

Matheus Weiler do Amaral¹, Adriana Seixas¹, Jeferson Segalin¹, Carlos Termignoni^{1,2}.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia(1) e Departamento de Bioquímica(2).

Introdução:

O carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, da família Ixodidae, é uma espécie de grande importância veterinária e econômica. A infestação por este ectoparasita causa prejuízos à pecuária por perda de peso, danos no couro e espoliação do hospedeiro, além de transmitir patógenos.

O *R. microplus* permanece ligado ao hospedeiro por vários dias. A complexidade da fisiologia das glândulas salivares e das moléculas por ela secretada são responsáveis por driblar as respostas hemostáticas, inflamatórias e imunológicas do hospedeiro. Neste trabalho, é mostrada a análise proteômica de glândulas salivares de fêmeas parcial e completamente ingurgitadas de *R. microplus*.

Resultados:

Tabela 1: Análise proteômica de glândulas salivares de fêmeas completamente ingurgitadas

ID	Peptide Sequence	EST Access	Best Similarity	Score	Seq. Coverage
FE1	YVPLWETNPR SHDSYLPR	gi 86371135	vitellogenin [<i>Dermacentor variabilis</i>]	77	9%
FE2	YVPLWETNPR SHDSYLPR	gi 89954505	hemelipoglycoprotein precursor [<i>Dermacentor variabilis</i>]	73	1%
FE3	IPIEELYAR EAFNNAYLELGGGER AAVHGSSEL AVGISEGNETVEDIAQR	gi 215493575	Na ⁺ /K ⁺ ATPase, alpha subunit, putative [<i>Ixodes scapularis</i>]	80	5%
FE5	APFDLFENR LGIHEDSQNR RAPFDLFENR GVVDSDELPLNISR NPDDISQEEYGEFYK	gi 241830514	Hsp90 protein, putative [<i>Ixodes Scapularis</i>]	95	6%
FE6	IGFPWSEIR APDFVFFAPR ITNWWAEHK	gi 241691407	radixin, moesin, putative [<i>Ixodes Scapularis</i>]	83	5%
FE7	NTTIPTR STLEPVEK DAGTIAGLNVL VEIANDQGNR FDDPAVQSDMK FEELNADLFR MVNFHYQEFK SOVHDIWLVGGSTR TTPSYAFTDTER NQVAMPNNTVFDKAK	gi 241153675	heat shock protein, putative [<i>Ixodes Scapularis</i>]	236	17%
FE8	IGFDLWQVK GAWVHPEIDNPTDPDK SGTIFDNLITDDEEYAR	gi 22652433	calreticulin precursor [<i>Rhipicephalus microplus</i>]	94	10%
FE9	IGPEPTTDR VYIGSFWDQPLR	gi 66510064	Achaete scute Target 1, isoform B [<i>Apis mellifera</i>]	100	10%
FE10	LVTDLTK AEFVEVTK LYEYIAR QNCQDFEK SHCIAEVEK CCTESLVNR KQATALVELLK LVNELTEFAK HLDEPNLIK SLHTLFGDELCK SLHTLFGDELCK YICDNQDTISSK TOVADESHAGCCK LGEYGFQNALIVR EYEAATLLECCAK DAFLGSLFLEYSR MPCTEDYLSLILNR	gi 1351907	albumin [<i>Bos taurus</i>]	770	13%
FE11	LPLQDVYK IGGIGTVPVGR YYVTIDAPGHR MDTTEPPFSQSR TLQALDAMEPPTRPDKPLR VETGVLPKGMVVTFAPANLITEVK	gi 13122812	elongation factor 1-alpha [<i>Amblyomma sp.</i>]	200	24%
FE12	IAPPER AGFADDAFR DLTOYLMK GYSFTTAEAR EITALAPSTMK HGGVMVGMGQK SYELPDGQVITIGNER PIEHGIITNWDDMEK TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILR	gi 156766	actin [<i>Drosophila melanogaster</i>]	398	31%
FE12	ATAEIAVPGK VTEQVLAAYVK	gi 241690479	fructose 1,6-biphosphato aldolase, putative [<i>Ixodes scapularis</i>]	56	2%
FE13	LTGMAFR EATYDEIK GAAQNIIPASTGAAK VPTPDVSVDLTCR	gi 41394411	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	127	4%
FE15	AYQEAFDISK YLAEVATGEQR	gi 241781373	hypothetical protein iscW014417 [<i>Ixodes scapularis</i>]	199	40%
FE15	NLLVYK LADSLPR EYFASDK RLADSLPR GVHFEKDR FEQLPNLK LTQSLAILR RFEQLPNLK APTPVVGTTAR YFEGPAPTYEK RYEFGPAPTYEK QFAPDAFANRPELLDYLR	gi 19848969	glutathione S-transferase [<i>Rhipicephalus microplus</i>]	606	40%
FE16	TATPDQAEVHSHK VVIAEPVWAIGTGK	gi 118175962	triosephosphate isomerase [<i>Boophilus microplus</i>]	74	11%
FE17	FAINVDR GSWGPSDLVR HFSPEEITVK YVLPEDVDPESVK	gi 29825385	putative heat shock-related protein [<i>Dermacentor variabilis</i>]	143	23%
FE19	AAVTAFWGK VLDVSDGMK LHVDPENFK VVAGVANALAHK KVLDSFSDGMK LLGNVLLVLLAR LLVVYPWTQR EFTPVLDQADFK GTFALSELHCDK FFESFGDLSTADAVMNNPK	gi 122539	full hemoglobin subunit beta-A	693	68%

Materiais e métodos:

Fêmeas parcial e completamente ingurgitadas de *R. microplus* foram dissecadas em PBS a 4 ° C e as glândulas salivares foram removidas e homogeneizadas em Tris 40 mM pH 8. Após centrifugação (10.000g, 10 min), as amostras foram dessalinizadas e concentradas com o ReadyPrep 2D Cleanup Kit (Bio-Rad).

As proteínas foram separadas em eletroforese 1-D, excisadas do gel em intervalos de 0,5-0,5 cm e digeridas usando Tripsina modificada (Promega) antes de submetê-las a análise em LC-ESI-MS-MS(Waters).

Para identificar diferenças em expressão proteica fêmeas parcial e completamente ingurgitadas, ambas amostras foram separadas por eletroforese 2-D (tiras IPG de 7 cm com gradiente linear de pH 3-10, seguido por separação em géis SDS-PAGE 12%). Os géis 2-D foram analisados utilizando o PDQuest 2D software (Bio-Rad). O espectro MS/MS foi analisado pelo Mascot Daemon software package (Matrix Science) e comparado com o banco de dados NCBI. Escores iônicos individuais > 47 indicam identidade ou forte homologia (p<0.05).

Tabela 2: Análise proteômica de glândulas salivares de fêmeas parcialmente ingurgitadas

ID	Peptide Sequence	EST Access	Best Similarity	Score	Seq. Coverage
PE1	SSLGSGYDAR FLEPDDER LCGLCGDYNLDR LSSLIFGK ATLAPLEK LEPDER	gi 89954505	hemelipoglycoprotein precursor [<i>Dermacentor variabilis</i>]	143	1%
PE1	YVPLWETNPR SHDSYLPR	gi 194241600	hemelipoglycoprotein precursor 2 [<i>Dermacentor variabilis</i>]	114	1%
PE1	YVPLWETNPR ASSHLISSGYNPK SHDSYLPR	gi 86371135	vitellogenin [<i>Dermacentor variabilis</i>]	116	17%
PE2	EKEPIAASTNR DKEQVAQVQVEGDELEQVEVLQK LMAESNLGVPEIQOR LDALEASAAR	gi 241997714	spectrin alpha chain, putative [<i>Ixodes scapularis</i>]	76	2%
PE2	VEIANDQGNR VTHAVTVPAYFNDQAQR SEVDDIVLVGGSTR	gi 213402569	glucose-regulated protein [<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>]	55	6%
PE3	ELISNSSDALDK YSEDEELNK NPDDISQEEYGEFYK APFDLFENR GVVDSDELPLNISR LGIHEDSQNR HIYFITGESK	gi 241830514	Hsp90 protein, putative [<i>Ixodes scapularis</i>]	194	10%
PE4	VEIANDQGNRTTPSYVAFTAAGER NQLTSNPFENTVFDKAK MKETAAYLQK DAGTIAGLNVMR VTHAVTVPAYFNDQAQR LTPEDIAR	gi 241998026	heat shock protein, putative [<i>Ixodes scapularis</i>]	181	13%
PE5	VEIANDQGNRTTPSYVAFTDTER NQVAMPNNTVFDKAK RFDPAVQSDMK MKEIAEAYLQKVTNNAVVTVPAYFNDQSR DAGTIAGLNVL SQVHDIWLVGGSTR LSKEEIER	gi 241153675	heat shock protein, putative [<i>Ixodes scapularis</i>]	224	170%
PE6	EEFNDGDAWKDR FVLSAKK FEFNSNEDK HEQNIDCGGGYVK KPEDWDR GAWVHPEIDNPEYTPDPDK	gi 22652433	calreticulin precursor [<i>Boophilus microplus</i>]	431	26%
PE7	IGFDLWQVKSGTIFDNLITDDEEYARVHGEETWAA LKDEEK HLVDEPNLIK YICDNQDTISSK LGEYGFQNALIVR	gi 1351907	albumin precursor [<i>Bos taurus</i>]	109	5%
PE8	YYVTIDAPGHR MDTTEPPFSQSRFEEIQK LPLQDVYKIGGIGTVPVGR	gi 148717317	elongation factor-1alpha [<i>Amblyomma sp.</i>]	210	13%
PE9	YYVTIDAPGHR MDTTEPPFSQSR LPLQDVYKIGGIGTVPVGR	gi 13122812	elongation factor-1alpha [<i>Amblyomma sp.</i>]	111	11%
PE9	LVQLLEDEYK TSFFQALQIPTK EYLKDPKSK	gi 67083831	60S acidic ribosomal protein P0 [<i>Ixodes scapularis</i>]	96	9%
PE10	GAAQNIIPASTGAAK VPTPDVSVDLTCR EATYDEIK	gi 41394411	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [<i>Phormictopus sp.</i>]	154	12%
PE11	GMEIVIPAGVPR DDLFRNTNASIVR RIQEAETGTVQAK	gi 241243545	malate dehydrogenase, putative [<i>Ixodes scapularis</i>]	173	11%
PE12	EICYDV LGLLDK YLAEVATGEQR AYQEAFDISK MQPTPIR	gi 241781373	hypothetical protein iscW_1SCW014417 [<i>Ixodes scapularis</i>]	144	40%
PE13	APTVPVGYT TAR GVHF EDKRYEFGPA PTYEK LTQSLAILR RLADSLPR RF EQLPNLKKEYFASDK	gi 19848969	glutathione S-transferase [<i>Boophilus microplus</i>]	383	29%
PE14	SKKIHLTDDSDFTDVLK MIAPILDEIADEYQK LNIDQNPGTAPK LNIDQNPGTAPK	gi 148071	thioredoxin [<i>Escherichia coli</i>]	367	50%

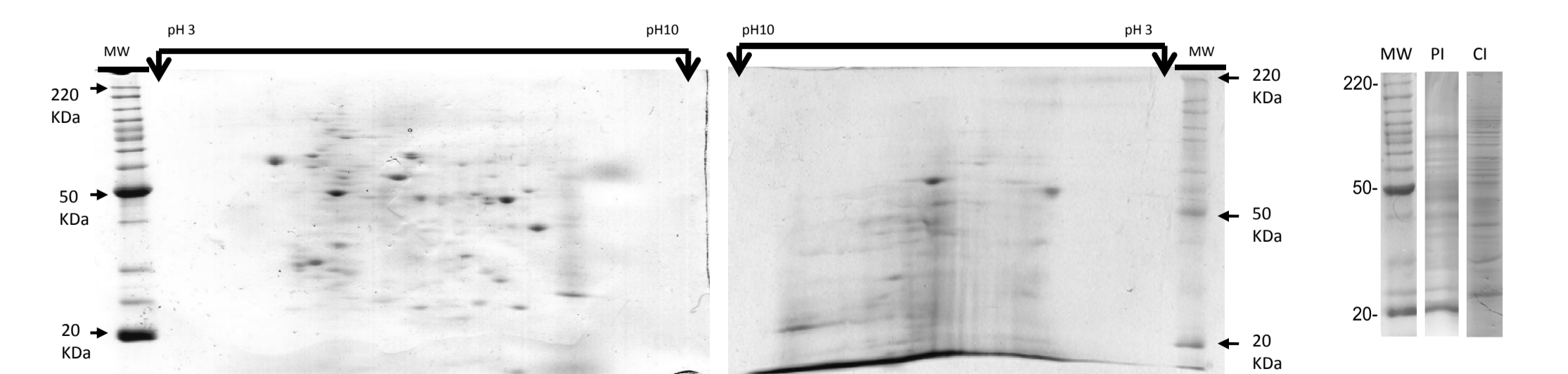


Figura 1: Eletroforese 2D de glândula salivar de fêmeas completamente ingurgitadas de *R. microplus*. Tira de IPG de 7 cm, pH 3-10. Gel de poliacrilamida 12%, corado com Comassie brilliant blue G. Extrato de glândula salivar (100 µg) tratado com ReadyPrep 2D Cleanup Kit (Bio-Rad).

Figura 2: Eletroforese 2D de glândula salivar de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus*. Tira de IPG de 7 cm, pH 3-10. Gel de poliacrilamida 12%, corado com Comassie brilliant blue G. Extrato de glândula salivar (100 µg) tratado com ReadyPrep 2D Cleanup Kit (Bio-Rad).

Figura 3: Eletroforese 1D de glândula salivar de fêmeas parcialmente ingurgitadas (PI) e completamente ingurgitadas (CI) de *R. microplus*

Conclusões:

A análise proteômica permitiu identificação de algumas proteínas de glândula salivar de fêmeas de *R. microplus*. A partir de comparação pela análise computacional (PDQuest 2D software (Bio-Rad)), foi determinada a diferença de expressão proteica: 121 em fêmeas completamente ingurgitadas e 152 nas completamente ingurgitadas. Este órgão é um bom alvo para desenvolvimento de vacinas carrapaticidas assim como fonte de moléculas com atividade farmacológica. Estudos estão em andamento para obter maior número e caracterizar funcionalmente as proteínas encontradas.