

Perfil de inibição enzimática e localização tecidual de uma cistatina do carrapato *Rhipicephalus appendiculatus*



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

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



INTRODUÇÃO

Cistatinas são inibidores de cisteíno proteases presentes na saliva de carrapatos. A função fisiológica de cistatinas do carrapato *Rhipicephalus appendiculatus*, um parasita que causa prejuízos econômicos na pecuária africana, ainda é desconhecida. O objetivo deste trabalho foi estudar o perfil inibitório de uma cistatina de *R. appendiculatus* (QnRacys2a) frente a diferentes enzimas, além da detecção de cistatinas em tecidos desse parasita e também do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*, um parasita presente em território brasileiro.

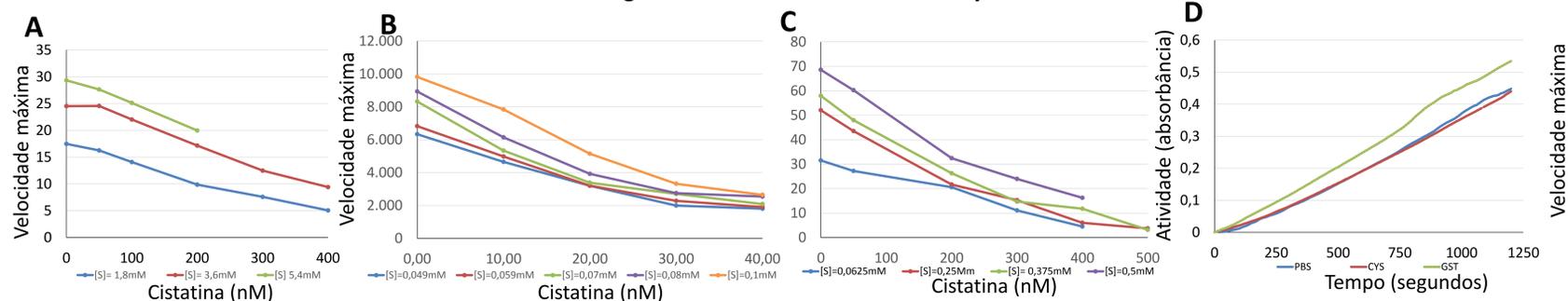
MATERIAIS E MÉTODOS

A sequência predita de aminoácidos da proteína QnRacys2a foi analisada, a ORF (*Open Reading Frame*) clonada e a proteína foi expressa em *Escherichia coli*. A proteína recombinante foi purificada e os ensaios enzimáticos foram realizados para avaliar o seu perfil inibitório para as catepsinas B, C, L, rBmCL1 (cisteíno proteases) e α -quimotripsina (serino protease). A imunização com a proteína recombinante foi realizada em coelho e o soro anti-rQnRacys2a foi utilizado em western blot para determinar sua imunogenicidade e auxiliar na localização das cistatinas nativas nos tecidos de *R. appendiculatus*. Também foi avaliada a capacidade do soro anti-rQnRacys2a de reconhecer de forma cruzada cistatinas nativas do carrapato *R. microplus* em diferentes tecidos. As estruturas tridimensionais de QnRacys2a e BrBmCys2c foram previstas por modelagem comparativa por homologia.

RESULTADOS

rQnRacys2a inibiu todas as cisteíno proteases (Figura 1), inclusive rBmCL1, uma catepsina L recombinante do carrapato *R. microplus*. (Figura 1E). Confirmando a especificidade inibitória de rQnRacys2a, a cistatina não inibiu a atividade da α -quimotripsina (Figura 1B). A estrutura protéica tridimensional da QnRacys2a apresenta cinco folhas- β paralelas, dois loops e uma α -hélice, característica das cistatinas da família II. Sua estrutura predita é similar ao arranjo da proteína BrBmCys2c (Figura 2). O western blot mostrou que rQnRacys2a foi imunogênica (Figura 3B). A presença de QnRacys2a foi detectada em larva e adulto não alimentados de *R. appendiculatus* (Figura 3C). Já em *R. microplus*, cistatinas similares de QnRacys2a foram detectadas em intestino de teleóquina e ninfa alimentada (Figura 3D).

Figura 1. Perfil inibitório de rQnRacys2a



Enzima	Familia	[Enzime]	Ki (nM)
Catepsina B ¹	Cisteíno protease	0.385 μ M	4,51nM
Catepsina C ¹	Cisteíno protease	0.162 μ M	90,9nM
Catepsina L ²	Cisteíno protease	0043 μ M	0,47nM
BmCL1 ³	Cisteíno protease	0,018 μ M	21,675nM
α -quimotripsina ¹	Serino protease	0.1125 μ M	n.i

1 = Origem bovina; 2 = Origem humana; 3 = Origem de *R. microplus*
n.i = não houve inibição com 500nM de rQnRacys2a

Figura 1. Perfil inibitório de rQnRacys2a. A. Inibição da catepsina C por rQnRacys2a em diferentes concentrações de substrato. B. Inibição da catepsina L por rQnRacys2a em diferentes concentrações de substrato. C. Inibição da catepsina B por rQnRacys2a em diferentes concentrações de substrato. D. Teste de inibição da α -quimotripsina com rQnRacys2a. E. Tabela com valores da constante de inibição de rQnRacys2a para cada enzima;

Figura 2. Comparação entre QnRacys2a e BrBmCys2c, uma cistatina de *R. microplus*

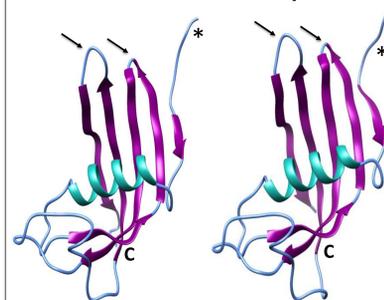


Figure 2. Comparação entre QnRacys2a e BrBmCys2c, uma cistatina de *R. microplus*. A. A estrutura de QnRacys2a com os loops 1 e 2 são indicadas por setas; A região N-terminal é indicada por um asterisco. A região C-terminal é apontada pela letra C. B. Marcações similares a A.

Figura 3. Expressão de QnRacys2a, imunogenicidade da proteína recombinante e localização de cistatinas nativas em tecidos de *R. appendiculatus* e *R. microplus*

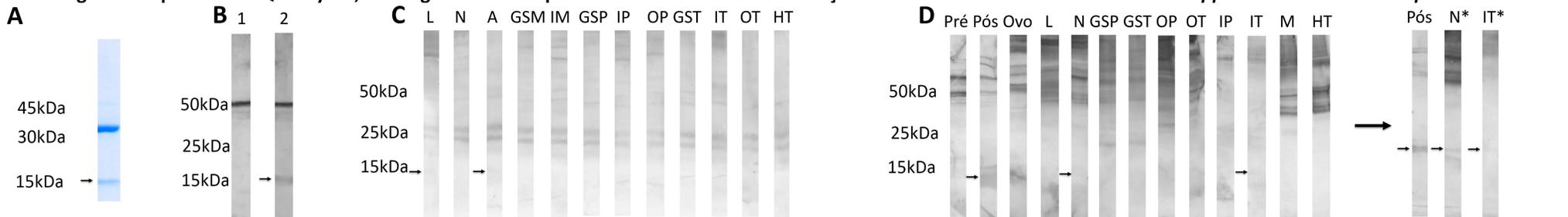


Figura 3. Expressão de QnRacys2a, imunogenicidade da proteína recombinante e localização de cistatinas nativas em tecidos de *R. appendiculatus* e *R. microplus*. A. SDS-page de GST+Cistatina (GST com 25kDa e cistatina com 15kDa) depois da purificação. B. Western blot utilizando soro pré-imune (1) e anti-rQnRacys2a (2). C. Western blot utilizando soro anti-rQnRacys2a contra tecidos de *R. appendiculatus* (L – larva; N – ninfa; A – adulto; GSM – glândula salivar de macho; IM – intestino de macho; GSP – glândula salivar de partenóquina; IP – intestino de partenóquina; OP – ovário de partenóquina; GST – glândula salivar de teleóquina; IT – intestino de teleóquina; OT – ovário de teleóquina; HT – hemolinfa de teleóquina). D. Western blot utilizando soro anti-rQnRacys2a contra tecidos de *R. microplus* (Pré – soro pré-imune contra rQnRacys2a; Pós – soro pós-imune contra rQnRacys2a; Ovo; L – larva; N – ninfa; GSP – glândula salivar de partenóquina; GST – glândula salivar de teleóquina; OP – ovário de partenóquina; OT – ovário de teleóquina; IP – intestino de partenóquina; IT – intestino de teleóquina; M – macho; HT – hemolinfa de teleóquina. Em N* e IT* confirma-se a presença de cistatinas similares em ninfa e intestino de teleóquina.

CONCLUSÕES

- QnRacys2a mostrou a capacidade de inibir cisteíno proteases e não serino proteases;
- QnRacys2a é capaz de inibir uma catepsina nativa de *R. microplus*, indicando possível semelhança e ortologia entre cistatinas das duas espécies;
- QnRacys2a apresentou uma estrutura característica de cistatinas do tipo II, sendo similar à estrutura de BrBmCys2c, uma cistatina de *R. microplus*;
- A reação cruzada entre os anticorpos anti-QnRacys2a com cistatinas de *R. microplus* e os resultados prévios de vacinas baseadas em cistatinas sugerem que rQnRacys2a poderia ser utilizada na construção de uma vacina multi-espécie;
- Como perspectiva, a ação de anticorpos anti-QnRacys2a contra *R. microplus* está em avaliação através de um experimento de alimentação artificial.

Agradecimentos:

