

SALÃO DE
INICIAÇÃO CIENTÍFICA
XXIX SIC
 **UFRGS**
PROPESQ



múltipla 
UNIVERSIDADE
inovadora  inspiradora

Evento	Salão UFRGS 2017: SIC - XXIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2017
Local	Campus do Vale
Título	Anticoagulantes da Saliva do Carrapato Bovino <i>Boophilus microplus</i>
Autor	FLÁVIO GABRIEL CARAZZA KESSLER
Orientador	CARLOS TERMIGNONI

Anticoagulantes da saliva do carrapato bovino *Boophilus microplus*

Kessler, F.G.C.; Termignoni, C.

Centro de Biotecnologia e Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

O ectoparasita *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, como os outros carrapatos, precisa de um amplo arcabouço de enzimas, peptídeos e outras moléculas anticoagulantes para contrapor a homeostase do hospedeiro e a ingestão adequada de sangue. Tais anticoagulantes estão presentes na saliva dos hematófagos, pois ela é o primeiro contato entre o sangue e o aparato bucal deste. Anteriormente, nosso grupo de pesquisa encontrou na saliva de *R. microplus* um peptídeo de 16 aminoácidos (1,7kDa) com atividade anticoagulante, denominado microfilina. Dados preliminares sugerem que esse peptídeo age no exsítio I da trombina. Entretanto, a sequência de aminoácidos da microfilina, que pode indicar um perfil anticoagulante interessante para a fabricação de novos fármacos, ainda não é conhecida, impedindo sua caracterização. Para caracterizar essa molécula, é preciso obtê-la em quantidades adequadas e, portanto, coletar saliva do carrapato para que se possa extrair a microfilina. Até o momento foram coletados aproximadamente 1,5 ml de saliva (rendimento de 0,8 µl por carrapato), quantidade ainda insuficiente para os trabalhos de caracterização, os quais terão início assim que a saliva necessária for obtida. Por outro lado, em seu trabalho de mestrado, XAVIER, M. A. (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS, 2016) identificou proteínas do intestino do mesmo parasita com a propriedade de inibir trombina (purificadas em colunas de cromatografia de troca iônica, de gel filtração e de afinidade por trombina). Análises por espectrometria de massas mostrou que, entre esses inibidores de trombina, a catepsina B foi a proteína que apresentou maiores contagens espectrais. Por isso, essa enzima foi selecionada para estudos mais detalhados. A expressão dessa enzima em sistema heterólogo foi escolhida como metodologia para se obter a quantidade devida para a caracterização. A fase de leitura aberta (ORF-*Open Reading Frame*) do gene desta proteína já estava subclonada no vetor de clonagem pGEM-T, formando a construção pGEM-CB (vetor de clonagem com o gene de catepsina B). No estágio atual do projeto este gene está em fase de clonagem no vetor de expressão pET 43a. O inserto com a região codificante da catepsina B já foi devidamente (i) transformado em células *Escherichia coli* TOP10 por choque térmico; (ii) extraído destas células por extração plasmidial de larga escala, midiprep; (iii) analisado com as enzimas de restrição compatíveis *BamHI* e *NdeI*; (iv) desfosforilado; (v) purificado de gel de agarose após clivagem com endonucleases, e (vi) ligado no vetor de expressão. Na próxima etapa do trabalho, bactérias *E. coli* competentes serão transformadas com este vetor por meio de técnica de eletroporação e analisadas quanto à capacidade de expressão da catepsina B de carrapato.