

Efeito de serpinas de *Rhipicephalus microplus* na liberação de peróxido de hidrogênio de macrófagos



SCHAFHAUSER, D. C. ¹; DA SILVA VAZ, I. ^{1,2,3}

¹Centro de Biotecnologia, UFRGS; ²Faculdade de Veterinária, UFRGS; ³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Brasil



INTRODUÇÃO

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasita hematófago da família dos ixodídeos, que apresenta um período de alimentação de em média 21 dias.

Durante a fase parasitária, o carrapato libera, através de sua saliva, diversas proteínas como, por exemplo, serpinas (*serine protease inhibitors*) que, em outras espécies de carrapatos já foram descritas como tendo um papel modulatório do sistema imune do hospedeiro. Dentre as serpinas presentes na saliva do *R. microplus* três sequências genicas foram previamente clonados e as proteínas expressadas e purificadas.

Os macrófagos são células fagocíticas do sistema imune, que atuam endocitando o antígeno, formando assim o fagossomo. Após a endocitose, o fagossomo se funde com o lisossomo formando o fagolisossomo. No fagolisossomo, o peróxido de hidrogênio provoca a oxidação do antígeno e, em conjunto com enzimas, a hidrólise proteica. No fim do processo, o fagossoma é exocitado, liberando o conteúdo.

OBJETIVO: Padronização do ensaio sobre os efeitos de três serpinas recombinantes (RmS-3, RmS-6 e RmS-17), sobre macrófagos peritoneais murinos a partir da quantificação do peróxido de hidrogênio liberado pela fagocitose.

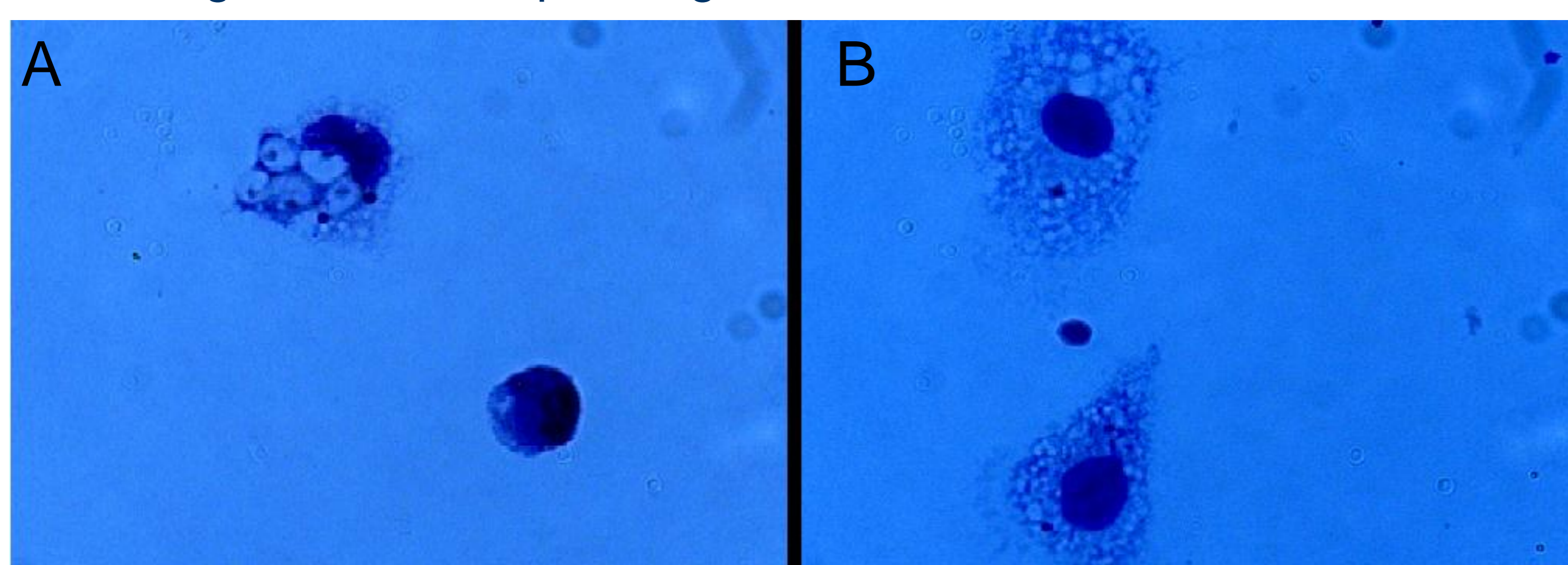
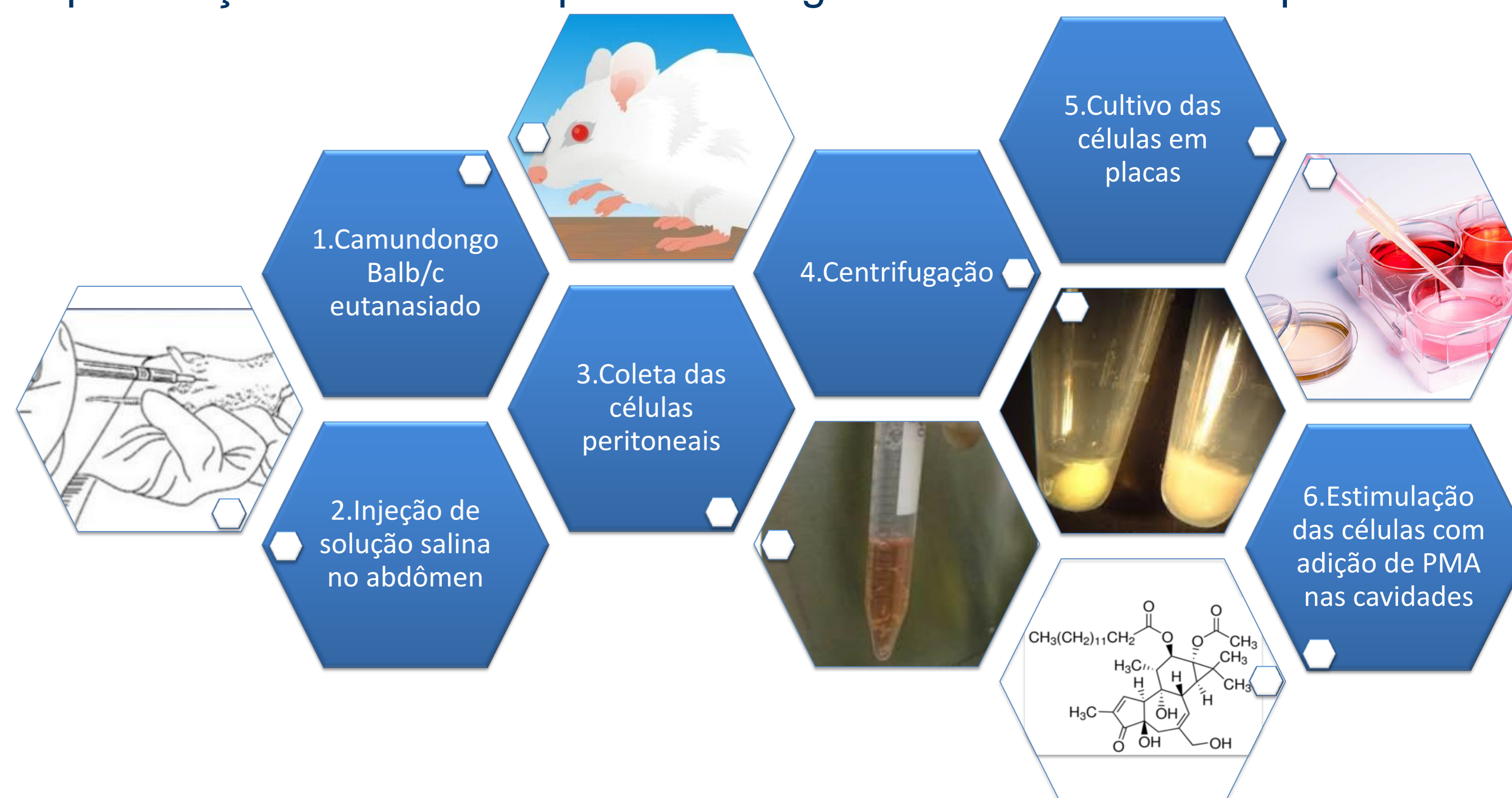


Figura 1: Fotos representativas do processo de fagocitose tiradas em microscopia ótica sob lente de imersão 100x (A) Mostra foto de macrófago em meio a fagocitose de partículas de zimozan, (B) Há apenas macrófagos espalhados sem fagocitose.

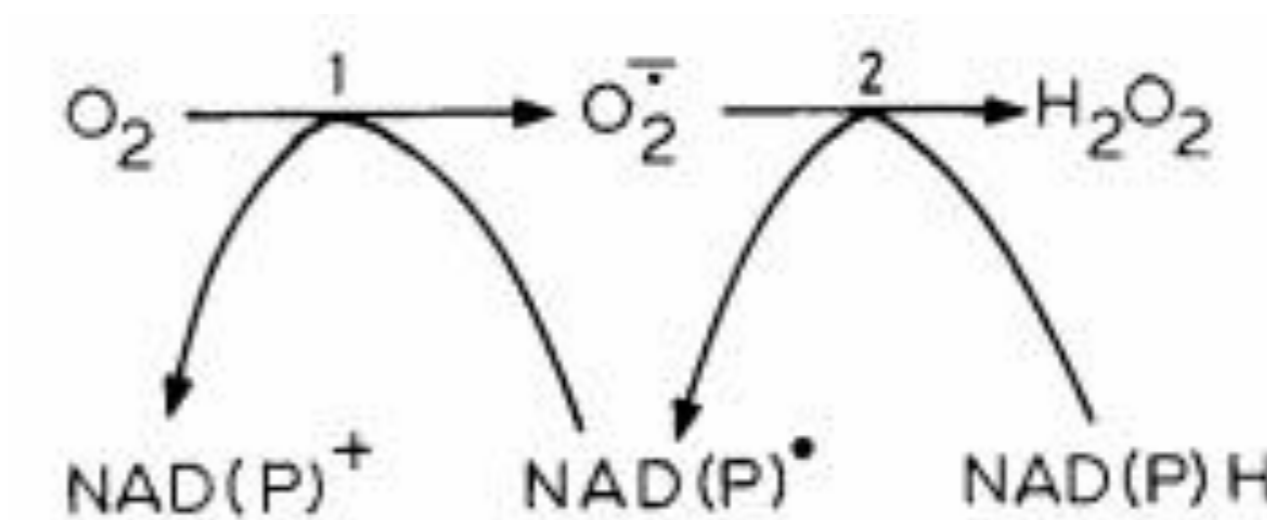
MATERIAIS E MÉTODOS

A sequência codificadora das serpinas Rms-3, Rms-6 e Rms-17 foram clonadas em *Pichia pastoris* X-33 usando o vetor pPICZαC. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade a níquel.



Para preparação da curva padrão de peróxido de hidrogênio foi feita uma diluição seriada de base 2 de H_2O_2 , obtendo concentrações de 40, 20, 10, 5 μM . As diferentes concentrações de H_2O_2 diluídas em solução de Hanks contendo fenol vermelho e peroxidase.

Após incubação a 37°C por 1h, foi adicionado 10 μL de uma solução 0,1M de NaOH para interromper a reação. Os resultados foram analisados em espectrofotômetro de placa utilizando comprimento de onda de 650nm.



RESULTADOS

Expressão e purificação: As ORFs dos genes das serpinas foram clonados e as proteínas RmS-3, RmS-6 e RmS-17 foram previamente expressadas e purificadas.

Cultivo celular: As células obtidas do peritônio foram cultivadas na concentração de 3×10^6 células/mL (100 μL /cavidade por 1h a 37°C e então lavadas com solução salina tamponada (PBS) para remoção das células não aderidas.

Padronização da curva de concentração: As concentrações escolhidas para padronização da curva estão dentro da faixa de linearidade relatada pela literatura. As densidades ópticas (DO) observadas no gráfico 1 foram obtidas utilizando como controle a média da DO das cavidades sem adição de H_2O_2 .

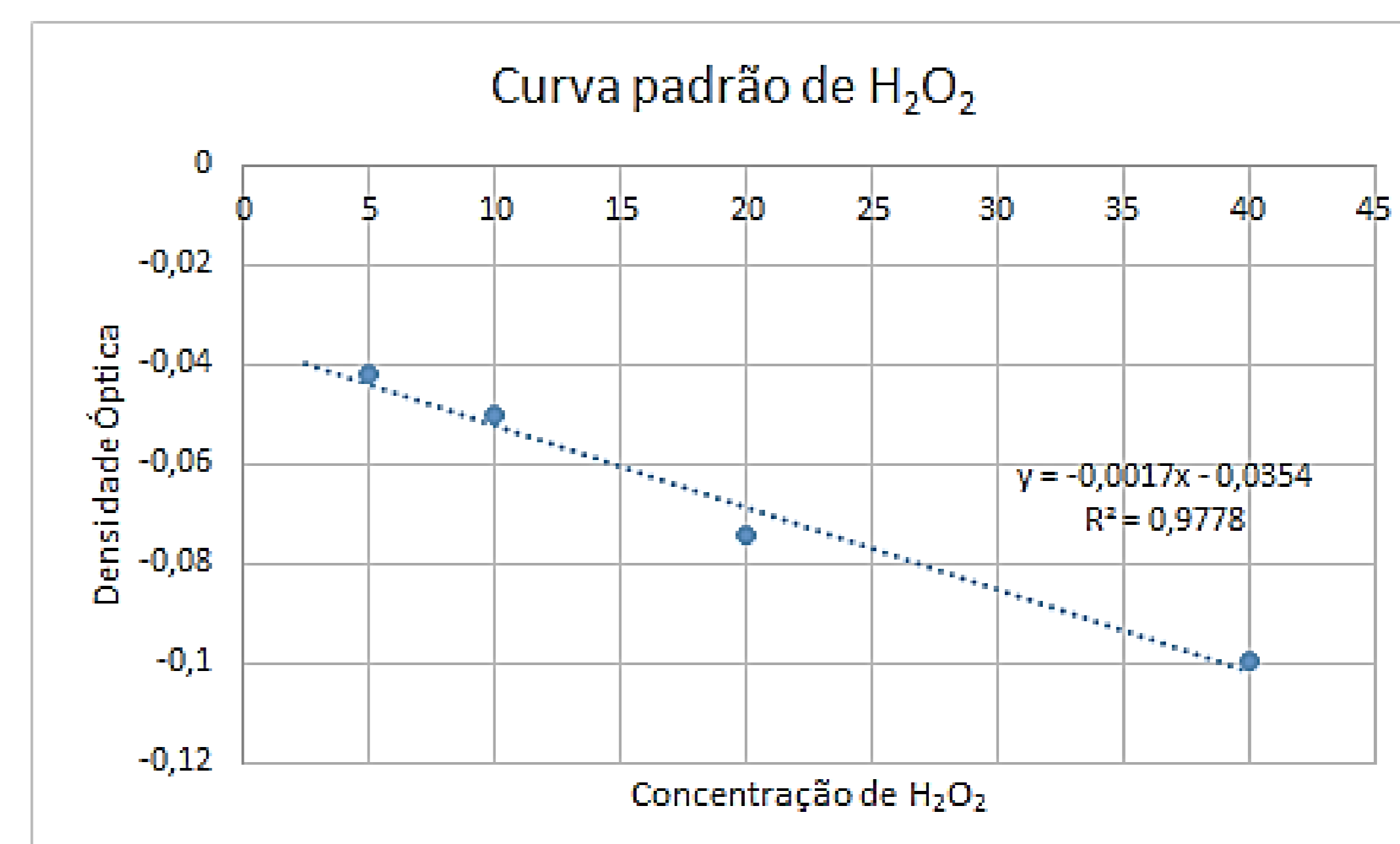
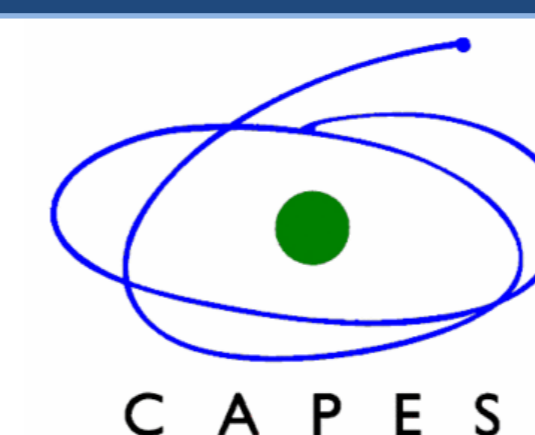


Gráfico 1: Curva padrão da concentração de peróxido de hidrogênio e absorbância obtida, utilizando macrófagos residentes estimulados com PMA.

PERSPECTIVAS

A partir dessa padronização será possível avaliar o efeito das serpinas na liberação de peróxido de hidrogênio de macrófagos estimulados com PMA.

AGÊNCIAS DE FOMENTO



Bolsista de iniciação científica-PIBIC

