

Clonagem, Expressão e Purificação de uma Tioredoxina e uma Tioredoxina Redutase Citosólica de Embriões do Mosquito *Aedes aegypti*

Jhenifer N. da Silva¹; Evenilton P. Costa²; Criscila de Souza³; Eldo Campos³; Carlos Logullo^{1,2}

¹UEA-UENF, RJ; ²LQFPP-CBB-UENF, RJ; ³LIBHM-NUPEM / UFRJ-Macaé;

O mosquito *Aedes aegypti* é um dos vetores da febre amarela e o principal vetor da dengue. Em 2010, Vital e colaboradores demonstraram a notável relação entre fases marcantes do desenvolvimento embrionário dessa espécie com processos distintos do metabolismo energético. Neste trabalho, propõem-se um entendimento mais aprofundado da relação entre o metabolismo redox e o energético nestes embriões. Portanto, nosso grupo de pesquisa investiga o metabolismo redox durante o desenvolvimento embrionário do mosquito *A. aegypti* para identificar enzimas que participem criticamente da manutenção desses processos citados anteriormente e, assim, estabelecer novos possíveis alvos moleculares para o desenvolvimento de drogas que controlem estes mosquitos. O sistema Tioredoxina (Trx) é ubíquo entre os organismos e representa um dos sistemas enzimáticos mais importantes de regulação redox celular. Ele está envolvido na regulação de numerosos processos metabólicos e na transcrição de alguns genes, além de participar das defesas antioxidantes. Dentro deste contexto, este projeto tem por objetivo produzir a Trx e a TrxR recombinantes e em grande escala para realizar sua caracterização cinética e estrutural. Para tanto, a clonagem de sua ORF ocorreu da seguinte maneira: o RNA total foi extraído de embriões com 24 h de desenvolvimento; Em seguida, o RNA total foi transcrito para cDNA; A região codificante da Trx possui 321 bases; Esta região foi amplificada por PCR e usando primers específicos. Em seguida, o amplicon foi purificado e ligado ao vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega, USA) e sequenciada em ambos os sentidos. Ambas as enzimas foram inseridas no vetor de expressão procarioto pCold-TF DNA (Takara, Japão). Este vetor de expressão possui uma região promotora responsiva a baixas temperaturas (15 °C) além de conter uma proteína de fusão (TF) que se liga aos ribossomos procarióticos aumentando a solubilização da proteína recombinante. Infelizmente, durante os ensaios de expressão, as enzimas superexpressas não apresentaram atividade. Em função disso, estamos sub-clonando ambas as sequências em uma nova versão deste mesmo vetor de expressão a frio, mas sem a proteína de fusão. Os próximos passos deste trabalho incluem a indução de expressão, a purificação e a determinação dos parâmetros cinéticos de ambas as enzimas, além de desafiarmos esse sistema com outros substratos oxidados.

Palavras-chave: embriões, Tioredoxina, Tioredoxina Redutase, controle redox.
Agências de fomento: FAPERJ, CAPES, CNPq e INCT – Entomologia Molecular.