

## Introdução

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um dos principais parasitos que afetam economicamente a pecuária bovina. Durante a fase parasitária, um único carrapato suga de 2 a 3 ml de sangue, o que se reflete em perdas na produção de leite e carne, além dos danos ao couro causados pelas lesões e reações inflamatórias nos pontos da fixação do carrapato.

Atualmente o controle do carrapato é feito através do uso de acaricidas que tem o inconveniente de selecionar populações de parasitas resistentes. Uma forma alternativa e promissora para o controle é o uso de vacinas a partir proteínas capazes de induzir uma resposta imune que possa interferir na fisiologia do carrapato.

As Cistatinas são proteínas inibidoras de cisteino endopeptidases. Estamos estudando uma expressa nas glândulas salivares do carrapato. Estudos recentes em outras espécies de carrapatos mostraram que cistatinas são importantes para o sucesso da alimentação.

## Objetivo

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

## Métodos

Previamente, foi obtido um amplicon codificante para uma cistatina extraída de um isolado de *R. microplus* do Uruguai de aproximadamente 400 pb, que foi clonado no vetor pGEM. A partir desse material, a região codificante para a cistatina foi sub-clonada no vetor de expressão pET5a, usando os sítios das enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*. Para confirmação da sub-clonagem, os plasmídeos foram analisados por PCR e hidrólise com enzimas de restrição.

## Resultados

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120

Cistatina - Uruguai MARMVSTIALLVLTALIAVSLAIPGGWSTKEPSSSPKYKELAHFVVAQRVEGLQKYDTVLKLTKEVETQIVAGVNYRLTFTITTTDCIIAEVEYNAERCPPKNNQAKATCTAVVYERPWENVRSLTSLRCA

Cistatina - Brasil .....V.....V.....D.....S.....

FIGURA1. Alinhamento das sequências de aminoácidos das cistatinas de *R. microplus* de isolados Uruguaio e Brasileiro.

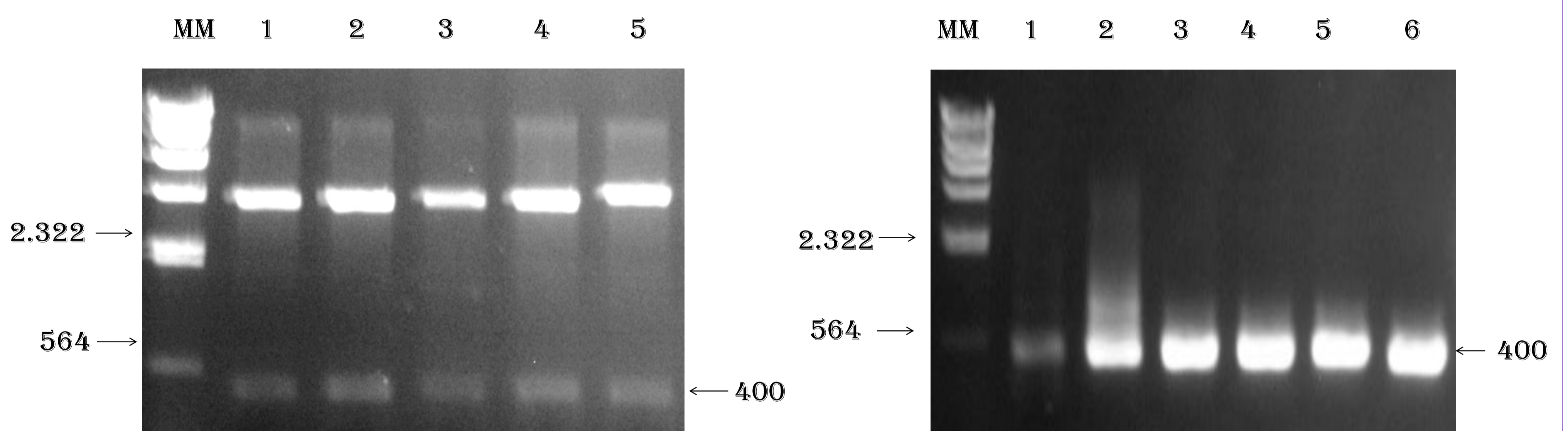


Figura 2 – Hidrólises dos clones visualizados em gel de agarose 0,8 %. MM, marcador de massa molecular; 1 a 5, clones de pET5a-Cis hidrolisados com *NdeI* e *BamHI*.

Figura 3 – PCR dos clones visualizados em gel de agarose 0,8 %. MM, marcador de massa molecular; 1, controle negativo (pET5a); 2, controle positivo (pGEM-Cis); 3 a 6, clones de pET5a-Cis.

## Conclusão e Perspectiva

A clonagem de toda região codificante da cistatina foi confirmada por sequenciamento. A análise dos clones mostrou que existem diferenças entre a cistatina de isolados brasileiros e uruguaio.

A seguir, realizaremos a expressão e a caracterização da cistatina recombinante.