



Atividade enzimática de aminotransferase durante o desenvolvimento embrionário de *Rhipicephalus microplus*

Roberto Carlos do Nascimento Junior^{1,2}, Carlos Termignoni^{1,3}

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

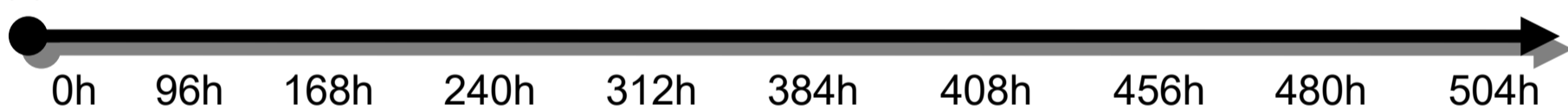
INTRODUÇÃO

Carrapatos são aracnídeos hematófagos que atuam como vetores de uma grande variedade de patógenos, incluindo vírus, bactérias e fungos. O carrapato *Rhipicephalus microplus* é o principal ectoparasita de rebanhos bovinos em várias regiões do mundo e vetor dos agentes causais da Tristeza Parasitária Bovina, doença endêmica em bovinos no Brasil, resultando assim em grandes prejuízos na pecuária nacional através de danos diretos e indiretos. Os prejuízos anuais no Brasil são estimados em cerca de US\$ 3 bilhões de dólares. Os atuais métodos de controle se resumem sobretudo na utilização de acaricidas químicos, que além de serem possíveis contaminantes ambientais quando não utilizados e descartados de maneira adequada, ainda facilitam a seleção de indivíduos resistentes ao princípio ativo em questão. Tendo em vista os prejuízos econômicos causados pelo parasitismo e as atuais dificuldades de controle, novos estudos acerca da embriogênese do artrópode são uma alternativa para propor métodos de controle eficientes. O objetivo desse projeto é determinar como a atividade da enzima aspartato aminotransferase evolui durante o desenvolvimento embrionário do carrapato *R. microplus* e contribuir para o entendimento do metabolismo energético do artrópode, bem como a realização da caracterização enzimática da enzima AST recombinante obtida a partir da clonagem da respectiva sequência codificadora do carrapato

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de ovos embrionados de *R. microplus*

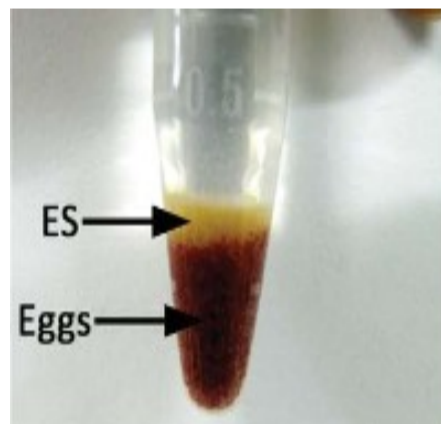
Para determinar a atividade enzimática da aspartato aminotransferase em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário, fêmeas teleógenas de *R. microplus* foram coletadas e submetidas a condições favoráveis de temperatura (28° C) e umidade (80%) para oviposição. A coleta de ovos foi padronizada de acordo com o tempo de desenvolvimento dos embriões, e foram coletados e pesados ovos de 24h, 96h, 168h, 240h, 312h, 384h, 408h, 432h, 456h, 480h e 504h.



Teleógena e massa de ovos postos



Coleta de ovos nos respectivos dias de acordo com o tempo de desenvolvimento embrionário



Extrato bruto de ovos após massagem com pistilo

Preparação do homogenato bruto de ovos

Após a pesagem dos ovos de diferentes estágios de desenvolvimento embrionário, os mesmos foram submetidos a maceração com auxílio de pistilo, seguida da centrifugação da amostra a 10.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante contendo dejetos celulares foi descartado e somente a porção solúvel da amostra foi mantida.

Determinação da atividade enzimática aspartato aminotransferase

O protocolo de determinação da atividade enzimática foi padronizado. O substrato (qual) foi incubado em tampão xxxx, pH, com amostras por 30 minutos a 37 °C e em seguida a reação foi interrompida pela adição NaOH (4M). A intensidade da cor em meio alcalino do produto gerado na reação foi determinada com auxílio de espectrofotômetro.

Extração total de RNA

Fêmeas teleógenas foram dissecadas com auxílio de estereoscópio, coletou-se intestinos médio, ovários e glândulas salivares. Os órgãos coletados, assim como os ovos embrionados, foram submetidos a protocolo de extração de RNA e posterior síntese de cDNA.

RESULTADOS

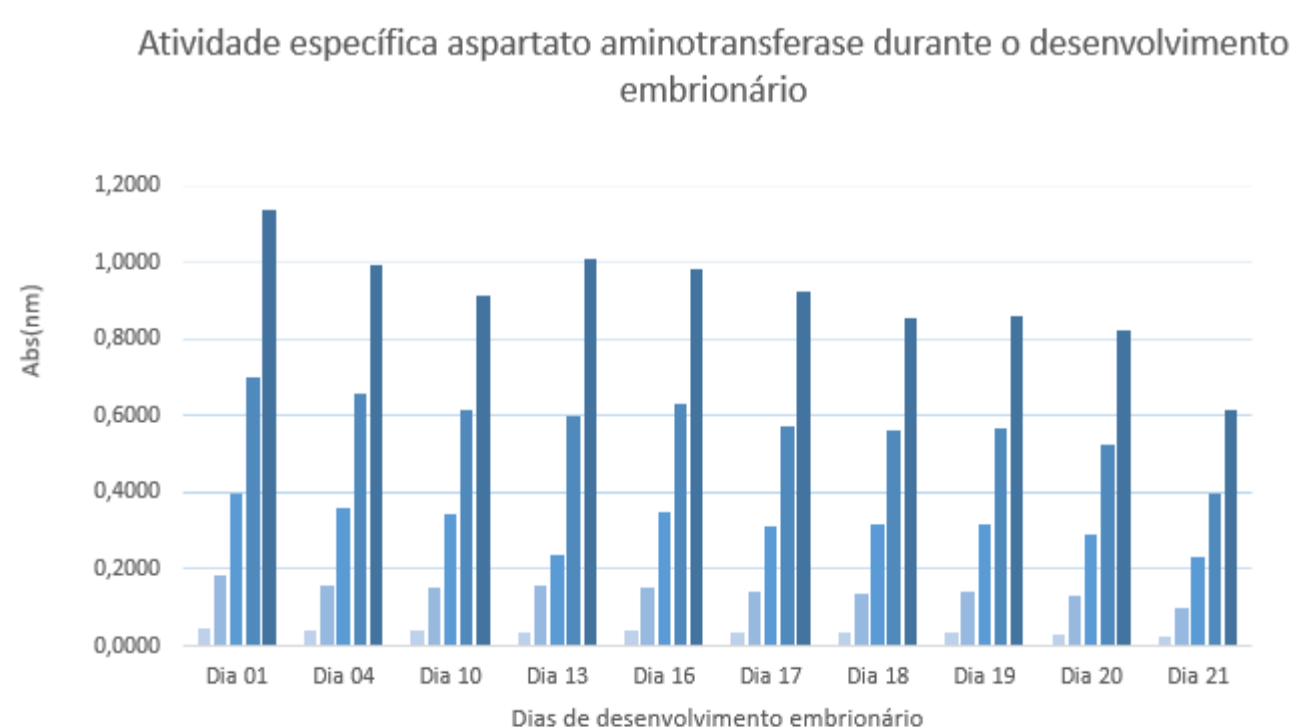


Imagem 1. Atividade da enzima aspartato aminotransferase (TGO) de *R. microplus* em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário

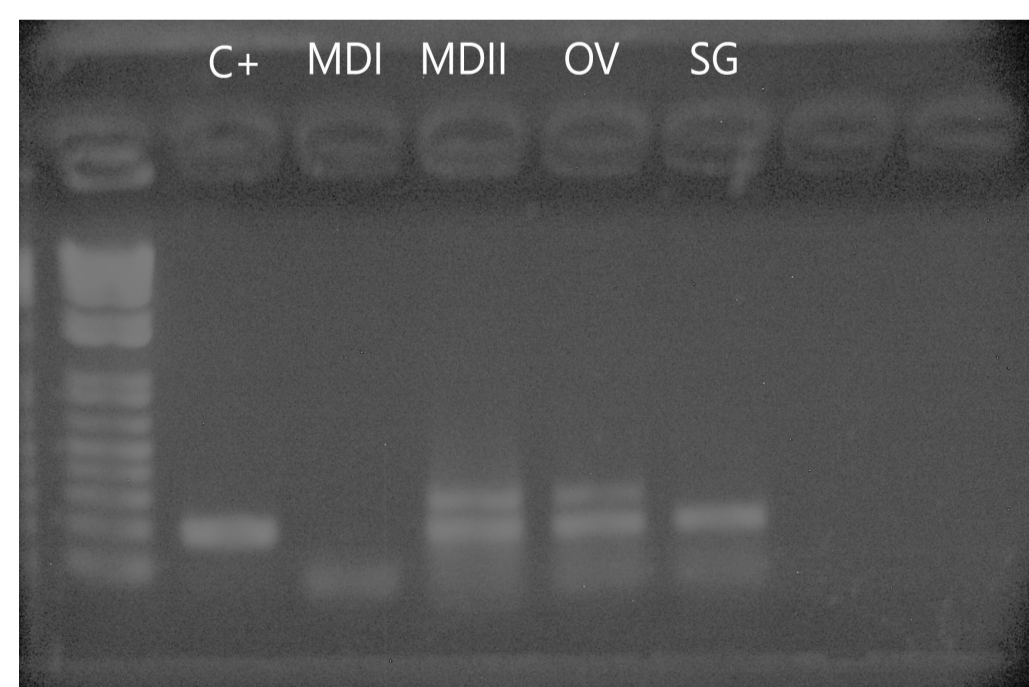


Imagem 2. Gel de eletroforese de RNA total extraído pré-tratamento com DNAase de fêmea teleógena de *R. Microplus* MD Intestino médio. OV ovário. SG glandula salivar. C+ actina

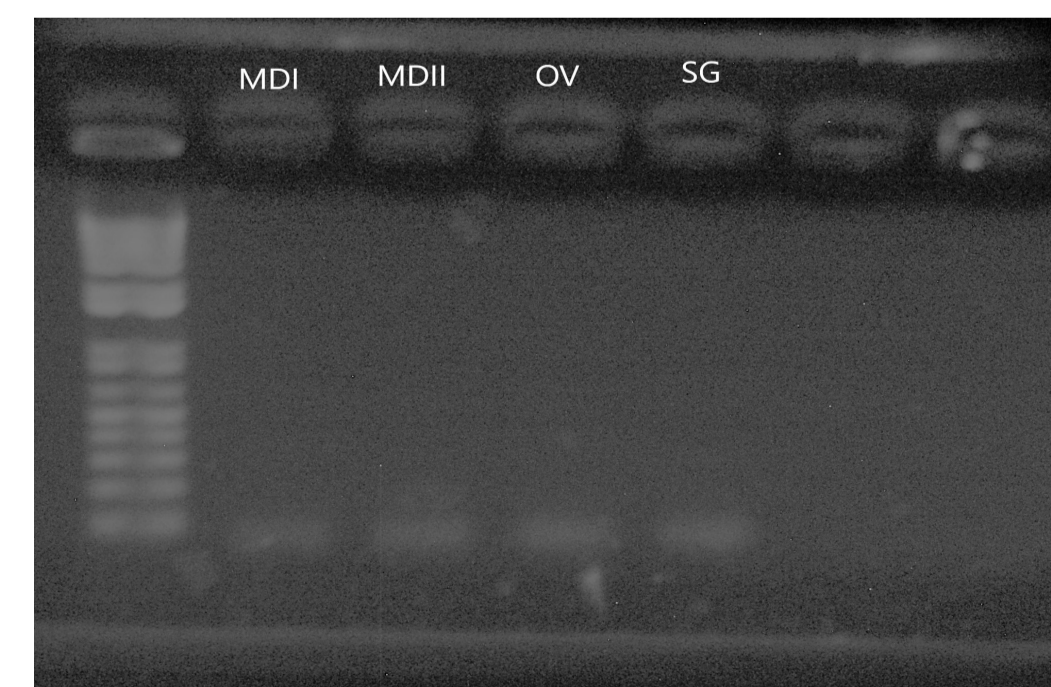


Imagem 3. Gel de eletroforese de RNA total extraído de fêmea teleógena de *R. microplus* após tratamento com DNAase MD Intestino médio. OV ovário. SG glandula salivar.

CONCLUSÃO

Através das análises dos resultados obtidos a partir dos ensaios enzimáticos, conclui-se que a atividade da aspartato aminotransferase varia durante a dinâmica do metabolismo energético embrionário de *R. microplus*, isso sugere uma multifuncionalidade dessa proteína que pode estar desempenhando diferentes funções de acordo com o tecido em questão. Além disso, sugere ainda uma versatilidade quanto a expressão do gene codificante da aspartato aminotransferase. Novos estudos moleculares estão em andamento para elucidar o papel da aspartato aminotransferase na embriogênese de *R. microplus*.