>   |
| <b>1.2 Regulação da Expressão Gênica e Estrutura da Cromatina</b> .....                              | <b>26</b>   |
| <b>1.3 Estrutura e Função do DNA Superenovelado</b> .....  | <b>28</b>   |
| <b>1.4 Estrutura e Função do Bending DNA</b> .....   | <b>31</b>   |
| <b>1.5 Proteínas do grupo de alta mobilidade eletroforética ou “High Mobility Group” (HMG)</b> ..... | <b>33</b>   |
| <b>1.6 Proteínas High Mobility Group Box 1 (HMGB1)</b> .....   | <b>36</b>   |
| 1.6.1 HMGB1 e Receptores de Esteróides .....   | <b>41</b>   |
| 1.6.2 Fosforilação de proteínas HMGB1 .....  | <b>44</b>   |
| 1.6.3 HMGB de Insetos .....  | <b>46</b>   |
| <br>   |             |
| <b>2.OBJETIVO GERAL</b> .....  | <b>48</b>   |
| 2.1 Objetivos Específicos .....  | <b>48</b>   |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                                       | <b>49</b> |
| 3.1 Obtenção da Sequência e Alinhamento .....                           | 49        |
| 3.2 Oligonucleotídeos .....   | 49        |
| 3.3 Extração de RNA e Síntese de cDNA .....                             | 50        |
| 3.4 Análise de Expressão Gênica .....                                   | 51        |
| 3.5 Clonagem, Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes ..... | 52        |
| 3.6 Dosagem de Proteínas .....  | 54        |
| 3.7 Marcação Radioativa de Sondas de DNA .....                          | 54        |
| 3.8 Ensaio de Circularização de DNA mediado por T4 DNA Ligase .....     | 55        |
| 3.8 Ensaio de Superenovelamento do DNA .....                            | 56        |
| 3.10 Ensaio de Fosforilação .....                                       | 58        |
| 3.11 Análise Estatística .....  | 59        |
| <b>4.RESULTADOS</b> .....   | <b>60</b> |
| 4.1 HMGB1 de <i>Aedes aegypti</i> .....                                 | 60        |
| 4.2 Produção das Proteínas Recombinantes .....                          | 62        |
| 4.3 Ensaio de Circularização de DNA mediado por T4 ligase .....         | 64        |
| 4.4 Ensaio de Superenovelamento de DNA .....                            | 66        |
| 4.5 Fosforilação da AaHMGB1 .....                                       | 68        |
| 4.6 Análise da Expressão Gênica de AaHMGB1 .....                        | 70        |
| <b>5. DISCUSSÃO</b> .....   | <b>74</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                              | <b>82</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti*, além de representar um importante vetor da febre amarela e dengue, é considerado um excelente modelo para estudos de artrópodes vetores de doenças, devido à grande disponibilidade de informação sobre o seu desenvolvimento, fisiologia e bioquímica.

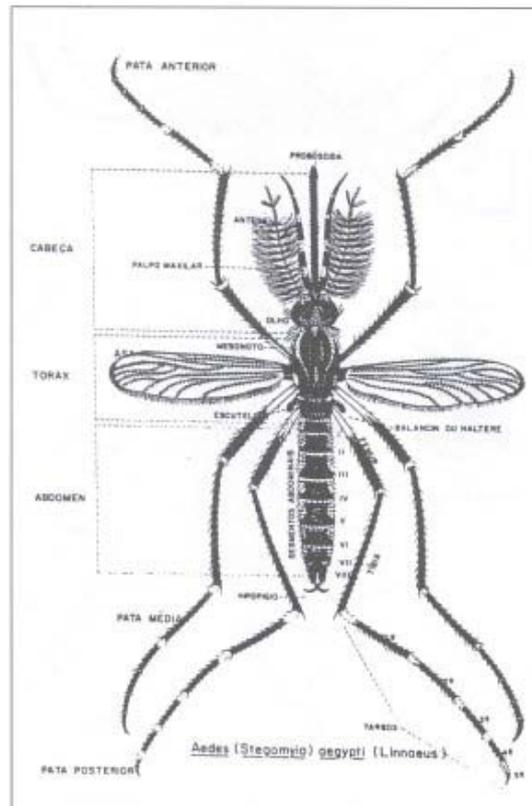
A espécie *Aedes aegypti* (figura 1) pertence ao filo *Arthropoda*, classe *Insecta*, ordem *Diptera* (*di* = duas; *ptera* = asas), família *Culicidae* e gênero *Aedes*. A principal característica deste filo são as pernas articuladas (*arthros* = articulação; *podos* = pés). Entretanto, não só as pernas são articuladas, como também as demais extremidades, representadas pelas antenas e peças bucais (BEATY & MARQUARDT, 1996).



**Figura 1: *Aedes aegypti*.**  
([www.rc.unesp.br/ib/zoologia/aedes\\_aegypti.jpg](http://www.rc.unesp.br/ib/zoologia/aedes_aegypti.jpg).)

O corpo dos mosquitos da espécie *Aedes aegypti* (como de todos os insetos) é organizado em três regiões: cabeça, tórax e abdome. Na cabeça encontram-se um par de antenas, um par de olhos compostos (formado por várias unidades denominadas omatídios) e as peças bucais compostas por um aparelho do tipo

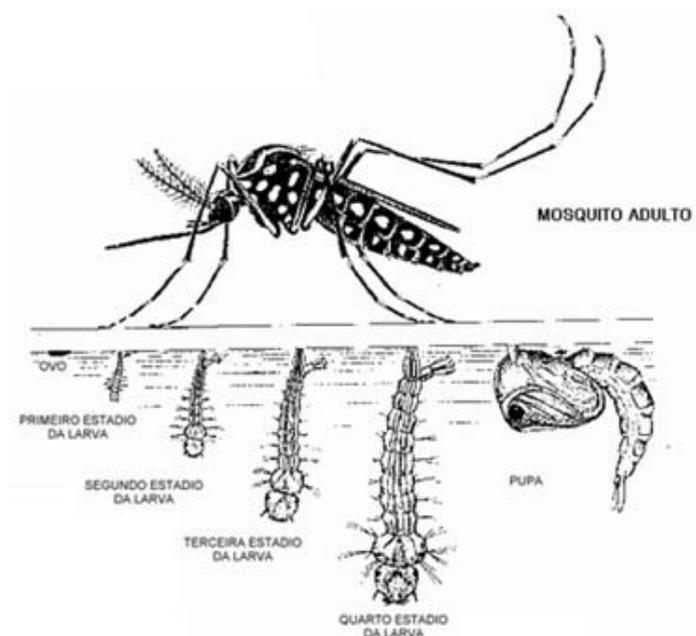
sugador picador. No tórax encontram-se três pares de patas e um par de asas (figura 2) (BEATY & MARQUARDT, 1996). No entanto, algumas dessas características podem variar de acordo com o grupo de inseto.



**Figura 2: Morfologia do *Aedes aegypti*.**  
([http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ipcv\\_002.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ipcv_002.pdf))

### 1.1.1 Desenvolvimento do *Aedes aegypti*

Os insetos podem apresentar três tipos de desenvolvimento. O *Aedes aegypti*, assim como os dípteros, caracterizam-se como holometábolos (*holo* = total), com metamorfose completa. Do ovo eclode a larva, que passa por quatro estágios, bastante distinta do adulto. Após o quarto estágio larval, esse organismo passa por um estágio denominado pupa. É nesse estágio que ocorre a metamorfose: a larva transforma-se num adulto, que emerge em macho ou fêmea (figura 3).



**Figura 3: Ciclo de vida do *Aedes aegypti*.**  
 (<http://neeladri.files.wordpress.com/2006/10/aedes-aegypti.gif>)

Os ovos do *Aedes aegypti* medem, aproximadamente, 1 mm de comprimento e apresentam contorno alongado e fusiforme (BEATY & MARQUARDT, 1996). São depositados pela fêmea, individualmente. Os ovos são capazes de resistir a longos períodos de dessecação, que podem prolongar-se por mais de um ano (HALSTEAD, 2008).

A capacidade de resistência dos ovos de *Aedes aegypti* à dessecação é um sério obstáculo para sua erradicação. Esta condição permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias, em recipientes secos, tornando-se assim o principal meio de dispersão do inseto (dispersão passiva) (HALSTEAD, 2008).

Todos os estágios imaturos do *A. aegypti* são aquáticos. A larva é composta de cabeça, tórax e abdome. A fase larval é o período de alimentação e crescimento.

As larvas possuem quatro estágios evolutivos. Alguns dias após a larva entrar no quarto estágio, ela sofre uma nova modificação e entra na fase de pupa, na qual

não se alimenta, esta fase dura geralmente de 2 a 3 dias (BEATY & MARQUARDT, 1996).

Cerca de 1 a 2 dias após a larva entrar no estágio de pupa, surge a fase adulta, com os machos emergindo primeiro (BEATY & MARQUARDT, 1996). O adulto de *A. aegypti* representa a fase reprodutora do inseto. Como ocorre com grande parte dos insetos alados, o adulto representa também importante fase de dispersão.

O *A. aegypti* é escuro, com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais, que permitem a identificação da espécie (figura 2) (BEATY & MARQUARDT, 1996). O macho se distingue da fêmea essencialmente por possuir antenas plumosas e palpos mais longos.

Em temperaturas mais elevadas (verão), o ciclo de vida do mosquito (ovo ao adulto), completa-se em torno de 10 dias (BEATY & MARQUARDT, 1996).

#### 1.1.2 A influência da Hematofagia em *Aedes aegypti*

A hematofagia é um processo fisiológico essencial em muitos organismos incluindo mosquitos, carrapatos e pulgas. Enquanto os machos de *A. aegypti* possuem a probóscide adaptada para sugar seiva de plantas (fonte de carboidratos), as fêmeas são hematófagas. A ingestão do sangue resulta em algumas modificações fisiológicas assim como influencia alterações teciduais seja em nível morfológico como funcional.

Em fêmeas de *A. aegypti*, o intestino médio tem um papel crucial, pois é o primeiro tecido envolvido no processamento do sangue ingerido. Este tecido é o

responsável não somente pela digestão e captação de nutrientes, mas também é o primeiro local de contato com o patógeno (SANDERS e cols., 2003).

A distensão do intestino médio, ocasionada pelo grande volume de sangue ingurgitado, causa grande estresse ao mesmo. Este tecido é estimulado pelo sangue a secretar uma camada extracelular semipermeável denominada matriz peritrófica (MP). A MP é composta por quitina, proteínas e proteoglicanos, cujas funções são prevenir ou reduzir a entrada de patógenos no organismo, modular a digestão e proteger as células epiteliais de qualquer dano mecânico e químico (ABRAHAM & JACOBS-LORENA, 2004). Han (2000) demonstrou que a maturação da MP de *A. aegypti* coincide com o desenvolvimento dos ovócitos de *Plasmodium*, sua invasão e penetração em células epiteliais do intestino médio (HAN e cols., 2000), enfatizando a função da MP como uma barreira contra a infecção por *Plasmodium* e outros patógenos (KATO e cols., 2008).

Os nutrientes presentes no sangue ingurgitado são essenciais para o desenvolvimento dos ovos. Estes desencadeiam uma série de processos hormonais levando à síntese protéica essencial para a vitelogênese. O corpo gorduroso é um tecido primordial neste fenômeno. A hematofagia estimula nas células do corpo gorduroso a proliferação de organelas, bem como a síntese e secreção das proteínas precursoras de vitelo (PPV – YPP, do inglês *yolk protein precursors*), proteínas relacionadas à vitelogênese. Através deste processo observa-se também um aumento de 3 a 4 vezes no RNA total deste tecido, refletindo na acumulação de RNAr e ribossomos (NIU & FALLON, 2000).

### 1.1.3 Vitelogênese

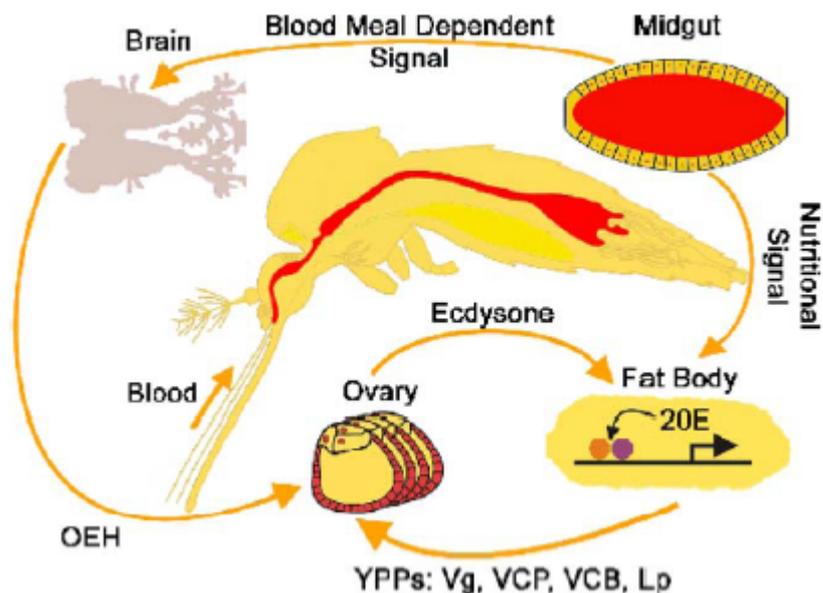
A vitelogênese é o processo através do qual reservas são progressivamente armazenadas nos ovócitos de animais ovíparos, originando o vitelo dos ovos maduros. O processo é surpreendentemente semelhante em todos os animais analisados até o momento. Há muitos pontos em comum durante a vitelogênese de helmintos, insetos e vertebrados.

O ciclo vitelogênico em *A.aegypti* pode ser dividido em três períodos distintos. Inicialmente, no período pré-vitelogênico, o corpo gorduroso do mosquito se prepara para a síntese de uma grande quantidade de PPV. Esse processo parece ser controlado por hormônio juvenil. Em um segundo estágio a síntese de PPV é muito diminuída e permanece dessa forma até a primeira alimentação sanguínea, quando o mosquito entra na fase em que se inicia a síntese de PPV propriamente dita. O corpo gorduroso produz PPV que se acumulam e são estocadas nos ovócitos. Essa fase do ciclo está sob o controle hormonal de 20-hidroxiecdisona (20E). Finalmente, no terceiro período, a síntese de PPV é cessada no corpo gorduroso (ATTARDO e cols., 2005).

O repasto sanguíneo das fêmeas fornece os nutrientes para o desenvolvimento dos ovos, ou seja, o início do processo de vitelogênese. Após o repasto, o intestino médio encontra-se completamente dilatado, esta situação estimula o tecido neuronal (cérebro) a liberar um neuropeptídeo conhecido como hormônio ecdisteroidogênico ovariano (HEO - OEH, do inglês *ovarian ecdysiotropic hormone*), na hemolinfa (BROWN e cols., 1998). O HOE estimula as células foliculares do ovário a produzirem ecdisona, um hormônio esteróide de inseto, que está envolvido no processo de muda, no desenvolvimento do sistema nervoso, na

reprodução e na produção de ferormônios. A ecdisona é convertida em sua forma ativa a 20E, no corpo gorduroso (HAGEDORN e cols., 1975).

Os aminoácidos obtidos do sangue através alimentação sinalizam para o corpo gorduroso, que junto com 20E, ativam os genes das PPV, sendo os principais, vitelogenina (Vg), carboxipeptidase vitelogênica (CpV – VCP, do inglês *vitellogenic carboxypeptidase*), catepsina B vitelogênica (CBV – VCB, do inglês *vitellogenic cathepsin*) e lipoforina (Lp), tendo a Vg como proteína mais abundante (Raikhel, 2002). A 20E é o maior estimulador que induz a expressão gênica em mosquito, após a ativação pela 20E os genes PPV são transcritos e traduzidos no corpo gorduroso e essas proteínas são processadas e secretadas para a hemolinfa, onde serão captadas por receptores no ovário para o desenvolvimento dos ovócitos (figura 4) (RAIKHEL e cols. , 2002).



**Figura 4: Esquema da ativação da vitelogenese pela alimentação de sangue.**

OEH: hormônio ecdisteroidogênico ovariano; 20E: 20-hidroxicdisona; YPP: precursor da proteína yolk; Vg: vitelogenina; VCP: carboxipeptidase vitelogênica; VCB: catepsina B vitelogênica; Lp: lipoforina (ATTARDO e cols., 2005).

Assim o título de 20E na hemolinfa está correlacionado com a síntese de PPV no corpo gorduroso (RAIKHEL e cols., 2002), no qual o nível máximo de 20E é atingido em 24h, o que está de acordo com os níveis máximos de transcrição do gene da Vg (CRUZ e cols., 2009). A 20E exerce o controle sob os genes das PPV através da interação com receptores intracelulares, estes são constituídos por um heterodímero, formado entre o receptor de ecdisona (REc – EcR, do inglês ecdysone receptor ) e o homólogo do receptor X retinóide chamado *ultraspiracle* (USP). Ambas unidades são membros da superfamília de receptores nucleares (YAO, 1993). A ativação do heterodímero, EcR-USP, através do ligante (20E) atua diretamente sobre os genes precoces E74 e E75 (MARTÍN e cols., 2001). Análises da região regulatória 5'-não traduzida do gene da Vg mostram a presença de sítios putativos de ligação para EcR-USP, E74 e E75 (figura 5), o que sugere que o gene Vg de *A. aegypti* pode ser regulado direta ou indiretamente pela 20E (RAIKHEL e cols., 2002).

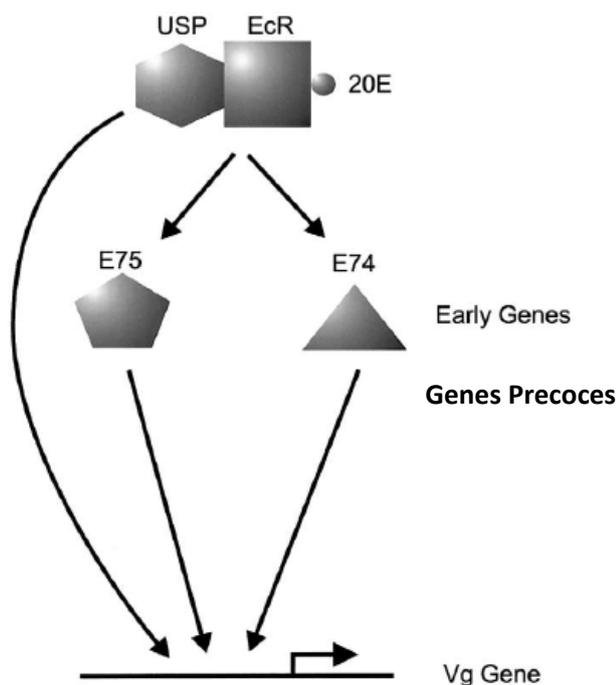


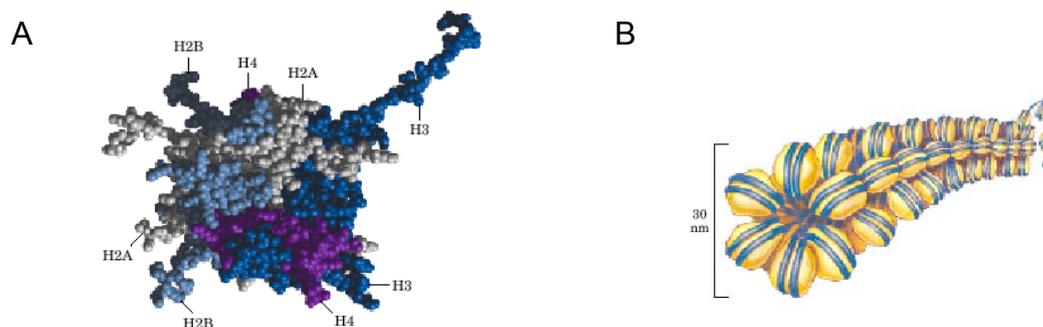
Figura 5: Esquema da regulação direta ou indireta da Vitelogenina por 20E (MARTÍN e cols, 2001).

A região 5' regulatória do gene da Vg contém sequências de ligação para EcR-USP, *E74*, *E75*. Genes que codificam para esses fatores de transcrição são super-expressos após a alimentação de sangue, revelando a participação direta de EcR-USP, *E74*, *E75* na regulação da Vg (RAIKHEL e cols., 2002).

## 1.2 Regulação da Expressão Gênica e Estrutura da Cromatina

A cromatina foi identificada pela primeira vez em 1882, por Walther Flemming, através de experimentos de refração e afinidade por corantes. Em 1974, Oudet e colaboradores, obtiveram evidências bioquímicas que demonstravam o genoma eucariótico claramente organizado e distribuído sob forma de unidades repetidas de tamanhos uniformes denominadas nucleossomos (OUDET e cols., 1975).

Os nucleossomos são constituídos pelo DNA genômico associado a um octâmero protéico que, por sua vez, é formado por dois conjuntos de quatro histonas nucleossomais denominadas H2A, H2B, H3 e H4. A composição linear do octâmero nucleossomal pode ser resumida como (H2A-H2B)-(H4-H3)-(H3'-H4')-(H2B'-H2A') em torno da qual um segmento de dupla hélice de DNA, composto por 147 pares de bases, perfaz 1.7 voltas, enrolando-se como uma linha em torno de um carretel (figura 6)



**Figura 6: Esquema do nucleossomo.**

(A) Representação da associação entre octâmero protéico e o DNA genômico. (B) Esquema ilustrativo da organização da estrutura de fibras do nucleossomo. (NELSON & COX, 2000).

Oudet e colaboradores fizeram as primeiras relações entre a estrutura dos nucleossomos e a função do genoma eucariótico em 1975. Estas observações continuam atuais, sendo corroboradas até hoje em experimentos que demonstram a desestruturação do nucleossomo em regiões promotoras de genes ativamente transcritos (BOEGER e cols., 2003). Hoje, sabe-se que o acesso dos fatores e maquinaria de transcrição ao DNA é regulado por diversos mecanismos capazes de alterar a estrutura dos nucleossomos.

A acessibilidade do DNA nucleossomal depende da dissociação transitória das histonas que o compõe, o que expõe regiões previamente oclusas, viabilizando assim o acesso e ligação de proteínas reguladoras. De forma geral, *in vivo*, a estrutura dos nucleossomos pode ser regulada por três principais mecanismos: modificações pós-traducionais nas porções amino-terminais das histonas, alterações na composição do octâmero de histonas e pelo reposicionamento do octâmero de histonas ao longo do DNA nucleossomal (SAHA e cols., 2006).

Se dividíssemos em duas etapas o intrincado processo de regulação da expressão gênica, consideraríamos a desestruturação dos nucleossomos como uma primeira etapa, na qual toda a informação contida na cromatina estaria sendo disponibilizada através de seu desempacotamento. A partir daí, a modulação

estrutural do DNA desempacotado seria considerada uma segunda etapa, que em última instância direcionaria as interações entre os fatores e a maquinaria basal de transcrição às suas regiões de atuação.

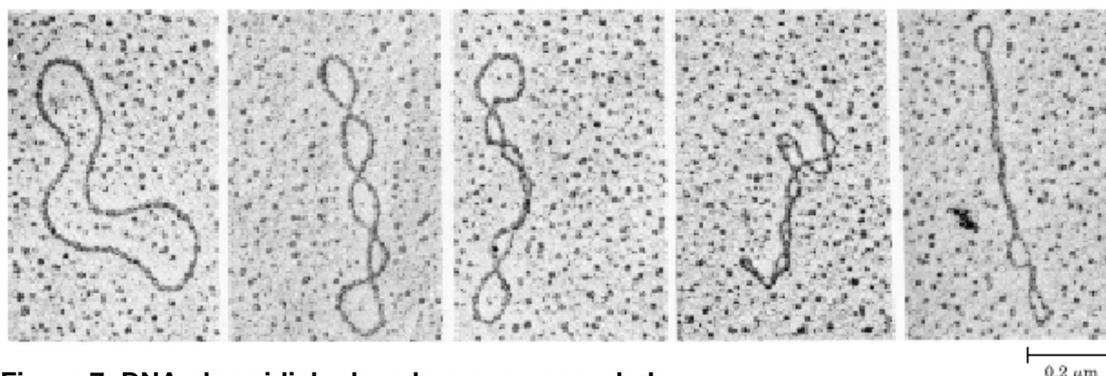
Dentro do contexto de regulação transcricional e levando-se em conta a função nuclear desempenhada pelas proteínas do tipo HMGB, será dada ao longo das próximas subseções uma maior atenção aos eventos de regulação gênica associados à modulação estrutural e topológica do DNA.

### **1.3 Estrutura e função do DNA superenovelado**

O DNA é capaz de sofrer modificações estruturais em resposta a forças físicas aplicadas a ele durante determinados processos biológicos. Mais especificamente, podemos citar o enovelamento e desenovelamento da dupla hélice do DNA através da ação da maquinaria basal de transcrição e de fatores transcricionais. Esse tipo de ação acarreta a geração transitória de forças que, por sua vez, atuam indiretamente no processo de regulação gênica (KOUZINE & LEVENS, 2007).

No DNA, o número de voltas periódicas em torno do seu eixo central é determinado pela estrutura planar estabelecida entre os pares de bases e pelas rígidas ligações fosfodiésteres entre seus fosfatos. Essa configuração favorece a formação de uma estrutura helicoidal estável denominada DNA tipo B. Nesse caso, a fita dupla de DNA apresenta voltas periódicas constituídas por 10.5 pares de base e de diâmetro equivalente a 20Å, sendo caracterizada, do ponto de vista topológico, como um arranjo estrutural “relaxado” (figura 7). Entretanto, se imobilizarmos uma das extremidades da dupla fita de DNA e promovermos uma rotação na outra

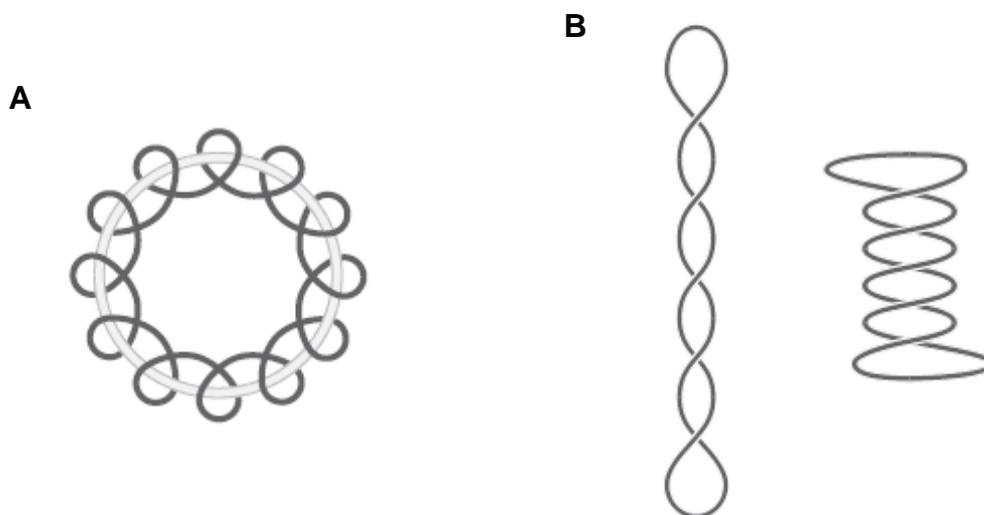
extremidade livre, dependendo da direção dessa rotação, estaremos introduzindo ou desfazendo voltas e, dessa forma, favorecendo um rearranjo estrutural da molécula. Esse rearranjo é decorrente de uma redistribuição de forças atuantes na estrutura do DNA e acarreta, em última instância, na formação de uma estrutura terciária superenovelada (figura 7).



**Figura 7: DNA plasmidial relaxado e superenovelado.**

A primeira micrografia eletrônica da esquerda representa a molécula relaxada e da esquerda para a direita o aumento nos níveis de superenovelamento do DNA. (NELSON & COX, 2000).

Se considerarmos a sequência de desoxirribunucleotídeos que constituem o DNA como uma estrutura primária e o arranjo helicoidal determinado por essas unidades como uma estrutura secundária, poderíamos considerar que as diferentes conformações assumidas pela dupla hélice de DNA estariam caracterizando uma espécie de estrutura terciária. O DNA superenovelado nesse caso, seria uma estrutura terciária capaz de assumir duas formas topologicamente equivalentes: a estrutura helicoidal toroidal (ou solenóide), na qual o eixo da molécula encontra-se enrolado como se estivesse em torno de um cilindro (figura 8A) e a estrutura plectonêmica, na qual o eixo da molécula encontra-se torcido em torno de si mesmo (figura 8B).



**Figura 8: Modelo ilustrativo da estrutura toroidal (A) e da estrutura plectonêmica (B). (Travers & Muskhelishvili, 2007).**

Em eventos de ativação da transcrição gênica a abertura transitória da molécula de DNA, a presença de fatores transcricionais e o deslizamento de RNA polimerase, promovem a propagação de torções na fita dupla. A literatura sobre o tema sugere que o acúmulo ou dissipação do torque ao longo da molécula de DNA seria capaz de desempenhar importante papel na modulação da temperatura de anelamento em regiões promotoras de determinados genes (KOUZINE & LEVENS, 2007).

A atividade transcricional em regiões promotoras localizadas próximas umas das outras, desencadeia a propagação de torques capazes de influenciar diretamente suas funções (OPEL & HATFIELD, 2001; DUNAWAY & OSTRANDER, 1993). Trinklein e colaboradores demonstraram que a energia contida em determinadas regiões promotoras próximas, favorece a separação da dupla fita, independentemente da ação da helicase TFIIH (TRINKLEIN e cols., 2004). O FUSE (*Far UpStream Element*) é uma sequência de nucleotídeos presentes no promotor

do protooncogene *c-myc* caracterizada como uma SIDD (*Stress Induced Duplex Destabilization*). As SIDDs podem ser teoricamente determinadas a partir de um algoritmo que calcula a estabilidade termodinâmica e a probabilidade de determinadas sequências em assumirem condições de fita simples mediante estresse induzido por propagação de torque (KOUZINE & LEVENS, 2007).

#### **1.4 Estrutura e função do Bending DNA**

Um fator de transcrição pode regular a expressão de um determinado gene mesmo que ambos estejam localizados em regiões distantes umas das outras ao longo da molécula de DNA.

Hahn e colaboradores demonstraram em bactérias que, a repressão do operon *araBAD* depende da interação da proteína *araC* com uma região do DNA localizada 200 pares de bases a montante ao sítio de iniciação de transcrição. Os autores sugeriram que a proteína *araC* seria capaz de interagir com outra proteína localizada em uma região próxima ao sítio de iniciação de transcrição através de dobras assumidas pela molécula de DNA (HAHN e cols., 1986; MARTIN e cols., 1986).

Outro exemplo para esse tipo de regulação pode ser encontrado no promotor do vírus SV40 (*simian vírus 40*). O promotor SV40 regula a expressão de genes específicos a partir da cooperação entre proteínas presentes em 3 diferentes regiões do DNA: uma região TATA, um segmento intermediário e uma região ativadora localizada a montante ao sítio de iniciação de transcrição. As interações entre essas regiões são dependentes de rearranjos estruturais da molécula de DNA, que favorecem suas aproximações espaciais. Para confirmar a hipótese de que

modificações na estrutura “primária” da molécula de DNA poderiam ser responsáveis pela alteração na estrutura “terciária” e no conseqüente desalinhamento de regiões reguladoras, Takahashi e colaboradores demonstraram uma diminuição na atividade transcricional através da inserção de pequenas sequências aleatórias entre as 3 regiões reguladoras do promotor SV40. Nesse contexto, a diminuição da transcrição em função do espaçamento das regiões do promotor sugere que a interação entre as proteínas reguladoras possa ser dependente de uma estrutura terciária assumida pela molécula de DNA (TAKAHASHI e cols., 1986).

Ptashne e colaboradores demonstrou, em 1986, que duas proteínas reguladoras de fago  $\lambda$  eram capazes de promover cooperativamente a transcrição de genes específicos através da formação de um heterodímero capaz de ligar-se a sequências adjacentes presentes no DNA bacteriano (PTASHNE e cols., 1986).

De forma contrária ao que foi observado por Takahashi, os autores demonstraram que os níveis de expressão obtidos nesse sistema, poderiam ser reproduzidos mediante a inserção de uma longa sequência de nucleotídeos entre as regiões reguladoras adjacentes. A inserção de uma longa sequência compreende uma estrutura helicoidal composta por 7 voltas e que, devido a sua flexibilidade, favorece a formação do heterodímero regulador através de uma dobra na molécula de DNA.

Hochschild e Ptashne (1986) complementaram os resultados obtidos por Takahashi agregando a idéia de que, independentemente do comprimento da sequência inserida entre as regiões reguladoras, a posição dessas regiões precisa ser preservada em torno do eixo da molécula de DNA. Caso isso não aconteça, mesmo através de modificações na estrutura “terciária” da dupla fita de DNA, o

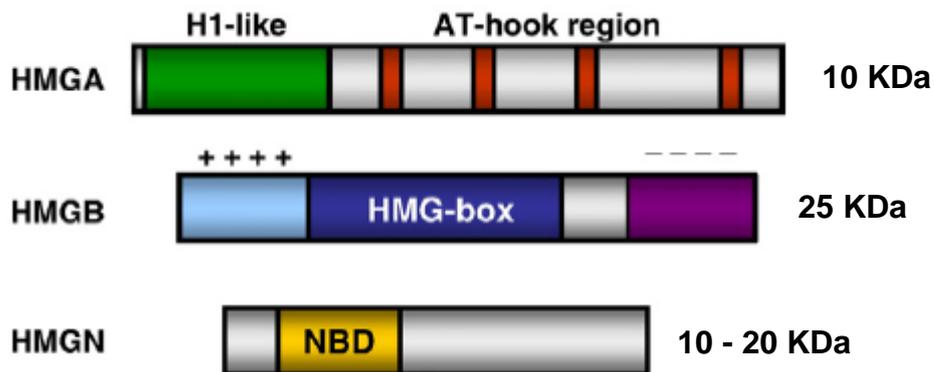
contato entre as proteínas reguladoras não será estabelecido devido ao desalinhamento de seus sítios de ligação (PTASHNE, 1986).

### **1.5 Proteínas do grupo de alta mobilidade eletroforética ou “High Mobility Group” (HMG)**

Na cromatina, além das histonas, existem proteínas não-histonas denominadas de High Mobility Group (HMG). As HMGs receberam essa denominação devido à sua alta mobilidade eletroforética em géis de uréia (GOODWIN e cols., 1973). Essa alta mobilidade eletroforética está diretamente relacionada à composição de aminoácidos desses polipeptídeos, compostos de muitos resíduos de aminoácidos básicos e ácidos. Esta família de proteínas nucleares não-histonas é o segundo grupo de proteínas cromossomais mais abundantes, cujas funções relacionadas ao DNA são a transcrição, replicação, recombinação e reparo, envolvendo modificação na estrutura do DNA e organização da fibra de cromatina (BUSTIN, 1999). Deste modo, as HMGs são denominadas de proteínas arquitetonas do DNA (AGRESTI & BIANCHI, 2003).

Apesar das HMGs possuírem funções similares, essas proteínas encontram-se agrupadas, em vertebrados, de acordo com suas propriedades estruturais em três famílias diferentes: HMGA são proteínas muito pequenas (aproximadamente 10 kDa), contém domínios de gancho AT, segmentos constituídos por nove aminoácidos, que se ligam a regiões do DNA ricas em repetições A/T *in vitro* e *in vivo* (ZHANG e cols., 2007) e compreendem quatro isoformas, a HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c e HMGA2. A família das HMGNs possuem peso molecular intermediário (entre 10 e 20 kDa) e contém domínio de ligação a nucleossomos

(DLN – NBD, do inglês *nucleosome binding domain*) e compreende a HMGN1, HMGN2, HMGN3, HMGN3a e HMGN4. Finalmente, as HMGBs têm uma massa molecular de aproximadamente 25 kDa e contêm domínios denominados “boxes”. Estes podem ser subdivididos em HMGB1, HMGB2 e HMGB3 (figura9) (HOCK e cols., 2006; AGRESTI & BIANCHI, 2003). Proteínas com domínios boxes como HMGs, têm sido descritas em leveduras (WEBER & ISENBERG, 1980), plantas (GRASSER, 1995; SPIKER e cols., 1978) e *Diptera* (principalmente *Drosophila*), no qual se tem caracterizado a HMGD e HMGZ, que são altamente homólogas a HMG-box (HMGB) de vertebrados (CHEN e cols., 2008; TRAVERS, 2000; NER e cols. 1993).

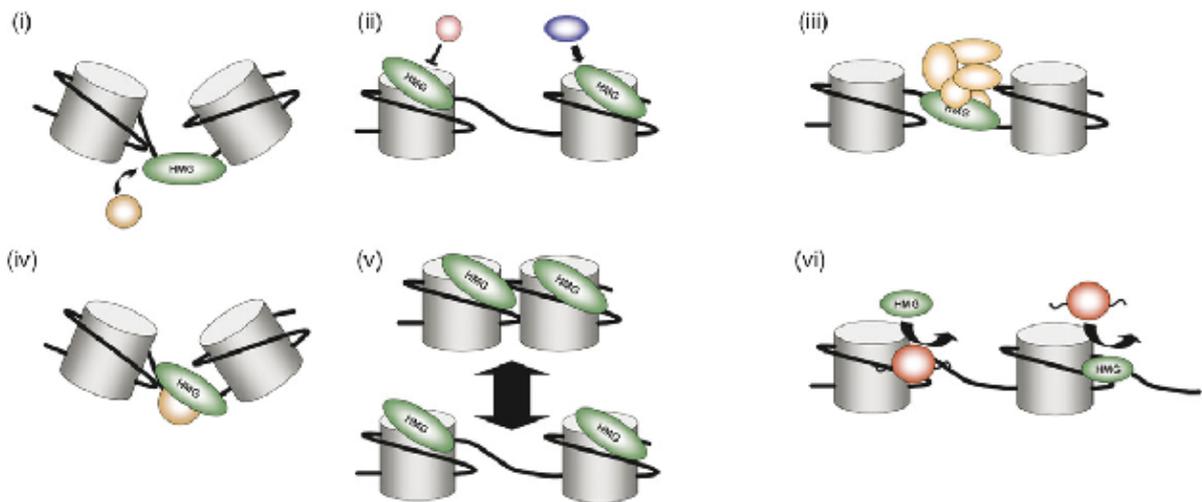


**Figura 9: Esquema representativo das proteínas da família das HMGs e seus respectivos motivos de ligação ao DNA.** Os retângulos vermelhos representam os domínios ganchos AT de ligação ao DNA, presentes nas HMGA; o retângulo azul representa os domínios boxes de ligação ao DNA, presentes nas HMGBs; o retângulo amarelo ilustra os domínios de ligação ao nucleossomo, característico das HMGNS; (+) refere-se à região N-terminal da proteína HMGB1 rica em aminoácidos com cargas positivas e (-) a região C-terminal da proteína HMGB1 rica em aminoácidos com cargas negativas. (GRASSER, 2006)

As HMGs são caracterizadas por apresentarem uma região carboxi-terminal rica em resíduos de aminoácidos ácidos. Ligam-se ao DNA independentemente de sequências específicas, mas tendo alta afinidade por regiões estruturadas. Sua função pode depender da interação com fatores de transcrição, co-ativadores ou co-repressores, assim como da sua capacidade em estabilizar determinadas

conformações de DNA. Recentemente, experimentos de microscopia demonstram que a interação dessas proteínas com a cromatina é extremamente dinâmica. As moléculas de HMG estão constantemente alternando seus sítios de ligação ao DNA através de uma dinâmica denominada *stop and go*, onde o tempo de residência da proteína é maior no estágio de ligação do que no estágio de transição para outro sítio de ligação. Pode-se dizer que proteínas do tipo HMG encontram-se associadas à cromatina, *in vivo*, durante maior parte do tempo (HOCK e cols., 2006). Entretanto, existe uma reciclagem contínua de proteínas HMGs ao longo dos pontos de ligação à cromatina e cada molécula de HMG compete pelo seu sítio de ligação com outros membros da mesma família e com as histonas H1 (HOCK e cols., 2006). Apesar das semelhanças estruturais entre os membros das diferentes famílias, experimentos com camundongos nocaute demonstram que cada um dos diferentes grupos de HMGs é responsável pelo controle de determinadas atividades celulares e que, aparentemente, suas funções biológicas não são obrigatoriamente redundantes. (BIANCHI & AGRESTI, 2005).

As HMGs, de uma forma geral, apresentam uma função de regulação global do genoma, estabelecendo domínios ativos ou inativos da cromatina (BIANCHI & AGRESTI, 2005) e controlando, dessa forma, a transcrição de determinados genes através de diferentes mecanismos (figura 10).



**Figura 10: Esquema representativo das modificações que as proteínas da família das HMGs fazem na estrutura da cromatina.**

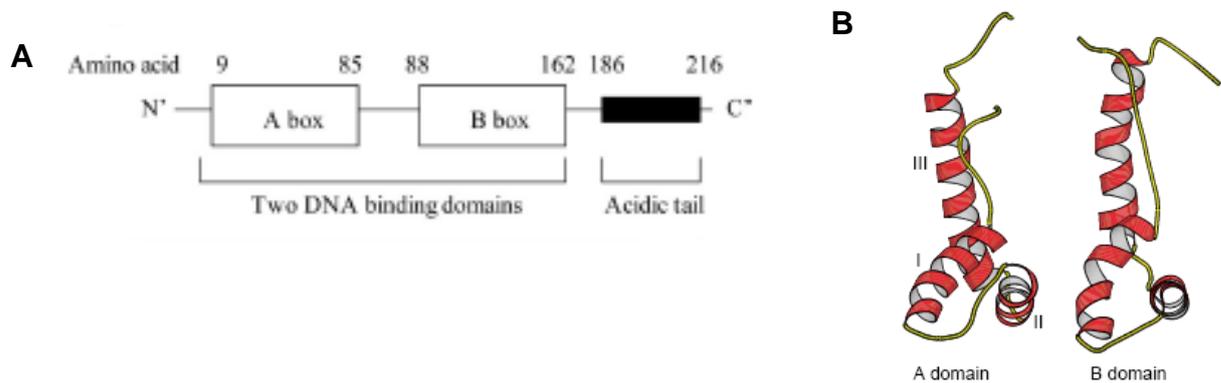
(i,ii) proteínas HMGs (verde) alteram a estrutura da cromatina e facilitam a ligação de fatores adicionais (círculos de outras cores); (iii) HMGs fazem parte da cromatina e modulam a ligação do complexo regulatório multiprotéico; (iv) HMGs facilitam modificação estrutural nos sítios nos quais elas são alvos por fatores regulatórios específicos; (v) afrouxamento da cromatina pelas proteínas HMGs ou compactação pela HMGA; (vi) proteínas HMGs competem com outras proteínas nucleares por sítios de ligação a cromatina, alterando a estrutura local ou global da fibra de cromatina. (HOCK e cols., 2006).

## 1.6 Proteínas High Mobility Group Box 1 (HMGB1)

As proteínas HMGB1, também chamadas de HMG1 e anfoterinas, são altamente abundantes no núcleo de células de mamíferos. Estima-se que a relação estequiométrica entre HMGB1 e nucleossomos seja de 1 para 10 (THOMAS & TRAVERS, 2001).

A HMGB1 de mamíferos foi a primeira a ser identificada e caracterizada. Proteínas HMGB1 canônicas possuem dois domínios boxes de ligação ao DNA (box A e box B), contendo cerca de 80 resíduos de aminoácidos cada e uma longa cauda ácida na região C-terminal contendo 30 resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico (figura 11A) (THOMAS & TRAVERS, 2001). Diversos trabalhos têm

mostrado que a cauda ácida tem importantes papéis na mediação das interações entre os HMG boxes e o DNA (TRAVERS, 2003). Enquanto a cauda ácida encontra-se aparentemente desestruturada, os domínios HMG boxes são estruturados sob a forma de três  $\alpha$ -hélices (I-III) dispostas em forma de L (figura 11B) (THOMAS & TRAVERS, 2001).

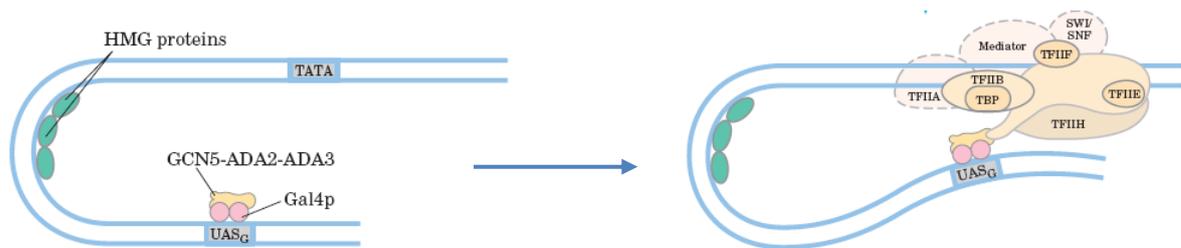


**Figura 11: Esquema representativo da estrutura da proteína HMGB de vertebrado.**

(A) As caixas brancas representam os boxes A e B e a caixa preta a cauda ácida C-terminal; os números na parte superior da figura simbolizam o número de aminoácidos da proteína HMGB1 de vertebrado. (Adaptado de: YANG, 2005); (B) estrutura determinada por RMN dos boxes A e B, demonstrando a disposição das  $\alpha$ -hélices I, II e III. (Adaptado de: THOMAS & TRAVERS, 2001).

As proteínas HMGB1 ligam-se ao DNA sem qualquer especificidade por sequências (THOMAS & TRAVERS, 2001; CROTHERS, 1993). Elas estão envolvidas em processos biológicos como transcrição, replicação, recombinação e reparo de DNA, caracterizando-se assim como proteínas arquitetonas (BONALDI e cols., 2002; STROS, 2001; TRAVERS, 2000; STROS & REICH, 1998; STROS e cols., 1994). Essas proteínas funcionam também como chaperonas, pois ao promoverem a dobradura de DNA, permitem a interação entre proteínas associadas a este DNA facilitando a formação de um complexo multi-protéico (STROS, 2001; BUSTIN, 1999).

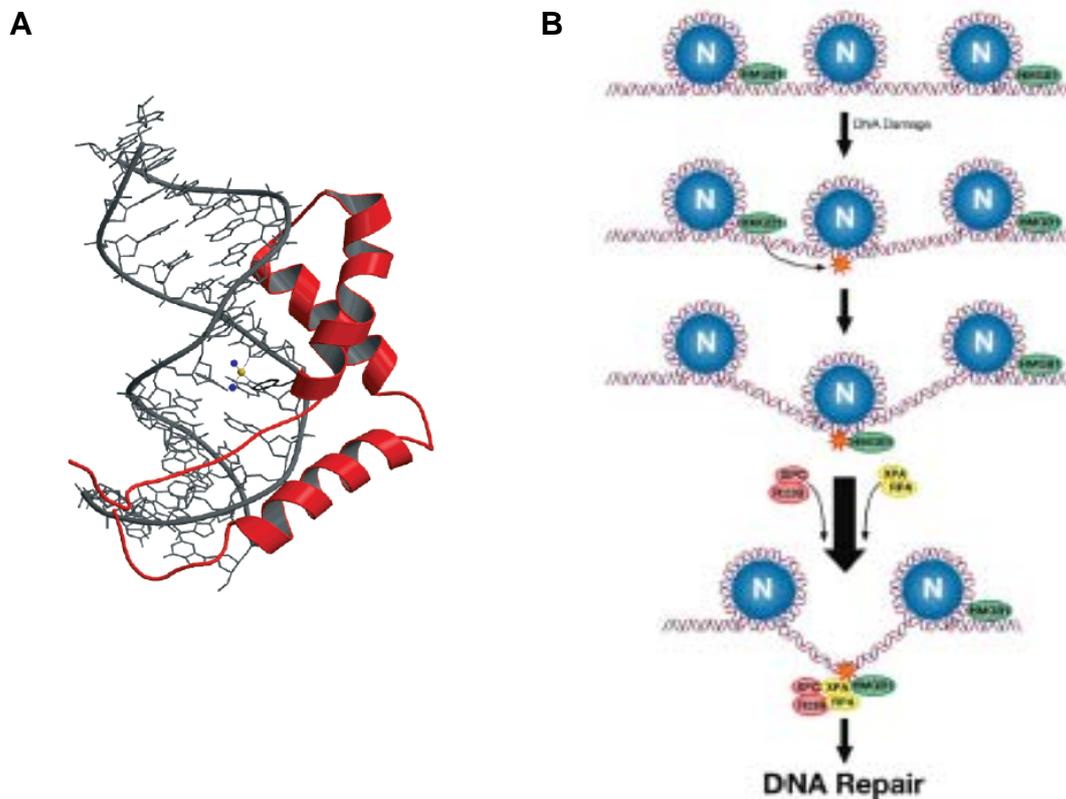
Ensaios *in vitro* têm demonstrado que HMGB1 pode regular positivamente ou negativamente a transcrição gênica através de diferentes mecanismos (THOMAS & TRAVERS, 2001). O primeiro deles sugere uma alteração conformacional no DNA nucleossomal através da inserção de dobras na molécula ou torções conforme descrito nas seções anteriores. Essa alteração estrutural induziria rearranjos das regiões de DNA reguladoras favorecendo a interação de fatores transcricionais e proteínas da maquinaria basal de transcrição, desencadeando ou reprimindo a expressão de genes específicos (figura 12) (WU & TRAVERS, 2004; AGRETI & BIANCHI, 2003; TRAVERS, 2003; BONALDI e cols., 2002).



**Figura 12: Complexo de proteínas envolvidas na ativação transcricional de genes eucarióticos mediante dobra do DNA pela HMGB1 (Adaptado de NELSON & COX, 2000).**

Os domínios HMG boxes são extremamente conservados ao longo de diferentes espécies e são capazes de promover alterações conformacionais no DNA através de suas ligações ao sulco menor do DNA (POHLER e cols., 1997; BIANCHI e cols., 1992; BIANCHI e cols., 1989). Esses domínios são capazes de reconhecer diferentes estruturas de DNA (STROS & REICH, 1998) como o DNA cruciforme, mimetizando a estrutura do tipo *Four-Way-Junction* (4WJs), normalmente encontrada em sítios de recombinação gênica; DNA superenovelado (STROS & MUSELIKOVA, 2000; POHLER e cols., 1997; BIANCHI e cols., 1992; BIANCHI e cols., 1989); e DNA modificado por cisplatina, um quimioterápico amplamente

utilizado no tratamento do câncer, cujo átomo de platina liga-se covalentemente ao DNA (RYBAK, 2007), modificando a sua conformação através de dobras ou quebras. Esta modificação conformacional é reconhecida pelas proteínas HMGB1, que se ligam a esta região recrutando proteínas de reparo por excisão de nucleotídeos (REN - NER do inglês *nucleotide excision repair*), facilitando o reparo do DNA. Este processo pode estar associado à resistência do DNA de células tumorais ao quimioterápico (LANGE e cols., 2008) (figura 13);

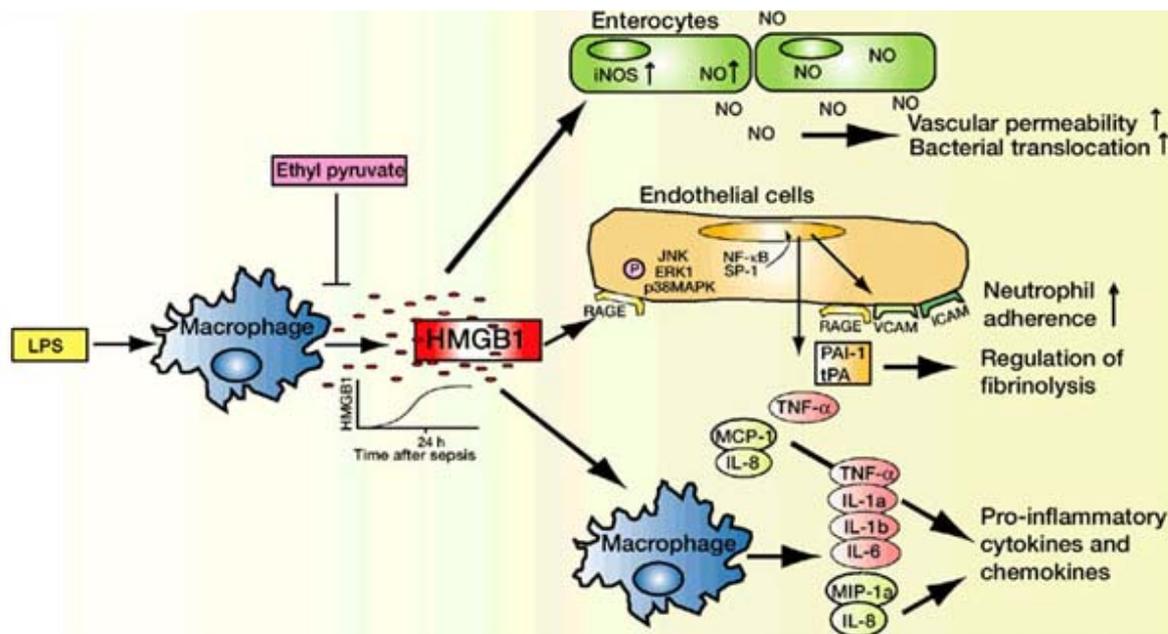


**Figura 13: Esquema do reconhecimento da proteína HMGB1 por modificações induzidas pela cisplatina.**

(A) Box B ligado ao DNA modificado por cisplatina (Adaptado de: HE, 2000); (B) modelo do efeito da HMGB1 no reparo do DNA modificado por cisplatina e remodelamento da cromatina. Ela recruta proteínas REN XPA, RPA e XPC-RAD23B, assim como fatores de remodelamento da cromatina para remover nucleossomos próximos (N) e facilitam o acesso ao DNA danificado para reparo. (LANGE, 2008).

Apesar de seu papel no metabolismo de DNA ser bem estabelecido, as HMGB1 podem também interagir com RNAs, sendo capazes de influenciar no processamento de RNA (BELL e cols., 2008).

Recentemente, a HMGB1 tem sido descrita como uma potente citocina pró-inflamatória. Nesse contexto, a HMGB1 pode ser passivamente liberada do núcleo de células necróticas ou danificadas ou ativamente secretada por monócitos/macrófagos ativados com LPS e citocinas pró-inflamatórias (ANDERSSON e cols., 2002; WANG e cols., 1999), induzindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios (GAZZAR, 2007). HMGB1 pode se ligar a receptores RAGE ou receptores do tipo Toll, como TLR2 e TLR4 ativando a proteína cinase mitogênica-ativada (MAPK) e promovendo a translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo com consequente indução da produção de várias citocinas pró-inflamatória (figura 14) (WANG e cols., 2006; CHEN e cols., 2004). HMGB1 já foi detectada em diversas amostras biológicas (soro, plasma, fluido sinovial, etc) obtidas de pacientes apresentando doenças inflamatórias como a sepse, artrite reumatóide, choque hemorrágico e algumas infecções virais como hepatite, encefalite e SARS (YAMADA & MARUYAMA, 2007; WANG e cols., 2006).



**Figura 14: O papel pró-inflamatório da HMGB1.** HMGB1 é produzida por macrófagos após estímulo inflamatório. HMGB1 pode ativar células fagocíticas, resultando na produção de mediadores pró-inflamatórios. Ela se liga a RAGE e Toll 2 e 4, levando a translocação nuclear de fatores de transcrição. ([http://www.medscape.com/viewarticle/453656\\_4](http://www.medscape.com/viewarticle/453656_4))

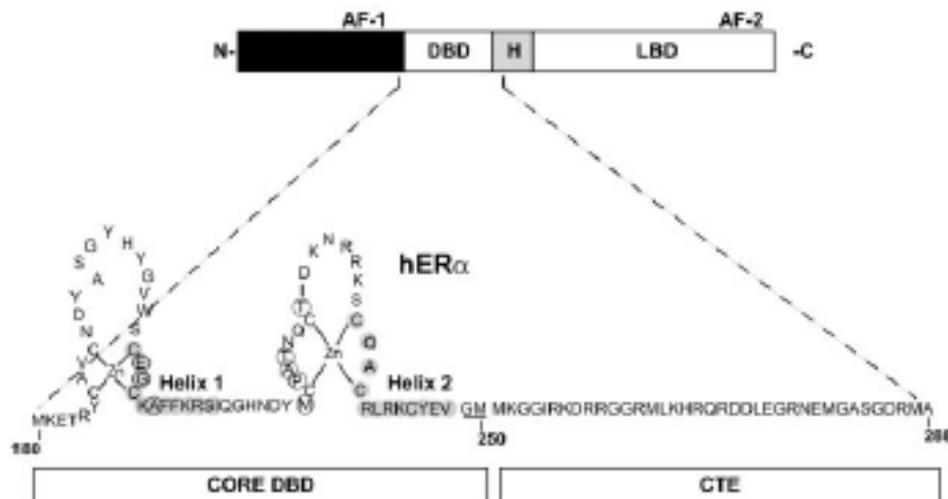
### 1.6.1 HMGB1 e Receptores de Esteróides

Os receptores nucleares de hormônios compreendem uma superfamília de fatores de transcrição dependentes de ligantes. Dentro desta superfamília, os receptores de hormônios esteróides interagem com regiões específicas do DNA chamadas de elementos responsivos a hormônios (ESH - HREs, do inglês *Hormone Responsive Elements*). Estes elementos compreendem sequências de DNA que estão situadas na região promotora dos genes (MELVIN e cols., 2004).

Os receptores nucleares apresentam uma região modular caracterizada pelo domínio de transativação 1 (AF-1) na região N-terminal, cuja ativação é independente de ligante; um domínio altamente conservado de ligação ao DNA (*DNA Binding Domain* - DBD); e um domínio de dimerização que contém o domínio

de transativação 2 (AF-2) na porção C-terminal, que é ligante dependente (*Ligand Binding Domain – LBD*) (figura 15) (KUMAR & THOMPSON, 1999).

O DBD consiste de uma região altamente conservada (*core DBD*) composta por dois motivos do tipo dedos de zinco e uma região com aproximadamente 30 aminoácidos chamada de extensão C-terminal (*C-terminal extension - CTE*). O CTE não é uma região conservada e tem diferentes motivos estruturais dependendo da classe de receptor nuclear, cuja função é estabilizar o complexo receptor-DNA (MELVIN e cols., 2004).

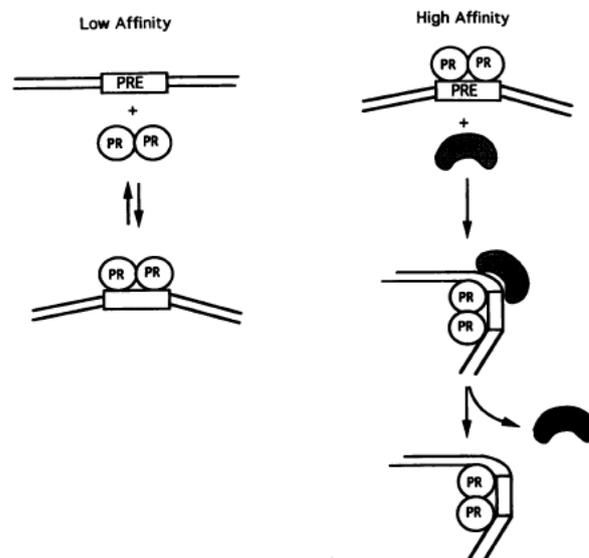


**Figura 15: Estrutura do receptor de esteróides.**

Sequência de aminoácidos e organização estrutural da região DBD e CTE. O domínio DBD representa o domínio de ligação ao DNA; LBD representa o domínio dependente de ligante (Adaptado de: MELVIN e cols., 2004)

Proteínas HMGBs são recrutadas para regiões promotoras através da interação com fatores de transcrição específicos, que reconhecem sequências específicas no DNA. Nesse sentido, proteínas HMGB1 já foram descritas interagindo com MLTF, Oct, Hox, p53, Rel e receptores de hormônios esteróides (KROHN e cols., 2002), sendo capaz de aumentar as suas atividades transcricionais.

Oñate demonstrou inicialmente que a proteína HMGB1 aumenta a afinidade dos receptores de progesterona aos elementos responsivos a progesterona (ESP) (regiões específicas do DNA) em cerca de 10 vezes (OÑATE e cols., 1994). Acredita-se que os receptores de progesterona sozinhos ligam-se com baixa afinidade aos ESPs, promovendo uma pequena torção ou dobra na estrutura do DNA. A geração desta pequena torção no DNA promove a ligação da HMGB1 por este sítio, aumentando a afinidade dos receptores de progesterona aos ESPs. Este modelo está melhor ilustrado na figura 16 (OÑATE e cols., 1994).



**Figura 16: Mecanismo proposto para o aumento da afinidade de ligação dos receptores de progesterona (PR) a regiões específicas do DNA (PRE). (OÑATE e cols., 1994).**

É importante mencionar que o efeito estabilizador da HMGB1 foi também descrito para os receptores de glicocorticóides, androgênio e estrogênio e que o aumento de afinidade dos receptores nucleares de esteróides aos elementos responsivos ao hormônio, potencializa a atividade transcricional dos receptores

(VERRIJDT e cols., 2002; BOONYARATANAKORNKIT e cols., 1998). Entretanto, o papel estabilizador da HMGB1 frente a regiões específicas do DNA não foi visto para presença de receptores não esteróides, como os receptores de retinóides, hormônios tireoidianos e de vitamina D (BOONYARATANAKORNKIT e cols., 1998).

### 1.6.2 Fosforilação de proteínas HMGB1

As modificações pós-traducionais de uma proteína determinam e/ou modulam a sua estabilidade, conformação tridimensional, distribuição, localização, meia-vida e interação com o DNA e com proteínas. Dentre essas modificações, destaca-se a fosforilação de proteínas que representa um mecanismo versátil para mediar respostas celulares (AMADIO e cols., 2006). Células eucarióticas utilizam a fosforilação reversível de proteínas como uma estratégia predominantemente usada para controlar as atividades protéicas. A principal classe de enzimas que controla esse processo é a superfamília de proteínas cinases, que catalisam a reação de transferência de fosfatos (AMADIO e cols., 2006).

A caseína cinase 2 ou CK2 é uma serina/treonina proteína cinase expressa de forma ubíqua em células eucarióticas e é extremamente conservada ao longo das espécies. Diferentemente de outras proteínas cinases, que apresentam subunidades catalíticas que as mantêm quiescentes até que a sua atividade seja ativada em resposta a um estímulo e efetores específicos, a CK2 é constitutivamente ativa e independe de segundos mensageiros e eventos de fosforilação (MEGGIO & PINNA, 2003). A proteína cinase C (PKC) é outra serina/treonina cinase, ubiquamente expressa e com múltiplas funções celulares como liberação de neurotransmissores, modulação de receptores, proliferação celular e expressão gênica (AMADIO e cols.,

2006). Pelo menos dez isoformas, codificadas por nove diferentes genes, têm sido descritas, de acordo com a similaridade de sequências. As PKCs são agrupadas em três classes distintas: cálcio dependente ou cPKCs clássicas ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II e  $\gamma$ ); cálcio independente ou nPKCs ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  e  $\theta$ ) e finalmente aPKCs atípicas ( $\xi$ ,  $\lambda$ /I) (AMADIO e cols., 2006).

Estudos *in vitro* demonstram que proteínas cinases dependentes de AMPc, proteínas cinases dependentes de GMPc, CK2 e proteínas cinases nucleares endógenas fosforilam proteínas da família HMG e essas fosforilações são capazes de modular a estabilidade e ligação dessas proteínas ao DNA (YOUN & SHIN, 2006; XIAO e cols., 2000). Por exemplo, a fosforilação da HMGB1 diminui a sua afinidade ao DNA e esse efeito é mediado pela introdução de cargas negativas à proteína (WOLFFE, 1994). Krohn e colaboradores (2002) demonstraram que a fosforilação da cauda ácida C-terminal de HMGB1 por CK2 diminui a interação de HMGB1 e Dof2 (um fator de transcrição de milho) ao DNA, devido à alteração conformacional da HMGB1. Esses dados mostram que os HMG boxes, além de ligarem a DNA, também regulam interações entre proteínas (KROHN e cols., 2002).

A cauda ácida de proteínas HMGBs de *Drosophila* e *Chironomus* (*Diptera*) é fosforilada por CK2 em determinados resíduos de serina e essa fosforilação modifica a conformação protéica influenciando na afinidade da HMGB pelo DNA (WISNIEWSKI e cols., 1999). A PKC também é capaz de fosforilar as proteínas HMGBs (cHMG1a e cHMG1b) de *Chironomus*, e essa fosforilação diminui em 10 vezes a afinidade dessas proteínas pelo DNA (WISNIEWSKI e cols., 1994). Além disso, foi demonstrado que a fosforilação da cauda ácida C-terminal da proteína cHMG1a resulta numa menor translocação da proteína do citoplasma para o núcleo (WISNIEWSKI e cols., 1994).

A forma fosforilada da HMGB1 é consistentemente encontrada em células de câncer de cólon. Nessas células, a fosforilação dos resíduos de serina 35, 39 e 42 da HMGB1 promove a sua translocação do núcleo para o citoplasma. Essa translocação pôde ser revertida com o tratamento das células com inibidores de PKC (KANG e cols., 2009).

### 1.6.3 HMGB de Insetos

Proteínas HMGBs também têm sido descritas em dípteros, principalmente em *Drosophila* e *Chironomus*. Em *Chironomus*, a família das HMGBs é representada pela cHMGB1a e cHMGB1b (WISNIEWSKI & SCHULZE, 1992). A HMGB de *Drosophila* compreendem a HMGD (WAGNER, 1992) e HMGZ, sendo esta última menos abundante (NER e cols., 1993). As proteínas HMGBs de insetos são caracterizadas por apresentarem um ou dois domínios HMG-box, conter grande quantidade de resíduos ácidos e básicos, mas principalmente pela presença de um maior conteúdo de triptofano, um aminoácido geralmente ausente em outras HMGs e histona H1 (WISNIEWSKI & SCHULZE, 1992).

As proteínas HMGBs de dípteros, como por exemplo, a HMGD, ligam-se com alta afinidade a dinucleotídeos TG (CHURCHILL e cols., 1995), DNA four-way junction (WISNIEWSKI & SCHULZE, 1992) e DNAs pré-dobrados (PAYET & TRAVERS, 1997).

HMGD e HMGZ, apesar de estruturalmente semelhantes, apresentam diferenças importantes de expressão ao longo do desenvolvimento da *Drosophila*. HMGD é altamente expressa durante o desenvolvimento embrionário da mosca assim como em fêmeas adultas (NER e cols., 1993). Alternativamente, altos níveis

do transcrito de HMGZ foram detectados em embriões após a completa celularização e no primeiro estágio larvar do inseto (NER e cols., 1993).

Apesar da caracterização de proteínas HMGB em alguns dípteros, as funções dessas proteínas na biologia desses insetos ainda são pouco conhecidas. Nesse sentido, a caracterização da HMGB1 de *Aedes aegypti* pode gerar contribuições importantes para o melhor entendimento do papel biológico desse grupo de proteínas nos insetos, assim como gerar subsídios para melhores estratégias de controle do mosquito.

**Tabela 1. Características das Proteínas High Mobility Group Box de *Drosophila* e *Chironomus* (Modificada ALEPOROU-MARINOU, 2003).**

| Proteína HMG | Domínio             | Peso Molecular (KDa) | Lócus        | Região de Ligação ao DNA |
|--------------|---------------------|----------------------|--------------|--------------------------|
| cHMGB1a      | Um domínio HMG1-box | 16,5                 | Cromossomo 1 | Sulco menor              |
| cHMGB1b      | Um domínio HMG1-box | 15,2                 | Cromossomo 1 | Sulco menor              |
| HMGD         | Um domínio HMG1-box | 13                   | Cromossomo 2 | Sulco menor              |
| HMGZ         | Um domínio HMG1-box | 30                   | Cromossomo 2 | ND                       |

ND, não determinado; HMG, high mobility group.

## 2. OBJETIVO GERAL

Considerando o importante papel de proteínas HMGB1 no metabolismo de DNA (participando dos processos de transcrição, replicação, recombinação e reparo), o presente trabalho tem como objetivo caracterizar a HMGB1 de *Aedes aegypti* (AaHMGB1) ao nível molecular.

### 2.1. Objetivos Específicos

2.1.1 Clonar o cDNA da AaHMGB1 e expressar a proteína AaHMGB1 e os AaHMGB1 $\Delta$ C e AaHMGB1 $\Delta$ AQ;

2.1.2 Avaliar a atividade da AaHMGB1 e de dois mutantes (AaHMGB1 $\Delta$ C e AaHMGB1 $\Delta$ AQ) na modificação topológica do DNA, através de ensaios de super-enovelamento e dobradura de DNA;

2.1.3 Avaliar a expressão do mRNA de AaHMGB1, através de RT-PCR, nas seguintes condições:

2.1.3.1 ao longo do ciclo de vida do *Aedes aegypti* (ovo - adulto);

2.1.3.2 em fêmeas alimentadas e não alimentadas com sangue;

2.1.3.3 em tecidos (corpo gorduroso, intestino médio e ovário) de fêmeas alimentadas ou não com sangue;

2.1.4 Verificar a fosforilação da proteína AaHMGB1 por PKC e CK2.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção da sequência e alinhamento

No sentido de clonar o cDNA que codifica para a HMGB1 de *A. aegypti* (AaHMGB1) recorreremos ao banco de dados do genoma do *A. aegypti* – VectorBase ([www.vectorbase.org](http://www.vectorbase.org)), como uma ferramenta para identificar essa sequência.

Em seguida utilizou-se a sequência identificada (cDNA), para buscar num banco de dados todas as características relevantes deste cDNA, assim como a sequência protéica gerada pelo mesmo, por isso, utilizou-se como ferramenta o blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A sequência de aminoácidos obtida demonstrou alta similaridade (100%) em relação à proteína HMGB1 de *A. aegypti*.

Por fim, para avaliar a conservação dos domínios de ligação ao DNA (domínios boxes), característicos das proteínas da família HMGB, fez-se um alinhamento das sequências de aminoácidos da HMGB1 de *A. aegypti* com alguns dípteros (*Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus*, *Drosophila melanogaster*) e com a proteína HMGB1 humana como referência, pois esta é a proteína mais bem caracterizada, utilizou-se o programa AlignX (figura 20).

#### 3.2 Oligonucleotídeos

A partir da sequência disponibilizada no VectorBase (com códon de iniciação e terminação), desenhamos oligonucleotídeos (tabela 2) para possibilitar a realização dos seguintes ensaios: clonagem da AaHMGB1 (AaHMGB1 F e AaHMGB1 R), clonagem da AaHMGB1 $\Delta$ C (AaHMGB1 F e AaHMGB1  $\Delta$ C R),

clonagem da *AaHMGB1*ΔAQ (*AaHMGB1* F e *AaHMGB1* ΔQ R), RT-PCR (*AaHMGB1* 200bp F e *AaHMGB1* 200bp R).

**Tabela 2: Sequências de oligonucleotídeos utilizadas para RT-PCR e Clonagem.**

| Oligonucleotídeo       | Sequência                                 |
|------------------------|---|
| <i>AaHMGB1</i> 200bp F | 5' ACGACGAACGGAACAAGGTTA 3'               |
| <i>AaHMGB1</i> 200bp R | 5' TGTTGGACTTGCGCCTGCAGT 3'               |
| RP49 F                 | 5' GCTATGACAAGCTTGCCCCCA 3'               |
| RP49 R                 | 5' TCATCAGCACCTCCAGCTC 3'                 |
| <i>AaHMGB1</i> F       | 5' <b>GGATCC</b> GTCAAGGACAATAAAC 3'      |
| <i>AaHMGB1</i> R       | 5' <b>AAGCTT</b> TACTCGTTATCATCCTCGTCG 3' |
| <i>AaHMGB1</i> ΔC R    | 5' <b>AAGCTT</b> GGCGTGGTGTGCCG 3'        |
| <i>AaHMGB1</i> ΔQ R    | 5' <b>AAGCTT</b> G TACTCGGTCATTCCTG 3'    |

F = forward; R = reverse. A sequência destacada em vermelho, representa o sítio de clivagem da enzima BamHI e a sequência em azul refere-se ao sítio de clivagem para *HindIII*.

### 3.3 Extração de RNA e Síntese de cDNA.

O RNA total do *A. aegypti* proveniente da cepa *Liverpool* foi isolado de acordo com o protocolo descrito pelo sistema de purificação de RNA por Trizol (Invitrogen). O RNA total foi extraído de todas as fases de desenvolvimento do mosquito, que incluem o ovo, larvas de primeiro ao quarto estágio, pupa, machos e fêmeas adultos. RNAs totais também foram extraídos de fêmeas alimentadas com sangue e não alimentadas com sangue e de tecidos (corpo gorduroso, intestino médio e ovário) de fêmeas alimentadas com sangue e não alimentadas com sangue. A alimentação das fêmeas de *A. aegypti* deu-se por sangue de coelho até que estas estivessem completamente ingurgitadas. As fêmeas alimentadas com solução de sacarose 5% caracterizavam o grupo das não alimentadas com sangue. Tanto nos estágios quanto nas fêmeas alimentadas e não alimentadas com sangue, utilizamos 10 indivíduos por grupo, enquanto na extração dos tecidos foram utilizados 20 animais por grupo.

A concentração de RNA total foi medida por espectrofotometria (NanoDrop). Cada 1 µg de RNA total obtido foi tratado com DNase I de acordo com o protocolo do kit (DNase, RNase-free - Fermentas) e em seguida, o cDNA foi sintetizado, segundo o protocolo do fabricante do kit RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas), utilizando Random Primer (Invitrogen).

### **3.4 Análise de Expressão Gênica.**

A análise da expressão gênica foi realizada em cadeia reversa da polimerase da transcrição (RT-PCR). Os cDNAs referentes aos diversos estágios de desenvolvimento, as fêmeas alimentadas e não alimentadas e aos tecidos, foram utilizados como molde para a reação de PCR, com o objetivo de avaliar a expressão da HMGB1.

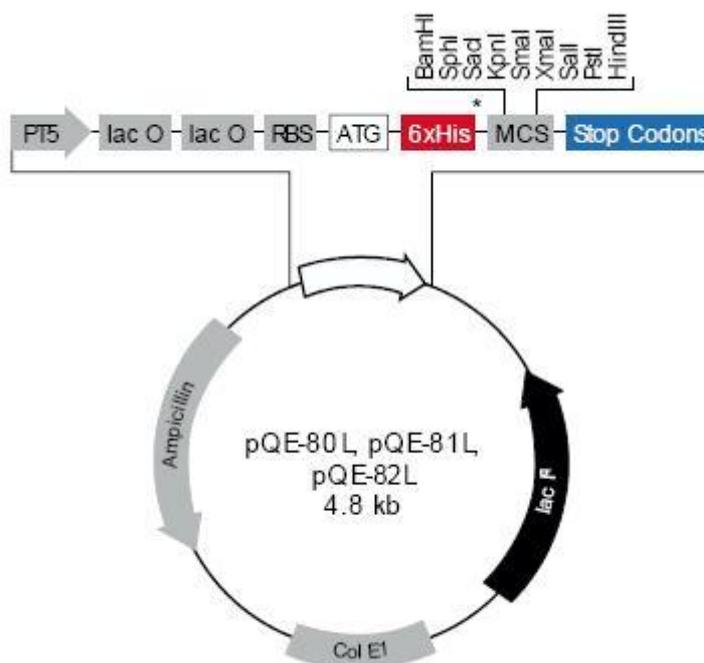
Cada reação continha também: tampão da Taq Polimerase 1X (Invitrogen), deoxiribonucleosídeos trifosfatados (dNTPs) 0,8 mM (Invitrogen), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) 1,5 mM (Invitrogen), oligonucleotídeos 0,5 mM cada e Taq polimerase (Invitrogen 5U/µL). O programa de ciclagem da PCR para estas reações foi de 5 minutos a 94°C; 25, 30 e 35 ciclos de 35 segundos cada a 94°C, anelamento por 35 segundos a 55°C, extensão por 35 segundos a 72°C e extensão final por 7 minutos a 72°C. Os ciclos (25,30 e 35) acima descritos foram previamente testados para o gene da AaHMGB1. Ao completar cada um dos três ciclos citados acima (25, 30 e 35), 15 µL de cada produto foi recolhido e mantido a 4°C até a análise eletroforética em gel de agarose 1,5%.

Após o fracionamento das amostras em gel de agarose, era feita a densitometria das bandas obtidas, utilizando o programa Image J. Esses valores

foram normalizados pelos respectivos valores do gene que codifica a proteína ribossomal 49 (RP49), cuja amplificação é a mesma para AaHMGB1. (GENTILE e cols., 2005).

### 3.5 Clonagem, Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes.

Com o objetivo de avaliarmos as atividades da proteína AaHMGB1, três construções gênicas foram geradas: uma construção contendo o cDNA referente a HMGB1 completa (AaHMGB1, aa 35 – aa 278), o cDNA referente a AaHMGB1 sem a região rica em alanina e glutamina e a cauda ácida (AaHMGB1 $\Delta$ AQ; aa 35 – aa 220) e o cDNA referente a AaHMGB1 sem a cauda ácida (AaHMGB1 $\Delta$ C; aa 35 – aa 265). Para as clonagens, foram feitas reações de PCR utilizando oligonucleotídeos contendo sítios para enzimas de restrição (BamHI em azul e HINDIII em verde) nas extremidades 5' e 3': sense AaHMGB1 – 5' **GGATCC**GTCAAGGACAATAAACC 3' (utilizado para gerar as três construções) antisense AaHMGB1 - 5' **AAGCTT**TTAC TCGTTATCATCCTCGTCCG 3'; antisense AaHMGB1 $\Delta$ C 5' **AAGCTT**GGCGTG GTGTGCCG 3'; antisense AaHMGB1 $\Delta$ AQ 5' **AAGCTT**GTAAGTCTCGGTCATTTTCCTG 3'. Os produtos das reações eram analisados em géis de agarose, as amostras purificadas segundo o protocolo do fabricante GFX (GE HealthCare) e utilizadas nas reações de clonagem (pGEM-T easy, Promega). Os clones foram sequenciados para confirmação de sequências e após digestão e purificação dos insertos, os mesmos foram subclonados no vetor de expressão pQE80L (QIAGEN), que contém uma cauda com 6 histidinas na região carboxiterminal (figura 17).



**Figura 17: Vetor de Expressão pQE-80L.**

O plasmídio pQE-80L foi utilizado na etapa de subclonagem da AaHMGB1, AaHMGB1ΔC e AaHMGB1ΔAQ. O retângulo vermelho destaca a cauda com 6 histidinas.

As células (BL21-DE3 – Novagen) foram transformadas por eletroporação, com os plasmídios contendo os cDNAs codificando para cada construção. Em seguida, foram inoculadas e crescidas em meio LB contendo ampicilina 100 µg/mL a 37° C até que atingissem a D.O. 600nm de 0,6. Logo após, adicionou-se IPTG 0,5 mM e manteve-se a cultura a 37° C por 5 horas. A suspensão de células foi centrifugada a 7700 x g por 10 minutos a 4° C. O precipitado de células resultante foi ressuspenso em tampão de lise (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) e sonicado (5 vezes, 20 segundos cada, com intervalos de 20 segundos em gelo). Seguiu-se uma nova centrifugação a 20.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, filtrado através de uma membrana de 0.45 µm (Millipore) e purificado em uma coluna de Níquel (Pro Bond – Invitrogen) pré-equilibrada com tampão de lavagem (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0). As proteínas foram eluídas em tampão de eluição (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 100

mM Imidazol, pH 8,0), dialisadas em tampão de diálise (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA e 0,5 mM DTT), dosadas e armazenadas a -70°C.

### 3.6 Dosagem de Proteínas.

A concentração das proteínas recombinantes foi determinada segundo o método de Bradford (BRADFORD, 1976), com reagente comercial (Bio-Rad Protein Assay). A curva padrão foi construída utilizando-se lisozima na concentração de 0,1 mg/mL.

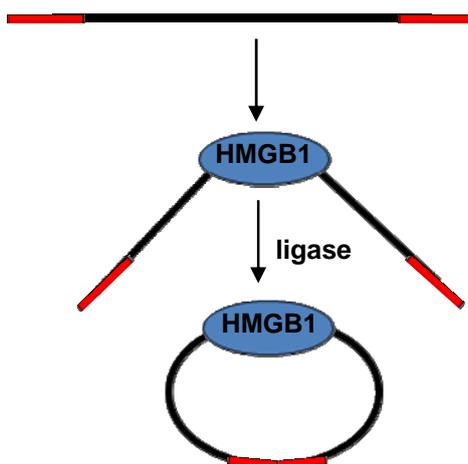
### 3.7 Marcação radioativa de sondas de DNA.

A partir de reações de PCR gerou-se um fragmento de 123 pb, contendo a seqüência 5' GATCCTCCAGTCAAAAGGTAACCAACGGAACGTCTGAGA ATGGAAACAGTTCCGACCAACCAGAAGAAAAAGCTGAAGATGATGTAAAGGAAA ATACGAATGGGAATTCATCGGTCGCATCGGGATC 3'. Esse fragmento continha extremidades coesivas com sítios de *Bam*HI.

Os produtos de PCR de 123 pb foi digerido com *Bam*HI (Promega) e tratado com fosfatase alcalina (New England Biolabs) segundo os manuais dos fabricantes. As marcações radioativas dos fragmentos de DNA foram realizadas utilizando-se a enzima T4 polinucleotídeo cinase (Promega) e 30 µCi de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-dATP (Perkim Elmer), segundo instruções do manual do fabricante.

### 3.8 Ensaio de Circularização de DNA mediado por T4 DNA Ligase.

O ensaio de circularização foi baseado em protocolos prévios de Štros, 1998 e 2001. O Fragmento de DNA de 123 pb (~1 nM) com extremidades coesivas (item 3.6) foram pré-incubados em gelo por 20 minutos com 100 e 150 nM das proteínas recombinantes em tampão de T4 ligase 1 X (30 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT e 0,5 mM ATP; Promega) em um volume final de 20 µl. O DNA foi incubado na presença de 0.6 U de T4 ligase (Promega) a 30°C por 20 minutos e a reação, encerrada, através da incubação das amostras a 65°C por 15 minutos (figura 18).



**Figura 18: Esquema resumido do ensaio de circularização de DNA mediado por T4 DNA ligase.**

Como controle, algumas das reações foram incubadas na presença de 50 U de exonuclease III (Promega), capaz de digerir DNA linear, a 37°C por 30 minutos. As reações foram terminadas com a adição de 460 µL de uma solução contendo 1% SDS e 1 M NaCl, 700 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) para extrair o DNA e eliminar as proteínas, seguida de uma centrifugação a 16.000 x g, 4°C por 10 minutos. Ao DNA obtido da fase aquosa adicionou-se 1 mL de Etanol 100% gelado. As amostras foram então deixadas a -20°C por 2 horas e centrifugadas por 30

minutos a 16.000 x g, 4°C. Ao precipitado obtido foi adicionado 1 mL de etanol 70%, centrifugado como acima, seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 15 µL TE (10 mM Tris-Cl pH 7,5, 1 mM EDTA). A amostra foi fracionada em gel de poliacrilamida não desnaturante a 6% (DNA 123 pb) em 0.5 X TBE a 200 V por 2–3 h a 4°C. Depois de fracionado, o gel foi desidratado e exposto a filmes de autoradiografia (Kodak, 18x24 cm) e este foi revelado em seguida.

### **3.9 Ensaio de Superenovelamento do DNA.**

O ensaio de superenovelamento de DNA (figura 19) requer, inicialmente, o isolamento da fração superenovelada de um plasmídeo através de um gradiente em CsCl (Molecular Cloning, 3ª edição, seção 1.155). O plasmídeo superenovelado (pTZ19R - Fermentas) foi incubado na presença de Topoisomerase I (Topo I) (Promega). Cada reação continha: tampão de reação (50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH7,5 e 1 mM EDTA), glicerol 80%, plasmídeo pTZ19R (0,5µg) e Topo I (1U) e um volume final de 3,54 µL foi obtido com adição de H<sub>2</sub>O MilliQ. Essa mistura foi deixada a 37°C por 90 minutos. Ao término da incubação, adicionou-se à mesma, uma nova alíquota de Topo I (1U), tampão de reação, 20 mM DTT, glicerol 80% e H<sub>2</sub>O Tipo I, obtendo um volume final de 8 µL. Essa mistura foi distribuída em diferentes tubos cônicos de 1,5 mL, exceto no tubo do controle de DNA superenovelado. Em seguida, as proteínas foram incluídas aos respectivos tubos, nas seguintes concentrações: AaHMGB1 e hHMGB1 (7,5 µM , 15 µM e 37,5 µM), AaHMGB1ΔC e AaHMGB1ΔQ (7,5 µM e 15 µM), em um volume final de 20 µL. Após a adição das proteínas, as amostras foram incubadas a 37°C por 60 minutos. As reações foram terminadas com a adição de 460 µL de uma solução contendo 1%

SDS e 1 M NaCl, 700  $\mu$ L de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e seguida de uma centrifugação a 16.000 x g a 4°C por 10 minutos. Ao DNA obtido da fase aquosa adicionou-se 1 mL de Etanol 100% gelado. As amostras foram então deixadas a -70°C por 30 minutos e centrifugadas por 30 minutos a 16.000 x g, 4°C. Ao precipitado obtido foi adicionado 1 mL de etanol 70%, centrifugado como acima, seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 25  $\mu$ L TE (10 mM TrisHCl pH 7,5, 1 mM EDTA). As reações foram então analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X (para 1L: 10,8 g de Tris, 11 g de Ácido Bórico e 4mL EDTA 0,5 M pH 8) por 17 h a 55 V. O gel foi então corado com Brometo de Etídio 0,4 mg/mL (GiboBRL) por 1 h, descorado com várias trocas de água e fotografado utilizando um transiluminador acoplado ao sistema ImaGo (L&B Systems).

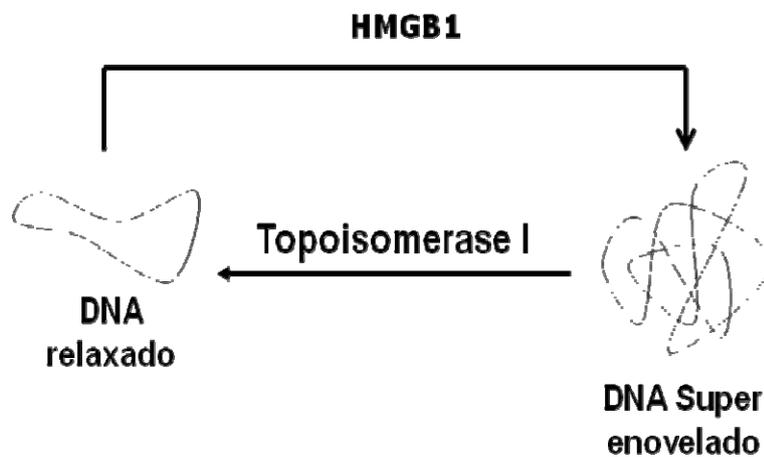


Figura 19: Esquema resumido do ensaio de superenovelamento de DNA.

### 3.10 Ensaio de Fosforilação.

A reação de fosforilação por CK2 das proteínas AaHMGB1 e SmHMGB1 recombinantes foram realizadas em tampão de reação contendo 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 μCi [<sup>32</sup>P]ATP (PerkinElmer) e 0,1 mM ATP em um volume final de 10 μL. As reações foram iniciadas com a adição de 1 U de CK2 (Promega). Enquanto a reação de fosforilação por PKC das proteínas AaHMGB1 e SmHMGB1 foram realizadas em tampão de reação contendo 30 mM Tris-HCl pH 7,6, 2 mM DTT, 6 mM de Acetato de Magnésio, 0,4 mM de CaCl<sub>2</sub>. Foi acrescentado também a esta reação 120 μM de ATP, 1 μCi [<sup>32</sup>P]ATP (PerkinElmer), 100 ng/μL de fosfatidilserina, 20 ng/μL diacilglicerol e 35 ng PKC (Calbiochem), em um volume final de 30 μL. Foram utilizados em ambas as reações 1 μg de cada proteína recombinante, incubando-as a 37°C na reação por CK2 e 20°C na reação por PKC por 1 hora nos dois experimentos. As reações foram encerradas com a adição de tampão de amostra de SDS-PAGE (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10 % glicerol e 100 mM de β-mercaptoetanol ou DTT). As reações foram então fervidas por 5 minutos e resolvidas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12-15%. Após o término da corrida, o gel foi corado com Coomassie Blue R-250 (0,25% em 45% álcool metílico e 10% ácido acético), descorado em solução descorante (50% álcool metílico, 10% ácido acético), desidratado e exposto a filmes de autoradiografia (Kodak, 18x24 cm) e revelado em seguida.

### 3.11 Análise Estatística.

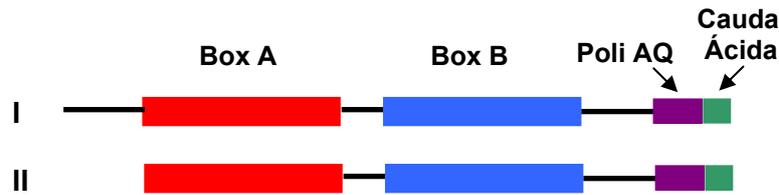
Os dados gerados foram expressos pela média de cada experimento. Os resultados estatisticamente significativos foram avaliados por ANOVA Tukey com o intervalo de confiança de 95%, nos ensaios de análise do nível de mRNA no ciclo de vida do *A. aegypti* (figura 25), em quintuplicata. Nas análises dos níveis de mRNA em fêmeas não alimentadas ou alimentadas com sangue (figura 26) foram feitas em sextuplicata por ANOVA Bonferroni com o intervalo de confiança de 95% e a análise dos níveis de mRNA em tecidos de fêmeas não alimentadas ou alimentadas com sangue (figura 27), foram feitas em quadruplicata por Variância com o intervalo de confiança de 99%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 HMGB1 de *Aedes aegypti*.

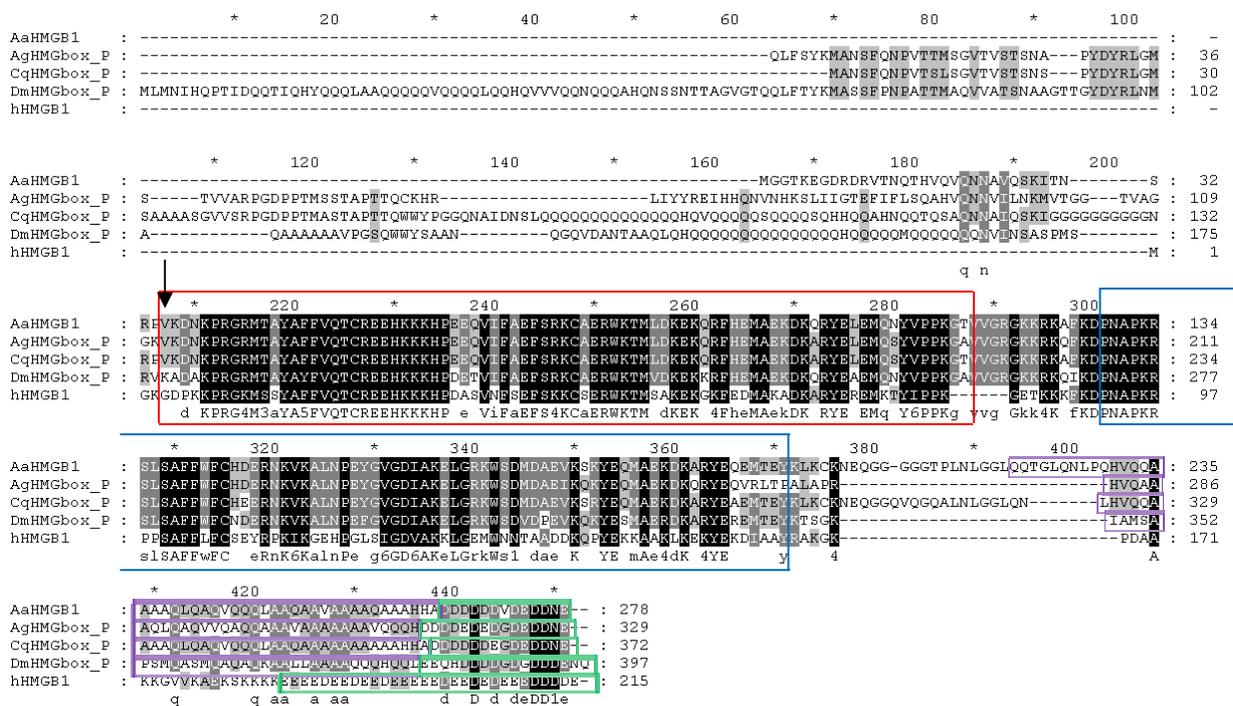
Inicialmente, não conseguimos amplificar nenhum produto utilizando os pares de iniciadores que compreendiam desde o códon de iniciação até o códon de terminação. Em função dos diversos erros de sequência já verificados no genoma do *A. aegypti* por outros grupos, principalmente na região 5' dos cDNAs depositados, fez-nos pensar que poderia ser, de fato, um erro na sequência 5' do gene. Sintetizamos dois outros oligonucleotídeos iniciadores, nos baseando em sequências mais internas ao códon putativo ATG descrito. Apenas o iniciador que alinhava mais internamente a sequência 5' do gene foi capaz de gerar um produto específico e com o tamanho esperado. Esse produto foi clonado, sequenciado e confirmamos que o cDNA referente a AaHMGB1 que tínhamos se iniciava no nucleotídeo de número 103, baseado na sequência depositada no banco de dados. Dessa forma, ainda não podemos afirmar se a sequência 5' do gene de AaHMGB1 depositada no VectorBase está errada e/ou se o 5' desse gene é longo, como descrito para outros dípteros. Essas questões serão brevemente respondidas utilizando o kit 5'-RACE (Clontech).

Nesse sentido, o cDNA referente a HMGB1 de *Aedes aegypti* que utilizamos neste trabalho não contém a região N-terminal com metionina inicial (figura 20-II). A proteína recombinante que produzimos e que utilizamos nos ensaios biológicos se inicia no resíduo de valina 35.



**Figura 20: Esquema ilustrativo da proteína HMGB1 de *A. aegypti* (AaHMGB1).** I corresponde a proteína produzida a partir da sequência obtida no Vector Base (número de acesso AAEL011380). II representa a proteína recombinante produzida neste trabalho (ausência da região N-terminal).

O alinhamento de aminoácidos da AaHMGB1 com proteínas HMG boxes descritas em outros dípteros e HMGB1 humana (hHMGB1) está mostrado na figura 21.



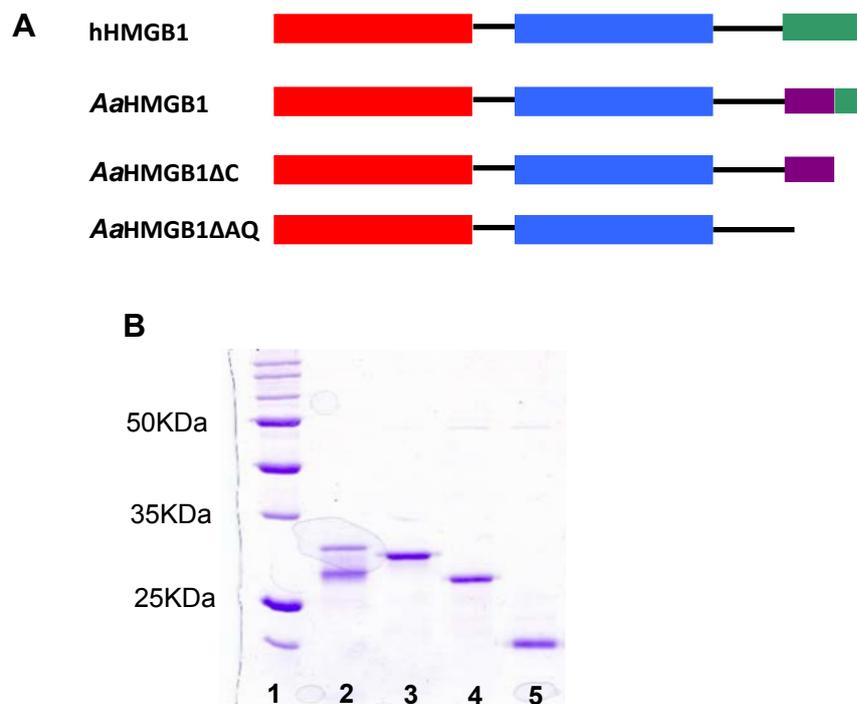
**Figura 21: Alinhamento das sequências de aminoácidos de AaHMGB1 com proteínas HMG boxes de outros dípteros e HMGB1 de humano (hHMGB1).** A seta indica o início da proteína recombinante (valina 35) que utilizamos neste trabalho. Os aminoácidos idênticos estão marcados em preto. O HMG Box A e HMG Box B estão marcados em vermelho e azul, respectivamente. As regiões ricas em alanina e glutamina estão em roxo. A cauda ácida está marcada em verde. AaHMGB1 (*Aedes aegypti*, número de acesso EAT36545), AgHMGB1\_Ptn (*Anopheles gambiae*, número de acesso XP\_311155.3), CqHMGB1\_Ptn (*Culex quinquefasciatus*, número de acesso XP\_001864141.1), DmHMGB1\_Ptn (*Drosophila melanogaster*, número de acesso NP\_001138203.1), hHMGB1 (humano, número de acesso EAX08458.1).

Os alinhamentos mostram claramente o alto nível de conservação entre os HMG boxes das proteínas descritas, com cerca de 80% e 70% de similaridade nos HMG boxes A e B, respectivamente. Curiosamente, as proteínas HMG boxes de dípteros, incluindo a *AaHMGB1*, apresentam uma extensão na região N-terminal não presente em HMGB1 de mamíferos. Além disso, essas proteínas de dípteros contêm uma cauda ácida curta com cerca de 11-13 resíduos de aminoácidos ácidos, principalmente ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E). A *AaHMGB1* contém 11 resíduos comparada a proteína de mamífero, que possui uma sequência intermitente de resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico. Outra peculiaridade das HMG boxes de dípteros e a *AaHMGB1* é a presença de uma região rica em resíduos de alanina (A) e glutamina (Q). Essa região parece também ser exclusiva destas proteínas em insetos.

#### **4.2 Produções das Proteínas Recombinantes**

Proteínas recombinantes contendo caudas com 6 histidinas foram geradas (Figura 22). Três construções de HMGB1 de *A. aegypti* foram geradas para este estudo: uma construção que se inicia no resíduo de valina 35, que representa o aminoácido referente ao primeiro códon que conseguimos amplificar (considerando o problema em amplificar o cDNA contendo o códon de iniciação depositado no banco de dados). No momento, definimos essa construção como a proteína inteira (*AaHMGB1*). Uma segunda construção foi gerada e constitui a proteína deletada da região rica em alanina e glutamina e da cauda ácida, que foi denominada de *AaHMGB1ΔAQ*. A terceira construção representa a proteína deletada da cauda ácida, que denominamos de *AaHMGB1ΔC*. A proteína recombinante referente a

HMGB1 humana completa foi expressa para efeito de comparações, já que as atividades e funções da hHMGB1 já estão bem estabelecidas na literatura (HOCK, e cols., 2006; AGRESTI & BIANCHI, 2003). Neste trabalho, esta proteína foi usada como ferramenta para comparação de sua atividade com a das proteínas caracterizadas neste trabalho. É importante ressaltar no entanto que sua estrutura polipeptídica se difere de maneira importante das HMGB1 de dípteros, com a ausência da região rica em A e Q, e apresentando uma cauda ácida significativamente mais longa.



**Figura 22: (A) Esquema das proteínas recombinantes:** O retângulo branco representa o Box A, o preto Box B e o cinza a cauda ácida C-terminal. **(B)** 1  $\mu$ g das proteínas recombinantes: SDS-PAGE 12%: canaleta 1: padrão de massa molecular; canaleta 2: hHMGB1 (30 kDa); canaleta 3: AaHMGB1 (27 kDa); canaleta 4: AaHMGB1ΔC (26 kDa); canaleta 5: AaHMGB1ΔAQ (19 kDa).

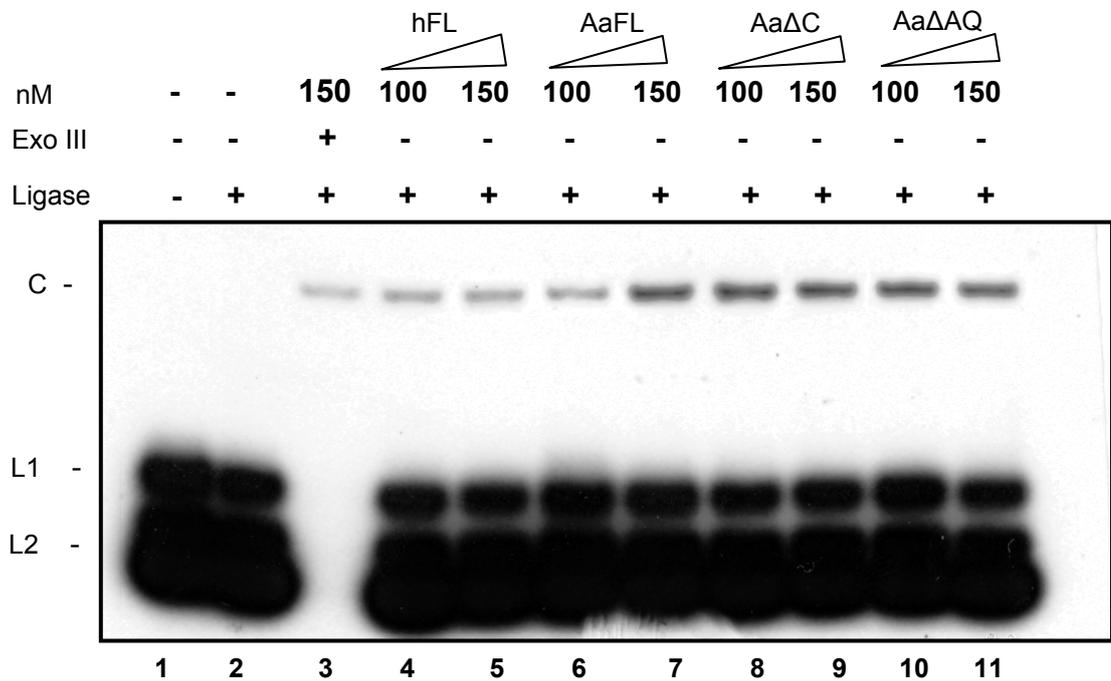
É importante mencionar que os ensaios biológicos foram realizados com concentrações de proteínas que variaram de 100 nM a 37,5  $\mu$ M. As duas bandas majoritárias presentes nas amostras de hHMGB1 representam produtos de proteólise intracelular, já bem caracterizada na literatura, onde a banda de menor massa molecular representa a proteína na ausência da cauda ácida.

### 4.3 Ensaio de circularização de DNA

Proteínas HMGB1 têm alta afinidade por moléculas de ácidos nucléicos, reconhecendo e/ou promovendo torções, dobras, enovelamentos em DNA e/ou RNA. Nesse contexto, a caracterização de proteínas HMGB1 canônicas passa pela capacidade dessas moléculas de promoverem dobras e superenovelamento no DNA. Assim, o ensaio de circularização de DNA mediado pela DNA T4 ligase representa uma abordagem importante para a caracterização de proteínas HMGB1. Resumidamente, o ensaio de circularização baseia-se na capacidade da AaHMGB1 em promover a dobra de fragmentos lineares de DNA, favorecendo o alinhamento e ligação intramolecular de suas extremidades coesivas mediante a ação de T4 ligase. A circularização de DNA decorrente de ligações intramoleculares pode ser comprovada através da sua resistência à enzima exonuclease III, capaz de digerir apenas moléculas de DNA lineares.

Na figura 23 mostramos que AaHMGB1 foi capaz de promover a dobra e circularização de moléculas de DNA contendo 123 bp (canaletas 6 e 7). Como a HMGB1 de *Aedes aegypti* apresenta uma região contendo segmentos de alanina e glutamina, assim como a ausência de uma cauda ácida longa, duas características que a diferem da hHMGB1, testamos a atividade de dobra de DNA

utilizando essas duas construções. Utilizando a construção *AaHMGB1ΔAQ*, podemos sugerir que a presença da região rica em alanina e glutamina não parecer ter um papel importante na atividade de dobra do DNA comparada a construção *AaHMGB1ΔC* (figura 23, compare as canaletas 10 e 11 com as canaletas 8 e 9). Entretanto, utilizando a construção *AaHMGB1ΔC*, deletada dos 11 resíduos ácidos, pudemos observar um significativo aumento na atividade de dobra de DNA em relação a proteína inteira, principalmente em menores concentrações (figura 23, compare as canaletas 8 e 9 com as canaletas 6 e 7). A presença de DNAs circulares pôde ser comprovada pela ação da enzima Exo III, capaz de digerir apenas o DNA linear (canaleta 3). Utilizamos a hHMGB1 como o controle positivo de atividade de dobra de DNA.



**Figura 23: Resultado do Ensaio de Circularização de DNA mediado por T4 DNA ligase.**

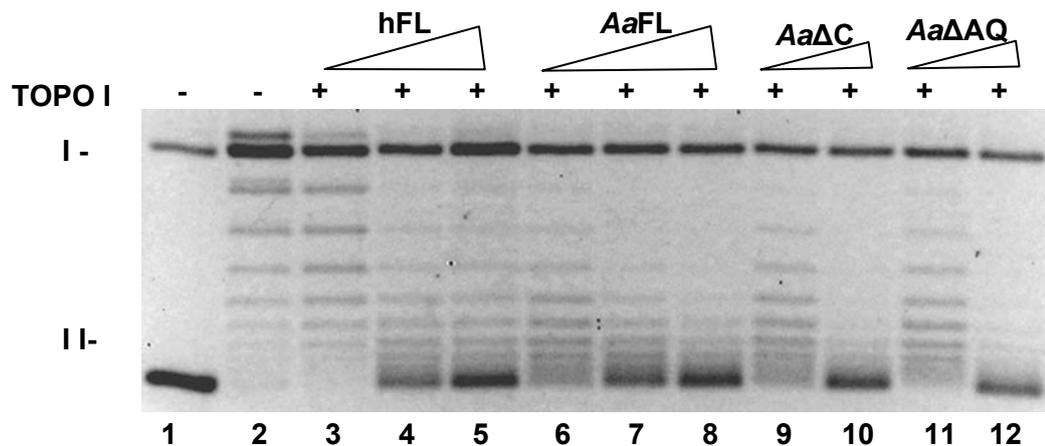
A sonda radioativa do DNA linear de 123 pb foi incubada com concentrações crescentes de proteína recombinante (como indicado na figura) e em seguida incubadas com T4 DNA ligase. As canaletas 1 e 2 são os controles negativos de circularização e a canaleta 3 corresponde ao controle positivo do DNA circular obtido através da incubação na presença de 150 nM da AaHMGB1 submetida, posteriormente, à exonuclease III. A abreviação “C” corresponde ao DNA circularizado, “L1” e “L2” indicam, respectivamente, os fragmentos de DNA linear e sonda livre. Os sinais “+” e “-” correspondem, respectivamente, a adição ou não de T4 DNA ligase ou exonuclease III. hFL representa a proteína inteira hHMGB1, AaFL corresponde a proteína inteira AaHMGB1, AaΔC corresponde a proteína AaHMGB1ΔC e AaΔAQ representa a proteína AaHMGB1ΔAQ.

#### 4.4 Ensaio de superenovelamento de DNA.

A capacidade de superenovelar moléculas de DNA também é uma característica de proteínas HMGBs. Assim como nos ensaios de circularização de DNA, utilizamos a hHMGB1 como controle positivo e as três construções da HMGB1 de *A. aegypti*.

O ensaio constitui-se basicamente de duas etapas. Na primeira etapa, um plasmídeo superenovelado purificado é colocado na presença de Topoisomerase I (Topo I), uma proteína capaz de desfazer as torções do plasmídeo, tornando-o relaxado. Na segunda etapa do experimento, o plasmídeo relaxado é colocado na presença das proteínas recombinantes, das quais deseja-se avaliar a atividade, ainda na presença de Topo I, de forma que a proteína recombinante e a Topo I irão atuar sobre o DNA, a primeira superenovelando e a segunda relaxando. Ao final do ensaio o que se obtém são formas intermediárias de superenovelamento do DNA, que quando separadas em um gel de agarose corado com brometo de etídio, apresentam um padrão de bandeamento sequencial, caracterizando a promoção do superenovelamento pela proteína estudada.

O padrão de DNA superenovelado pode ser demonstrado na figura 24, canaleta 1 e o perfil de DNA relaxado na canaleta 2. Os dados contidos na figura 24 mostram que todas as proteínas recombinantes foram capazes de superenovelar o DNA plasmidial. A AaHMGB1 foi capaz de superenovelar o DNA de forma mais eficiente do que a hHMGB1 (figura 24, compare as canaletas 3, 4 e 5 com as canaletas 6, 7 e 8). As construções AaHMGB1 $\Delta$ C e AaHMGB1 $\Delta$ AQ mostraram-se mais eficientes em promover o superenovelamento do DNA do que a AaHMGB1 e hHMGB1 (figura 24, compare as canaletas 3, 4 (hHMGB1), 6, 7 (AaHMGB1) com as canaletas 9, 10 (Aa $\Delta$ C), 11 e 12 (Aa $\Delta$ AQ).



**Figura 24: Resultado do Ensaio de Superrenovelamento de DNA**

Gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio e fotografado com o sistema de registro de imagem ImaGo (B&LSystems). Canaleta 1. 0,5 $\mu$ g Plasmídeo pTZ19R superrenovelado; canaleta 2. 0,5 $\mu$ g Plasmídeo pTZ19R na forma relaxada; canaletas 3, 4 e 5: hHMGB1 (7,5  $\mu$ M, 15 $\mu$ M e 37,5  $\mu$ M); canaletas 6, 7 e 8: AaHMGB1 (7,5  $\mu$ M, 15 $\mu$ M e 37,5  $\mu$ M); canaletas 9 e 10: AaHMGB1 $\Delta$ C (7,5  $\mu$ M e 15 $\mu$ M); canaletas 11 e 12: AaHMGB1 $\Delta$ AQ (7,5  $\mu$ M e 15 $\mu$ M). As letras I e II indicam, respectivamente, as formas relaxadas e superrenoveladas do DNA plasmidial. hFL representa a proteína inteira hHMGB1, AaFL corresponde a proteína inteira AaHMGB1, Aa $\Delta$ C refere-se a proteína AaHMGB1 $\Delta$ C e Aa $\Delta$ AQ representa a proteína AaHMGB1 $\Delta$ AQ.

#### 4.5 Fosforilação da AaHMGB1

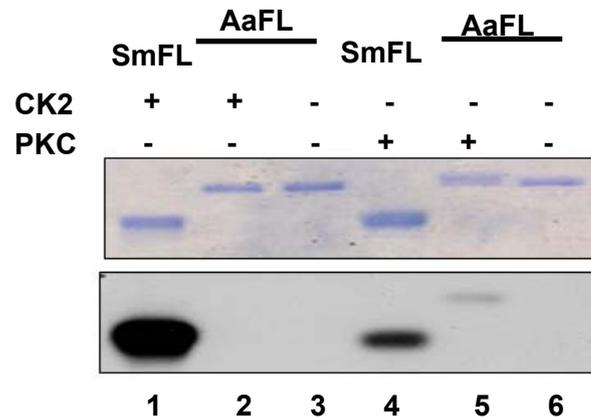
A fosforilação é de grande importância na regulação da função de inúmeras proteínas nucleares. Nesse contexto, decidimos avaliar se a AaHMGB1 poderia ser substrato para proteínas cinases. Nós utilizamos de ferramentas básicas de bioinformática para identificar sítios putativos de fosforilação na AaHMGB1. A sequência primária da AaHMGB1 foi analisada no programa NetPhos 1.0 (disponível em: <<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>>). A tabela 3 mostra que a AaHMGB1 apresentou diversos sítios putativos para duas cinases principais; proteína cinase C (PKC) e caseína cinase 2 (CK2). Pudemos observar ainda que um dos sítios putativos mais abundantes presentes na AaHMGB1 era para PKC, além de alguns trabalhos anteriormente descritos com essa enzima.

**Tabela 3. Análise da AaHMGB1 no programa NetPhosK 1.0 Server. Em negrito estão destacadas os sites putativos para a proteína cinase CK2 e a proteína cinase C (PKC).**

| Site         | Kinase      | Score       |
|--------------|-------------|-------------|
| <b>T-16</b>  | <b>PKC</b>  | <b>0.65</b> |
| <b>S-27</b>  | <b>PKC</b>  | <b>0.76</b> |
| <b>S-32</b>  | <b>PKC</b>  | <b>0.52</b> |
| T45          | PKG         | 0.61        |
| <b>T-53</b>  | <b>CKII</b> | <b>0.56</b> |
| <b>T-53</b>  | <b>PKC</b>  | <b>0.72</b> |
| T-82         | RSK         | 0.52        |
| <b>T-115</b> | <b>PKC</b>  | <b>0.54</b> |
| S-135        | PKA         | 0.74        |
| S-135        | PKG         | 0.63        |
| S-137        | RSK         | 0.53        |
| S-137        | PKA         | 0.72        |
| S-137        | PKG         | 0.62        |
| Y-157        | SRC         | 0.54        |
| S-171        | RSK         | 0.53        |
| S-171        | PKA         | 0.68        |
| <b>S-179</b> | <b>CKII</b> | <b>0.57</b> |
| Y-181        | EGFR        | 0.58        |
| T-223        | Cdc2        | 0.52        |

No sentido de confirmarmos as predições do programa, realizamos ensaios de fosforilação *in vitro*, utilizando a proteína recombinante AaHMGB1 como substrato para PKC e CK2. A figura 25 mostra os ensaios de fosforilação. Apesar da predição *in silico*, observamos que a AaHMGB1 foi fosforilada por PKC (canaleta 5), mas não por CK2 (canaleta 2). Para comprovarmos que a falta de fosforilação de AaHMGB1 por CK2 não era em função da falta de atividade da enzima CK2, utilizamos a HMGB1 de *Schistosoma mansoni* (SmHMGB1 foi previamente caracterizada, De Oliveira, 2006) como um controle positivo tanto para CK2 como para PKC. As canaletas 3 e 6 da figura 25 mostra claramente que a SmHMGB1 foi

altamente fosforilada por ambas as enzimas. Esse resultado confirma que AaHMGB1 é substrato para a enzima PKC, mas não CK2.



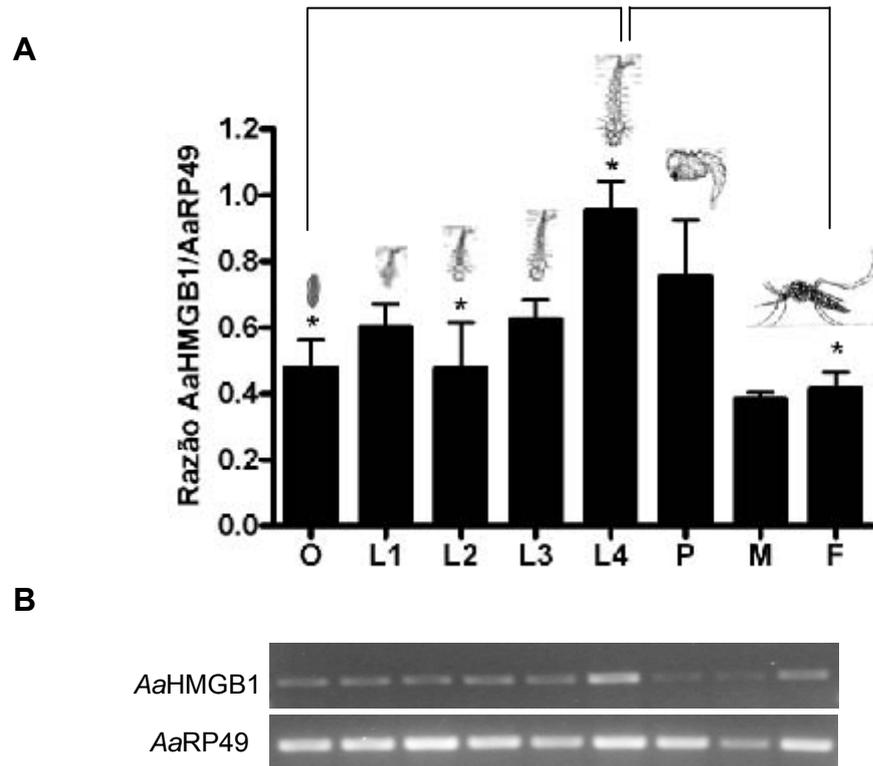
**Figura 25. Fosforilação da AaHMGB1**

As canaletas 1 e 4 contêm 1 µg da *SmHMGB1*, as canaletas 2, 3, 5 e 6 contêm 1 µg da proteína *AaHMGB1*. Painel superior: SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue; painel inferior: autoradiografia.

#### 4.6 Análise da expressão de AaHMGB1

A análise da expressão do mRNA de AaHMGB1 foi avaliada através da técnica de RT-PCR, sob três diferentes condições. Numa primeira fase, verificamos a expressão de AaHMGB1 ao longo do ciclo de vida do mosquito. Numa segunda fase, verificamos a influência dos hábitos alimentares na expressão do mRNA de AaHMGB1, utilizando tanto mosquito inteiro como diversos tecidos isolados.

De acordo com a figura 26, podemos sugerir que AaHMGB1 está expressa em todos os estágios de desenvolvimento do *A. aegypti*, revelando uma maior expressão no quarto estágio larvar.



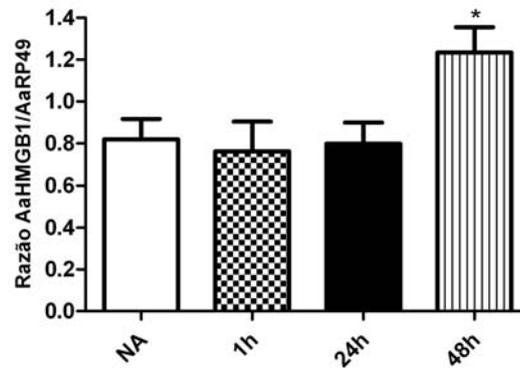
**Figura 26: Resultado da expressão de AaHMGB1 ao longo do ciclo de vida do *A. aegypti*.**

O RNA total de cada estágio do *A. aegypti* foi extraído e o cDNA sintetizado e utilizado em reações de RT-PCR. (A) Cada barra corresponde a densitometria média de cinco experimentos normalizada pelo gene constitutivo RP49. (B) Gel de agarose 1,5% demonstrativo de três experimentos, no qual foram realizadas as densitometrias. \* $p < 0,05$

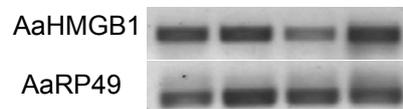
Considerando que fêmeas de *A. aegypti* são hematófagas e que este hábito alimentar desencadeia uma série de modificações fisiológicas no mosquito, decidimos avaliar a influência da ingestão de sangue na expressão do mRNA de AaHMGB1.

A figura 27 mostra que não existiram diferenças entre fêmeas não alimentadas (controle - NA) e fêmeas alimentadas com sangue, cujo RNA foi extraído 1 hora (1h) e 24 horas (24h) após a alimentação. No entanto, pudemos observar uma diferença significativa do controle, 1h e 24h em relação às fêmeas alimentadas com sangue e cujo RNA foi extraído após 48h (figura 27, compare NA, 1h e 24h com 48h).

A



B

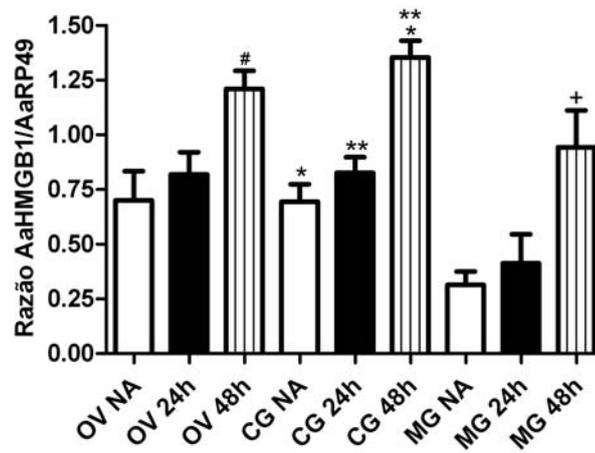


**Figura 27: Resultado da expressão de AaHMGB1 em fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue e não alimentadas com sangue.**

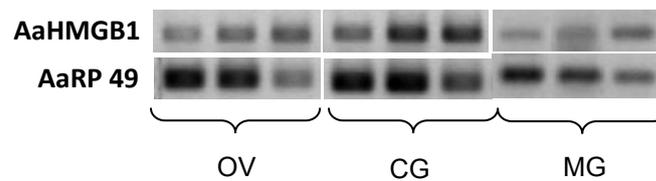
O RNA total foi extraído, o cDNA de mosquitos fêmeas inteiro foi sintetizado e utilizado em reações de RT-PCR. (A) Cada barra corresponde a densitometria média de seis experimentos independentes, normalizadas pelo seu gene constitutivo, RP49. (B) Gel de agarose 1,5% demonstrativo de seis experimentos independentes, nos quais foram realizadas as densitometrias. NA: fêmeas não alimentadas, 1h: RNA extraído 1 hora após a alimentação das fêmeas, 24h: RNA extraído 24 horas após a alimentação das fêmeas e 48h: RNA extraído 48 horas após a alimentação das fêmeas. \*  $p < 0.05$ ;

A figura 28 mostra a expressão do mRNA de AaHMGB1 em diferentes tecidos analisados de fêmeas não alimentadas ou alimentadas com sangue, nos períodos de 24 e 48hs após a alimentação. Com esses ensaios, pudemos constatar que a expressão do mRNA de AaHMGB1 é significativamente aumentada em todos os tecidos testados, no período de 48hs após a alimentação, mas não no período de 24hs.

A



B



**Figura 28: Resultado da expressão de AaHMGB1 de tecidos de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue e não alimentadas com sangue.**

O RNA total foi extraído, o cDNA foi sintetizado e utilizado em reações de RT-PCR. (A) Cada barra corresponde a densitometria média de quatro experimentos independentes, normalizadas pelo seu gene constitutivo, RP49. (B) Gel de agarose 1,5% demonstrativo de quatro experimentos independentes, nos quais foram realizadas as densitometrias. O gel superior representa o gene AaHMGB1 e o gel inferior o gene constitutivo RP49. OV: ovário; CG: corpo gorduroso; MG: intestino médio; NA: fêmeas não alimentadas; 24h: RNA extraído 24 horas após a alimentação das fêmeas e 48h: RNA extraído 48 horas após a alimentação das fêmeas. \*, \*\*  $p < 0.01$  e #, +  $p < 0.05$ .

## 5. DISCUSSÃO

A proteína HMGB1 de humano já está muito bem caracterizada, tanto estruturalmente quanto funcionalmente (THOMAS & TRAVERS, 2001). Apesar de proteínas HMGBs já terem sido descritas em alguns insetos, a importância dessas proteínas na biologia desses organismos ainda não está bem estabelecida (NER e cols., 1993; WAGNER e cols., 1992). Além disso, nenhuma HMGB1 foi até o momento caracterizada em insetos vetores. A identificação, clonagem e caracterização da HMGB1 de *Aedes aegypti* pode representar o início do entendimento da função desta proteína na fisiologia do mosquito.

Proteínas HMGB1 já foram descritas em células eucarióticas, incluindo animais, vegetais e fungos. Protozoários como o *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* entre outros também apresentam ortólogos desta proteína.

Como nenhuma informação sobre proteínas HMG em mosquito estava disponível, fizemos uso do Vector base, banco de dados do *A. aegypti*, no intuito de identificar a HMGB1 do mosquito e avaliar o seu grau de homologia.

A busca no banco de dados revelou a presença de duas formas de HMG no mosquito, uma homóloga a HMGB1 de mamíferos e a outra homóloga a HMGD de *Drosophila*. No presente trabalho descreveremos apenas a caracterização da HMGB1 de *Aedes*.

A análise *in silico* da sequência de HMGB1 depositada no banco de dados continha o cDNA completo, que incluía o códon de iniciação ATG, codificando para a metionina inicial, assim como o códon de terminação TGA. Entretanto, após inúmeras tentativas de amplificar por PCR a região 5' inicial

do cDNA, concluímos que a sequência depositada não corresponde à sequência correta do mRNA de *Aedes*. A confirmação da sequência contendo o códon inicial do mRNA da HMGB1 de *Aedes* será realizada com ensaios de 5' RACE. Apesar da ausência da sequência inicial do gene, pudemos iniciar os nossos estudos considerando que os domínios funcionais da proteína estavam presentes.

Constatamos que a HMGB1 de *Aedes aegypti* contém os dois domínios de ligação ao DNA conservados. A cauda ácida característica desse grupo de proteínas está presente na HMGB1 de *Aedes*. Entretanto, quando comparada à HMGB1 humana (hHMGB1), essa cauda ácida se apresenta bem mais curta, com apenas 11 resíduos ácidos (a hHMGB1 contém 30). Esse dado não é surpreendente, visto que outras proteínas HMG de insetos também apresentam caudas ácidas curtas. Além disso, proteínas HMGB1 de outros organismos, como helmintos, por exemplo, também apresentam caudas ácidas curtas (DE OLIVEIRA e cols., 2006), o que sugere que a aquisição de uma cauda ácida longa seja um evento evolutivo mais recente.

Sabe-se que a cauda ácida C-terminal da hHMGB1 tem importante influência na regulação da interação dos HMG boxes com o DNA alvo. A afinidade da hHMGB1 sem a cauda ácida ao DNA aumenta 4 vezes em relação a hHMGB1 selvagem. Este aumento de afinidade reflete no aumento da atividade desta proteína em superrenovar um DNA plasmidial (STROS e cols., 1994).

Neste trabalho, verificamos que a AaHMGB1 na ausência da sua curta cauda ácida também se mostrou mais ativa do que a proteína na presença dos 11 resíduos ácidos. Entretanto, até o momento não podemos sugerir qualquer

contribuição da região rica em alanina e glutamina na interação com o DNA. Curiosamente essa região está presente somente em proteínas de inseto, o que pode sugerir um papel específico desta região na biologia desses organismos.

Verificamos que AaHMGB1 foi capaz de promover a circularização de fragmentos de DNA lineares. Nesses ensaios, também concluímos que a ausência da cauda ácida aumentou a capacidade de dobrar o DNA. Novamente, a proteína na ausência da região rica em alanina e glutamina não revelou diferenças significativas. Esses dados sugerem que a AaHMGB1 pode estar participando de processos importantes como transcrição, recombinação e reparo de DNA, já que essas atividades são requeridas durante esses processos celulares.

A fosforilação tem influências importantes na mediação da interação da hHMGB1 ao DNA (PELOVSKY e cols., 2009; WISNIEWSKI e cols., 1999). Esses dados nos motivaram a verificar se a AaHMGB1 era substrato para cinases que atuam regulando eventos nucleares, como é o caso da PKC e CK2. Neste trabalho mostramos que a AaHMGB1 é substrato apenas para PKC. Comparando com a fosforilação da HMGB1 de *S. mansoni*, pudemos verificar que o nível de fosforilação da AaHMGB1 é significativamente mais baixo. Esse dado será avaliado com maior detalhe futuramente, mas podemos imaginar que a presença da região rica em alanina e glutamina presente adjacente à cauda ácida da proteína, poderia estar contribuindo com um impedimento estérico, inibindo parcialmente a ação da PKC. Essa hipótese será facilmente testada em ensaios de fosforilação *in vitro* utilizando a construção AaHMGB1 $\Delta$ AQ.

Proteínas HMGB1 estão envolvidas no controle de desenvolvimento e diferenciação (AGRESTI & BIANCHI, 2003). O *A. aegypti* é um inseto holometábolo, apresentando formas morfológicas bastante diferenciadas quando se comparadas a forma imatura com o organismo adulto.

A HMGB1 é uma das proteínas mais abundantes em células eucarióticas e está envolvida com processos celulares básicos como manutenção da estrutura da cromatina, transcrição e reparo de DNA. Essas características têm definido a HMGB1 como uma proteína de expressão constitutiva. Entretanto, em alguns estágios de desenvolvimento, como na embriogênese de mamíferos e de *Drosophila* e em alguns tipos celulares, como nos neurônios, a HMGB1 tem a sua expressão altamente regulada. Além disso, foi também observado que modificações na expressão de HMGB1 de *Drosophila* inviabilizam a eclosão dos adultos pela má formação das pupas (CHEN e cols., 2008). Nesse sentido, considerando que nada se sabe sobre o papel da HMGB1 em *A. aegypti*, resolvemos avaliar os níveis de mRNA da AaHMGB1 ao longo do ciclo de vida do mosquito. Os dados obtidos utilizando o RT-PCR revelam um aumento significativo de expressão de AaHMGB1 no quarto estágio larvar do mosquito. Apesar deste ser um dado de difícil interpretação, o resultado mostrou-se consistente, repetindo-se em três experimentos com amostras independentes. Por outro lado, preferimos ser cautelosos nas sugestões, e pretendemos confirmar estes dados através de PCR em tempo real.

A influência da hematofagia das fêmeas de *A. aegypti*, modificando a atividade transcricional nos tecidos e proporcionando alterações fisiológicas, vem sendo descrito na literatura (ATTARDO e cols., 2005; ABRAHAM & JACOBS-LORENA, 2004; RAIKHEL, 1992). Por isso iniciou-se a avaliação da

influência da alimentação por sangue na expressão de mRNA de AaHMGB1. Acredita-se que o aumento da expressão ao longo da alimentação (48h após a alimentação), nos tecidos (ovário, corpo gorduroso e intestino médio) está relacionado ao papel transcricional desempenhado pela HMGB1. Nos tecidos avaliados o sangue estimula a síntese e o transporte de lipídios e proteínas além da síntese da MP no intestino médio (SANDERS e cols., 2003), a síntese de proteínas e fatores transcricionais no corpo gorduroso (NIU & FALLON, 2000) e a formação do ovo (ovário), dependente de vários produtos produzidos nos tecidos mencionados anteriormente (ATTARDO e cols., 2005).

Vários mecanismos moleculares têm sido descritos para a participação da hHMGB1 no processo de transcrição gênica. Entretanto, a participação da hHMGB1 na regulação de genes responsivos a hormônios esteróides tem despertado muita atenção.

Hormônios esteróides participam de praticamente todos os processos metabólicos celulares e atividade desses hormônios é mediada obrigatoriamente por receptores nucleares. O mecanismo molecular de ação dos hormônios esteróides se baseia na ligação do hormônio aos receptores, que podem agir como homo ou heterodímeros. Uma vez dimerizado, os receptores se ligam a sequências específicas no DNA, denominadas de elementos responsivos ao hormônio (ou em inglês, *hormone responsive element*, ou *HRE*). Uma vez ligado ao DNA, os receptores recrutam co-ativadores com atividade de modificação de histonas, como acetilação e metilação destas proteínas, desempacotando o nucleossoma e finalmente sinalizando para a chegada da maquinaria basal de transcrição.

Inicialmente, a interação dos receptores ao DNA é de baixa afinidade, apesar de específica, tendo numa segunda fase, um aumento na afinidade de cerca de 100 vezes. Esse aumento da afinidade dos receptores é mediado através do reconhecimento de proteínas HMGB1 ao DNA alvo, em função de uma pequena dobra gerada no momento da ligação dos receptores de esteróides (VERRIJDT e cols., 2002; BOONYARATANAKORNKIT e cols., 1998; OÑATE e cols., 1994). Esse mecanismo de ação da hHMGB1 na regulação de genes que respondem a hormônios esteróides nos fez refletir sobre um possível papel da AaHMGB1 na regulação de genes de vitelogênese em *A. aegypti*.

A ecdisona é um esteróide presente em todos os insetos, onde 20 hidroxiecdisona (20E) é a sua forma ativa. A participação de 20E na regulação da vitelogênese em *A. aegypti* tem sido demonstrada de forma contundente (TUFAIL & TAKEDA, 2008; ATTARDO e cols., 2005; RAIKHEL e cols., 2002).

Cruz e colaboradores demonstraram que o pico de expressão dos receptores de ecdisona (REc-USP), assim como a expressão dos genes E74 e E75, são atingidos em 24h (CRUZ e cols., 2009). Esse aumento está relacionado ao pico de 20E é também responsável pelo aumento de expressão de vitelogenina (Vg), que é máxima em 24h (RAKHEL e cols., 2002). Apesar do pico na expressão de mRNA de AaHMGB1 não ter sido observado em 24h após a alimentação com sangue, o aumento significativo dessa expressão verificado ao longo do tempo (48h após a alimentação) no corpo gorduroso, já que é neste tecido que ocorre a síntese Vg, que é dependente de 20E (ATTARDO, 2005), corrobora com o papel da HMGB1 desempenha como chaperona numa possível relação com o complexo REc-USP, podendo

aumentar a sua atividade transcricional. Algumas proteínas importantes para a fisiologia do mosquito podem ser sintetizadas e permanecer na hemolinfa por longos períodos (KOKOZA e cols., 2000) o que ratifica esse aumento no transcrito de *AaHMGB1* em 48h.

Considerando a característica multifuncional da *hHMGB1*, que atua tanto intracelularmente no metabolismo de DNA e extracelularmente como uma citocina pró-inflamatória, permitimos-nos fazer, nos próximos parágrafos, algumas especulações acerca de outros possíveis papéis da *AaHMGB1* no mosquito, além da já descrita hipótese de sua participação na regulação da vitelogênese.

A *hHMGB1* tem um papel importante no reparo de DNA. Um DNA danificado por cisplatina é avidamente reconhecido por *hHMGB1*, e esse reconhecimento está relacionado com a resistência de células tumorais a quimioterápicos que interagem com o DNA (LANGE e cols., 2008). Assim como a cisplatina, existem pesticidas como o Tiurano, que interagem com o DNA causando quebras e outros danos. De acordo com dados da literatura, este pesticida induz à síntese de *SSL2*, *PHR1*, *MAG1* e *MGT1*, que são proteínas envolvidas no reparo do DNA por excisão de nucleotídeo e remoção de grupos metil (KITAGAWA e cols., 2002). Esse mecanismo está de acordo com o modelo de reparo induzido pela cisplatina e reconhecido pela *hHMGB1*, sinalizando para o reconhecimento de proteínas de reparo por excisão de nucleotídeo (figura 13B, proposto por LANGE e cols., 2008).

Outra possível participação da *AaHMGB1* na fisiologia do mosquito poderia estar relacionado aos mecanismos de imunidade do inseto. A *hHMGB1*

age como uma citocina pró inflamatória, através de interação com receptores Toll e desencadeando uma série de sinais que culminam com a ativação de vias de sinalização que levam a respostas imunológicas. Nesse sentido, a AaHMGB1 poderia também estar mediando respostas imunes do mosquito a infecção por patógenos, como bactérias e o vírus da Dengue.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E.G. & JACOBS-LORENA, M. **Mosquito midgut barriers to malaria parasite development.** *Insect Biochem Mol Biol*, v. 34, p. 667–671, 2004.

AMADIO, M.; BATTAINI, F.; PASCALE, A. **The different facets of protein kinases C: old and new players in neuronal signal transduction pathways.** *Pharmacological Research*, v. 54, p. 317–325, 2006.

ANDERSSON, U.; ERLANDSSON-HARRIS, H.; YANG, H.; TRACEY, K. J. **HMGB1 as a DNA-binding cytokine.** *Journal of Leukocyte Biology*, v. 72, p. 1084-1091, 2002.

AGRESTI, A. & BIANCHI, M. E. **HMGB proteins and gene expression.** *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v. 13, p. 170-178, 2003.

ALEPOROU-MARINO, V.; MARINO, H.; PATARGIAS, T. **A Mini Review of the High Mobility Group Proteins of Insects.** *Biochemical Genetics*, v. 41, p. 291-304, 2003.

ATTARDO, G. M.; HANSEN, I. A.; RAIKHEL, A. S. **Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: Implications for autogeny.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 35, p. 661-675, 2005.

BEATY, B. J. & MARQUARDT, W. C. **The Biology of Disease Vectors.** Editora Colorado, capítulo 6, p. 85-96, 1996.

BEDNAR, J.; HOROWITZ, R. A.; GRIGORYEV, S. A.; CARRUTHERS, L. M.; HANSEN, J. C.; KOSTER, A. J.; WOODCOCK, C. L. **Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 95, p. 14173-14178, 1998.

BELL, A. J.; CHAUHAN, S.; WOODSON, S. A.; KALLENBACH, N. R. **Interactions of recombinant HMGB proteins with branched RNA substrates.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 377, p. 262-267, 2008.

BIANCHI, M. E.; BELTRAME, M.; PAONESSA, G. **Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG1.** *Science*, v. 243, p. 1056-1059, 1989.

BIANCHI, M. E.; FALCIOLA, L.; FERRARI, S.; LILLEY, D. M. **The DNA binding site of HMG1 protein is composed of two similar segments (HMG boxes), both of which have counterparts in other eukaryotic regulatory proteins.** *Embo. J.*, v. 11, p. 1055-1063, 1992.

BIANCHI, M. E.; AGRESTI, A. **HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation.** *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v. 15, p. 496-506, 2005.

BOEGER, H.; GRIESENBECK, J.; STRATTAN, J. S.; KORNBERG, R. D. **Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter.** *Mol Cell*, v. 11, p. 1587-1598, 2003.

BONALDI, T.; LANGST, G.; STROHNER, R.; BECKER, P. B.; BIANCHI, M. E. **The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding.** *Embo J.*, v. 21, p. 6865-6873, 2002.

BONALDI, T.; TALAMO, F.; SCAFFIDI, P.; FERRERA, D.; PORTO, A.; BACHI, A.; RUBARTELLI, A.; AGRETI, A.; BIANCHI, M. E. **Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion.** *EMBO J.*, v. 22, p. 5551-5560, 2003.

BOONYARATANAKORNKIT, V.; MELVIN, V.; PRENDERGAST, P.; ALTMANN, M.; RONFANI, L.; BIANCHI, M. E.; TARASEVICIENE, L.; NORDEEN, S. K.; ALLEGRETTO, E. A.; EDWARDS, D. P. **High-mobility Group Chromatin Proteins 1 and 2 Functionally Interact with Steroid Hormone Receptors To Enhance Their DNA Binding In Vitro and Transcriptional Activity in Mammalian Cells.** *Molecular and Cellular Biology*, v. 18, p. 4471-4487, 1998.

BROWN, M. R.; GRAF, R.; SWIDEREK, K. M. FENDLEY, D.; STARCKER, T. H.; CHAMPAGNE, D. E.; LEA, A. O. **Identification of a steroido-genic neurohormone in female mosquitoes.** *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 3967-3971, 1998.

BUSTIN, M. **Regulation of DNA-Dependent Activities by the Functional Motifs of the High-Mobility-Group Chromosomal Proteins.** *Molecular and Cellular Biology*, v. 19, p. 5237-5246, 1999.

CALOGERO, S.; GRASSI, F.; AGUZZI, A. **The lack of chromosomal protein HMG1 does not disrupt cell growth, but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice.** *Nature Genet.*, v. 22, p. 276-280, 1999.

CHEN, G.; WARD, M. F.; SAMA, A. E.; WANG, H. **Extracellular HMGB1 as a Proinflammatory Cytokine.** *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v. 24, p. 329-333, 2004.

CHEN, J.; WANG, H.; WANG, Y. F. **Overexpression of HmgD Causes the Failure of Pupariation in *Drosophila* by Affecting Ecdysone Receptor Pathway.** *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 68, p. 123-133, 2008.

CHURCHILL, M. E. A.; JOHNS, D. M. N.; GLASSER, T.; HEFBER, H.; SEARLES, M. A.; TRAVERS, A. A. **HMGD is an architecture specific protein that preferentially binds to DNA containing the dinucleotide TG.** *EMBO J.*, v. 14, p. 1264, 1995.

CROTHERS, D. M. **Architectural elements in nucleoproteins structures.** *Curr. Biol.*, v. 3, p. 675-676, 1993.

CRUZ, J.; SIEGLAFF, D. H.; ARENSGURGER, P.; ATKINSON, P. W.; RAIKHEL, A. S. **Nuclear receptor in the mosquito *Aedes aegypti* Annotation, hormonal regulation and expression profiling.** *FEBS Journal*, v. 276, p. 1233-1254, 2009.

DE OLIVEIRA, F. M. B.; DA SILVA, I. C. DE A.; RUMJANEK, F. D.; DIAS-NETO, E.; GUIMARÃES, P. E. M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; STROS, M.; FANTAPPIÉ, M. R. **Cloning the genes and DNA binding properties of High Mobility Group B1 (HMGB1) proteins from the human blood flukes *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*.** *Gene*, v. 377, p. 33-45, 2006.

DUNAWAY, M.; OSTRANDER, E. A. **Local domains of supercoiling activate a eukaryotic promoter in vivo.** *Nature*, v. 361, p. 746-748, 1993.

GAZZAR, M. E. **HMGB1 modulates inflammatory responses in LPS-activated macrophages.** *Inflammation Research*, v. 56, p. 162-167, 2007.

GENTILE, C.; LIMA, J. B.; PEIXOTO, A. A. **Isolation of a fragment homologous to the rp49 constitutive gene of *Drosophila* in the Neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae).** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.100, p. 545-7, 2005.

GOODWIN, G. H.; SANDERS, C.; JOHNS, E. W. **A new group of chromatin associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids.** *Eur J Biochem*, v.38, p. 14-19, 1973.

GRASSER, K. D. **Plant chromosomal high mobility group HMG proteins.** *Plant J.*, v. 7, 1995.

GRASSER, K. D. **Chromatin-associated HMGA and HMGB proteins: versatile co-regulators of DNA-dependent process.** *Plant Molecular Biology*, v. 53, p. 281-295, 2003.

GRASSER, K.; LAUNHOLT, D.; GRASSER, M. **High mobility group proteins of the plant HMGB family: Dynamic chromatin modulators.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007.

HAGEDORN, H. H.; O'CONNOR, J. D.; FUCHS, M. S.; SAGE, B.; SCHLAEGER, D. A.; BOHM, M. K. **The ovary as a source of alpha-ecdysone in an adult mosquito.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 72, p. 3255-3259, 1975.

HAHN, S.; HENDRICKSON, W.; SCHLEIF, R. **Transcription of *Escherichia coli* ara in vitro. The cyclic AMP receptor protein requirement for PBAD induction that depends on the presence and orientation of the araO2 site.** *J. Mol. Biol.*, v. 188, p. 355-367, 1986.

HALSTEAD, S. B. **Dengue Virus-Mosquito Interactions.** *Annu. Rev. Entomol.*, v. 53, p. 273-291, 2008.

HAN, Y.S.; THOMPSON, J.; KAFATOS, F.C.; BARILLAS-MURY, C. **Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes.** *EMBO J.*, v. 19, p.6030-6040, 2000.

HE, Q.; OHNDORF, U.; LIPPARD, S. J. **Intercalating Residues Determine the Mode of HMG1 Domains A and B Binding to Cisplatin-Modified DNA.** *Biochemistry*, v. 39, p. 14426-14435, 2000.

HOCK, R.; FURUSAWA, T.; UEDA, T.; BUSTIN, M. **HMG chromosomal proteins in development and disease.** *Trends. Cell. Biol.*, v. 17, p. 72-79, 2006.

JONES, D. N.; SEARLES, M. A.; SHAW, G. L.; CHURCHILL, M. E.; NER, S. S.; KEELER, J.; TRAVERS, A.; NEUHAUS, D. **The solution structure and dynamics of the DNA-binding domain of the HMG-D form *Drosophila melanogaster*.** *Structure*, v. 2, p. 609, 1994.

KANG, H. J.; LEE, H.; CHOI, H. J.; YOUN, J. H.; SHIN, J. S.; AHN, Y. H.; YOO, J. S.; PAIK, Y. K.; KIM, H. **Non-histone nuclear factor HMGB1 is phosphorylated and secreted in colon cancers.** *Laboratory Investigation*, p. 1–12, 2009.

KATO, N.; MUELLER, C. R.; FUCHS, J. F.; MCELROY, K.; WESSELY, V.; HIGGS, S.; CHRISTENSEN, B. M. **Evaluation of the Function of a Type I Peritrophic Matrix as a Physical Barrier for Midgut Epithelium Invasion by Mosquito-Borne Pathogens in *Aedes aegypti*.** *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 8, p. 701-712, 2008.

KITAGAWA, E.; TAKAHASHI, J.; MOMOSE, Y.; IWAHASHI, H. **Effects of the Pesticide Thiuram: Genome-wide Screening of Indicator Genes by Yeast DNA Microarray.** *Environ. Sci. Technol.*, v. 36, p. 3908-3915, 2002.

KOKOZA, V.; AHMED, A.; CHO, W. L.; JASINSKIENE, N. JAMES, A. A.; RAIKHEL, A. **Engineering blood meal-activated systemic immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*.** *PNAS*, v. 97, p. 9144-9149, 2000.

KOUZINE, F.; LEVENS, D. **Super-coil driven DNA structures regulate genetic transactions.** *Front. Biosci.*, v. 12, p. 4409-4423, 2007.

KROHN, N. M.; YANAGISAWA, S.; GRASSER, K. D. **Specificity of the Stimulatory Interaction between Chromosomal HMGB Proteins and the Transcription Factor Dof2 and Its Negative Regulation by Protein Kinase CK2-mediated Phosphorylation.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 32438–32444, 2002.

KUMAR, R.; THOMPSON, E.B. **The structure of the nuclear hormone receptors.** *Steroids*, v. 64, p. 310–9, 1999.

LANGE, S. S.; MITCHELL, D. L.; VASQUEZ, K. M. **High mobility group protein B1 enhances DNA repair and chromatin modification after DNA damage.** *PNAS*, v. 105, p. 10320-10325, 2008.

MARTÍN, D.; WANG, S. F.; RAIKHEL, A. S. **The vitellogenin gene of the mosquito *Aedes aegypti* is a direct target of ecdysteroid receptor.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 173, p. 75-86, 2001.

MARTIN, K.; HOU, L.; SCHLEIF, R. F. **The DNA loop model for ara repression: arac protein occupies the proposed loop sites in vivo and repression-negative mutations lie in the same sites.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 83, p. 3654-3658, 1986.

MEGGIO, F.; PINNA, L. A. **One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?** *FASEB J.*, v.17, p. 349-368, 2003.

MELVIN, V. S.; HARREL, C.; ADELMAN, J. S.; KRAUS, W. L.; CHURCHILL, M.; EDWARDS, D. P. **The Role of the C-terminal Extension (CTE) of Estrogen Receptor  $\alpha$  and  $\beta$  DNA Binding Domain in DNA Binding and Interaction with HMGB.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 14763-14771, 2004.

NELSON, D. L. & COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry.** Terceira edição, capítulo 24 e 28, p. 917, 924 e 1105.

NER, S. S.; CHURCHILL, M. E.; SEARLES, M. A.; TRAVERS, A. A. **DHMG-Z, a second HMG-1 related protein in *Drosophila melanogaster*.** *Nucleic Acids. Res.*, v. 21, p. 4369, 1993.

NER, S. S. & TRAVERS, A. A. **HMG-D, the *Drosophila melanogaster* homologue of HMG1 protein, is associated with early embryonic chromatin in absence of histone H1.** *EMBO J.*, v. 13, p. 1817, 1994.

NIU, L. L. & FALLON, A. M. **Differential regulation of ribosomal protein gene expression in *Aedes aegypti* mosquitoes before and after the blood meal.** *Insect Molecular Biology*, v. 9, p. 613-623, 2000.

OÑATE, S. A.; PRENDERGAST, P.; WAGNER, J. P.; NISSEN, M.; REEVES, R.; PETTIJOHN, D. E.; EDWARDS, D. P. **The DNA -Bending Protein HMG-1 Enhances Progesterone Receptor Binding to Its Target DNA Sequences.** *Molecular and Cellular Biology*, v. 14, p. 3376-3391, 1994,

OPEL, M.; HATFIELD, G. W. **DNA supercoiling-dependent transcriptional coupling between the divergently transcribed promoters of the *ilvYC* operon of *Escherichia coli* is proportional to promoter strengths and transcript lengths.** *Mol. Microbiol.*, v. 39, p. 191-198, 2001.

OUDET, P.; GROSS-BELLARD, M.; HAMBON, P. **Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit.** *Cell*, v. 4, p. 281-300, 1975.

PAYET, D. & TRAVERS, A. **The acidic tail of the high mobility group HMGD modulates the structural selectivity of DNA-binding.** *J. Mol. Biol.*, v. 266, p. 66, 1997.

PELOVSKY, P.; PASHEV, I. G.; PASHEVA, E. **Interplay between in vitro acetylation and phosphorylation of tailness HMGB1 protein.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 380, p. 138-142, 2009.

POHLER, J. R.; LILLEY, D. M. THE INTERACTION OF HMG-BOX PROTEINS WITH THE FOUR-WAY DNA JUNCTION. *Biochem Soc. Trans.*, v. 25, p. S647, 1997.

PTASHNE, M. **Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance.** *Nature*, v. 322, p. 697-701, 1986.

RAIKHEL, A. S. **Adv. Dis. Vector Res.**, v. 9, p. 1-39, 1992.

RAIKHEL, A. S. KOKOZA, V. A.; ZHU, J.; MARTIN, D.; WANG, S. F.; LI, C.; SUN, G.; AHMED, A.; DITTMER, N.; ATTARDO, G. **Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 32, p. 1275-1286, 2002.

RENNER, U.; GHIDELLI, S.; SCÄFER, M. A.; WIŚNIEWSKI, J. R. **Alteration in titer and distribution of high mobility group proteins during embryonic development of *Drosophila melanogaster*.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1475, p. 99-108, 2000.

RYBAK, L. P. **Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection.** *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* v.15, p. 364-9, 2007.

RYDBERG, B.; HOLLEY, W. R.; MIAN, I. S.; CHATTERJEE, A. **Chromatin conformation in living cells: support for a zig-zag model of the 30 nm chromatin fiber.** *J. Mol. Bio.*, v. 284, p. 71-84, 1998.

SAHA, A.; WITTMAYER, J.; CAIRNS, B. R. **Chromatin remodeling: the industrial revolution of DNA around histones.** *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, v. 7, p. 437-447, 2006.

SANDERS, H. R.; EVANS, A. M.; ROSS, L. S.; GILL, S. S. **Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 33, p. 1105–1122, 2003.

SEBASTIAN, N. T.; BYSTRY, E. M.; BECKER, N. A.; MAHERIII, L. J. **Enhancement of DNA Flexibility in Vitro and in Vivo by HMGB Box A Proteins Carrying Box B Residues.** *Biochemistry*, v. 48, p. 2125-2134, 2009.

SPIKER, S.; MARDIAN, J. K. W.; ISENBERG, I. **Chromosomal HMG Proteins occur in three eukaryotic kingdoms.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 82, 1978.

STROS, M.; STOKROVÁ, J.; THOMAS, J. O. **DNA looping by HMG-box domains of HMGB1 and modulation of DNA binding by the acidic C-terminal domain.** *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 1044-1051, 1994.

STROS, M. & REICH, J. **Formation of large nucleoprotein complexes upon binding of the high-mobility-group (HMG) box B-domain of HMG1 protein to supercoiled DNA.** *Eur. J. Biochem.*, v. 251, p. 427-434, 1998.

STROS, M.; MUSELIKOVA, E. **A role of basic residues and the putative intercalating phenylalanine of the HMG-1 box B in DNA supercoiling and binding to four-way DNA junctions.** *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 35699-35707, 2000.

STROS, M. **Two mutations of basic residues within the N-terminus of HMG-1 B domain with different effects on DNA supercoiling and binding to bent DNA.** *Biochemistry*, v. 40, p. 4769-4779, 2001.

STROUMBAKIS, N. D. & TOLIAS, P. P. **Localized maternal and zygotic expression of the gene encoding Drosophila HMGD.** *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1218, p. 245, 1994.

TAKAHASHI, K.; VIGNERON, M.; MATTHES, H.; WILDEMAN, A.; ZENKE, M.; CHAMBON, P. **Requirement of stereospecific alignments for initiation from the simian virus 40 early promoter.** *Nature*, v. 319, p. 121-126, 1986.

THOMAS, J. O. **HMG 1 and 2: architectural DNA-binding proteins.** *Biochemical Society Transactions*, v. 29, p. 395-401, 2001.

THOMAS, J. O. & TRAVERS, A. A. **HMG1 and 2, and related "architectural" DNA-binding proteins.** *TRENDS in Biochemical Sciences*, v. 26, p. 167-174, 2001.

TRAVERS, A. **Recognition of distorted DNA structures by HMG domains.** *Current Opinion in Structural Biology*, v. 10, p. 102-109, 2000.

TRAVERS, A. A. **Priming the nucleosome: a role for HMGB proteins?** *European Molecular Biology Organization*, v. 4, p. 131-136, 2003.

TRAVERS, A. & MUSKHELISHVILI, G. **A common topology for bacterial and eukaryotic transcription initiation?** *EMBO reports*, v. 8, p. 147-151, 2007.

TRINKLEIN, N. D.; ALDRED, S. F.; HARTMAN, S. J.; SCHROEDER, D. I.; OTILLAR, R. P.; MYERS, R. M. **An abundance of bidirectional promoters in the human genome.** *Genome Res*, v. 14, p. 62-66, 2004.

TUFAIL, M. & TAKEDA, M. **Molecular characteristics of insect vitellogenins.** *Journal of Insect Physiology*, v. 54, p. 1447-1458, 2008.

VERRIJDT, G.; HAELENS, A.; SCHOENMAKERS, E.; ROMBAUTS, W.; CLAESSENS, F. **Comparative analysis of the influence of the high-mobility group box 1 protein on DNA binding and transcriptional activation by the androgen, glucocorticoid, progesterone and mineralocorticoid receptors.** *Biochem. J.*, v. 361, p. 97-103, 2002.

XIAO, D.; PAK, J. H.; WANG, X.; SATO, T.; HUANG, F. L.; CHEN, H. C.; HUANG, K. P. **Phosphorylation of HMG-I by Protein Kinase C Attenuates Its Binding Affinity to the Promoter Regions of Protein Kinase C  $\gamma$  and Neurogranin/RC3 Genes.** *Journal of Neurochemistry*, Vol. 74, No. 1, 2000.

WAGNER, C. R.; HAMANA, K.; ELGIN, S. C. R. **A high mobility group protein and its cDNA from *Drosophila melanogaster*.** *Mol. Cell. Bio.*, v. 12, p. 1915, 1992.

WANG, H.; BLOOM, O.; ZHANG, M.; VISHNUBHAKAT, J. M.; OMBRELLINO, M.; CHE, J.; et al. **HMG-1 as a Late Mediator of Endotoxin Lethality in Mice.** *Science*, v. 285, p. 248-251, 1999.

WANG, H.; WARD, M. F.; FAN, X. G.; SAMA, A. E.; LI, W. **Potential Role of High Mobility Group Box 1 in Viral Infectious Diseases.** *Viral Immunol.*, v. 19, p. 3-9, 2006.

WEBER, S. & ISENBERG, I. **High mobility group proteins of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochemistry*, v. 19, 1980.

WISNIEWSKI, J. R. & SCHULZE, E. **Insect proteins homologous to mammalian high mobility group protein 1: Characterization and DNA-binding properties.** *J. Bio. Chem.*, v. 276, p. 17170, 1992.

WISNIEWSKI, J. R.; SCHULZE, E.; SAPETTO, B. **DNA binding and nuclear translocation of insect high-mobility-group protein-1 (HMG1) proteins are inhibited by phosphorylation.** *Eur. J. Biochem*, v. 225, p. 687-693, 1994.

WISNIEWSKI, J. R.; SZEWCZUK, Z.; PETRY, I.; SCHWANBECK, R.; RENNER, U. **Constitutive Phosphorylation of the Acidic Tails of the High Mobility Group 1 Proteins by Casein Kinase II Alters Their Conformation, Stability and DNA Binding Specificity.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 20116-20122, 1999.

WOLFFE, A. P. **Architectural transcription factors.** *Science*, v. 264, p. 1100-1101, 1994.

WU, C.; TRAVERS, A. **A 'one-pot' assay for the accessibility of DNA in a nucleosome core particle.** *Nucleic. Acids. Res.*, v. 32, p. 122, 2004.

YAMADA, S. & MARUYAMA, I. **HMGB1, a novel inflammatory cytokine.** *Clinica Chimica Acta*, v. 375, p. 36-42, 2007.

YANG, H.; TRACEY, K. J. **High mobility group box 1 (HMGB1).** *Crit. Care Med.*, v. 33, p. S474-S473 (suppl.), 2005.

YAO, T.; FORMAN, B. M.; JIANG, Z.; CHERBAS, L.; CHEN, J. D.; MCKEOWN, M.; CHERBAS, P.; EVANS, R. M. **Functional ecdysone receptor is the product of EcR and ultraspiracle genes.** *Nature*, v. 336, p. 476-479, 1993.

YOUN, J. H. & SHIN, J. S. **Nucleocytoplasmic Shuttling of HMGB1 Is Regulated by Phosphorylation That Redirects It toward Secretion.** *The Journal of Immunology*, v. 177, p. 7889 –7897, 2006.

ZHANG, Q.; ZHANG, K.; ZOU, Y.; PERNA, A.; WANG, Y. **A quantitative study on the *in vitro* and *in vivo* acetylation of high mobility group A1 proteins.** *J Am Soc Mass Spectrom*, v.18, p.1569-1578, 2007.

ZIMMERMAN, J.; MAHER III, L. J. **Transient HMGB protein interactions with B-DNA duplexes and complexes.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008.

# CURRICULUM VITAE

**Nome: Fabio Schneider Ribeiro.**

Nascimento: 21/02/1981.

Naturalidade: Rio de Janeiro – RJ.

## Formação Acadêmica/Titulação

- Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, março de 2002 a dezembro de 2006.
- Mestrado em Química Biológica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, agosto de 2007 a agosto de 2009.

## Comunicação em congressos

- 2 comunicações em congressos internacionais.
- 2 comunicações em congressos nacionais.

## Publicações

Estrela Rde C, Ribeiro FS, Barroso PF, Tuyama M, Gregório SP, Dias-Neto E, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. (2009). **ABCB1 polymorphisms and the concentrations of lopinavir and ritonavir in blood, semen and saliva of HIV-infected men under antiretroviral therapy.** *Pharmacogenomics* 10(2):311-8.

Estrela RC, Ribeiro FS, Carvalho RS, Gregório SP, Dias-Neto E, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. (2008). **Distribution of ABCB1 polymorphisms among Brazilians: impact of population admixture.** *Pharmacogenomics* 9(3):267-76.

Estrela RC, Ribeiro FS, Seixas BV, Suarez-Kurtz G. (2008). **Determination of lopinavir and ritonavir in blood plasma, seminal plasma, saliva and plasma ultra-filtrate by liquid chromatography/tandem mass spectrometry detection.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 22(5):657-64.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)