

Perfil inibitório de uma cistatina do carrapato *Rhipicephalus appendiculatus*

Konrdörfer, C.R.¹; da Silva Vaz Jr I.^{1,2,3}

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

pro-pesq
Pró-Reitoria de Pesquisa - UFRGS



Introdução

Cistatinas são inibidores de cisteíno peptidases que podem regular a atividade de diferentes catepsinas envolvidas na biologia dos organismos. No caso dos carrapatos, que são ectoparasitas hematófagos, as cistatinas podem ser secretadas na saliva do artrópode, afetando então o sistema imune do hospedeiro. Além disso, as cistatinas também atuam na regulação do processamento do sangue durante a digestão pelo carrapato. A caracterização de cistatinas de diferentes espécies é importante para entender o papel fisiológico destes inibidores e para ajudar no desenvolvimento de novas estratégias de controle desses parasitas. A espécie de carrapato *Rhipicephalus appendiculatus* é responsável pela maioria dos prejuízos econômicos na pecuária nos países africanos, além de transmitir patógenos. Com o objetivo de aumentar o entendimento do papel fisiológico das cistatinas de carrapatos, foi analisada a sequência de aminoácidos de uma cistatina de *R. appendiculatus*, QnRacys2a. Além disso, sua forma recombinante (rQnRacys2a) foi expressa e caracterizada em relação ao seu perfil inibitório contra enzimas.

Materiais e métodos

A sequência predita de aminoácidos da proteína QnRacys2a foi alinhada com sequências de cistatinas de diferentes espécies de carrapatos. A expressão da rGST-QnRacys2a foi realizada utilizando a bactéria *Escherichia coli* cepa BL21(DE3) pLysS. A cistatina recombinante foi expressa conjugada a GST em uma forma quimérica com o objetivo melhorar a expressão da proteína de interesse. rGST-QnRacys2a foi purificada por cromatografia de afinidade e hidrolisada com trombina. O perfil inibitório da rQnRacys2a foi caracterizado para catepsina C e α quimi tripsina, ambas de origem bovina.

Resultados

1. Alinhamento e motivos conservados de cistatinas

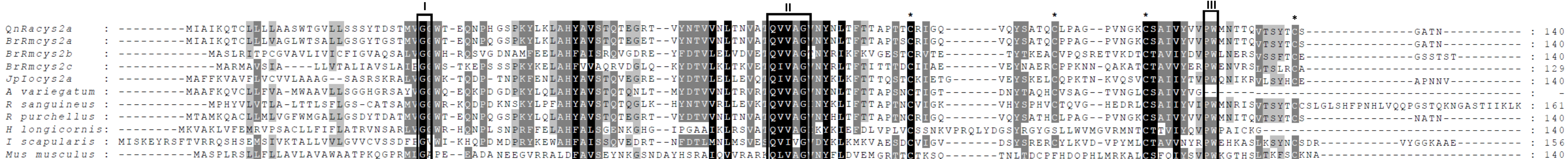


Figura 1. Alinhamento e motivos conservados de cistatinas. Os três motivos conservados característicos de cistatinas estão destacados pelas caixas pretas. I. Glicina Da região N-terminal. II. Grupo QXVVG. III. Aminoácidos PW localizados na região C terminal. Estes três motivos conservados formam uma estrutura inibitória que interage com o centro catalítico das cisteíno proteases. As quatro cisteínas características das cistatinas tipo 2 estão destacadas acima das sequências por asteriscos. Aminoácidos conservados estão indicados nas regiões sombreadas.

2. Expressão, purificação e hidrólise da rGST-QnRacys2a

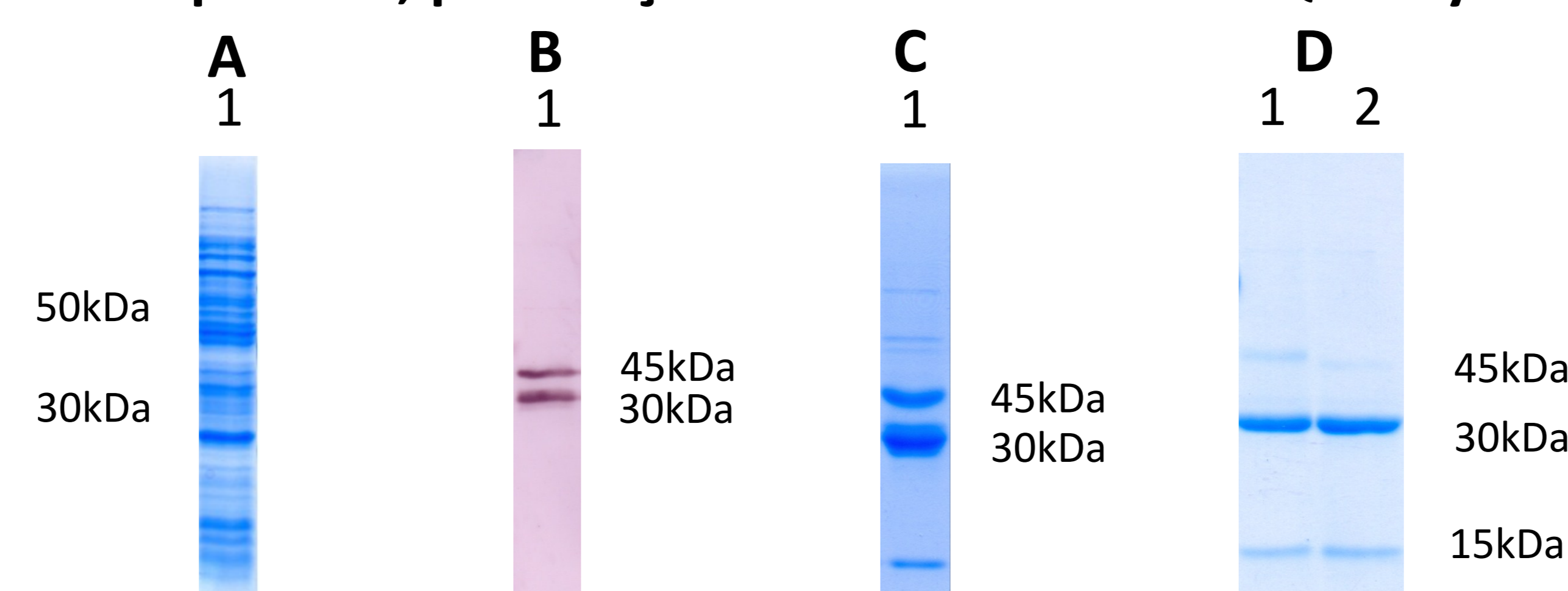


Figura 2. Expressão, purificação e hidrólise da rGST-QnRacys2a. A. Extrato protéico da expressão. 1) Sobrenadante após sonicação B. Western blot usando anticorpo policlonal contra GST. C. Proteína após purificação. D. GST+Cistatina após hidrólise com trombina e purificação. 1) 3 horas de hidrólise. 2) 7 horas de hidrólise (final).

3. Perfil inibitório da rQnRacys2a

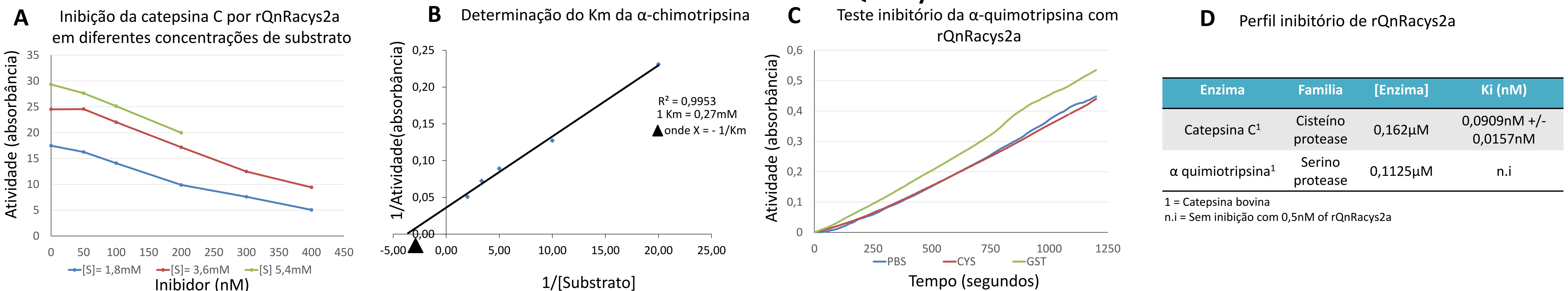


Figura 3. Perfil inibitório da rQnRacys2a. A. Inibição da catepsina C com rQnRacys2a em diferentes concentrações de substrato. B. Determinação do km da α -quimi tripsina C. Teste de inibição da α -quimi tripsina com rQnRacys2a. D. Perfil inibitório da rQnRacys2a.

Conclusão

A sequência de aminoácidos da QnRacys2a apresentou níveis de identidade entre 30% e 91% com cistatinas de carrapatos. A inibição da catepsina B sugere que QnRacys2a pode estar envolvida nos processos finais de digestão da hemoglobina no carrapato *R. appendiculatus*. A não inibição da enzima α -quimi tripsina mostra que QnRacys2a não é capaz de inibir serino proteases. As medidas de inibição com catepsina B e L estão em andamento. Além disso, as condições de larga escala de expressão e purificação da rQnRacys2a estão sendo estabelecidas. Por fim, um experimento de vacinação também está sendo realizado para testes de proteção contra tecidos de *R. appendiculatus* e *R. microplus*, além de alimentação artificial para verificar a ação de anticorpos anti-cistatina no carrapato *in vivo*.

Agradecimentos

