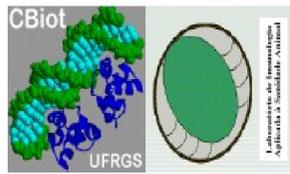


# Clonagem e expressão de uma cistatina do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* do isolado Uruguaio.



Ferreira V.<sup>1</sup>; Rodrigues F.<sup>1</sup>; Parizi L.F.<sup>1</sup>; Acevedo C.<sup>4</sup>; Benavides U.<sup>4</sup>; Masuda A.<sup>1,2</sup>  
& da Silva Vaz I. Jr.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Centro de Biotecnologia UFRGS, Brasil, <sup>2</sup> Dep. de Biologia Molecular e Biotecnologia UFRGS, Brasil, <sup>3</sup> Fac. de Veterinária UFRGS, Brasil, <sup>4</sup> Laboratório de Imunologia, Fac. de Veterinária, UDELAR, Uruguai



## Introdução

O carrapato *R. microplus* é um ectoparasita hemofágico que afeta economicamente o rebanho bovino. Está relacionado aos danos causados na produção animal e também na transmissão de doenças. O carrapato *R. microplus* também é vetor de doenças tais como a Babesiose (*Babesia bovis* e *Babesia bigemina*), a Anaplasmoze (*Anaplasma marginale*) agentes que causam a tristeza parasitária bovina. Um dos métodos utilizados para o controle desse ectoparasita é o uso de acaricidas. Alguns dos principais problemas da utilização de produtos químicos é a seleção de populações resistentes aos acaricidas, danos ao meio ambiente e prejuízo na produção de leite e carne. Outro método alternativo é o controle imunológico através de vacinas, baseadas na identificação de moléculas do carrapato que induzem uma resposta imune que protege do carrapato. Atualmente já existe vacina para o controle deste ectoparasita, porém é eficiente apenas em alguns países. Sendo assim, a identificação de novos antígenos para o desenvolvimento de novas vacinas é um objetivo de vários grupos de pesquisa. As cistatinas são proteínas inibidoras reversíveis de cisteína endopeptidases e são encontradas em todos os organismos. Neste trabalho estudamos uma cistatina expressa nas glândulas salivares do carrapato. Estudos recentes em outras espécies de carrapatos mostraram que cistatinas são importantes para o sucesso da alimentação. Devido a esta função, as cistatinas podem ser alvos potenciais para o controle do carrapato.

## Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi clonar e expressar a região codificante de uma cistatina de *R. microplus* de um isolado do Uruguai para comparar com cistatinas de isolados brasileiros.

## Métodos

A ORF do gene da cistatina foi obtida por RT-PCR e clonada em pGEM-T. A região de codificação foi amplificada e o fragmento com 387pb foi clonado no vetor de expressão pET5a, a clonagem foi confirmada por PCR, hidrólise com enzimas de restrição e sequenciamento (Figura 2). Sequenciamento e análise dos clones mostrou diferenças de quatro de 129 aminoácidos entre as cistatinas dos isolados brasileiro e uruguaio (Figura 1). A expressão de cistatina recombinante foi padronizada em *Escherichia coli* C41 cepa foi transformada com plasmídeo resultante e análise de expressão foi realizada por SDS-PAGE e Western blot. A proteína foi expressa após incubação overnight a 20 ° C com 1 mM de IPTG (Figura 3). Antigenicidade foi verificada através da sequência da cistatina do isolado uruguaio (Figura 4).

## Resultados

```
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
Cistatina - Uruguaio MARMVSIALLVLTALIAVSLAIPGGWSTKEPSSSPKYKELAHFVVAQRVEGLQKYDVLKLTKEVETQIVAGVNYRLTFTITTTDCIIAEVEYNAERCPPKHNQAKATCTAVVYERPEWNRSLTSLRCA
Cistatina - Brasil .....V.....V.....D.....S.....
```

FIGURA 1. Alinhamento das sequências de aminoácidos das cistatinas de *R. microplus* de isolados Uruguaio e Brasileiro.

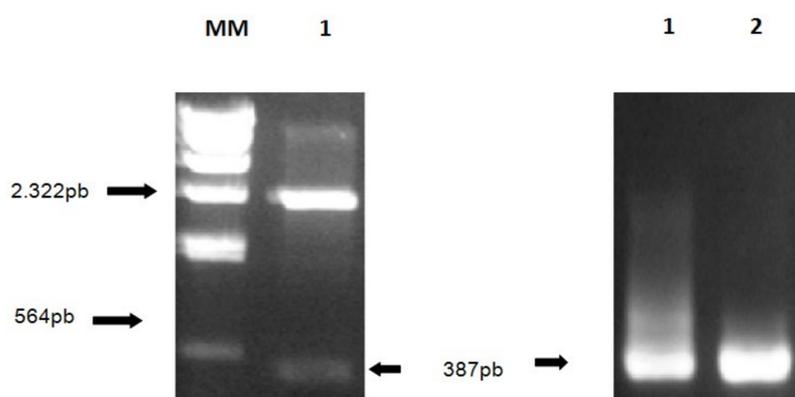


FIGURA 2. Hidrólise e PCR dos clones visualizados em gel de agarose 0,8%. MM, marcador de massa molecular; (A) Hidrólise pET5a-Cis com enzimas de restrição *Nde I* e *BamH I*. (B) 1 controle positivo (pGEM - Cis); 2 clone pET5a-Cis



FIGURA 3. Western blot da expressão do clone pET5a-Cis em *E. coli* C41. MM, Marcador de Massa Molecular; 1. Pellet 20°C 1mM IPTG; 2. Sobrenadante 20°C 1mM IPTG.



FIGURA 4. Análise da antigenicidade do *R. microplus* cistatina isolado do Uruguai.

## Conclusão e Perspectiva

A análise de sequências da cistatina mostrar que existem diferenças entre *R. microplus* do Brasil e do Uruguai. A purificação da cistatina *R. microplus* do isolado do Uruguai está em andamento para análise da imunogenicidade das proteínas recombinantes.

Apoio:

