

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ALINE DOMINGUES SCHULER

“CARACTERIZAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PROTEÍNA
GLICOGÊNIO SINTASE QUINASE 3 β DE
Rhipicephalus microplus”

PORTO ALEGRE

2014

ALINE DOMINGUES SCHULER

“CARACTERIZAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PROTEÍNA
GLICOGÊNIO SINTASE QUINASE 3 β DE
Rhipicephalus microplus”

Autor: Aline Domingues Schuler

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção de grau de mestre em Ciências Veterinárias,
na área de Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior

Coorientadora: Dra. Mariana Loner Coutinho

PORTO ALEGRE

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Domingues Schuler, Aline
Caracterização da Inibição da Proteína Glicogênio
Sintase Quinase 3B de *Rhipicephalus microplus* /
Aline Domingues Schuler. -- 2014.
52 f.

Orientador: Itabajara da Silva Vaz Jr..
Coorientador: Mariana Loner Coutinho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Carrapato bovino. 2. Inibição. 3. Glicogênio
sintase. 4. Metabolismo energético. 5.
Serina/treonina quinase. I. da Silva Vaz Jr.,
Itabajara, orient. II. Loner Coutinho, Mariana,
coorient. III. Título.

ALINE DOMINGUES SCHULER

“CARACTERIZAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PROTEÍNA GLICOGÊNIO SINTASE
QUINASE 3 β DE *Rhipicephalus microplus*”

Aprovada em 27 FEV 2014.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Itabajara Vaz Jr.
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Carlos Alexandre Ferreira
Membro da Comissão

Prof. Dr. Carlos Eugênio Silva
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Membro da Comissão

Prof. Dr. Adriana Seixas
Membro da Comissão (suplente)

*Ao meu pai, Meno Fernando, minha luz para seguir em frente,
à minha mãe, Maria Cristina, o cerne do meu ensino e
à minha irmã, Anelise, uma inspiração para a minha vida acadêmica*

AGRADECIMENTOS

Agradeço

à minha família, acima de tudo, que sempre esteve presente me dando suporte em todas as situações, mesmo nos meus momentos de pouca paciência e tolerância;

aos professores Itabajara Vaz Jr., Aoi Massuda, Sandra Farias e Carlos Termignoni pelo conhecimento transmitido durante todo o período de Iniciação Científica e agora de Mestrado;

aos demais professores que me ajudaram a trilhar o caminho que me fez chegar até aqui.

à Mariana Coutinho pela co-orientação e pelos “happy-hours”;

ao Luis Fernando Parizi, que me ajudou a dar os primeiros passos no Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal, e aos demais colegas pela ajuda prestada e pelas risadas compartilhadas;

à Silvia, à Graziela, à Daiana e às demais companheiras dos divertidos almoços no refeitório do CBIOT;

aos meus amigos que entenderam a minha ausência durante os períodos conturbados e mesmo assim estiveram sempre presentes fosse para nos divertirmos ou para me consolar, em especial ao Marco Alexandre Silva pelos cafezinhos desestressantes, à Juciana Cazarolli pela força, ao Bernardo Rosenberg pelo apoio, à Ana Carolina Joazeiro e à Anelise Klein pela amizade e companhia no Campus do Vale;

ao Ali, ao Apolo e ao Galileu pelo amor e felicidade incondicionais;

e por fim à UFRGS pela formação e oportunidades oferecidas.

*“ É do buscar e não do achar
que nasce o que eu não conhecia.”*

Clarice Lispector

RESUMO

O *Rhipicephalus microplus* é um parasita obrigatório hematófago, monoxeno, que gera grande impacto econômico a partir da ação espoliativa sobre o seu hospedeiro preferencial. A glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3), uma proteína altamente conservada e ubiquamente expressa entre diversas espécies, foi identificada no carrapato bovino sob a isoforma GSK-3 β . Envolvida na modulação da atividade da proteína glicogênio sintase, como um agente regulador da síntese de glicogênio, essa proteína atua no metabolismo energético do *R. microplus*. A GSK-3 também está envolvida na via de sinalização Wnt, e por isso, já foi descrita como uma quinase essencial para a formação do embrião, estando diretamente envolvida no processo reprodutivo deste carrapato. Neste contexto, a GSK-3 β é uma candidata para o desenvolvimento de novas alternativas de controle do carrapato bovino. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi estudar a participação da proteína GSK-3 β na fisiologia do *R. microplus* a partir da inibição de sua atividade. Ensaio *in vitro* e *in vivo* foram realizados para testar a inibição química e imunológica da atividade dessa proteína. Anticorpos contra peptídeos sintéticos baseados na sequência da GSK-3 β (anti-SRm0218 e anti-SRm86100) usados neste trabalho não foram capazes de inibir a atividade dessa proteína, no entanto, a inibição da GSK-3 β foi alcançada quando células embrionárias de *R. microplus* foram submetidas à inibição química, por meio de um inibidor específico. Este resultado sustenta o potencial dessa proteína como alvo para o desenvolvimento de uma alternativa de controle do carrapato bovino, pois a sua inibição possivelmente atuaria negativamente na capacidade reprodutiva do carrapato *R. microplus*.

Palavras-chave: Carrapato bovino, GSK-3 β , inibição, glicogênio.

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus is a monogenetic, hematophagous ectoparasite that has a large economic impact due to associated losses in the cattle industry. Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) is a highly conserved and ubiquitously expressed protein in several species. It has been identified as GSK-3 β isoform in the cattle tick, and is involved in the modulation of glycogen synthase activity, as a regulator of glycogen synthesis with a role in energy metabolism of *R. microplus*. GSK-3 β is also involved in the Wnt signaling pathway. It is a fundamental kinase for embryo development, and is directly linked with *R. microplus* reproductive process. Thus, the aim of this study was to investigate the role of GSK-3 β in *R. microplus* physiology by inhibiting its activity. *In vitro* and *in vivo* assays were carried out to test its immunological and chemical inhibition. Rabbit antibodies against synthetic peptides based on GSK-3 β sequence (anti-SRm0218 and anti-SRm86100) used in this work were not capable to inhibit GSK-3 β activity, but GSK-3 β inhibition was reached when *R. microplus* embryo cells were cultivated with a specific inhibitor. This result supports the potential of this protein as a target to develop a new cattle tick control method, because its inhibition probably acts detrimentally in the reproductive capacity of the tick.

Keywords: Cattle tick, GSK-3 β , inhibition, glicogen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo vida do <i>Rhipicephalus microplus</i>	15
Figura 2 – Etapas da embriogênese do <i>Rhipicephalus microplus</i>	17
Figure 1 – Nucleotide and deduced amino acid sequence of <i>Rhipicephalus microplus</i> glycogen synthase kinase 3 β	31
Figure 2 – Analysis of <i>Rhipicephalus microplus</i> GSK-3 β antigenic index	32
Figure 3 – Expression of <i>Rhipicephalus microplus</i> GSK-3 β	32
Figure 4 – Effect of IgG anti-SRm0218 and IgG anti-SRm86100 on embryonic tick cells BME26	36
Figure 5 – Cellular viability assay	37

LISTA DE TABELA

Table 1 – Biologic parameters evaluated after the capillary feeding assay	34
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	O CARRAPATO BOVINO.....	12
1.2	A EMBRIOGÊNESE DO CARRAPATO BOVINO.....	16
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	ARTIGO CIENTÍFICO	21
3.1	INTRODUCTION.....	22
3.2	MATERIALS AND METHODS.....	24
3.2.1	Animals	24
3.2.2	Cloning of N- and C-GSK-3 β cDNA and expression of the protein fragments	25
3.2.3	SRm0218 and SRm86100 peptides synthesis and sera production.....	26
3.2.4	Recognition of native protein and recombinant proteins expression.....	27
3.2.5	<i>In vitro</i> inhibition of GSK3 β	27
3.2.6	<i>In vivo</i> inhibition of GSK3 β	28
3.3	RESULTS	29
3.4	DISCUSSION.....	38
3.5	ACKNOWLEDGMENTS	39
4	DISCUSSÃO	40
5	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CARRAPATO BOVINO

Os carrapatos são ectoparasitas terrestres de hábito hematofágico, que possuem importância médico-veterinária, uma vez que são vetores de diversos patógenos que causam doenças a homens e animais (KAUFMAN, 1989). Como parasitos obrigatórios, estes ácaros atingem uma ampla gama de hospedeiros, incluindo vertebrados de sangue frio, pássaros e mamíferos. Dentre as 867 espécies de carrapatos existentes (BARKER & MURRELL, 2004) a espécie de maior importância no Brasil, em consequência do impacto econômico gerado sobre a bovinocultura, é a *Rhipicephalus microplus*.

Originário da Ásia (HOOGSTRAAL, 1985), atualmente este carrapato está amplamente disseminado por países tropicais e subtropicais, em regiões não desérticas, podendo ser encontrado em todos os continentes entre os paralelos 32°N e 32°S (POWELL & REID, 1982; ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2006; CAMPOS PEREIRA *et al.*, 2008).

O *R. microplus*, é um Ixodidae monoxeno com ciclo de vida composto por uma fase de vida livre e uma fase de vida parasitária. É estimado que apenas 5% dos parasitas de uma população estejam sobre o hospedeiro e o restante esteja presente em fase de vida não parasitária no ambiente, na forma de ovos, larvas ou fêmeas em período de pré-postura ou postura (CAMPOS PEREIRA *et al.*, 2008). Em condições adequadas de temperatura e umidade, a fase de vida livre deste carrapato tem duração média de 28 dias, porém esse período pode ser alterado caso não sejam oferecidas condições ambientais adequadas. Já a fase de vida parasitária é pouco influenciada por

alterações ambientais, possuindo uma duração de aproximadamente 21 dias (GONZALES, 1975).

A fase de vida livre deste parasita inicia-se no momento em que a teleógina, fêmea fecundada e totalmente ingurgitada, se desprende do hospedeiro e cai ao solo, entrando no período de pré-postura e estende-se até fim da oviposição, quando as larvas resultantes da eclosão dos ovos dessas teleóginas estarão disponíveis para infestar um novo hospedeiro suscetível.

Durante os três dias de pré-postura ocorre o amadurecimento do ovário, e a produção e maturação dos oócitos (CHERRY, 1973). O sucesso deste processo é dependente da conversão metabólica energética e proporcional à quantidade de nutrientes ingerida pela fêmea (NAGAR, 1968). Cada fêmea de *R. microplus* põe de dois a três mil ovos, morrendo logo após o fim da postura.

Ovos eclodem cerca de um mês após a postura liberando as larvas que se tornam infestantes, ou seja, aptas a se fixarem no hospedeiro, em aproximadamente uma semana (GONZALES *et al.*, 1974). Em busca de um hospedeiro suscetível, ocorre a migração dessas larvas por geotropismo negativo. O encontro com o bovino dá início à fase parasitária do ciclo de vida (FURLONG, 1993). As regiões preferenciais para a fixação do carrapato no bovino são mais vascularizadas, com menor espessura de pele e de difícil acesso à lambadura promovida pelo hospedeiro (processo de limpeza), tais como: úbere, mamas, regiões perineal, perianal, vulvar e entrepernas (WAGLANG, 1978). O sucesso do processo de alimentação, maturação da fêmea e postura é dependente da ocorrência da fecundação. Os machos permanecem por mais tempo sobre o hospedeiro a fim de se acasalarem com mais de uma fêmea. Em torno do 17º dia os machos já estão aptos à cópula. As fêmeas, após serem fecundadas, passam de neóginas para partenóginas (estado parcial de ingurgitamento) e, em seguida, a teleóginas (estado de ingurgitamento máximo) (GONZALES *et al.*, 1974).

A alimentação do *R. microplus* divide-se em três fases: A primeira consiste na fase preparatória (dois dias), quando ocorre a fixação no hospedeiro; seguida pela fase lenta (quatorze a dezoito dias), quando ocorre o acasalamento, nesta fase a fêmea

aumenta seu tamanho em cerca de 10 vezes; e por último a fase rápida, que consiste em uma alimentação intensa por 24 horas, responsável por promover novamente o aumento do tamanho da fêmea em 10 vezes. Após essa última fase, a fêmea deixa o hospedeiro (SEIXAS *et al.*, 2010).

O controle do carrapato bovino é tradicionalmente feito a partir da aplicação de carrapaticidas, porém, a seleção de populações resistentes, por pressão seletiva, às principais classes de acaricidas químicos vem limitando o uso desta metodologia. Além disso, o uso desses compostos químicos pode gerar contaminação ambiental e de produtos de origem animal (KUNZ & KEMP, 1994). Deste modo, se faz necessário o desenvolvimento de novas metodologias eficientes no controle deste parasita, capazes de diminuir o processo de seleção de carrapatos resistentes e que não gerem problemas de toxicidade. Nesta busca aplica-se a caracterização funcional de moléculas fisiologicamente importantes para o parasita e que não causem prejuízo para o hospedeiro.

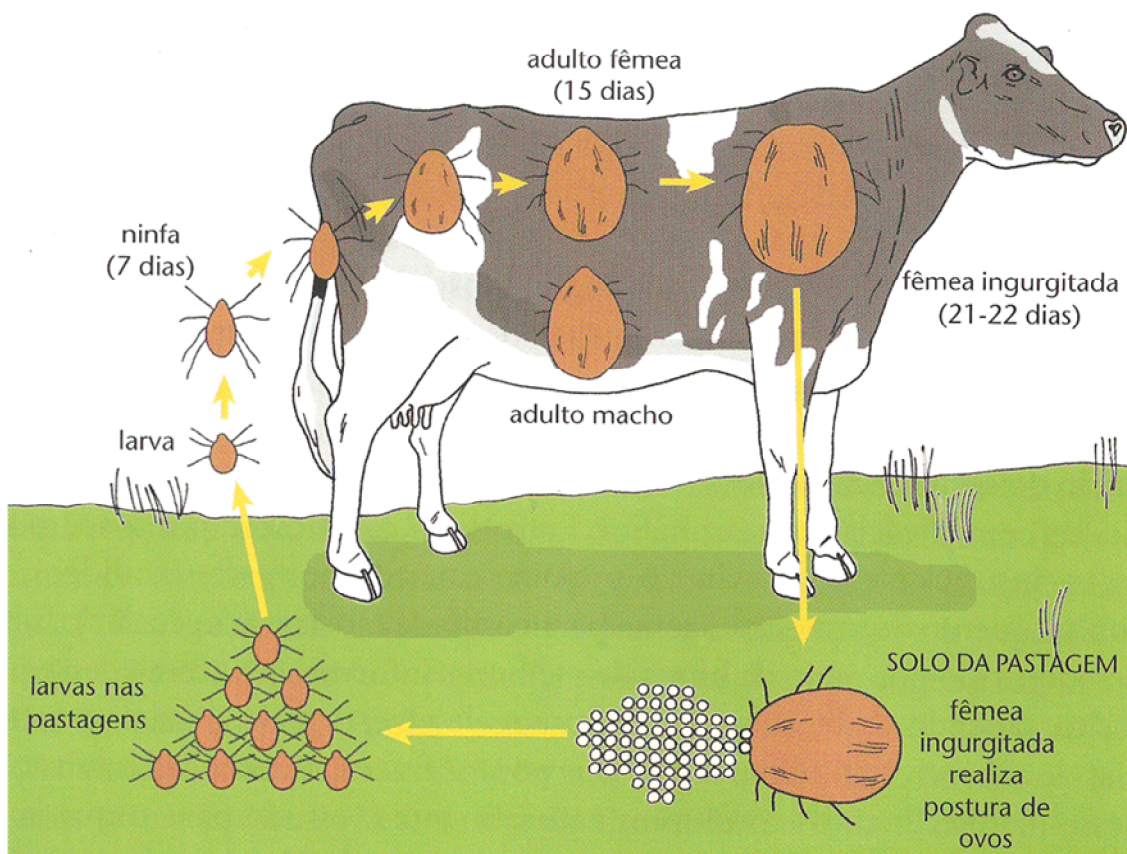


Figura 1 – Ciclo de vida do *Rhipicephalus microplus*. O ciclo de vida do carrapato bovino é dividido em duas fases; uma de vida livre, vivida no solo, e outra parasitária, vivida sobre o hospedeiro (CAMPOS PEREIRA *et al.*, 2008).

1.2 A EMBRIOGÊNESE DO CARRAPATO BOVINO

Na embriogênese de animais ovíparos, como é o caso do carrapato bovino, *R. microplus*, ocorre a ausência de nutrientes exógenos, por isso esses animais são dependentes dos nutrientes maternos estocados nos oócitos (SAPPINGTON & RAIKHEL, 1998; SONG *et al.*, 2006).

Uma vez maturados, os oócitos aumentam de tamanho e acumulam RNA, carboidratos, lipídeos e proteínas que servem como substratos para vias metabólicas funcionais do desenvolvimento embrionário, de modo que ovos maduros contêm todas as fontes energéticas necessárias para o desenvolvimento e manutenção do embrião (CAMPOS *et al.*, 2006).

A vitelina é a principal reserva energética utilizada por animais ovíparos durante o desenvolvimento embrionário, já que há ausência de fontes de nutrientes externas (ESTRELA *et al.* 2010). O consumo dessa proteína durante a embriogênese do *R. microplus* foi evidenciado por Logullo e colaboradores (2002). Nesse estudo, foi demonstrado que durante esse período de desenvolvimento do carrapato bovino ocorrem dois picos de degradação dessa proteína. O primeiro pico nos primeiros dias após a postura, quando ocorre uma queda de 20% no conteúdo de vitelina nos ovos, e o segundo pico, 15 dias após, de forma que, no momento da eclosão das larvas, 40% do conteúdo total de vitelina já foi consumido. Três enzimas já foram descritas como responsáveis pela hidrólise da vitelina, *tick heme binding aspartic protease* (THAP), *Boophilus yolk cathepsin* (BYC) e *vitellin degrading cysteine endopeptidase* (VTDCE) (SORGINE *et al.*, 2000; SEIXAS *et al.*, 2003). Dentre essas enzimas aquela que se destaca como responsável pela sua maior taxa de degradação é a VTDCE (SEIXAS *et al.*, 2012; OLDIGES *et al.* 2012).

A embriogênese do carrapato bovino é dividida em duas fases; uma fase inicial, antes da formação do blastoderme celular, que é caracterizada pelo consumo de glicogênio materno estocado e uma segunda fase que é caracterizada pela intensa degradação de aminoácidos, que promovem o acúmulo de glicogênio e glicose (SONG

et al., 2006; MORAES *et al.*, 2007).

Com apenas um dia de desenvolvimento o ovo já apresenta núcleo (Fig. 2A). Com três dias de desenvolvimento já ocorre a formação do blastoderma sincicial (Fig. 2B), na qual muitos núcleos estão presentes em um citoplasma comum. Subsequentemente, as membranas crescem a partir da superfície envolvendo os núcleos e formando células, que dão origem ao blastoderma celular (Fig. 2C), formada no quinto dia. A partir do sétimo dia o embrião já se apresenta segmentado (Fig. 2D) (CAMPOS *et al.*, 2006). Até o quinto dia as reservas de glicogênio reduzem drasticamente, atingindo seu nível basal entre o quinto e o sexto dia, voltando a subir somente na segunda fase de desenvolvimento. Concomitantemente sobem os níveis de glicose, que se originam do glicogênio materno estocado.

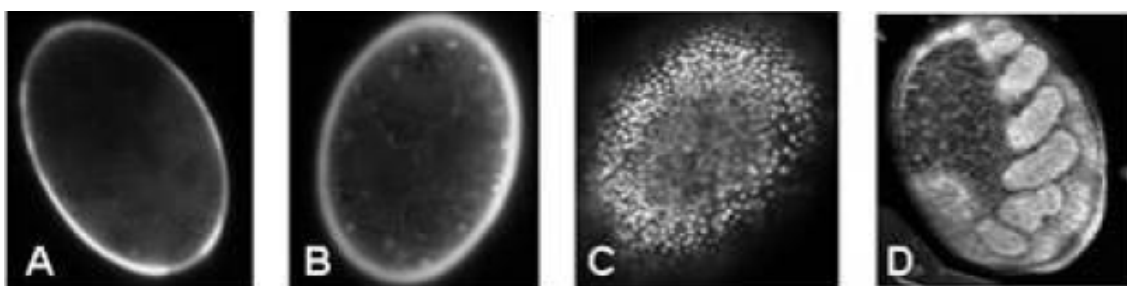


Figura 2 – Etapas da embriogênese do *Rhipicephalus microplus*. Etapas do desenvolvimento do *Rhipicephalus microplus* em diferentes dias da embriogênese (Editado de CAMPOS *et al.*, 2006): A) um dia, B) três dias (blastoderma sincicial), C) cinco dias (blastoderma celular), D) sete dias (embrião segmentado).

Genes importantes na fisiologia do organismo de artrópodes adultos também exercem importantes funções durante o seu desenvolvimento embrionário, sendo assim a interferência em sua expressão pode resultar em prejuízo na sua capacidade reprodutiva (CATTERUCCIA *et al.*, 2000; CATTERUCCIA *et al.*, 2005). O estudo de proteínas atuantes no metabolismo do *R. microplus* pode auxiliar no entendimento da embriogênese deste parasita. Dessa forma, metodologias de controle tendo como alvo essas proteínas podem ser sugeridas, interferindo-se diretamente na formação das

reservas energéticas deste parasita, na ovogênese e/ou embriogênese, podendo gerar prejuízos irreversíveis ao seu desenvolvimento.

A principal fonte energética para a realização do processo de segmentação embrionária em artrópodes são os carboidratos (NUSSLEIN-VOLHARD & ROTH, 1989; BATE & ARIAS, 1993). No caso do carrapato bovino, a glicose presente nos oócitos, armazenada na forma de glicogênio, é a fonte energética utilizada. Como os embriões de *R. microplus* se desenvolvem sem aporte energético maternal adicional à postura e empenham uma porção significativa de suas reservas energéticas neste processo, a GSK-3 β , que participa na via da glicogênese, atuando diretamente no metabolismo energético dessa espécie, é um possível alvo para o desenvolvimento de metodologias de controle contra o carrapato bovino.

1.3 A GLICOGÊNIO SINTASE QUINASE 3

A serina/treonina quinase, GSK-3, é uma proteína conservada e ubiquamente expressa em diversas espécies. Em mamíferos são conhecidas três isoformas desta proteína: A isoforma nuclear, GSK-3 α , e as isoformas citoplasmáticas GSK-3 β e GSK-3 β 2 (FISHER *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 1994; FRAME & COHEN, 2001; WOODGETT, 2001; MUKAI *et al.*, 2002). A isoforma descoberta mais recentemente, a GSK-3 β 2, foi identificada em tecido cerebral de ratos, camundongos e humanos, sendo resultante de um *splicing* alternativo do gene codificante da isoforma GSK-3 β , diferindo em apenas 13 aminoácidos desta sequência (MUKAI *et al.*, 2002).

Originalmente identificada apenas como um agente regulador da síntese de glicogênio por intermédio da inibição da proteína glicogênio sintase, a GSK-3 hoje está classificada como uma proteína multifuncional. À medida que esta proteína está associada a diversos processos celulares e fisiológicos essenciais como proliferação,

motilidade e diferenciação celular, apoptose, metabolismo energético e desenvolvimento embrionário (ALI, HOEFLICH, WOODGETT, 2001).

Em *R. microplus* foi identificada, somente uma isoforma desta proteína, a GSK-3 β , sendo ela responsável, neste organismo, pela inibição da atividade da glicogênio sintase (GS), sendo muito importante durante a embriogênese desse parasita. Durante esta etapa do desenvolvimento deste carrapato os níveis de glicose e glicogênio variam de forma que o percentual de atividade da GSK-3 β é inversamente proporcional ao conteúdo de glicogênio disponível na célula (LOGULLO *et al.*, 2009).

O glicogênio, principal reserva energética em células animais (RAGANO-CARACCILO *et al.*, 1998), é muito requisitado no desenvolvimento do embrião, principalmente na fase de transição do sincício à blastoderme celular. Neste processo, o metabolismo de glicose e do glicogênio é mantido através de um balanço entre a glicogenólise e glicogênese em que a GSK-3 β é participante ativa (CAMPOS *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2007; ABREU *et al.*, 2009). A GSK-3 β está envolvida, ainda, na manutenção da viabilidade dos ovos e larvas do *R. microplus*, como foi demonstrado a partir de ensaios inibitórios realizados com um inibidor químico (alsterpaullone) e com RNAi (silenciamento genético – RNA interferente) (FABRES *et al.*, 2010).

A desregulação da atividade desta enzima está associada ao desenvolvimento de diversas patologias em humanos; como, distúrbio de comportamento, doença de Alzheimer e câncer (BHAT *et al.* 1994, 1998; RING *et al.*, 2003; CUZZOCREA *et al.*, 2007). Além disso, já foi reportado que a inibição GSK-3 promove proteção contra condições inflamatórias em diversos modelos animais (JOPE *et al.*, 2007). E ainda que GSK-3 β pode ser alvo para desenvolvimento de fármacos aplicados ao controle de parasitas. Neste contexto, Ojo *et al.* (2008) e Ojo *et al.* (2011) identificaram uma isoforma da GSK-3 expressa em *Trypanosoma brucei*, TbGSK-3 *short*, que possui uma sequência muito similar a isoforma GSK-3 β de humanos, e classificaram-na como um promissor alvo para o desenvolvimento de métodos de controle contra esse parasita, assim como Tsai *et al.* (2013) classificaram a GSK-3 β em um estudo aplicado ao controle do *Echinococcus granulosus*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a participação da proteína glicogênio sintase quinase-3 β (GSK-3 β) na fisiologia do *Rhipicephalus microplus*, a partir da inibição de sua atividade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Selecionar regiões antigênicas para a síntese de peptídeos

2.2.2 Clonar as regiões codificadoras da porção N- e C-terminal da proteína GSK-3 β de *Rhipicephalus microplus* a fim de expressar as proteínas recombinantes

2.2.3 Avaliar a capacidade dos anticorpos produzidos reconhecerem a expressão das formas nativa e recombinantes da proteína GSK-3 β de *Rhipicephalus microplus*

2.2.4 Avaliar o efeito dos anticorpos produzidos sobre o *Rhipicephalus microplus* através de ensaios *in vitro* e *in vivo*

2.2.5 Avaliar o efeito da adição em cultivo celular do inibidor químico GSK3XI sobre as células das linhagens de carrapato (BME26) e de bovino (MDBK).

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Characterization of *Rhipicephalus microplus* glycogen synthase kinase 3 β protein by inhibition assays

Schuler, A. D.^{1,2}; Logullo, C.³; Coutinho, M. L.²; Da Silva Vaz, I.^{1,2,}*

¹ Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre 91540-000, RS, Brazil.

² Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, RS, Brazil.

³ Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, Rio de Janeiro 28015-620, RJ, Brazil.

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus is a monogenetic, hematophagous ectoparasite that has a large economic impact due to associated losses in the cattle industry. Glycogen synthase kinase 3 is a highly conserved and ubiquitously expressed protein in several species. It has been identified as GSK-3 β isoform in the cattle tick, and is involved in the modulation of glycogen synthase activity, as a regulator of glycogen synthesis with a role in energy metabolism of *R. microplus*. GSK-3 β is also involved in the Wnt signaling pathway. It is a fundamental kinase for embryo development, and is directly linked with *R. microplus* reproductive process. Thus, the aim of this study was to investigate the role of GSK-3 β in *R. microplus* physiology by inhibiting its activity. *In vitro* and *in vivo* assays were carried out to test its immunological and chemical inhibition. Rabbit antibodies against synthetic peptides based on GSK-3 β sequence (anti-SRm0218 and anti-SRm86100) used in this work were not capable to inhibit GSK-3 β activity, but GSK-3 β inhibition was reached when *R. microplus* embryo cells were cultivated with a specific inhibitor. This result supports the potential of this protein as a target to develop a new cattle tick control method, because its inhibition probably acts detrimentally in the reproductive capacity of the tick.

Keywords: Cattle tick, GSK-3 β , protein function, inhibition.

3.1 INTRODUCTION

The cattle tick *Rhipicephalus microplus* is an ectoparasite found in tropical and subtropical areas. Its importance in veterinary is due to its ability to transmit pathogens (JONSSON, 2006). It causes considerable losses in the cattle industry, with substantial damage to livestock. Together, the economic losses caused by *R. microplus* parasitism and costs associated with its control in Brazil are estimated at US\$ 2 billion dollars a year (GRISI *et al.*, 2002). Therefore, the control of tick populations down to acceptable levels is crucial. However, chemical acaricides, the major control strategy currently used, have lost their original effectiveness due to the increasing number of *R. microplus* populations resistant to the major classes of acaricides (WILLADSEN, 2006; ROSARIO-CRUZ *et al.*, 2009). In addition, residues of these chemicals can contaminate animal products and the environment (KUNZ & KEMP, 1994). Thus, elucidating the physiological function of tick proteins and their role in the parasite-host interaction is an essential step in the development of new control methods.

The proteins involved in the energy metabolism during tick embryogenesis may be seen as an interesting target for parasite control. Any interference in this process could disrupt embryo development and consequently render new offspring unviable. In this sense, embryogenesis is an important target, since the absence of exogenous nutrients makes oviparous animals dependent on maternal nutrients stored in oocytes until the blastoderm formation stage (SAPPINGTON & RAIKHEL, 1998; SONG, WONG & WESSEL, 2006).

Glycogen synthase kinase 3 is a highly conserved protein ubiquitously expressed in various vertebrate and invertebrate species (FISHER *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 1994; HEDGEPEETH, 1999; WOODGETT, 2001; MUKAI *et al.*, 2002). It was initially defined as a regulator of glycogen metabolism. It phosphorylates residues on glycogen synthase, inhibiting this enzyme and consequently modulating glycogen synthesis (PARKER, CAUDWELL & COHEN, 1983). However, GSK-3 is a multifunctional protein that affects several cellular and physiological events such as cell cycle, gene transcription, apoptosis and embryo development, besides its role in carbohydrate

metabolism (PLYTE *et al.*, 1992; WOODGETT, 2001; ALI, HOEFLICH, WOODGETT, 2001). Three isoforms of this protein have been identified in mammals the nuclear isoform, GSK-3 α and both cytoplasmic isoforms, GSK-3 β and GSK-3 β 2. The last one was most recently identified, in mouse, rat and human cerebral tissues. This isoform is result of an alternative splicing and differs by the alteration of 13 amino acids from GSK-3 β (WOODGETT, 1990; MUKAI *et al.*, 2002). Abnormal GSK-3 activity is associated with human pathologies like cancer, diabetes, mood disorders and Alzheimer's dementia (RING *et al.*, 2003; BHAT *et al.* 2000; CUZZOCREA *et al.*, 2007). Furthermore, it was reported that GSK-3 inhibition provides protection from inflammatory condition in different animal models (JOPE, YUSKAITIS & BEUREL, 2007; KLAMER *et al.*, 2010). In this context, GSK-3 is under investigation as a potential drug target to be used in disease treatment and parasite control (SCAPIN, 2002; McVEIGH *et al.*, 2012). OJO *et al.* (2008) and OJO *et al.* (2011) demonstrated this potential in a study with *Trypanosoma brucei* using TbGSK-3 *short*, a GSK-3 isoform, similar to human GSK-3 β used in the treatment of leishmaniasis. This concept also was studied by Tsai *et al.* (2013), who classified GSK-3 β as a top drug target against *Echinococcus granulosus*.

Only one isoform, GSK-3 β , was identified in *R. microplus* (LOGULLO *et al.*, 2009). This protein acts in *R. microplus* embryogenesis and is involved in tick oviposition and egg viability, as shown by experiments with GSK-3 β inhibitors and RNA interference (FABRES *et al.*, 2010). GSK-3 β inhibits glycogen synthase (GS) activity by phosphorylation and modulation of glycogen synthesis. It was reported that GSK-3 β enzymatic activity is inversely correlated with embryo glycogen content. Considering that glycogen is the major energy source in animal cells (RAGANO-CARACCILOLO *et al.*, 1998), and that it is a requirement in embryo maintenance until blastoderm formation, the role this protein plays in tick development is clearly important.

The study of proteins involved in *R. microplus* embryogenesis is useful to understand the energy metabolism of parasites. It may provide the basis for the development of new control methods, interfering in parasite development, oviposition and viability, or causing premature lethality of females. In this work, embryo tick cells and female ticks were used to evaluate the effect of interferences on *R. microplus*

physiology by inhibition of GSK-3 β activity using antibodies or a GSK-3 β specific inhibitor.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 Animals

Hereford (*Bos taurus*) cattle acquired from an *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. and tick free area (Santa Vitória do Palmar - RS), were kept in individual pens on slatted floors as hosts for *R. microplus* ticks (Porto Alegre strain). During the non-parasitic life stage, *R. microplus* females and eggs were maintained in an incubator at 28°C and 85% humidity.

Five-month-old New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were maintained in individual wired cages in a ventilated room under natural light regimen. All animals were fed commercial food pellets and given water *ad libitum*.

All animals used in these experiments were housed in Faculdade de Veterinária at Universidade Federal do Rio Grande do Sul. This study was conducted considering ethic and methodological aspects in agreement with the International and National Directives and Norms by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.2.2 Cloning of N- and C-GSK-3 β cDNA and expression of the protein fragments

The plasmid GSK-3 β -pGEM-T (LOGULLO *et al.*, 2009) was used as template DNA to amplify N-GSK-3 β and C-GSK-3 β fragments by PCR, following the conditions: initial denaturation at 94°C for 5 min; 34 cycles of 94°C for 30 s, 63°C for 30 s and 72°C for 1 min and 30 s; and a final elongation step of 5 min at 72°C. The upstream (TTTTTCATATGAGTGGACGGCCGAGGACG) and downstream (TTTTTGAATTCTAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGAAGGAGCAGGTTCTGCGGT TTGATGTCCCGATGGCAGAT) primers used to amplify N-GSK-3 β included *Nde*I and *Eco*RI restriction sites, respectively. The upstream (TTTTTTGGATCCGACCCCGAGACGGGAGTCCTCAAG) and downstream (AAAAAGGATCCTTACACGGGGCCGCTGTTTGAAGG) primers used to amplify the C-GSK-3 β included *Bam*HI and *Eco*RI restriction sites, respectively. Subsequently, the amplicons were ligated to the vector pAE to obtain the plasmids N-GSK-3 β /pAE and C-GSK-3 β /pAE, respectively. DNA sequencing was performed to confirm the identities of clones.

Escherichia coli cultures were used to obtain the *R. microplus* GSK-3 β recombinant proteins. *E. coli* BL21 (DE3) C41/ N-GSK-3 β /pAE were grown in *Luria-Bertani* culture medium at 25°C, and *E. coli* BL21 (DE3) RP/ C-GSK-3 β /pAE were grown in *Super Optimal Broth* culture medium enriched with MgCl₂. Both cultures were induced with IPTG and incubated with agitation for 2 h. Cells were resuspended in PBS and disrupted by freezing-thawing and sonication.

The rN-GSK-3 β and rC-GSK-3 β expressions were monitored by 12% SDS-PAGE stained with Coomassie Blue G-250. To confirm protein expression, cell lysates were electrophoretically separated and transferred to a nitrocellulose membrane. After 1 h, the membrane was incubated with 5% non-fat milk at room temperature and then incubated with alkaline phosphatase labeled anti-polyhistidine antibody, IgG anti-SRm0218, IgG anti-SRm86100 (16.5 ng/mL) or anti-human-GSK-3 β antibody for 16 h. Goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase-conjugated was used as the secondary antibody. The reaction signal was generated using NBT (nitro blue tetrazolium) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate).

3.2.3 SRm0218 and SRm86100 peptides selection and sera production

Peptides SRm0218 and SRm86100 were selected based on the analysis of *R. microplus* GSK-3 β antigenic index using the Jameson-Wolf algorithm (JAMESON & WOLF, 1988) in the software Lasergene.

New Zealand rabbits were immunized subcutaneously three times at 15-day intervals with 570 μ g of one of the peptides conjugated with the carrier protein keyhole limpet hemocyanin (KLH) emulsified with Marcol-Montanid adjuvant. Fifteen days after the last immunization, the sera were collected and stored at -20°C.

Total IgG was purified from sera obtained by affinity chromatography on a *HiTrap* Protein G HP column (GE Healthcare Biosciences) according to the manufacturer's instructions. The purified IgGs were quantified by UV absorption (λ = 280nm).

3.2.4 Recognition of native protein and recombinant proteins expression

R. microplus embryo cells, BME26 cell lineage, were cultured according to Esteves *et al.* (2008) in modified *Leibovitz's* medium (Gibco) (L15B300) (MUNDERLOH & KURTTI 1989) enriched with glucose (10.83g/L), 10% fetal bovine serum (FBS), 10% triptose phosphate broth (TPB), 100 U/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin. A BME26 cell suspension in Tris-HCl buffer (pH 8.2), with protease inhibitors (pepstatin A - 1mg/mL, TPCK - 0.1 mM, leupeptin 1 mg/mL) and a detergent (deoxycholate 1%) was incubated in ice for 15 min followed by 40 min of centrifugation (32,000 G) to provide a cell extract. The total protein concentration in the extract was quantified by the Bradford assay (BRADFORD, 1976).

The BME26 cell extract, rN-GSK3 β and rC-GSK-3 β were subjected to a 12% SDS-PAGE under urea and β -mercaptoethanol reduction and transferred to a nitrocellulose membrane to test the capability of anti-SRm0218 and anti-SRm86100 antibodies to recognize native and recombinant proteins by an immunoblotting assay.

3.2.5 *In vitro* inhibition of GSK3 β

Cellular viability was evaluated with 15 μ g, 30 μ g or 60 μ g of IgG anti-SRm0286 and IgG anti-SRm86100 in BME26 cells culture for 3, 5 or 7 days in a MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide - Sigma) assay (MOSMANN, 1983; CARMICHAEL *et al.*, 1987). Culture medium alone was used as control. A serum against a non-related peptide conjugated with KLH was also used to test if antibodies against this carrier protein affect the cell culture.

A specific GSK3 β inhibitor, GSK3 β XI (3-(1-(3-Hydroxypropyl)-1H-pyrrolo [2, 3-b] pyridin-3-yl]-4-pyrazin-2-yl-pyrrole-2, 5-dione - Santa Cruz Biotechnology), was also used to test the effect of GSK-3 β inhibition by evaluating morphological alterations and/or viability induced *in vitro*. MDBK cells (gently donated by Cláudio Wageck Canal, Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária, UFRGS) were used to analyze the GSK-3 β interaction with the host cells. Three different inhibitor concentrations were tested: 32 nM, 64 nM or 96 nM in BME26 and MDBK cultures. The cells were incubated at 34°C (BME26) or 37°C (MDBK). After 8 days (BME26) or 3 days (MDBK), cellular viability was evaluated by the MTT assay (MOSMANN, 1983; CARMICHAEL *et al.*, 1987).

3.2.6 *In vivo* inhibition of GSK3 β

Partially engorged female ticks weighing 30-60 mg were collected from bovines and sorted into homogeneous groups. Each female was fixed with double-sided tape in a polystyrene surface and fed by capillarity for 28 h (GONSIOROSKI *et al.*, 2012). Bovine blood added IgG anti-SRm0218, IgG anti-SRm86100 or IgG purified from a non-related-antibody (300 μ g of each IgG/group) or blood alone were offered to the female ticks. Groups fed on blood alone or blood with non-related antibody were used as negative controls. Female feeding was maintained at 28°C under 85% humidity. After feeding, biological parameters like female weight increase and female weight decrease (weight after feeding - residual weight), egg production index ([total egg mass weight / weight after feeding] x 100), nutrient index ([total egg mass weight / weight decrease] x 100), hatching index ([total larvae mass weight / total egg mass weight] x 100) and eggs and larva morphology were analyzed according to Bennett (1974).

3.3 RESULTS

The protein GSK3 β is involved in *R. microplus* energetic metabolism, and tick embryos accumulate glucose as glycogen. In the present work, two different methodologies were used to test the effect of inhibition of tGSK-3 β activity in *in vitro* and *in vivo* assays.

Epitopes used to synthesize the peptides SRm0218 and SRm86100 were determined in *R. microplus* GSK-3 β N-terminal and C-terminal regions from an *in silico* analysis of the protein antigenic index (fig. 1 and 2). Anti-SRm0218 and anti-SRm86100 sera with titers equal or greater than 1,000 were obtained from immunized rabbits and purified in order to obtain IgG anti-SRm0218 and IgG anti-SRm86100.

Recombinant proteins were expressed to characterize the sera obtained. To achieve the recombinant proteins rN-GSK-3 β and rC-GSK-3 β , two PCR were performed to amplify the sequences N-GSK-3 β (564 base pairs - bp) and C-GSK-3 β (669 bp) using as template the plasmid GSK-3 β -pGEM (LOGULLO *et al.*, 2009) and specific primers flanking position to the serine/threonine protein kinase active site motif (bold - fig. 1). The recombinant proteins rN-GSK-3 β and rC-GSK-3 β were obtained in soluble and insoluble form, respectively. The recombinant protein fragments expression was confirmed by western blot with labeled anti-polyhistidine-tag antibody (fig. 3). The recombinant protein rC-GSK-3 β presented an apparent molecular mass equal to its predicted molecular mass, approximately 25 kDa, different from rN-GSK-3 β , which presented an apparent molecular mass of 37 kDa, different from its predicted molecular mass, 22 kDa.

The ability of the anti-GSK antibodies to recognize the recombinant and native proteins was evaluated by western blot. IgG anti-SRm0218 were able to recognize rN-GSK-3 β , and anti-SRm86100 was able to recognize both rN-GSK-3 β and rC-GSK-3 β . Purified IgG also recognized the expression of the native *R. microplus* GSK-3 β . IgG anti-SRm86100 detected the expression of the native protein with the same recognition pattern exhibited by anti-human GSK-3 β antibody used as control. However, anti-

human GSK-3 β antibody was not able to recognize any recombinant protein. Pre-immune sera were not able to detect any protein expression, when tested using native or recombinant proteins (Fig. 3).

1	<u>ATG</u>	<u>AGT</u>	<u>GGA</u>	<u>CGG</u>	<u>CCG</u>	<u>AGG</u>	ACG	ACT	TCC	TTT	GCT	GAA	GGG	39
1	<u>M</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>P</u>	<u>R</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	13
40	AAC	AAG	CAG	CCT	CAA	CAG	CCG	AAT	TTT	CTC	GCT	GGA	GTG	78
14	<u>N</u>	<u>K</u>	<u>Q</u>	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	26
79	AAA	ATA	ACC	AGC	AAG	GAC	GGC	GCC	AAG	GTG	ACC	ACG	GTG	117
27	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	39
118	CTG	GCC	ACC	CCG	GGC	CAG	GGG	CCG	GAC	CGG	CCG	CAG	GAG	156
40	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>R</u>	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	52
157	GTG	TCT	TAC	TGC	GAC	ACC	AAG	GTG	ATC	GGC	AAT	GGC	TCC	195
53	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	I	G	N	G	S	65
196	TTC	GGG	GTG	GTG	TAC	CAG	GCG	CGG	CTG	CTC	GAC	TCT	GGC	234
66	F	G	V	V	Y	Q	A	R	L	L	D	S	G	78
235	CAA	CTG	GTG	GCC	ATC	AAA	AAG	GTG	CTG	CAG	GAC	AAG	CGC	273
79	Q	L	V	A	I	K	K	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	91
274	TTC	AAG	AAT	CGC	GAG	CTG	CAG	ATC	ATG	CGC	CGC	CTG	GAC	312
92	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>I</u>	<u>M</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	104
313	CAC	TGT	AAC	ATA	GTG	AAG	CTC	AAG	TAC	TTC	TTC	TAC	TCG	351
105	<u>H</u>	<u>C</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>F</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	117
352	AGC	GGC	GAC	AAG	AAA	GAC	GAG	GTG	TAC	CTG	AAC	CTG	GTG	390
118	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	130
391	CTC	GAG	TAC	ATC	CCC	GAA	ACT	GTG	TAC	CGG	GTG	GCA	CGC	429
131	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>Y</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>Y</u>	<u>R</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	143
430	CAC	TAC	AGC	AAG	TCC	AAG	CAG	ACC	ATC	CCG	ATC	TCC	TTT	468
144	<u>H</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>Q</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	156
469	ATC	AAG	CTC	TAC	ATG	TAC	CAG	CTG	TTC	AGA	AGT	CTG	GCA	507
157	<u>I</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>M</u>	<u>Y</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	169
508	TAC	ATC	CAC	TCT	CTG	GGC	ATC	TGC	<u>CAT</u>	<u>CGG</u>	<u>GAC</u>	<u>ATC</u>	<u>AAA</u>	546
170	<u>Y</u>	<u>I</u>	<u>H</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	I	C	H	R	D	I	K	182
547	<u>CCG</u>	<u>CAG</u>	<u>AAC</u>	<u>CTG</u>	<u>CTC</u>	<u>CTT</u>	<u>GAC</u>	<u>CCC</u>	<u>GAG</u>	<u>ACG</u>	<u>GGA</u>	<u>GTC</u>	<u>CTC</u>	585
183	P	Q	N	L	L	L	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	195
586	<u>AAG</u>	CTG	TGC	GAC	TTT	GGC	AGC	GCC	AAG	CTG	CTA	ATC	AAG	624
625	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	208

625	GGT	GAG	CCC	AAC	GTG	TCG	TAC	ATC	TGC	TCG	CGC	TAC	TAC	663
209	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>I</u>	<u>C</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	221
664	CGG	GCC	CCA	GAA	CTG	ATC	TTT	GGT	GCG	ACA	GAC	TAC	ACG	702
222	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>	234
703	ACC	ATG	ATT	GAC	GTG	TGG	TCG	GCG	GGT	TGT	GTG	CTG	GCC	741
235	<u>T</u>	<u>M</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>V</u>	<u>W</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	247
742	GAG	CTA	CTG	CTG	GGC	CAG	CCC	ATT	TTT	CCC	GGG	GAC	AGC	780
248	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	<u>F</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	260
781	GGT	GTT	GAC	CAG	CTG	GTG	GAG	ATC	ATC	AAG	GTG	TTG	GGC	819
261	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	273
820	ACG	CCC	TCT	AAG	GAG	CAG	ATC	CGC	GAG	ATG	AAC	CGC	AAC	858
274	<u>T</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>E</u>	<u>Q</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>E</u>	<u>M</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	286
859	TAC	ACG	GAG	TTC	AAG	TTT	CCC	CAG	ATC	AAG	GCA	CAC	CCG	897
287	<u>Y</u>	<u>T</u>	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>H</u>	<u>P</u>	299
898	TGG	CAC	AAG	GTG	TTT	CGG	GCA	CGG	ACG	CCC	GGC	GAC	GCC	936
300	<u>T</u>	<u>H</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	<u>F</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>T</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	312
937	ATC	GAA	CTG	GTC	TCG	CGG	CTG	CTC	GAG	TAC	ACA	CCC	AGT	975
313	<u>I</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	325
976	GCA	CGC	ATA	GGC	CCC	CTG	CAG	GCC	TGC	GCG	CAC	AAC	TTC	1014
326	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>H</u>	<u>N</u>	<u>F</u>	338
1015	TTC	AAT	GAG	TTA	CGG	GAA	CCG	GGC	ACC	AGG	CTG	CCT	AAT	1053
339	<u>F</u>	<u>N</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>E</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	351
1054	GGG	CGC	GAG	CTG	CCT	CCC	CTC	TTT	GAC	TTC	ACA	CCC	CAC	1092
352	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>P</u>	<u>H</u>	364
1193	GAG	CTC	TCT	CTG	GAG	CCC	CAG	CTG	AAT	GCC	ACG	CTG	ATC	1131
365	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	377
1132	CCA	GCG	TAT	TTG	CGA	GGT	GGC	GAG	GCT	GTT	CCC	ACG	GCG	1170
378	<u>P</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	390
1171	GGA	GCG	GCA	GGG	TCG	TCG	TCC	GAG	ACA	GCC	GAA	GCA	TCC	1209
391	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	403
1210	<u>ACC</u>	<u>TCA</u>	<u>AAC</u>	<u>AGC</u>	<u>GGC</u>	<u>CCC</u>	<u>GTG</u>	<u>TAA</u>						1233
404	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>V</u>	STOP						411

Figure 1 – Nucleotide and deduced amino acid sequence of *Rhipicephalus microplus* glycogen synthase kinase 3 β . The regions used for primer synthesis are solid-underlined on the nucleotide sequence. The protein kinase ATP-binding region motif is shown in bold. The serine/threonine protein kinase active site motif is shown in italic-bold. The residues used to synthesize the peptides are single-underlined.

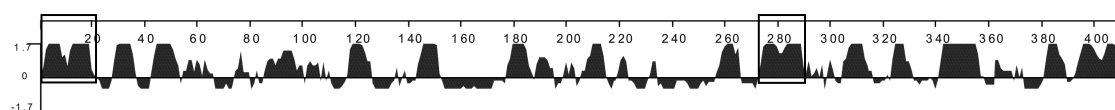


Figure 2 – Analysis of *Rhipicephalus microplus* GSK-3 β antigenic index. Analysis performed with Jameson-Wolf algorithm in the software Lasergene. Regions chosen to synthesize the peptides SRm0218 and SRm86100 are inside the boxes, respectively (JAMESON & WOLF, 1988).

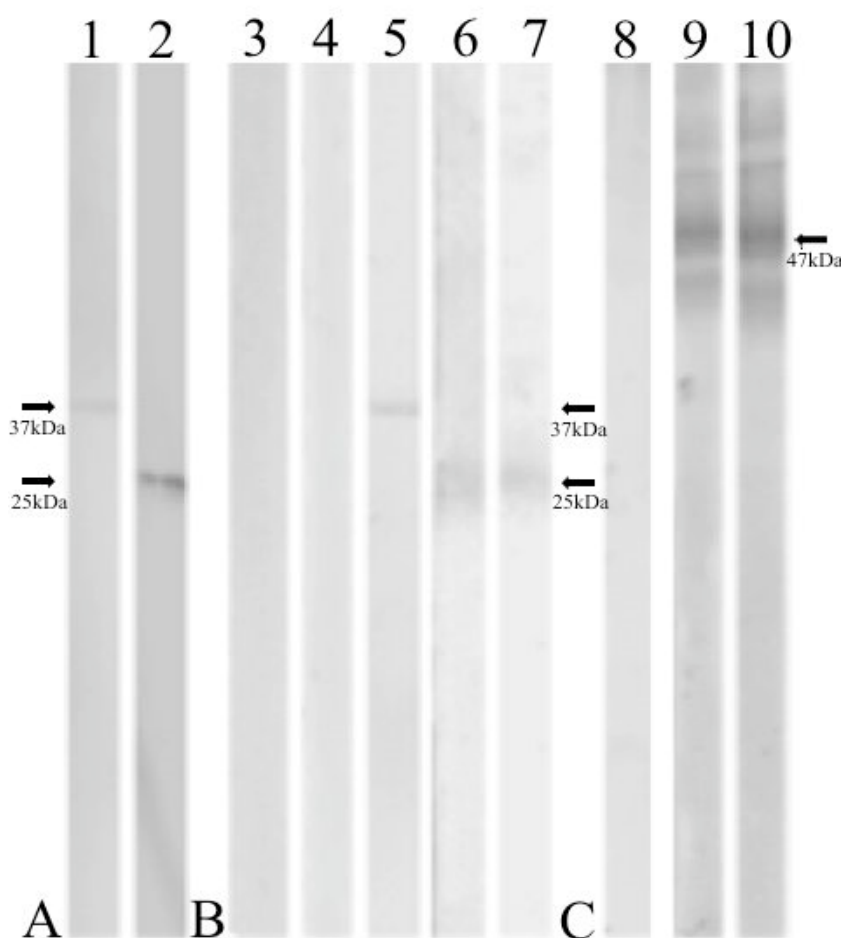


Figure 3 – Expression of *Rhipicephalus microplus* GSK-3 β A) Expression of rN-GSK-3 β and rC-GSK-3 β in *Escherichia coli* extract: Western blot probed with labeled anti-polyhistidine-tag antibody using (1) rN-GSK-3 β and (2) rC-GSK-3 β as antigens. B) Expression of rN-GSK-3 β and rC-GSK-3 β : Western blot probed with (3) pre-immune serum against rN-GSK-3 β , (4) pre-immune serum against rC-GSK-3 β , (5) anti-SRm0218 against rN-GSK-3 β , (6) anti-SRm0218 against rC-GSK-3 β , (7) anti-SRm86100 against rC-GSK-3 β using anti-rabbit IgG alkaline-phosphatase conjugate as secondary antibody. C) Expression of the native *Rhipicephalus microplus* GSK-3 β : by BME26 cells Western blot probed with (8) pre-immune serum, (9) IgG anti-SRm86100 and (10) anti-human GSK-3.

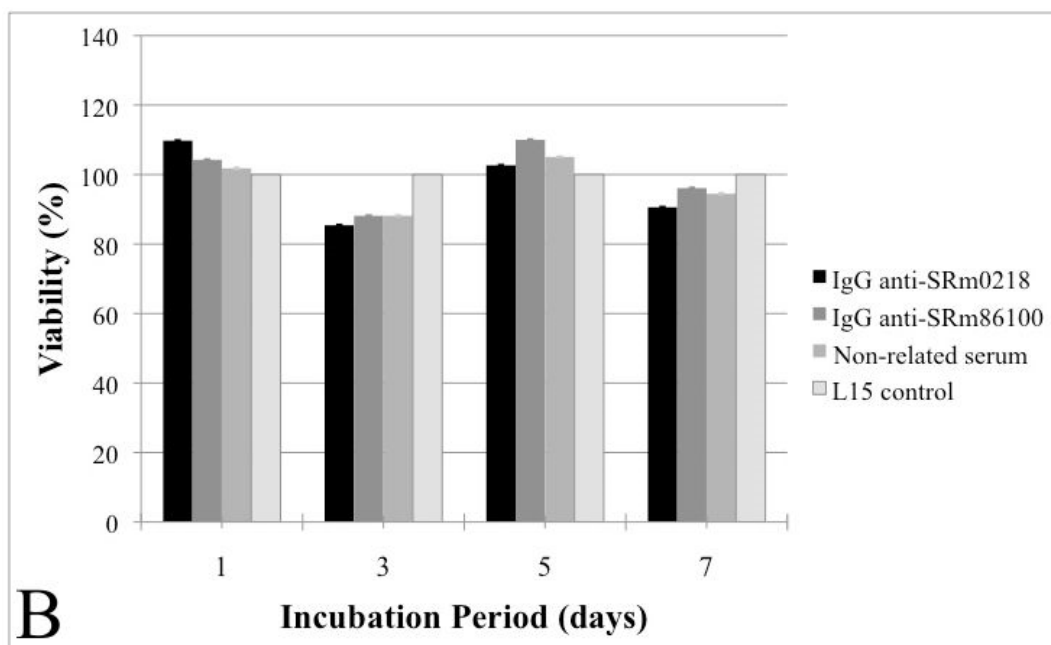
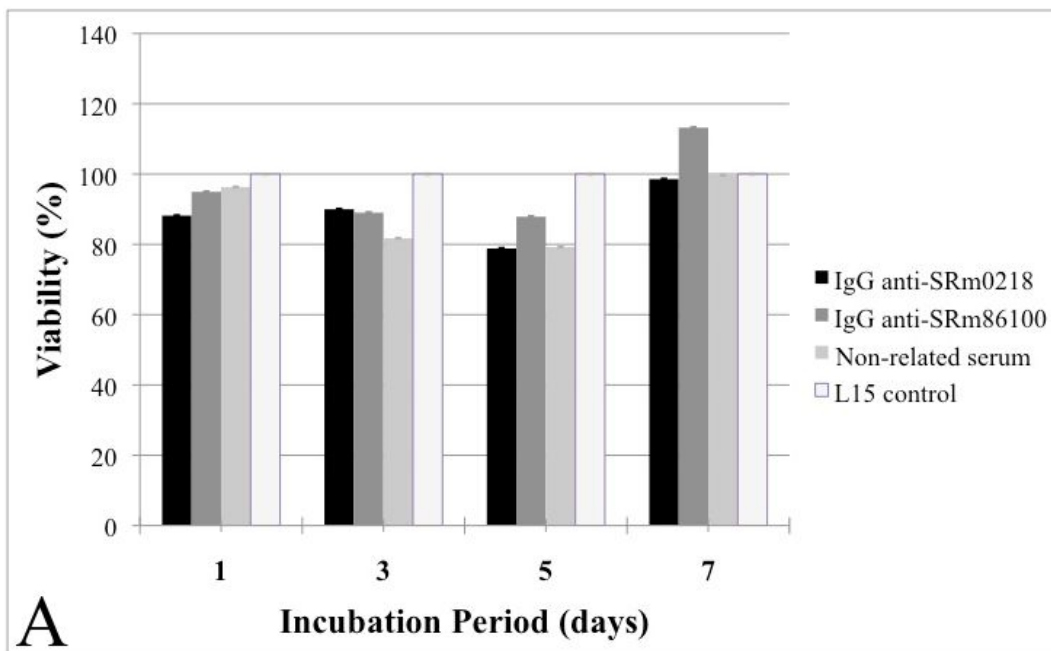
Cytoplasmic glycogen inclusions are present in BME26 cells (ESTEVEZ *et al.*, 2008), suggesting the activity of GSK-3 in these cells. The influence of this protein activity was evaluated adding GSK-3 β antibodies to a BME26 culture. Although BME26 cells have been subjected to different IgG anti-SRm0218 β and IgG anti-SRm86100 concentrations for varied incubation periods, neither morphological alterations nor significant difference ($p>0.05$) were observed in cell viability, when comparing treated and control groups (Fig. 4).

Reproductive effects on engorged female ticks artificially fed with IgG anti-SRm0218 and IgG anti-SRm86100 antibodies were evaluated. Among fed ticks, mean weight gain was approximately 200% (IgG anti-SRm0218: 217.78%, IgG anti-SRm86100: 186.01%, Control group – IgG non-related: 165.04%, Control group - blood: 211.26 % - Tab.1), indicating that treatments did not interfere in *R. microplus* female feeding behavior. Egg Production Index and Nutrient Index (Tab.1) were similar for all groups, without significant difference ($p<0.05$), indicating that anti-SRm0218 and anti-SRm86100 antibodies do not affect *R. microplus* oviposition. In addition, morphologically normal larvae hatched from treated female tick eggs reveal that its reproductive physiology was not affected by anti-SRm0218 and anti-SRm86100 IgG feeding, in the concentration used in this assay.

Table 1 – Biologic parameters evaluated after the capillary feeding assay. Mean (and standard deviation)

Group	Weight Before Feeding (mg)	Weight After Feeding (mg)	Weight Increase (%)	Total Eggs Weight (mg)	Larvae Weight (mg)	Weight Decrease (mg)	EPI	NI	Hatching Index
Anti-SRm0218	35,41 (7.77)	111.45 (30.19)	217.78 (80.53)	20.46 (10.31)	1.50 (3.22)	48.63 (12.66)	19.77 (10.72)	42.95 (21.42)	7.33
Anti-SRm86100	34.99 (8.45)	102.37 (18.15)	202.23 (66.65)	26.06 (10.86)	4.27 (3.65)	46.18 (15.61)	25.50 (9.53)	56.39 (16.06)	16.38
Non-related antibody	40.65 (8.50)	103.93 (25.34)	163.78 (83.55)	19.12 (9.69)	3.41 (4.23)	42.85 (12.33)	19.10 (9.70)	47.26 (25.40)	17.81
Bovine blood	38.93 (9.70)	110.21 (25.35)	196.69 (92.42)	31.60 (13.07)	5.50 (4.43)	48.16 (17.94)	28.23 (8.74)	65.05 (7.27)	17.41

Bovine blood alone or mixed with IgG anti-SRm0218, IgG anti-SRm86100 or IgG anti serum not related were used to feed artificially partially engorged *Rhipicephalus microplus* females. The results were obtained from two experimental events. Weight Decrease = Weight after feeding - Residual Weight (Fully-engorged female tick weight after oviposition), EPI = Egg production index, NI = Nutrient index



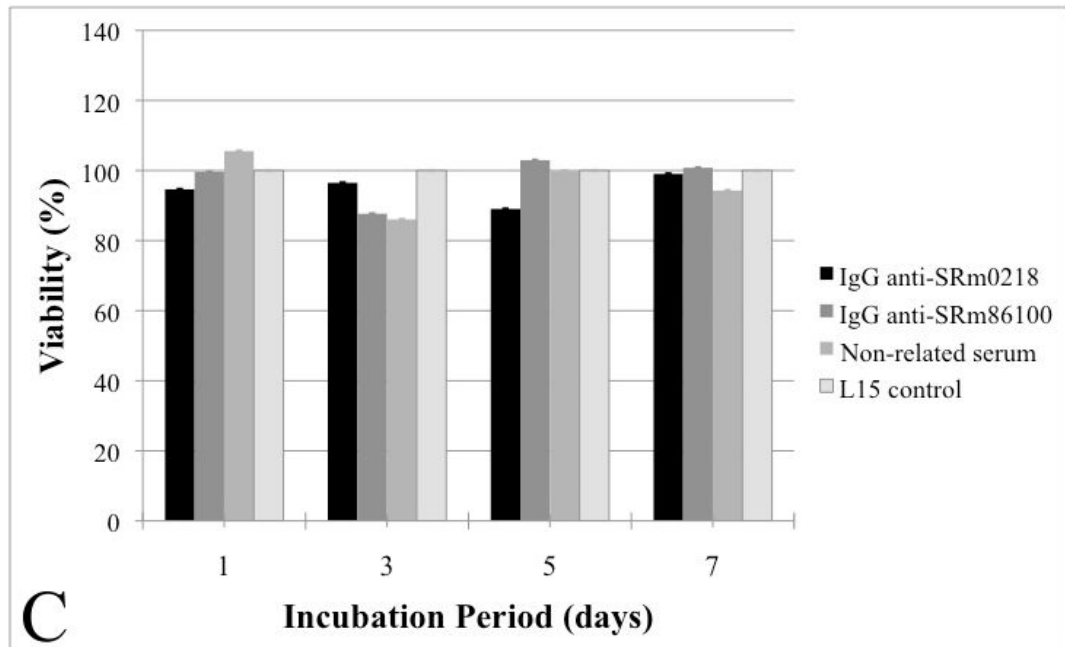


Figure 4 – Effect of IgG anti-SRm0218 and IgG anti-SRm86100 on embryonic tick cells BME26. Different amounts (30 μ g (A), 60 μ g (B) and 120 μ g (C)) of immunoglobulins; IgG anti SRm0218, IgG anti-SRm86100, or IgG purified from a non-related serum or culture medium, L15, alone, as control were tested in culture with embryo tick cell, BME26, under different periods of incubation 1, 3, 5 or 7 days at 34°C * $p > 0.05$ (ANOVA/Dunnet's).

Subsequently, the effects of GSK3 β inhibition were tested using the specific inhibitor GSK3 β XI. The inhibition was tested in BME26 and MDBK cells, enabling to evaluate the effect on host cells also, since GSK-3 β is a conserved protein. After the incubation period, MDBK cells did not show any significant decrease in cellular viability ($p < 0.05$), while tick embryo cells showed significant decrease as tested by ANOVA/Dunnet's, showing up to 48% cellular viability, when incubated with 32 nM of GSK3 β XI and a similar cellular viability decrease when incubated with 64 nM of inhibitor with a standard deviation (S.D.) of 16.2% and 16.4% respectively. (fig. 5). This *in vitro* assay indicates that GSK-3 β inhibition by GSK3 β XI might affect more the parasite than the host, although more studies with different bovine cell lines would help to elucidate the magnitude of the effect of GSK3 β XI.

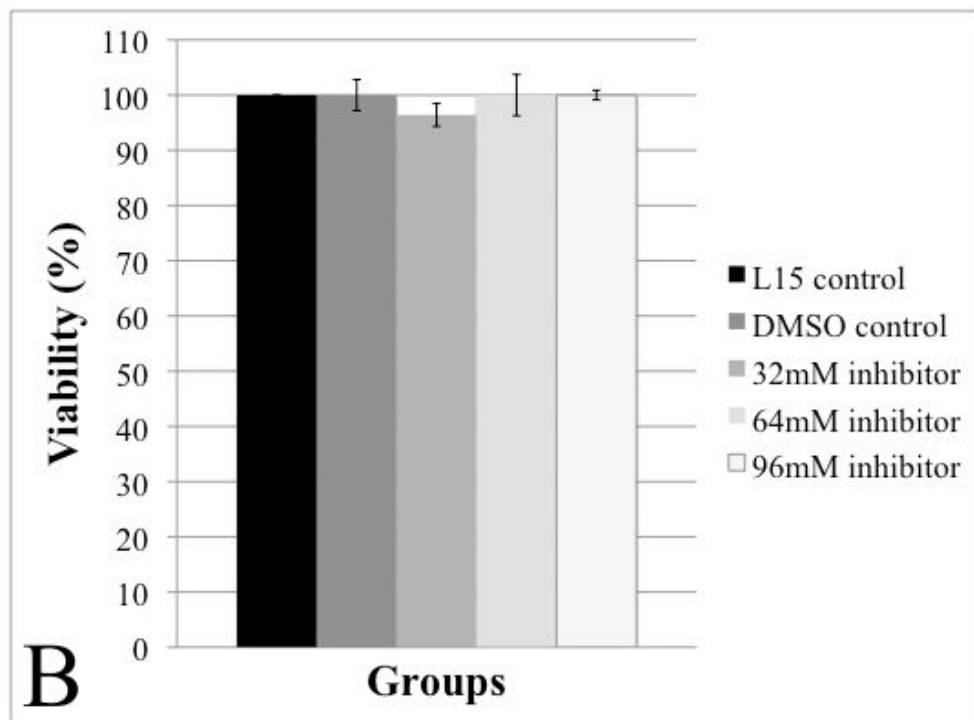
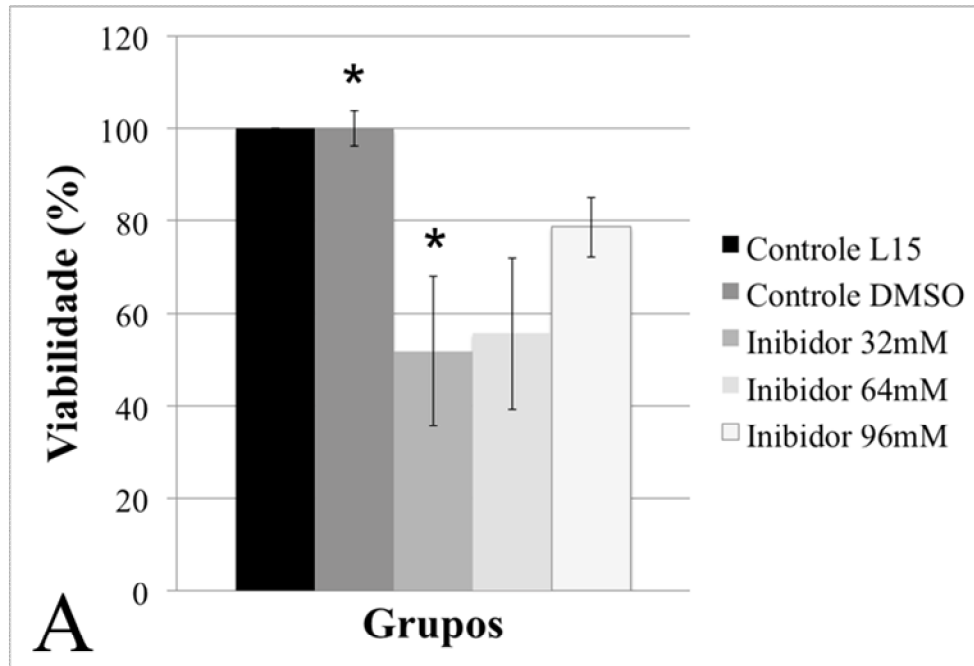


Figure 5 – Cellular viability assay. (A) BME26 and (B) MDBK cells incubated with different concentrations (32 nM, 64 nM, 96 nM) of the inhibitor GSK3 β XI. * $p > 0.05$ (ANOVA/Dunnet's).

3.4 DISCUSSION

GSK-3 is well established as a multifunctional protein, but its involvement in glycogen synthesis modulation is important to *R. microplus*, since it is an oviparous animal (FRAME & COHEN, 2001; VAN AMERONGEN & NUSSE, 2009). In *R. microplus*, GSK-3 β acts in energy metabolism, first promoting the increase in glucose levels in eggs to support embryos metabolism, and then decreasing glucose contents, resulting in glycogen storage (MORAES *et al.*, 2007; LOGULLO *et al.* 2009). In this context, the study of GSK-3 β may help to elucidate how tick embryos use energy and how this usage pattern is reflected on the tick reproductive process.

Serine/threonine kinase GSK-3 β is widely conserved in different species (FISHER *et al.*, 1999; BAX *et al.*, 2001). However, the N-terminal region sequences of these proteins are more conserved than the C-terminal regions; therefore, the C-terminal region has a higher potential as a target for the development of immunological or chemical control method, compared to the N-terminal region (LOGULLO *et al.* 2009). To verify this potential, anti-SRm0218 and anti-SRm86100, antibodies against GSK3 β were evaluated for their GSK-3 β activity inhibition potential and the effects caused on BME26 cellular viability and on *R. microplus* reproductive capacity.

GSK-3 β was reported as an essential kinase in early embryonic patterning, cell fate, cellular polarity, and cell movement in both vertebrates and invertebrates (SALINAS, 2004), which was recently reviewed by Medina and Wandosell (2011). Additionally, Fabres *et al.* (2010) showed that the inhibition of GSK-3 activity alters egg viability, reducing *R. microplus* oviposition and egg hatching, and demonstrating the important role played by GSK-3 β in embryogenesis. In this work, we demonstrated the ability of anti-SRm0218 and anti-SRm86100 to interact with native and recombinant proteins.

However, immunological inhibition assays did not show significant decrease in cell viability. GSK-3 β inhibition was not achieved, possibly because the protein may

not be available to antibodies, since GSK-3 β is an internal protein stored in cytoplasm inclusions and, consequently, it does not interact with host antibodies in tick hemolymph (VAZ Júnior *et al.*, 1996). In addition, the anti-SRm0218 and anti-SRm86100 antibodies were raised against a synthetic peptide, so it is possible that they did not recognize the native protein under physiological conditions. Another possibility is that the peptides chosen are not capable to form the epitopes to block GSK-3 β activity. Besides that, the concentration of antibodies used in the assay may not have inhibited the total amount of protein.

Protein kinases, proteases, G-protein-couple receptors and ion channels GSK-3 β have been studied to identify novel drug targets to be used against disease and to control parasites (McVEIGH *et al.* 2012). The role of GSK-3 in multiple signaling pathways as a regulatory agent suggests the participation in various pathological situations and defines GSK-3 as an important target for disease treatments and parasite control (WOODGETT, 2003). In this work, we tested the effect of GSK-3 β inhibition using the specific inhibitor GSK3XI in culture with tick embryo cells. The significant decrease ($p < 0.05$) of 48% (S.D. 16.2%) in cell viability after the inhibition of GSK-3 β activity shows that the use of an inhibitor could be an alternative to interfere in GSK-3 function and decrease tick reproductive capacity.

In conclusion, understanding the role of proteins, as GSK-3, a key enzyme involved in critical cellular and physiological process, in the parasite development and in its feeding capacity could be important to discover new targets for tick control.

3.5 ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from CNPq-Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Entomologia Molecular, FINEP, CAPES, CNPq, FAPERJ and FAPERGS.

4 DISCUSSÃO

A caracterização funcional de moléculas fisiologicamente importantes para o *R. microplus* e a definição do papel dessas moléculas na interação com hospedeiro auxilia a elucidar a biologia deste parasita. Neste trabalho foi avaliado o efeito produzido pela inibição da atividade da GSK-3 β de *R. microplus*, enfatizando-se as implicações causadas sobre a reprodução.

Apesar de altamente conservada, a variabilidade entre as sequências da proteína GSK-3 conhecidas justifica o seu potencial como alvo para o desenvolvimento de metodologias de controle parasitário. O percentual de identidade entre as sequências dessas proteínas é relativo, principalmente, às alterações presentes em sua porção C-terminal, menos conservada do que na sua porção N-terminal. Dessa forma a região C-terminal possui maior potencial como alvo para o desenvolvimento de métodos de controle químicos ou imunológicos (FISHER *et al.*, 1999; BAX *et al.*, 2001; LOGULLO *et al.*, 2009). Para testar este potencial foram produzidos anticorpos contra peptídeos sintéticos com sequências obtidas de cada uma das regiões, avaliando-se sua capacidade inibitória e os efeitos relativos à viabilidade celular, bem como possíveis alterações na capacidade reprodutiva das fêmeas de *R. microplus*.

No *R. microplus*, a GSK-3 atua no metabolismo energético, fundamental para o desenvolvimento embrionário. Num primeiro momento, a GSK-3 β de *R. microplus* promove o aumento do índice de glicose nos ovos proporcionando o metabolismo embrionário, em seguida, participa do processo que promove a redução deste índice através da glicogênese, que resulta no aumento do índice de glicogênio e consequentemente no armazenamento de reserva energética (MORAES *et al.*, 2007; LOGULLO *et al.*, 2009). É provável que uma interferência nas rotas metabólicas responsáveis pela disponibilização energética a este carrapato seja irreversivelmente prejudicial para seu desenvolvimento e formação de uma nova prole.

Devido ao seu envolvimento na via de sinalização Wnt a GSK-3 já foi descrita como uma quinase essencial para a formação do embrião, sendo uma candidata para a avaliação do processo reprodutivo do carrapato (FERKEY & KIMELMAN, 2002).

Em um experimento *in vitro* com a linhagem celular embrionária de *R. microplus*, BME26, foi observado que a GSK-3 β pode ser inibida por estímulo exógeno (ABREU *et al.*, 2009). Neste trabalho testamos a inibição da atividade da proteína GSK-3 β na mesma linhagem celular a partir da adição dos anticorpos anti-SRm0218 e anti-SRm86100 ou do inibidor GSK-3 β XI no meio de cultura, relacionando o sucesso da inibição da atividade proteica com a diminuição da viabilidade celular.

A capacidade dos anticorpos anti-SRm0218 e anti-SRm86100 interagirem com as formas nativa e recombinantes da proteína GSK-3 β de *R. microplus* foi demonstrada neste trabalho. No entanto, quando aplicados em ensaios de inibição imunológica *in vitro* com células embrionárias de carrapato bovino, BME26, não exerceram efeito na viabilidade celular. Isso se explica, possivelmente, porque a GSK-3 β não está diretamente disponível para a interação com os anticorpos incubados ou que a ligação dos anticorpos com o alvo não foi capaz de inibir a atividade biológica. Outra hipótese é que esses anticorpos, por terem sido produzidos contra peptídeos sintéticos, não sejam capazes de reconhecer a proteína nativa.

Em concordância com o nosso estudo existem na literatura relatos da avaliação de proteínas quinase, como a GSK-3 β , proteases, receptores de proteína-G e canais de íons, objetivando - se identificar um novo alvo para o desenvolvimento de um fármaco contra doenças ou para o controle de parasitas (McVEIGH *et al.*, 2012). Neste estudo, a inibição da GSK-3 β foi avaliada através do uso de um inibidor químico específico, denominado GSK3 β XI, adicionado à cultura de células. A redução de 48% (+/-16%, $p < 0,05$) na viabilidade celular de BME26, após adição do inibidor químico no cultivo celular sugere que a inibição da atividade dessa proteína poderia ser uma alternativa para o controle do carrapato bovino, pois essa interferência possivelmente atuaria negativamente na capacidade reprodutiva do carrapato. No entanto mais estudos são necessários para esclarecer esta hipótese.

Portanto, a caracterização funcional de moléculas fisiologicamente importantes

para o *Rhipicephalus microplus* e a definição do papel dessas moléculas na interação com o hospedeiro auxiliam na elucidação da biologia desse parasita e corroboram para o desenvolvimento de novas metodologias de controle parasitário, a medida que sugerem novos alvos para pesquisas nessa direção.

5 REFERÊNCIAS

ABREU, L. A. *et al.* Exogenous insulin stimulates glycogen accumulation in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo cell line BME26 via PI3K/AKT pathway. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 2, n. 153, p. 185–190, 2009.

ALI, A.; HOEFLICH, K. P.; WOODGETT, J. R. Glycogen synthase kinase-3: properties, functions and regulation. **Chemical Reviews**, v. 101, p. 2527–2540, 2001.

BARKER, S. C.; MURRELL, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. **Parasitology**, v. 129, p. 15–36, 2004.

BATE, M., ARIAS, M. **The Development of *Drosophila melanogaster***. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1993.

BAX, B. *et al.* The structure of phosphorylated GSK-3 beta complexed with a peptide, FRATtide, that inhibits beta-catenin phosphorylation. **Structure**, v. 9, p. 1143–1152, 2001.

BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarida: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v. 16, n. 1 p. 52–61, 1974.

BHAT, R. V. *et al.* Regulation and localization of tyrosine 216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 20, p. 11074–11079, 2000.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

CAMPOS PEREIRA, M. *et al.* *Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência*. São Paulo: MedVet, 169 p. 2008.

CAMPOS, E. *et al.* Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. *Veterinary Parasitology*, v. 138, p: 349–357, 2006.

CARMICHAEL J. *et al.* Evaluation of a tetrazolium based semi-automated colorimetric assay. Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research*, v. 47, p. 936–942, 1987.

CATTERUCCIA, F. *et al.* Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature*, v. 405, p. 959–962, 2000.

CATTERUCCIA, F.; BENTON, J. P.; CRISANTI, A. An Anophelestransgenic sexing strain for vector control. *Nature Biotechnoly*, v. 23, n. 11, p. 1414–1417, 2005.

CHERRY, L. M. The accumulation and utilization of food reserves by adult female cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrine). *Australian Journal of Zoology*, v. 21, p. 403–412, 1973.

CUZZOCREA, S. *et al.* Effects of glycogen synthase kinase-3[beta] inhibition on the development of cerulein-induced acute pancreatitis in mice, *Critical Care Medicine*. v. 35, n. 12, p. 2811-2821, 2007.

ESTEVEZ, E. *et al.* Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, v. 38, p. 568–580, 2008.

ESTRADA-PEÑA, A. *et al.* The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental and Applied Acarology*, v. 38, n. 2–3, p. 219–235, 2006.

ESTRELA, A. B. *et al.* Vitellin- and hemoglobin- digesting enzymes in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae and females. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 157, n. 4, p. 326–335, 2010.

FABRES, A. *et al.* Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi on tick oviposition and egg hatching. **Parasitology**, v. 137, p. 1537–1546, 2010.

FERKEY, D. M.; KIMELMAN, D. Glycogen synthase kinase-3 β mutagenesis identifies a common binding domain for GBP and axin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 18, p. 16147–16152, 2002.

FISHER, D. L.; MORIN, N.; DOREE, M. A novel role for glycogen synthase kinase-3 in *Xenopus* development: maintenance of oocyte cell cycle arrest by a beta-catenin-independent mechanism. **Development**, v. 126, p. 567–576, 1999.

FRAME, S.; COHEN, P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. **The Biochemical Journal**, v. 359, p. 1–16, 2001.

FURLONG J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. Belo Horizonte: **Escola de Veterinária da UFMG, 1993. Boletim Técnico**, n. 8, p.49–61, 1993.

GONSIOROSKI, A. V. *et al.* Anti-tick monoclonal antibody applied by artificial capillary feeding in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 359–363, 2012.

GONZALES, J. C. O ciclo parasitário do *Boophilus microplus* (Canestrine, 1887) em bovinos estabulados. **Arquivo faculdade de veterinária UFRGS**, v. 2, n. 1, p. 25–34, 1974.

GONZALES, J. C. A vida livre do carrapato bovino (Canestrine, 1887). **Arquivo faculdade de veterinária UFRGS**, v. 3, n. 1, p. 13–19, 1975.

GRISI, L. *et al.* Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8–10, 2002.

HEDGEPEETH, C. M.; DEARDORFF, M. A.; KLEIN, P. S. *Xenopus* axin interacts with glycogen synthase kinase-3 beta and is expressed in the anterior midbrain. **Mechanisms of Development**, v. 80, n. 2, p. 147–151, 1999.

HOOGSTRAAL, H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Advances in Parasitology**, v. 24, p. 135–238, 1985.

JAMESON, B. A.; WOLF, H. The antigenic index – a novel algorithm for predicting antigenic determinants. **CABIOS** 4, p. 181–186, 1988.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 1–10, 2006.

JOPE, R. S.; YUSKAITIS, C. J.; BEUREL, E. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, diseases and therapeutics. **Neurochemical Research**, v. 32, p. 577–595, 2007.

KAUFMAN, W. R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitology Today**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 47–56, 1989.

KLAMER G. *et al.* Using small molecule GSK-3 beta inhibitors to treat inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2873–81, 2010.

KUNZ, S. E.; KEMP, D. H. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impacts. **Revue Scientifique et Technique de L'Office International Des Epizooties**, v. 13, p. 1249–1286, 1994.

LOGULLO, C. *et al.* Binding and storage of heme by vitellin from tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 32, n. 12, p. 1805–1811, 2002.

LOGULLO, C. *et al.* Expression and activity of glycogen synthase kinase during vitellogenesis and embryogenesis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 261–269, 2009.

McVEIGH, P. *et al.* Parasite neuropeptide biology: Seeding rational drug target selection. **International Journal of Parasitology Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 76–91, 2012.

MEDINA, M.; WANDOSELL, F. Deconstructing GSK-3: The fine regulation of its activity. **International Journal of Alzheimer's Diseases**, v. 2011, p. 1–12, 2011.

MORAES, J. *et al.* Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*, **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, p. 528–533, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MUKAI, F. *et al.* Alternative splicing isoform of tau protein kinase I /glycogen synthase kinase 3 β . **Journal of Neurochemistry**, v. 81, n. 5, p. 1073–1083, 2002.

MUNDERLOH U. G. *et al.* Invasion and intracellular development of the human granulocytic ehrlichiosis agent in tick cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2518–2524, 1999.

NAGAR, S. K. On the significance of the duration of preoviposition and oviposition periods in ixodid ticks. **Acarologia**, v.40, p. 123–131, 2006.

NELSON D. L.; COX M. M. Hormonal regulation of fuel metabolism. *In*: Leninger. **Principles of Biochemistry**, New York: W. H. Freeman and Company, p. 922–929, 2008.

NUSSLEIN-VOLHARD, C.; ROTH, S. Axis determination in insect embryos. **Ciba Foundation Symposium Journal**, v. 144, p. 37–55, 1989.

OJO, K. K. *et al.* Glycogen synthase kinase 3 is a potential drug target for african trypanosomiasis. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3710–3717, 2008.

OJO, K. K. *et al.* Structure determination of glycogen synthase kinase-3 from *Leishmania major* and comparative inhibitor structure–activity relationships with *Trypanosoma brucei* GSK-3. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3710–3717, 2011.

OLDIGES, D. P. *et al.* A *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cathepsin with dual peptidase and antimicrobial activity. **International Journal for Parasitology**, v. 42, p. 635–645, 2012.

PARKER P. J.; CAUDWELL F. B.; COHEN P. Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle; effect of insulin on the state of phosphorylation of the seven phosphoserine residues *in vivo*. **Euro Journal Biochemistry**, v. 130, p. 227–34, 1983.

PLYTE S. E. *et al.* Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. **Biochimica Biophysica Acta**; v. 1114, p. 147–62, 1992.

POWELL, R. T.; REID, T. J. Project tick control. **Agricultural Journal**, v. 108, n. 6, p. 279–300, 1982.

RAGANO-CARACCILO, M. *et al.* Nuclear Glycogen and Glycogen Synthase Kinase 3. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 249, n. 2, p. 422–427, 1998.

ROSA DE LIMA, M. F. *et al.* Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 747–754, 2002.

ROSARIO-CRUZ, R. *et al.* Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 14, p. 2657–2665, 2009.

RING, D. B. *et al.* Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization *in vitro* and *in vivo*. **Diabetes**, v. 52, n. 3, p. 588–595, 2003.

SALINAS, P. C. Signaling at the vertebrate synapse: new roles for embryonic morphogens? **Journal of Neurobiology**, v. 64, n. 4, p. 435–445, 2005.

SAPPINGTON, T. W. RAIKHEL, A. S. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, p. 277–300, 1998.

SAUERESSIG, T. M. Estudo da fase não parasitária do carrapato de bovinos em pastagens cultivadas e nativa no Distrito Federal. **Planaltina: Embrapa Cerrados, Boletim de Pesquisa**, v. 37, 15p, 1994.

SCAPIN, G. Structural biology in drug design: Selective protein kinase inhibitors. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 11, 2002.

SEIXAS, A. *et al.* A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase **Parasitology**, v. 126, p. 155–163, 2003.

SEIXAS, A. *et al* *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 148, p. 149–156, 2012.

SEIXAS, A. *et al*. Endocrinologia e controle da vitelogênese em carrapatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 2, p. 95–111, 2010.

SONG, J. L.; WONG, J. L.; WESSEL, G. M. Oogenesis: Single cell development and differentiation. **Developmental Biology**, v. 300, p. 385–405, 2006.

SORGINE, M. H. *et al*. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 28659–32865, 2000.

TSAI, I. J. *et al*. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. **Nature**, v. 496, p. 57–63, 2013.

VAN AMERONGEN, R.; NUSSE, R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. **Development**, v. 136, p. 3205–3214, 2009.

VAZ Júnior, I. da S. *et al*. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p.155–160, 1996.

WAGLANG, B. M., Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animals. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29, p.401-409, 1978.

WANG, Q. M. *et al*. Glycogen synthase kinase-3 β is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 20, p. 14566–14574, 1994.

WILLADSEN, P. Tick control: Thoughts on a research agenda. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 161–168, 2006.

WOODGETT, J. R. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. **The Embo Journal**, v. 9, n. 8, p. 2431–2438, 1990.

WOODGETT, J. R. Judging a protein by more than its name: GSK-3. **Science Signaling: The Signal Transduction Knowledge Environment**, v. 2001, n. 100, p. 1–12, 2001.

WOODGETT, J. R. Physiological roles of glycogen synthase kinase-3: potential as a therapeutic target for diabetes and other disorders. **Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 3, n. 4, p. 281–90, 2003.