



Evento	Salão UFRGS 2018: SIC - XXX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2018
Local	Campus do Vale - UFRGS
Título	Identificação e caracterização de proteínas ligadoras de heparina dos tecidos de Rhipicephalus microplus e Fasciola hepatica
Autor	LARISSA MACHADO DA SILVEIRA
Orientador	CARLOS TERMIGNONI

Identificação e caracterização de proteínas ligadoras de heparina dos tecidos de *Rhipicephalus microplus* e *Fasciola hepatica*

da Silveira, L.M.^{1,2,3}; Termignoni C.^{1,3}

¹Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil; ²Faculdade de Medicina Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil; ³Departamento de Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

Introdução: A heparina é um glicosaminoglicano sulfatado, sintetizado pela maioria das células animais. Possui capacidade de ligar-se a diversas proteínas, devido aos seus variados sítios ativos, o que possibilita sua ampla utilização por patógenos na interação com as células do hospedeiro. O carrapato *Rhipicephalus microplus* e o platelminto *Fasciola hepatica* são parasitos hematófagos que causam prejuízos significativos na pecuária brasileira. O objetivo do presente trabalho foi (i) identificar o perfil de proteínas ligadoras de heparina presentes nos tecidos dos parasitos supracitados; (ii) identificar proteínas que possam comprometer a viabilidade do parasito.

Metodologia: Fêmeas parcialmente e totalmente ingurgitadas de *R. microplus* foram dissecadas para obtenção de extratos proteicos de ovário, glândula salivar e intestino. Larvas de *R. microplus* também foram usadas para o preparo de extrato de proteínas. As amostras de *Fasciola hepatica* adulta foram coletadas de um fígado parasitado. As mesmas foram colocadas em tampão fosfato salino, posteriormente em meio de cultivo para que o conteúdo do intestino fosse excretado e então maceradas para extrato proteico. Para a identificação de proteínas ligadoras de heparina nos extratos, cada um destes foi separado por cromatografia de afinidade em resina com heparina imobilizada em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, usando gradiente (0 a 2 M de NaCl) para eluir as proteínas. As frações obtidas a partir das cromatografias foram ainda separadas por SDS-PAGE 12%, e os géis foram corados com coomassie blue ou nitrato de prata para visualização das proteínas. Proteínas foram selecionadas e recortadas dos géis correspondentes aos extratos de larva e analisadas por espectrometria de massas (LC-MS/MS).

Resultados: Por SDS-PAGE foram observadas proteínas abundantes com baixa afinidade em todos os tecidos de carrapato, exceto no extrato de glândula salivar de fêmeas parcialmente ingurgitadas, que não apresentou proteínas ligadoras de heparina. Em intestino e ovário de fêmeas parcialmente ingurgitadas e em glândula salivar de fêmeas totalmente ingurgitadas foram observadas proteínas com maior afinidade (eluição acima de 1,5 M de NaCl) com diferentes pesos moleculares. Em *Fasciola hepatica* foram observadas proteínas com cerca de 50 kDa eluídas com alta afinidade (2 M de NaCl). Individualmente, amostras de larva de *R. microplus* apresentaram proteínas com média afinidade (eluição em cerca de 1 M de NaCl) com bandas correspondentes a 25 kDa, e bandas abaixo de 10kDa de proteínas com maior afinidade (eluição em mais de 1,5 M de NaCl). A análise por LC-MS/MS destas duas bandas de proteínas identificou a proteína de 25 kDa como Histona tipo 1, e como Histonas tipo 2A e 2B as proteínas abaixo de 10 kDa.

Conclusão: Proteínas ligadoras de heparina encontram-se nos tecidos de *Rhipicephalus microplus* e *Fasciola hepatica*. Testes enzimáticos devem ser feitos com as proteínas identificadas nos tecidos de larva para caracterizar seu perfil de atividade. É esperado, devido a estudos anteriores, que as histonas na presença de heparina bloqueiem a atividade da mesma, porém quando isoladas com plasma sanguíneo apresentem um perfil anticoagulante.

Agradecimentos: CNPq, CAPES, INCT-EM.