



## Caracterização imunológica de uma proteína salivar rica em glicinas recombinante do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Bolsista; Huama Oliveira dos Santos, Carlos Alexandre Sanchez Ferreira (orientador)

*Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
(PUCRS)*

### **Resumo**

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um importante ectoparasita de rebanhos bovinos. Sua ação espoliativa causa queda na produção de leite e carne, além de transmitir doenças parasitárias e causar reações inflamatórias no local da fixação. O controle do *R. microplus* é feito com o uso de acaricidas e o aparecimento de isolados resistentes às drogas representa um sério problema para a saúde e produção animal, nos levando a procura de outros meios de controle, como vacinas. Entre os possíveis alvos para a busca de antígenos protetores estão os presentes na saliva do carrapato. A presença de pequenas quantidades de proteínas do carrapato em sua saliva impõe que a melhor estratégia para o isolamento, identificação e caracterização de antígenos que entram em contato com bovinos seja o uso de sistemas heterólogos de expressão. Recentemente, o nosso grupo isolou um cDNA correspondente a uma proteína rica em glicina, presente na glândula salivar e potencialmente componente do cone de cemento do carrapato. Proteínas ricas em glicina são descritas como de origem salivar, encontradas no cone de cemento do carrapato que tem como função fixar o carrapato no hospedeiro auxiliando assim no parasitismo. Análises por sequenciamento e sondagens imunológicas têm mostrado novas sequências de proteínas ricas em glicina, as quais são expressas durante a alimentação dos carrapatos. Pretendeu-se desta forma, a clonagem e expressão da Proteína Rica em Glicinas para avaliação de sua possível presença no carrapato. A metodologia consiste na amplificação do fragmento de cDNA por PCR e clonagem utilizando o “Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit”. Para a expressão da Proteína Rica em Glicinas foram sintetizados oligonucleotídeos

iniciadores (FP25 B 5' caccatgaaattgttgcgtgcagcc 3'; RP25 B 5' tcaatggtgatggtgatgatgattgttctacggttgccgcc 3'; FP25 C 5' caccatggagagcagctcgtgggg 3'; RP25 C 5' tcaatggtgatggtgatgatgggggaagttgccgccgaat 3') os quais foram usados de duas formas: FP25 B - RP25 B; FP25 C - RP25 C; FP25 B - RP25 C e FP25 C - RP25 B. A clonagem da sequência de interesse no vetor de expressão foi realizada utilizando o “kit” citado, e este inserido por eletroporação em cepas de *Escherichia coli* linhagem Top 10, logo após foi realizada a extração do DNA plasmidial e sequenciamento. Após a confirmação da correção da clonagem do cDNA codificante para a proteína Rica em Glicinas no vetor de interesse, este foi inserido em *Escherichia coli* linhagem BL21. A transformação foi realizada através de choque térmico, sendo confirmada por extração plasmidial e PCR. A expressão foi avaliada por SDS-PAGE seguida de Western-blot, utilizando-se anticorpo específico para a cauda de histidinas, tendo-se verificado que a Proteína Rica em Glicinas não foi expressa. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que a Proteína Rica em Glicinas aparentemente não pode ser expressa no modelo de expressão procariótico utilizado. O grupo de pesquisa está desenvolvendo uma nova estratégia utilizando nova inserção da sequência codificante em novo vetor para expressão na levedura *Pichia pastoris*.

### **Palavras-chave**

Carrapato; *Rhipicephalus microplus*; Proteína Rica em Glicinas.