

# Expressão e purificação de cistatinas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Klein, A. S.<sup>1</sup>, Vaz, I.S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Anelise dos Santos Klein, medicina veterinária, UFRGS

<sup>2</sup> Itabajara da Silva Vaz Júnior, Centro de biotecnologia, UFRGS



**XXV SIC**  
Salão Iniciação Científica

CA - Ciências Agrárias

## Introdução

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é considerado o principal ectoparasita de bovinos, causando prejuízos para a pecuária. Seu controle é feito principalmente com o uso de acaricidas químicos. Devido a problemas com os métodos tradicionais, diversas alternativas para seu controle vem sendo estudadas.

As cistatinas fazem parte de uma família de inibidores de cisteíno-proteases. Essas proteínas podem representar um alvo para o controle dos carrapatos, pois participam de processos fisiológicos, como a modulação das respostas dos hospedeiros contra a infestação. Um grande número desses inibidores foi anteriormente descrito em diversos tecidos dos carrapatos.

## Objetivo

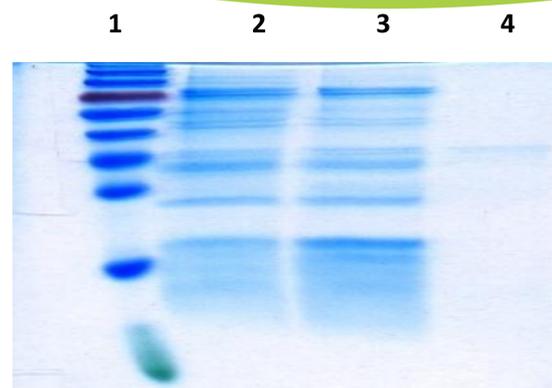
O objetivo do presente trabalho foi expressar as formas recombinantes das cistatinas BrBmcys2a, BrBmcys2b e BrBmcys2c de *R. microplus* e realizar a purificação destas proteínas.

## Materiais e métodos

Em um estudo anterior, três cistatinas de *R. microplus* foram clonadas em vetor de expressão pET-5a sendo que cada sequência possuía em torno de 500pb. Estes plasmídeos foram utilizados na transformação de bactérias *Escherichia coli* cepa C41 (para BrBmcys2a e a BrBmcys2b) e C43 (para a BrBmcys2c). Testes de expressão com estas bactérias foram realizados através da incubação em meio SOB com 0,4 mM de IPTG a 25° C por 16 horas. Após, foi realizada a purificação das proteínas por cromatografia de afinidade por níquel em concentrações de eluição 100, 150 e 500mM de imidazol. As cistatinas foram concentradas e dialisadas em PBS.

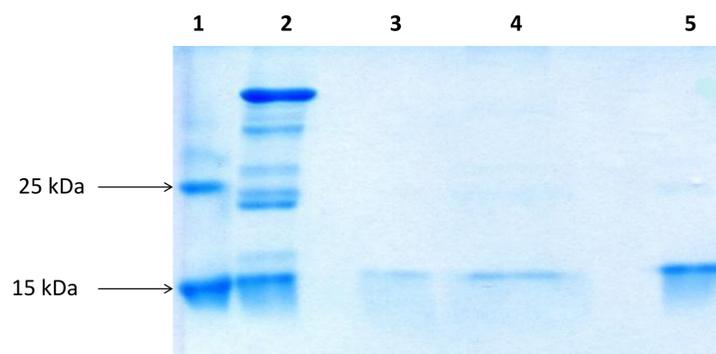
## Resultados

A cistatina BrBmcys2a não foi expressa em níveis detectáveis quando analisada por SDS-PAGE, conforme demonstrado na figura 1

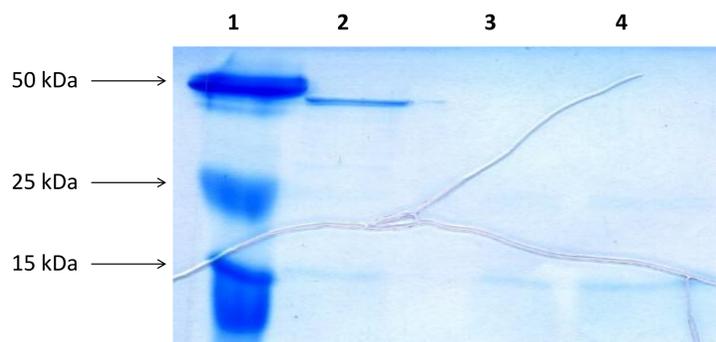


**FIGURA 1.** Purificação da BrBmcys2a com diferentes concentrações de Imidazol analisadas em SDS-PAGE 16%. (1) marcador de massa molecular, (2) fração 100mM de imidazol, (3) fração 100mM de imidazol, (4) fração 150mM de imidazol.

As cistatinas BrBmcys2b e BrBmcys2c foram obtidas em nível satisfatório. O resultado das expressões visualiza-se nas figuras 2 e 3.



**FIGURA 2.** Etapas da produção da cistatina BrBmcys2b, analisadas em SDS-PAGE 16%. (1) marcador de massa molecular, (2) amostra concentrada em Amicon 50k, (3) amostra eluída em Amicon 50k, (4) amostra liofilizada, (5) amostra dialisada.



**FIGURA 3.** Etapas da produção da cistatina BrBmcys2c, analisadas em SDS-PAGE 16%. (1) marcador de massa molecular, (2) amostra concentrada em Amicon 50k, (3) amostra eluída em Amicon 50k, (4) amostra após liofilização e diálise.

## Perspectivas

Obteve-se para as cistatinas BrBmcys2b e BrBmcys2c um bom nível de expressão e purificação, possibilitando a produção em maior escala para a realização de testes de imunização em coelhos e bovinos de forma a avaliar sua capacidade antigênica.



MODALIDADE  
DE BOLSA

**BIC - UFRGS**