

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Clonagem e caracterização do gene da Glicogênio
Sintase Quinase 3 de *Rhipicephalus (Boophilus)*
microplus

Caroline Pinto de Andrade

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular da UFRGS

Orientador: Itabajara da Silva Vaz Jr.

Co-orientadora: Aoi Masuda

Porto Alegre, novembro de 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Clonagem e caracterização do gene da Glicogênio
Sintase Quinase 3 de *Rhipicephalus (Boophilus)*
microplus

Caroline Pinto de Andrade

Este trabalho foi realizado no Laboratório de
Imunologia Aplicada à Sanidade Animal do Centro
de Biotecnologia, na Universidade Federal do Rio
Grande do Sul - UFRGS, com apoio financeiro da
CAPES, PRONEX, FINEP, FAPERGS, FAPERJ e
JSPS.

Color Esperanza

Sé que hay en tus ojos con solo mirar
que estas cansado de andar y de andar
y caminar girando siempre en un lugar

Sé que las ventanas se pueden abrir
cambiar el aire depende de ti

te ayudara vale la pena una vez más

Saber que se puede querer que se pueda

quitarse los miedos sacarlos afuera

pintarse la cara color esperanza

tentar al futuro con el corazón

Es mejor perderse que nunca embarcar

mejor tentarse a dejar de intentar

aunque ya ves que no es tan fácil empezar

Sé que lo imposible se puede lograr

que la tristeza algún día se irá

y así será la vida cambia y cambiará

Sentirás que el alma vuela

por cantar una vez más

Vale más poder brillar

Que solo buscar ver el sol

Diego Torres

Dedico este trabalho aos meus Pais, Silvia e Luiz,

minha irmã Luciana, aos meus avós e ao Bruno

por sempre estarem ao meu lado me

apoiando e dando força.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por iluminar meu caminho.

Agradeço aos orientadores Itabajara da Silva Vaz Jr. e Aoi Masuda pela oportunidade de aprendizagem e pelos ensinamentos.

Ao Professor Laurent Meijer, do Instituto de Rocoff (França) pela importante colaboração e por acreditar no meu trabalho.

À banca examinadora por dedicar um pouco do seu tempo para a leitura e defesa da dissertação.

À secretária Silvia e ao secretário Luciano por toda ajuda.

À Professora Sandra pela amizade e ensinamentos.

À técnica Clotilde pela amizade e por sempre estar disposta a ajudar.

Ao Carlos Logullo e a todos os amigos do Laboratório de Química e Função de Proteína e Peptídeos da UENF por toda ajuda e amizade quando estive em Campos.

Aos amigos antigos e novos que fiz durante esses 3 anos no laboratório: Silvia, Alexandra, Luis, Melina, Andressa, Carolina, Isis e Kiyoko. Em especial as amigas do coração: Ana Paula, Maria Lúcia, Paula, Mariana, Leonara, Juliana e Fernanda pela amizade e por todos os momentos inesquecíveis que passamos e que passaremos juntas.

Um agradecimento especial a minha querida família, meus pais Silvia e Luiz, minha irmã Luciana, meu cunhado Cristiano, meus avós, em especial, minha avó Isabel por serem o meu Porto Seguro e por todo amor e carinho. Ao Bruno por fazer meus dias mais felizes e por sempre estar ao meu lado, mesmo em noites de tormenta, pelo amor e carinho incondicional. Se hoje estou aqui é por causa dessas pessoas que sempre me deram força e são os meus exemplos de vida.

Por fim agradeço a todos que de alguma forma ajudaram a concluir a mais uma etapa da minha vida.

OBRIGADA

Caroline Pinto de Andrade

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	8
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. O carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> e o ciclo de vida.....	14
1.2. Importância econômica	15
1.3. Métodos de Controle.....	16
1.3.1 Controle Químico	16
1.3.2 Controle Biológico.....	17
1.3.3 Controle Imunológico.....	18
1.4. Embriogênese do carrapato.....	20
1.5. Glicogênio Sintase Quinase -3 β (GSK-3 β).....	21
1.6. Inibidores da GSK-3 β	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Soluções e Tampões.....	26
3.1.1. Tampão para eletroforese e <i>Western blot</i>	26
3.1.2. Soluções para extração de DNA plasmidial.....	26

3.1.3. Gel de agarose, gel de poliacrilamida e marcadores de massa molecular.....	27
3.1.4. Meio de Cultura.....	27
3.1.5. Antibióticos.....	28
3.1.6 Inibidores.....	28
3.2. Linhagens de <i>E. coli</i>.....	28
3.3. Enzimas.....	29
3.4. Vetores para clonagem e expressão.....	30
3.5. Primers para a clonagem e qPCR.....	30
3.5.1. Primers para 5'RACE e 3'RACE.....	30
3.5.2. Primers para clonar a ORF da GSK-3 β	30
3.5.3. Primers para clonagem no vetor de expressão.....	30
3.5.4. Primers para o qPCR.....	31
3.6. Clonagem da região codificadora da GSK-3β de <i>R. microplus</i>.....	31
3.6.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	31
3.6.2. 5'RACE e 3'RACE.....	32
O cDNA foi sintetizado a partir de ovos do carrapato, o qual o primer utilizado foi 5'-CAATGCGGTCCACAAA-3' e a enzima transcriptase reversa (M-MLV RT). O cDNA amplificado do PCR foi feito com primer ancorador (AUAP) e um <i>primer</i> "nested" específico. Um segundo primer nested específico foi utilizado para uma segunda reação de PCR. O produto do PCR foi clonado no vetor pGEM-TEasy e seqüenciado uma porção do plasmídeo. Novos <i>primers</i> foram desenvolvidos para clonar o cDNA completo da região codificadora da GSK-3 β o cDNA, correspondentes ao final 3'e 5'. O produto do PCR foi clonado também no vetor pGEM-TEasy.....	32
3.6.3 Clonagem da região codificadora da GSK-3 β do carrapato <i>R. microplus</i>	32
3.6.4 Transformação por eletroporação e por choque térmico.....	33
3.6.6 Análise quantitativa e qualitativa do DNA plasmidial.....	34
3.6.7 Seqüenciamento dos clones obtidos na extração plasmidial.....	35
3.7. Subclonagem da região codificadora da GSK-3β nos vetores de expressão.....	35
3.7.1 Purificação do DNA por extração de banda de gel de agarose (GeneClean).....	35
3.7.2 Hidrólise do DNA purificado para subclonagem nos vetores de expressão.....	36
3.7.3 Desfosforilação dos vetores de expressão.....	36
3.7.4 Reação de ligação.....	36
3.8. Teste de expressão da rGSK-3β em pequena escala.....	36
3.8.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	37
3.8.2 <i>Western blot</i>	37

3.9.	Avaliação da transcrição relativa da GSK3β por PCR quantitativo	38
3.9.1	Tratamento das células embrionárias BME26 para análise por qPCR.....	38
3.10.	Inoculação dos inibidores específicos da GSK-3β em teleóginas.....	39
3.11.	Alimentação artificial por capilar.....	39
4.	RESULTADOS	40
4.1.	Clonagem da região codificadora da GSK-3β do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>.....	40
4.2.	Análise da transcrição relativa por qPCR do gene da GSK-3β de <i>Rhipicephalus microplus</i>....	44
	Órgãos de partenóginas e teleóginas.....	44
	Embriogênese do carrapato.....	45
	Células embrionárias do carrapato (BME26) tratadas sob diferentes condições	46
4.3.	Análise da inoculação do inibidor alsterpaullone em teleóginas	48
4.4.	Análise do inibidor alsterpaullone em partenóginas via alimentação artificial por capilar	52
5.	DISCUSSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
	ANEXO	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

° C	graus Celsius
µg	microgramas
µL	microlitros
µM	micromolar
g	grama
kDa	quilodalton = 1000 daltons
PB	pares de bases
mim	minutos
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
Ic ₅₀	Concentração inibitória para 50%
3'RACE	Rapid amplification of 3' complementary DNA ends
5'RACE	Rapid amplification of 5' complementary DNA ends
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
BIO-6	Bromo-indirubin-oxime 6
BME26	Células embrionárias do carrapato <i>R. microplus</i>
BYC	<i>Boophilus Yolk pro-Cathepsin</i>
cDNA	DNA complementar
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deóxido nucleotídeo (dATP+ dCTP+ dGTP+ dTTP)
eIF2B	Fator de iniciação eucariótica
GSK-3β	Glicogênio Sintase Quinase 3 beta
GST	Glutathione S Transferase
IMI	Indirubin-3'-oxime
IPTG	isopropil β-D-tiogalactosídeo
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosida
IRS	Receptor de insulina

mRNA	RNA mensageiro
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PKB/Akt	Proteína Quinase B
qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real
RT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase por Transcrição reversa
SDS- PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio
THAP	Aspártico Proteinase ligadora de Heme do carrapato
VTDC	Cisteíno endopeptidase degradadora de vitelina
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

Figura 2. Etapas do desenvolvimento do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

Figura 3. Esquema representativo da ativação e desativação da GSK-3 via cascata da insulina.

Figura 4. Análise em eletroforese em gel de agarose 0,8% da extração plasmidial das construções nos vetores de expressão e GSK-3 β e dos produtos de PCR de cada clonagem.

Figura 5. Alinhamento da seqüência de aminoácidos deduzidos da GSK-3 β de *R. microplus* e outros organismos.

Figura 6. Análise da transcrição relativa do gene GSK-3 β por qPCR em ovário, intestino e corpo gorduroso de partenóginas e teleóginas em relação ao gene 40S ribossomal.

Figura 7. Análise da transcrição relativa do gene GSK-3 β por qPCR em ovos de diferentes dias da embriogênese após o primeiro dia de postura de fêmeas ingurgitadas, em relação ao gene 40S ribossomal.

Figura 8. Análise da transcrição relativa do gene GSK-3 β por qPCR em células embrionárias BME26 tratadas sob diferentes condições, em relação ao gene 40S ribossomal.

Figura 9. Efeito do inibidor alsterpaullone no desenvolvimento do embrião após 21 dias de postura.

Figura 10. Foto ilustrativa da técnica de alimentação artificial por capilar.

Figura 11. Efeito do inibidor alsterpaullone em partenóginas através da alimentação artificial por capilar.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração de cada reagente para SDS-PAGE 12%.

Tabela 2. Concentrações de antibióticos utilizados.

Tabela 3. Linhagens de *E. coli* BL21.

Tabela 4. Efeito do inibidor alsterpaullone em fêmeas ingurgitadas, postura e eclosão dos ovos.

Tabela 5. Efeito dos inibidores BIO-6 e Indirubin-3-oxime em fêmeas ingurgitadas, postura e eclosão dos ovos.

Tabela 6. Efeito do inibidor alsterpaullone em partenóginas alimentadas artificialmente por capilar, postura e eclosão dos ovos.

RESUMO

Rhipicephalus (Boophilus) microplus é um parasita que infesta bovinos causando grandes perdas na pecuária. O método convencional para o controle é através do uso de produtos químicos. Esses produtos causam a seleção de carrapatos resistentes a acaricidas e a poluição do meio-ambiente. Uma abordagem alternativa tem sido testada, o qual inclui o uso de vacinas. Entretanto, o sucesso dessa estratégia é dependente da caracterização de antígenos do carrapato. A Glicogênio Sintase Quinase-3 β (GSK-3 β) é uma serina\treonina quinase que está envolvida no metabolismo do glicogênio, durante a embriogênese do carrapato. O estudo da embriogênese do carrapato é fundamental no desenvolvimento de novas metodologias propostas para o controle desses vetores. A interferência na embriogênese pode resultar em um decréscimo na viabilidade dos ovos ou até em uma letalidade precoce. Nesse trabalho, a região codificadora da GSK-3 β do carrapato foi obtida através do 5'RACE, 3'RACE. A transcrição relativa do gene da GSK-3 β em ovário de carrapato foi maior quando comparado com intestino e corpo gorduroso, sugerindo que a GSK-3 β está envolvida no desenvolvimento de oócitos. Na embriogênese a transcrição relativa do gene da GSK-3 β começou no 1º dia de postura com um aumento gradual até 15º dia. No 18º dia ocorre um declínio e depois a transcrição relativa do gene aumentou novamente, indicando que a GSK-3 β teria alguma função relacionada com o final de embriogênese. A transcrição relativa do gene da GSK-3 β em células embrionárias do carrapato (BME26) aumentou com o tratamento de insulina. Quando tratadas com tirfostin (inibidor do receptor de insulina), SB216763 (inibidor específico da GSK-3), e wortimanina (inibidor da PI3K) a transcrição relativa do gene foi semelhante ao controle. O alsterpaullone (inibidor específico da GSK-3) inibiu o desenvolvimento dos embriões tanto em fêmeas injetadas com o inibidor como em fêmeas alimentadas artificialmente, sugerindo que a GSK-3 β seria crucial para o desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

Rhipicephalus (Boophilus) microplus is a parasite that infests bovines causing losses in cattle production. The conventional method for control is the use of synthetic chemical products. These products cause the selection of acaricide-resistant ticks and pollution of the environment. A range of alternative approaches have been taken, which include the use of vaccine. However, the success of this strategy is dependent on the characterization of the tick antigens. The Glycogen Synthase Kinase (GSK-3 β) is a serine/threonine kinase that is involved in glycogen metabolism during tick embryogenesis. The tick embryogenesis studies have played a fundamental role in designing new methodologies proposed for the control of these vectors. Interference on embryogenesis can result in the decrease of the egg's viability or even in early lethality. In this work, the full length cDNA encoding the GSK-3 β protein of the tick has been obtained by 5'-RACE and 3'-RACE. The relative transcription of GSK-3 β gene in ovaries was higher when compared with gut and fat body, suggesting that GSK-3 β was involved in the oocytes development. In the embryogenesis the relative transcription of the GSK-3 β gene started on 1st day with gradual increase until a peak at 15th day post oviposition. In 18th day occurred a decline and after the relative transcription increase again. Probably the GSK-3 β has some function related with final embryogenesis. The relative transcription of GSK-3 β gene in cells BME26 when treated with insulin increased. When treated with tyrphostin, wortimanin and SB216763 did not increase. The alsterpaullone, GSK-3 β specific inhibitor, blocks the embryo development of females ticks injected with the inhibitor and with artificial capillary feeding method, suggesting that GSK-3 β could have a crucial function in the embryo development.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e o ciclo de vida

Em 2003, o *Boophilus microplus* foi reclassificado, com base em análises moleculares e morfológicas, como pertencente ao gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus*, com a nomenclatura de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MURREL & BARKER, 2003), sendo a nova nomenclatura utilizada neste texto.

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita hematófago pertencente à família Ixodidae, que tem como principal hospedeiro os bovinos, podendo eventualmente infestar búfalos, ovelhas e cavalos. Sua distribuição ocorre entre os paralelos 32°N e 32°S, nas regiões da América, Ásia, África e Oceania (GONZALES, 1975).

O ciclo biológico do carrapato compreende duas fases de vida, uma parasitária e uma livre. A fase parasitária dura aproximadamente 21 dias, na qual o carrapato diferencia-se nos estágios de larva, ninfa e adulto. Nessa fase o carrapato alimenta-se do sangue do hospedeiro até completar o seu ingurgitamento, onde cairá no solo (GONZALES, 1975).

A fase de vida livre inicia com a queda da fêmea ingurgitada (teleógina) onde ela realizará a postura dos ovos até aproximadamente o 21º dia. As larvas recém eclodidas migram para as pontas da vegetação, onde localizam o hospedeiro pelo odor, vibrações, sombreamento e estímulo visual (WALADDE & RICE, 1982). As larvas que encontram hospedeiro se fixam em regiões corporais mais propícias para seu desenvolvimento e se alimentam de linfa. Em aproximadamente sete

dias, mudam para o estágio de ninfa e estas se diferenciam em adulto, período em que ocorre o dimorfismo sexual. Nesse estágio, ocorre a cópula e a fêmea começa a ingerir sangue até seu ingurgitamento total, que propicia sua queda ao solo. O macho permanece no hospedeiro à procura de novas fêmeas, sobrevivendo até duas vezes mais que elas (ROBERTS, 1968).

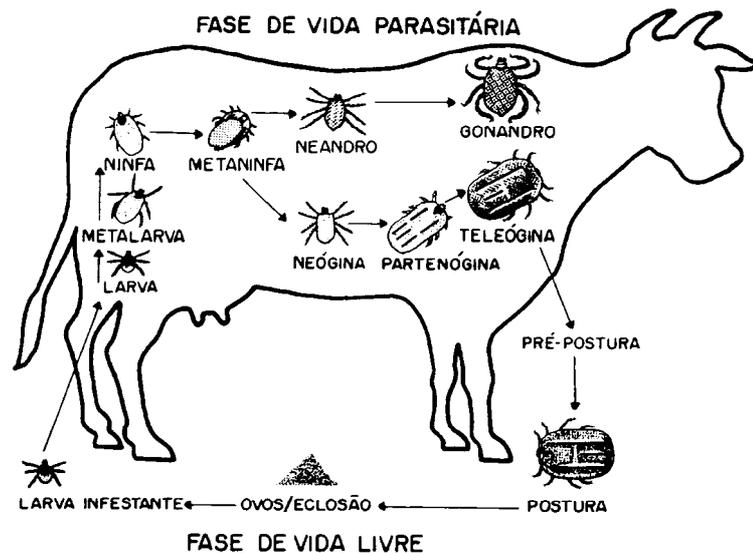


Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida do carrapato *R. microplus* (Fonte: GONZALES, 1975).

1.2. Importância econômica

Atualmente, o Brasil é o maior produtor de carne bovina do mundo, e possui um rebanho bovino de aproximadamente 207 milhões de cabeças, produzindo 9 milhões de toneladas de carne e 25 bilhões de leite por ano (CNPQ, 2007). O carrapato *Rhipicephalus microplus* é o mais importante ectoparasita dos rebanhos bovinos do Brasil, causando diversos danos no couro devido à reação inflamatória no local de fixação do carrapato e

queda na produção de leite e carne, principal fonte de proteína consumida no país (GONZALES, 1975).

Além disso, o carrapato é principal vetor de protozoários do gênero *Babesia* e rickétsia do gênero *Anaplasma*, agentes da tristeza parasitária bovina (TPB) (YOUNG & MORZARIA, 1986; McCOSKER, 1981). Os prejuízos causados pelo parasitismo podem ultrapassar um bilhão de dólares anuais no Brasil, devido aos danos no gado, couro e leite (EMBRAPA, 2006).

1.3. Métodos de Controle

O principal método de controle utilizado no combate ao carrapato é o controle químico, através do uso de acaricidas. Porém, outras alternativas estão sendo desenvolvidas, como o controle biológico e o controle imunológico.

1.3.1 Controle Químico

Os principais compostos utilizados nos acaricidas são as formamidas, organofosforados ou piretróides sintéticos (BARRÉ *et al.*, 2008). Contudo esses compostos causam muitos prejuízos, como por exemplo, a presença de resíduos na carne e no leite, a contaminação do ambiente com resíduos deixados no solo e na água, além de selecionar populações de carrapatos resistentes com contínuo uso de acaricidas (PRUETT, 1999; NOLAN, 1985).

O Amitraz é um dos principais acaricidas utilizados no controle do carrapato, porém esses parasitas têm mostrado resistência desde 2001. ROSADO-AGUILAR *et al.* (2008) demonstraram que carrapatos apresentaram resistência ao amitraz após 15 tratamentos em campo, o que corresponde aproximadamente 5 gerações.

Outro problema encontrado é o surgimento de populações de carrapatos resistentes a mais de um acaricida, como por exemplo, no sul do México, onde populações de *R. microplus* apresentaram resistência a piretróides, organofosforados e amitraz. A alternativa possível para uso de acaricidas é a

rotação no uso dos compostos, que poderá permitir uma redução no número de carrapatos resistentes aos acaricidas (THULLNER *et al.*, 2007).

Outra alternativa seria o uso de novos acaricidas, como os inibidores de desenvolvimento, fluazuron e fipronil, que têm sido utilizados na tentativa de controlar carrapatos resistentes a outros princípios ativos (GEORGE *et al.*, 2004; SABATINI *et al.*, 2001).

1.3.2 Controle Biológico

O controle biológico pode ser um método alternativo, o qual irá depender do tipo de vegetação e das condições climáticas e tem como predadores naturais bactérias e fungos, bem como insetos e aves.

Os carrapatos estão sujeitos a muitos predadores, dentre os quais deve-se salientar a garça-vaqueira (*Egretta ibis*) que segue os rebanhos bovinos e alimenta-se de fases imaturas retiradas do corpo dos bovinos ou de teleóginas que caem ao solo, sendo capazes, em certas circunstâncias, de reduzir em até 66% o número de teleóginas que realizam postura (ALVES-BRANCO *et al.*, 1983). O pássaro "vira-bosta" (*Molotrus bonariensis*), o quero-quero (*Vanellus chilensis*) e formigas carnívoras também se alimentam das teleóginas que caem ao solo (GONZALES, 1975).

Bactérias, como *Escherichia coli*, *Cedecea lapagei* e *Enterobacter agglomerans* são naturalmente encontradas no aparelho reprodutor feminino do carrapato. Existem relatos de uma diminuição de até 47% na postura quando teleóginas de *R. microplus* foram submersas em suspensão de *C. lapagei* (BRUM, 1988). Outros organismos parasitas, tais como nematódeos, tem sido também avaliados como ferramentas no controle biológico de carrapatos, já que têm se mostrados eficientes no controle de insetos (SAMISH & GLAZER, 2001).

O uso de fungos entomopatogênicos no controle do carrapato tem sido muito estudado, principalmente se esses organismos penetrarem na cutícula e que sejam capazes de afetar todos os estágios de desenvolvimento (FERNANDES & BITTENCOURT, 2008).

Um estudo demonstra que o fungo *Metarhizium anisopliae*, da linhagem Ma34 teve alto grau de virulência contra o carrapato, principalmente com os ovos e adultos do *R. microplus* (OJEDA, 2007). Essa mesma linhagem foi utilizada em carrapatos de campo e foi constatado um alto grau de virulência (ALONSO-DÍAZ *et al.*, 2007).

Outro sistema estudado é o uso de ferormônios e fungos, onde os carrapatos do campo são atraídos para locais onde estão localizados os fungos a fim de reduzir a população desses parasitas (MARANGA *et al.*, 2006).

1.3.3 Controle Imunológico

O controle imunológico surgiu como uma tecnologia adicional no controle desse parasita (PRUETT, 1999; NOLAN, 1985). Entretanto, o sucesso dessa estratégia é dependente da clonagem de genes e caracterização de antígenos do carrapato. Testes de imunização com diferentes antígenos do parasita fornecem evidências de que o controle do carrapato pode ser realizado através da vacinação. É necessário também, além da identificação de proteínas capazes de induzir uma resposta imune protetora, o conhecimento dos mecanismos de resposta imunológica dos hospedeiros (WIKEL, 1996).

A busca de proteínas com possível potencial imunogênico pode ser baseada na categoria de antígenos naturalmente expostos ao sistema imune do hospedeiro durante a fase parasitária, como proteínas presentes na saliva, e os antígenos ocultos, aqueles que não entram em contato com o hospedeiro. E por não serem expostos naturalmente ao hospedeiro possam causar uma maior proteção. (WILLADSEN & KEMP, 1988).

Duas vacinas, baseadas no antígeno recombinante Bm86 (WILLADSEN *et al.*, 1995; DE LA FUENTE *et al.*, 1999), já foram desenvolvidas contra o carrapato *R. microplus*, sendo possível verificar redução no número, peso e capacidade de reprodução das fêmeas (WILLADSEN, 2006). Na Austrália, por exemplo, a vacinação contra carrapatos bovinos levou a uma redução de 56% no número de carrapatos e 72% de redução da eficácia de reprodução (JONSSON *et al.*, 2000a). Em Cuba o uso da vacina reduziu o número de tratamentos com acaricidas, como

também a incidência de anaplasmosose e babesiose, sendo capaz de controlar populações de carrapatos resistentes a carrapaticidas (DE LA FUENTE *et al.*, 1999).

Duas proteínas do carrapato têm sido descritas e já foram testadas em ensaios de imunização de animais e conferiram algum grau de imunoproteção ou induziram a produção de anticorpos, interferindo no sucesso reprodutivo do carrapato, como é o caso da glicoproteína BYC (*Boophilus* Yolk Cathepsin) (LOGULLO *et al.*, 1998; DA SILVA VAZ JR. *et al.*, 1998), e de inibidores de tripsina (BmTIs) (ANDREOTTI *et al.*, 2002).

Outras proteínas envolvidas em diferentes funções fisiológicas do carrapato têm sido caracterizadas por diversos grupos de pesquisa, como a THAP (*Tick Heme-binding Aspartic proteinase*) (SORGINE *et al.*, 2000), a Glutathione S-transferase (GST) (DA SILVA VAZ JR. *et al.*, 2004; ROSA DE LIMA *et al.*, 2002), a VTDCE (SEIXAS *et al.*, 2003) a BmCL1 (RENARD *et al.*, 2000) e a calreticulina (FERREIRA *et al.*, 2002).

O efeito imunoprotetor da BYC recombinante (rBYC) expressa em *E. coli* foi avaliado (LEAL *et al.*, 2006). O soro dos bovinos imunizados com rBYC reconheceu a proteína nativa com título entre 125 e 4000 (ELISA). Os bovinos imunizados quando desafiados com 20.000 larvas de *R. microplus* apresentaram uma proteção de 25% que é similar à alcançada com a proteína nativa, o qual teve uma proteção de 36%, considerando o peso dos carrapatos, oviposição e eclosão (DA SILVA VAZ JR. *et al.*, 1998).

Diferentemente da Bm86, o primeiro antígeno usado em vacina contra carrapato (WILLADSEN, 1995), os anticorpos gerados após a imunização com BYC interferiram no aparelho reprodutivo, afetando principalmente a eclosão das larvas, efeito que é consistente com o papel proposto para esta enzima na degradação de vitelo durante a embriogênese (LOGULLO *et al.*, 1998).

No entanto, mesmo com todas estas demonstrações de que a imunização pode ser um método eficiente no controle de carrapato, vacinas contra carrapato devem ser empregadas dentro de um contexto de controle integrado, isto é, em conjunto com acaricidas, já que as vacinas atualmente não conferem imunidade total (REDONDO *et al.*, 1999).

1.4. Embriogênese do carrapato

O estudo da embriogênese e do metabolismo energético do *R. microplus* tem um papel fundamental no desenvolvimento de novas metodologias para o controle desses vetores. E estudar essa fase de vida do carrapato possibilita entender como os embriões são capazes de coordenar todo o processo de obtenção de energia encapsulados nos ovos, para manter o controle da mobilização e síntese das principais reservas desses embriões.

O embrião necessita de uma alta demanda de energia, que é suprimida pelo catabolismo de biomoléculas, tais como, carboidratos e lipídeos, os quais participarão de outras vias biossintéticas, para garantir o sucesso do desenvolvimento embrionário (THOMPSON & STEWART, 1997).

Na embriogênese de ovíparos ocorre uma ausência de nutrientes exógenos durante o desenvolvimento, sendo dependente dos nutrientes maternos estocados nos oócitos, como os carboidratos que são estocados como glicogênio (SONG *et al.*, 2006; SAPPINGTON & RAIKHEL, 1998). Depois da maturação, os oócitos aumentam e acumulam RNA, carboidratos, lipídeos e proteínas que servem como substratos para vias metabólicas funcionais do desenvolvimento embrionário (DE OLIVEIRA *et al.*, 2006). A fase inicial, antes da formação do blastoderme celular, é caracterizada pelo consumo de glicogênio materno e ocorre uma segunda fase caracterizada pela intensa degradação de aminoácidos que promovem a acumulação de glicogênio de glicose nesse estágio (SONG *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2007).

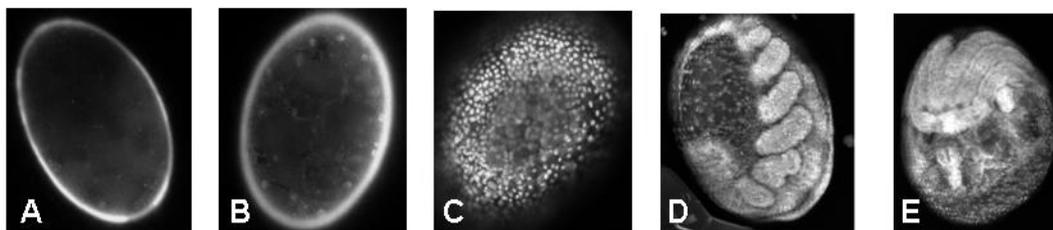


Figura 2: Etapas do desenvolvimento do carrapato *R. microplus*. A- 1 dia, B- 3 dias (blastoderma sincicial), C- 5 dias (blastoderma celular), D- 7 dias (embrião segmentado), E- 12 dias (Campos *et al.*, 2006).

Por isso, o estudo da embriogênese do carrapato *R. microplus* é importante, pois pode fornecer bases científicas para o desenvolvimento de novas metodologias de controle, que podem resultar em um decréscimo da viabilidade dos ovos ou uma letalidade precoce das fêmeas em postura (ROSA DE LIMA *et al.*, 2002).

Uma maneira de aprofundar os estudos sobre a embriogênese do carrapato é através do uso de células embrionárias do carrapato. ESTEVES *et al.* (2008) caracterizou as células embrionárias do *R. microplus*, denominada BME26. A cultura primária foi desenvolvida em 1981, a partir de uma massa de ovos de 17 dias. Como as células foram obtidas a partir de uma massa de tecido de ovos, ainda não se conhece a origem do tecido e a diferenciação dessas células, sendo uma linhagem heterogênea (ESTEVES *et al.*, 2008).

1.5. Glicogênio Sintase Quinase -3 β (GSK-3 β)

A Glicogênio Sintase Quinase (GSK-3) é uma serina/treonina quinase, que, em mamíferos, apresenta duas isoformas a GSK-3 β e GSK-3 α . O gene da GSK-3 é muito conservado entre os organismos e sua função tem sido relacionada com diversos processos fisiológicos, como, síntese de glicogênio, diferenciação e determinação celular fetal, proliferação celular e motilidade celular (ALI *et al.*, 2001).

A inibição da GSK-3 por fosforilação ocorre através da ligação da insulina ao seu receptor, que dispara uma cascata de sinalização mediada por substratos receptores de insulina (IRS), PI-3 quinase e PKB (Akt). Como resultado, os resíduos da glicogênio sintase e do fator de iniciação eucariótico (eIF2B) sofrem desfosforilação aumentando suas atividades e assim estimulam respectivamente a síntese de glicogênio e proteínas (FRAME & COHEN, 2001).

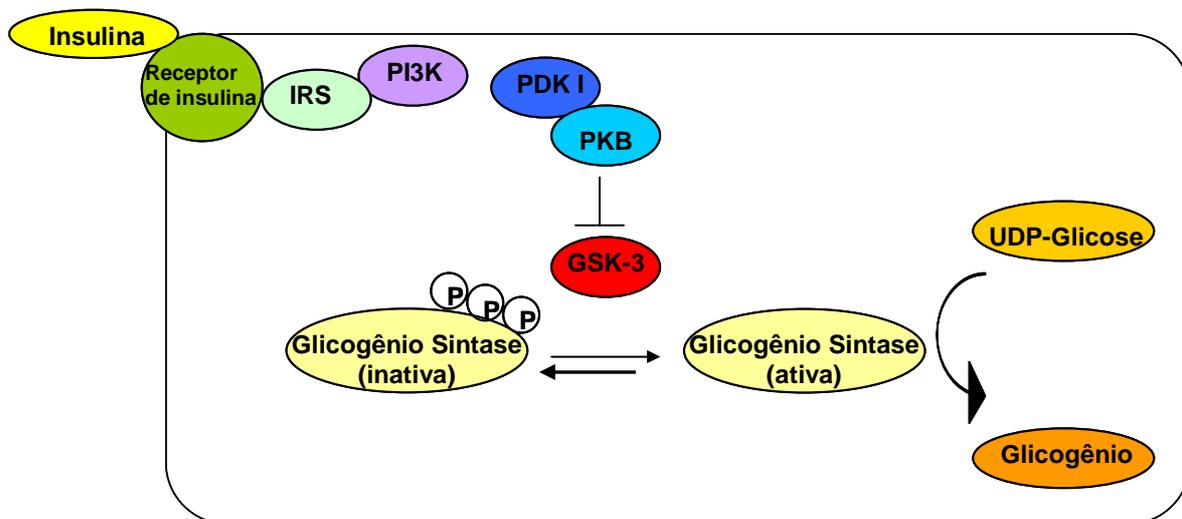


Figura 3: Esquema representativo da ativação e desativação da GSK-3 via cascata da insulina (Frame & Cohen, 2001).

De acordo com ACEVEDO *et al.* (2007), um tratamento com elevados níveis de insulina influencia o desenvolvimento embrionário de camundongos, indicando que os oócitos possuem uma via de insulina funcional e que a GSK-3 β também altera a sua fosforilação com a presença da insulina. Em outro trabalho de BUTTRICK *et al.* (2008) verificou que a AKT é essencial para a fosforilação da Zw3, proteína homóloga a GSK-3 β , no desenvolvimento embrionário em *Drosophila*.

A GSK-3 também é descrita como uma quinase essencial na especificação do destino de células em embriões, através da via Wnt, mostrado em estudos conduzidos em *Drosophila* e *Xenopus*. Um sinal extracelular libera β -catenina pela dissociação de um complexo GSK-3, APC (adenomatous poliposis coli) e Axina (Axin). A β -catenina liberada se dirige para o núcleo onde ativa fatores de transcrição, ativando os genes de padronização de segmentos. A via Wnt é altamente conservada entre *Drosophila*, *Xenopus* e vertebrados (FERKEY & KIMELMAN, 2000).

A GSK-3 β também está envolvida na fosforilação e inativação da Glicogênio Sintase no metabolismo do glicogênio (FRAME & COHEN, 2001; HEDGEPEETH *et al.*, 1999), atuando durante a embriogênese do carrapato. Assim,

a via gliconeogênica seria ativada durante o desenvolvimento do carrapato a partir do blastoderma celular aumentando a concentração de glicose nos ovos, onde parte desta seria utilizada no metabolismo do embrião e o restante seria estocado como glicogênio. Dessa forma, no início do desenvolvimento (1° ao 6° dia) há uma diminuição dos níveis de glicogênio concomitante ao aumento da atividade da GSK-3 β , que atinge o seu máximo no 12° dia. Após esse momento, a re-síntese de glicogênio parece ser retomada e a atividade da GSK-3 β volta a diminuir (MORAES *et al.*, 2007).

1.6. Inibidores da GSK-3 β

Devido à importância da GSK-3 β em diversos processos fisiológicos, a procura de inibidores de GSK-3 β que possam ter utilidade clínica e/ou científico-tecnológicas é um campo de pesquisa bastante prolífero (MEDINA & CASTRO, 2008).

Um dos principais inibidores da GSK-3 β já descritos é o lítio. A inibição por lítio é do tipo competitiva com Mg⁺⁺ e não competitiva pelo substrato (RYVES & HORWOOD, 2001). Contudo, o lítio não é um inibidor seletivo da GSK-3 β , inibindo também outras enzimas, incluindo polifosfato-1 fosfatase, inositol monofosfato, caseína kinase II, proteína kinase -2 ativada por MAP (MAPKAP-K2) e quinase ativada e fosforilada por p38 (BERRIGDE *et al.*, 1989 e DAVIES *et al.*, 2000). Em *Drosophila* estudos indicam que o tratamento com lítio inibe a GSK-3 β diminuindo a toxicidade de duas proteínas, a poliglutamina e polialanina, impedindo que ocorram mutações (BERGER *et al.*, 2005).

Por isso novas moléculas que inibem especificamente a GSK-3 β têm sido estudadas, entre elas, podemos citar o alsterpaullone, o 6-bromoindirubin-30-oxime (BIO), o indirubin-3'-monoxime, o SB616763, etc (LEOST *et al.*, 2000; MEIJER *et al.*, 2004).

O inibidor alsterpaullone atua por competição com ATP, ligando-se no sítio catalítico da GSK-3 β , e dados *in vivo* mostram que o alsterpaullone inibe a fosforilação da proteína tau (substrato da GSK-3) (LEOST *et al.*, 2000). Estudos em camundongos demonstram que o tratamento com alsterpaullone e/ou lítio

cometem anomalias em embriões, interferindo na mitose e diferenciação nuclear (ACEVEDO *et al.*, 2007).

Outro inibidor utilizado é o bromo-indirubin-oxime o qual inibe a fosforilação do resíduo de tirosina, sítio ativo da GSK-3 e um estudo com células-tronco embrionárias de camundongos tratados com 6-bromoindirubin-3-oxime (BIO) demonstram que o inibidor é capaz de promover a proliferação de cardiomiócitos. Tanto em camundongos neonatos, como em adultos a estimulação por BIO promove o ciclo celular, aumentando o número de mitoses (TSENG *et al.*, 2006).

O indirubin-3-oxime também inibe a GSK por competição com ATP e estudos indicam que a inibição da GSK-3 β pelo IMI (indirubin-3'-oxime) resulta em uma recuperação da sístole e diástole do coração depois de uma isquemia. Essa inibição também aumenta a ação da insulina acentuando a produção de glicose (BARILLAS *et al.*, 2007).

Esses trabalhos enfatizam a importância de conhecer os efeitos que os inibidores específicos e inespecíficos da GSK-3 β causam nos organismos. Por isso seria importante conhecer os seus efeitos no desenvolvimento do embrião do carrapato, e se a inibição da GSK-3 β causaria algum efeito na postura ou fertilidade dos ovos.

Por a GSK-3 β estar envolvida no metabolismo energético do embrião do carrapato *R. microplus* seria interessante estudar a sua funcionalidade na embriogênese. Este conhecimento poderia servir de base para o desenvolvimento de novos métodos de controle para carrapato.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do estudo foi caracterizar a Glicogênio Sintase Quinase 3 β (GSK-3 β) do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

2.2. Objetivos Específicos

- Clonar e testar a expressão da região codificadora da GSK-3 β em sistema procarioto (*E. coli*).

- Avaliar a transcrição do gene GSK-3 β em diferentes órgãos do carrapato, em células embrionárias do carrapato *R. microplus* (BME26) e durante a embriogênese por qPCR.

- Analisar o efeito da inoculação de inibidores da GSK-3 β em fêmeas ingurgitadas.

- Analisar o efeito do inibidor específico da GSK-3 β , o alsterpaullone, através da técnica de alimentação artificial por capilar.

3. Materiais e Métodos

3.1. Soluções e Tampões

3.1.1. Tampão para eletroforese e *Western blot*

- TAE 50X – 242 g de Tris-base, 57,1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0) e água destilada q. s. p 1 litro.

- Tampão de amostra (para géis de agarose) - azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%.

- Tampão de amostra para gel de poliacrilamida: Tris-HCl (pH 8,0) 62,5 mM , SDS 2%, glicerol 10%, beta-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,001%, uréia 10 M;

Tampão para *Western blot*

- Tampão de transferência: NaHCO₃ 13 mM, Metanol 20%, pH 9,9;

- Tampão PBS 1X: NaCl 150mM, NaH₂PO₄ 25 mM, pH 7,5;

- Tampão de revelação fosfatase (TRF): Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM;

- Solução de bloqueio 5%: 5 g de leite em pó desnatado (Molico) em 100 mL de água destilada;

- NBT: 0,05 g em 1 mL de DMF 70%

- BCIP: 0,05 g em DMF 100%

- Solução de Ponceau: ponceau S 2%, TCA 30%, ácido sulfossalicílico 30% em água destilada.

3.1.2. Soluções para extração de DNA plasmidial

- Solução I: Glicose 50 mM, Tris-HCl (pH 8,0) 25 mM, EDTA (pH 8,0) 10 mM;

- Solução II: NaOH 0,2 N e SDS 1%;

- Solução III: 60 ml acetato de potássio 5 M, 11,5 mL de ácido acético glacial, água destilada quantidade suficiente para 100 mL.

- Solução de Tris-EDTA: Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM pH 8,0

- Solução de fenol tamponado (pH 8,0): fenol tamponado com solução de Tris-HCl pH 8,0 e hidroxiquinolina 0,01% (v/w).
- Solução de precipitação: acetato de sódio 3 M, pH 5,2

3.1.3. Gel de agarose, gel de poliacrilamida e marcadores de massa molecular

- Gel de agarose 0,8%: 0,8 g de agarose dissolvida em 100 ml de TAE 1X com brometo de etídeo 5 µg/mL.
- Solução de poliacrilamida: acrilamida 30% e bisacrilamida 0,8% em água destilada.
- Gel de poliacrilamida 12%

Tabela 1: Concentração de cada reagente para SDS-PAGE 12%

Gel	Corrida	Empilhamento
[] gel %	12	5
Acrilamida	4000 µL	1000 µL
Tris 1 M pH 8,8	3,733 µL	pH 6,8 0,780µL
SDS 10%	100 µL	60 µL
H₂O	2,107 µL	4,124 µL
APS 10%	50 µL	30 µL
TEMED	10 µL	6 µL
Vol desejado	10 mL	6 mL

- Marcador de massa molecular DNA Lambda *Hind*III: DNA de fago lambda *gt*118 hidrolisada com endonuclease de restrição *Hind*III (Fermentas).
- Marcador pré-corado para SDS-PAGE: Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

3.1.4. Meio de Cultura

Todos os componentes foram dissolvidos em água destilada, autoclavados a 121°C por 15 min e mantidos à temperatura ambiente até o uso.

- LB líquido: NaCl 0,5%, extrato de levedura 0,5% e triptona 1%, pH 7,5;
- LB sólido: LB líquido acrescido de 1,5% de agar bacteriológico;
- SOC: triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,05%, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, glicose 20% na concentração final de 20 mM.
- Placas de cultura: LB sólido foi fundido, o antibiótico de interesse foi adicionado e o meio foi distribuído em placas de Petri estéreis sob fluxo laminar. Após a solidificação do meio, as placas foram acondicionadas a 4 °C.

3.1.5. Antibióticos

TABELA 2: Concentrações de antibióticos utilizados

Antibiótico	Concentração de uso
Ampicilina	100 µg/mL
Canamicina	50 µg/mL
Tetraciclina	12,5 µg/mL

3.1.6 Inibidores

- Inibidores de protease: SBTI, PMSF, molibdato de sódio, leupeptina.
- Inibidores da GSK-3β: alsterpaullone, bromo-indirubin-oxime 6 (BIO-6) e indirubin-3'-oxime.

3.2. Linhagens de *E. coli*

- TOP 10 (linhagem de *E. coli* para clonagem de proteínas recombinantes)
- BL21 (DE3): Star, RIL, RP, C43, Roseta, pLysE e pLysS (linhagens de *E. coli* para expressão de proteínas recombinantes)

Tabela 3: Linhagens e características de *E. coli* BL21

Linhagem	Marca
BL21 Star (DE3)	Invitrogen
BL21(DE3) pLysE	Invitrogen
BL21(DE3) pLysS	Invitrogen
Rosseta (DE3)	Novagen
BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	Stratagene
BL21-CodonPlus (DE3)-RP	Stratagene
C43 (DE3)	Avidis

- XL1Blue (linhagens de *E. coli* para a produção de proteínas recombinantes)

3.3. Enzimas

Enzimas de restrição

Todas as enzimas de restrição utilizadas nos experimentos foram conduzidas de acordo com as especificações do fabricante, sempre mantendo a proporção máxima de 10% do volume da enzima nas reações. Todas as enzimas foram estocadas a -20°C.

- *EcoRI*: 5 U/ μ L
- *NdeI*: 5 U/ μ L
- *BamHI*: 10 U/ μ L
- *NcoI*: 5 U/ μ L

Enzimas

- Taq polimerase: 1 U/ μ L
- Elongase: 1 U/ μ L
- Ligase: 2 U/ μ L
- SuperScript: 1U/ μ L
- CIAP: 1 U/ μ L

3.4. Vetores para clonagem e expressão

- pGEM-Teasy: plasmídeo utilizado na clonagem do 5'RACE, 3'RACE e na clonagem da ORF da GSK-3 β de *R. microplus*.
- pET 14B: Invitrogen
- pET32B: Invitrogen
- pAE: vetor não comercial baseado no pET-3 (RAMOS *et al.*, 2004).

3.5. Primers para a clonagem e qPCR

3.5.1. Primers para 5'RACE e 3'RACE

Primers degenerados para amplificar a seqüência parcial do cDNA da GSK-3 β

- 5'-GTIGCIATHAARAARGTIYTICARGAY-3'
- 5'-YTTRWRYTCIRTRTARTTIGGRTTCAT-3'

Primer forward: 5'-gctcgcgctactaccgggccccagaact-3'

Nested Primer 1: 5'-GACGTGTGGTCGGCGGGTTGTGTGCTGG-3'

Nested Primer 2: 5'-CCAGGGAGTGGATGTAGGCCAGGCTCCG-3'

Nested Primer 3: 5'-TGGACTTGCTGTAGTGGCGCGCCACGCG-3'

Nested Primer 4: 5'-GCCCATGCGAGTCATGATGCGCATGCTG-3'

3.5.2. Primers para clonar a ORF da GSK-3 β

Primer forward: 5'-ATGAGTGGACGGCCGAGGACG-3'

Primer reverso: 5'-CACGGGGCCGCTGTTTGAGG-3'

3.5.3. Primers para clonagem no vetor de expressão

- Primers vetor pET14B

Primer forward: 5'-TTTTTCATATGAGTGGACGGCCGAGGACG-3'

Primer reverso: 5'-AAAAAGGATCCTTACACGGGGCCGCTGTTTGAGG-3'

- Primers vetor pET32B

Primer forward: 5'- TTTTCCATGGATGAGTGGACGGCCGAGGACG-3'

Primer reverso: 5'- AAAAAGAATTCTTACACGGGGCCGCTGTTTGAGG-3'

- Primers vetor pAE

Primer forward: 5'- TTTTGGATCCATGAGTGGACGGCCGAGGACG-3'

Primer reverso: 5'- AAAAAGAATTCTTACACGGGGCCGCTGTTTGAGG-3'

3.5.4. Primers para o qPCR

- Primer GSK-3 β

Primer forward: 5'-CGAGGTGTACCTGAACCTGGT-3'

Primer reverso: 5'-CGATGGCAGATGCCAGAGAC-3'

- Primer 40S

Primer forward: 5'-GGACGACCGATGGCTACCT-3'

Primer reverso: 5'-TGAGTTGATTGGCGCACTTCT-3'

3.6. Clonagem da região codificadora da GSK-3 β de *R. microplus*

3.6.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA

- Extração de RNA total

O RNA total foi extraído de ovos de 9 dias de postura com Trizol para clonar a ORF da GSK-3 β e para os experimentos da 5'RACE e 3'RACE. Para a síntese do cDNA total utilizou-se RNA total com oligo-(dT) e a enzima SuperScript (transcriptase reversa). A reação de transcrição reversa foi de 65 °C por 5 min, 42 °C por 2 min, 42 °C por 50 min e 70 °C por 15 min.

- Extração de RNA total para o qPCR

O RNA total foi extraído com Trizol (Invitrogen) a partir de ovos (diferentes dias de postura), órgãos de fêmeas partenóginas e teleóginas e células embrionárias do carrapato BME26 tratadas sob diferentes condições. Para a síntese do cDNA total utilizou-se RNA total, primers randômicos e a enzima MuiItScribe transcriptase reversa. A reação de transcrição reversa foi de 25 °C por 10min, 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 segundos.

3.6.2. 5'RACE e 3'RACE

Primers degenerados, baseado em regiões conservadas da GSK-3 β foram utilizados na reação de PCR para amplificar a seqüência parcial do cDNA da GSK-3 β de ovos de *R. microplus*. Condições de amplificação com *Taq* polimerase foram: 94 °C por 5 min, 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 45 °C por 1 min e 72 °C por 1 min, 72 °C por 10 min. O produto do PCR correspondeu a um fragmento de 600 pb, referente a seqüência parcial do cDNA da GSK-3 β e foi purificado a partir de banda de gel de agarose (Gene Clean DNA purification – BIO 101 Systems). O fragmento foi clonado no vetor pGEM-TEasy em *E. coli* (linhagem DH5 α). O plasmídeo recombinante foi extraído através do miniprep (Qiagen) e a seqüência de ácidos nucléicos determinado por um seqüenciador automatizado (Beckman CEQ2000). A seqüência predita da GSK-3 β de *R. microplus* foi verificada por análise comparativa com seqüências da GSK-3 β obtidas no GenBank.

Para clonar o cDNA completo da GSK-3 β foi realizado o 5'RACE e 3'RACE utilizando o fragmento de 600 bp. Para o 3'RACE foi utilizado o System for Rapid Amplification of cDNA Ends Kit (invitrogen) e um primer adaptador contendo oligo-(dT) de acordo com instruções do fabricante.

O cDNA foi sintetizado a partir de ovos do carrapato, o qual o primer utilizado foi 5'-CAATGCGGTCCACAAA-3' e a enzima transcriptase reversa (M-MLV RT). O cDNA amplificado do PCR foi feito com primer ancorador (AUAP) e um *primer* "nested" específico. Um segundo primer nested específico foi utilizado para uma segunda reação de PCR. O produto do PCR foi clonado no vetor pGEM-TEasy e seqüenciado uma porção do plasmídeo. Novos *primers* foram desenvolvidos para clonar o cDNA completo da região codificadora da GSK-3 β o cDNA, correspondentes ao final 3'e 5'. O produto do PCR foi clonado também no vetor pGEM-TEasy.

3.6.3 Clonagem da região codificadora da GSK-3 β do carrapato *R. microplus*

O cDNA proveniente do RNA total de ovos de 9 dias foi sintetizado e utilizado na reação em cadeia de polimerase (PCR) para amplificar o cDNA completo da proteína correspondente, utilizando primers específicos para região

codificadora. A reação de PCR foi realizada com *Taq* polimerase com ciclos de: 94 °C por 5 min, 35 ciclos de, 94 °C por 30 seg, 63 °C por 30 seg, 72 °C por 90 seg e um ciclo final de 72 °C por 7 min. As concentrações dos reagentes para o PCR foram: primers forward e reverso: 10 pmol/μL; MgCl₂: 50 mM; dNTP's: 10 mM; tampão da enzima: 10x e 1 U da enzima *Taq* polimerase.

O produto do PCR foi ligado no vetor pGEM-TEasy de acordo com o fabricante: 1 μL do vetor pGEM-TEasy, 3 μL do produto do PCR, 5 μL do tampão de ligação e 1 μL da enzima T4 DNA ligase por 18 horas a 4 °C.

3.6.4 Transformação por eletroporação e por choque térmico

Eletroporação

Após a ligação o produto da ligação foi utilizado para transformar por eletroporação a linhagem de *E. coli* XI1Blue, segundo SAMBROOK *et al.* (1989). Em uma cubeta de eletroporação, foram misturados 40 μL de células competentes (XL1Blue) e 2 μL da reação de ligação. Após um pulso elétrico de 25 μF (2500 V), na cubeta foi adicionado 1 mL de meio SOC e este meio contendo as bactérias transformadas foi distribuído em placas de meio de cultura LB sólido contendo ampicilina, X-gal e IPTG. Após, a placa foi incubada a 37 °C por 16 horas, no escuro, para posterior seleção das colônias bacterianas transformantes brancas, através da seleção por β-galactosidase.

Choque térmico

A transformação de *E. coli* por choque térmico de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989). Ao DNA plasmidial foi adicionado a 100 μL de células competentes (*E. coli* Top 10) e incubados a 4 °C por 30 min. As células foram submetidas ao choque térmico a 42 °C por 2 min, seguido pela adição de 200 μL de LB líquido. Após incubação a 37 °C por 1 h, 100 μL da suspensão foram distribuídos em placas de meio de cultura LB contendo ampicilina para seleção das colônias bacterianas transformantes. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h.

3.6.5 Extração plasmidial por lise alcalina (mini-prep)

A técnica foi realizada segundo SAMBROOK & RUSSEL, (2001) com modificações. As colônias bacterianas brancas, contendo os plasmídeos de interesse, foram inoculadas em 3 mL de LB líquido, contendo o antibiótico

ampicilina e incubadas a 37 °C sob agitação constante. As células foram coletadas por centrifugação a 16.900 g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 100 µL da Solução 1 (50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCL, 10 mM de EDTA) com agitações vigorosas, e mantidas por 10 min no gelo. Em seguida foi adicionado 200 µL da solução 2 (0,2 N NaOH, SDS 1 %, e água destilada) homogeneizando por inversão lenta e incubando por 1 min no gelo. Após foi acrescentado 150 µL da solução 3 (acetato de potássio 5 M, ácido acético e água) e novamente homogeneizado por inversão lenta e incubado por 20 min. O homogenato foi mantido por 20 min no gelo e a preparação foi centrifugada a 16.900 g por 20 min a 4 °C. A seguir, o sobrenadante foi tratado uma vez com 1 volume de fenol, centrifugado a 15.000 g por 5 min, a fase superior da solução foi removida para novos microtubos, tratada com 1 volume de fenol/clorofórmio, seguida de nova centrifugação a 15.000 g por 5 minutos. Novamente a fase superior foi removida, adicionado 1 volume de clorofórmio e centrifugado a 15.000 g por 5 min. Ao sobrenadante foi adicionado 0,1 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol 100% ou 1 volume de isopropanol e mantido por 2 horas a -20 °C. O homogeneizado foi centrifugado a 20.400 g por 30 min a 4 °C e removido o sobrenadante. O sedimento de DNA foi lavado (sem ressuspender) com 1 mL de etanol 70%, mantido a temperatura ambiente até a secagem e dissolvido em 100 µL de água milli-Q. A solução de Ribonuclease a 200 ng/mL (Fermentas) foi adicionada à mistura e mantida por 45 min a 37 °C para digestão do RNA.

3.6.6 Análise quantitativa e qualitativa do DNA plasmidial

A concentração e pureza do DNA obtido da extração plasmidial dos clones (GSK-3β/pGEM-TEasy), foi determinada por espectrofotometria pela relação entre as leituras nos comprimentos de onda 260 nm/280 nm. O DNA plasmidial foi hidrolisado com a enzima de restrição *EcoRI* para liberação do inserto correspondente à região codificadora da GSK-3β e submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8 % com tampão TAE 1X. O tamanho do fragmento gerado na

reação foi determinado pela comparação com o marcador de massa molecular λ /HindIII.

3.6.7 Seqüenciamento dos clones obtidos na extração plasmidial

Os clones foram submetidos ao seqüenciamento para a confirmação da clonagem da região codificadora da GSK-3 β . Os primers utilizados foram o T7 promoter e o Sp6 terminator, cada um com uma concentração de 5 pmol/ μ L. As amostras foram encaminhadas ao Centro de Biologia Genômica e Molecular da PUCRS para seqüenciamento no aparelho MegaBACE 1000 (ABI Prism 3100). Para a análise das seqüências de nucleotídeos foi utilizado o programa BioEdit versão 7.0.

3.7. Subclonagem da região codificadora da GSK-3 β nos vetores de expressão

Após a confirmação por seqüenciamento da clonagem da região codificadora da GSK-3 β no vetor de clonagem foi realizado um novo PCR com os primers específicos para cada vetor de expressão (pAE, pET32-b e pET14b), ver item 3.5.3.

A reação de PCR foi realizada com o DNA plasmidial extraído do clone GSK-3 β /pGEM-TEasy, com a enzima *Elongase* com ciclos de: 94 °C por 5 min, 35 ciclos de, 94 °C por 30 seg, 63 °C por 30 seg, 68 °C por 90 seg e um ciclo final de 68 °C por 7 min. As concentrações dos reagentes para o PCR foram: *primers* forward e reverso: 10 pmol/ μ L; tampão A e B: 5x; dNTP's: 10 mM; e 1 U da enzima *Elongase*.

3.7.1 Purificação do DNA por extração de banda de gel de agarose (GeneClean)

Tanto o produto do PCR para a subclonagem da região codificadora da GSK-3 β como o DNA da extração plasmidial dos vetores de expressão selvagens foram submetidos à purificação através da extração por banda de gel de agarose.

A banda correspondente ao DNA de interesse foi cortada e a ela foi adicionada a solução NaI, de acordo com o fabricante. Após, a solução com a

banda de gel cortada foi incubada a 65 °C até a banda dissolver na solução. Após é adicionado a resina para ligação do DNA. A resina foi lavada com o tampão de lavagem Wash buffer duas vezes e deixada secar. Após secar a resina o DNA é ressuspensionado em água e quantificado de acordo com o item 3.6.6.

3.7.2 Hidrólise do DNA purificado para subclonagem nos vetores de expressão

O DNA purificado de banda de gel foi hidrolisado com as enzimas de restrição correspondentes ao sítio de clonagem de cada vetor de expressão.

Os vetores de expressão selvagens purificados também foram hidrolisados com as enzimas de restrição, para posterior reação de ligação.

3.7.3 Desfosforilação dos vetores de expressão

Os vetores de expressão foram desfosforilados com a enzima CIAP para impedir a re-ligação do vetor selvagem e aumentar a eficiência da ligação com o inserto. Ao DNA extraído, purificado e hidrolisado foi adicionado 1 U da enzima CIAP e o seu tampão correspondente, e incubado por 5 min a 50 °C. A reação de desfosforilação foi inativada por 15 min a 65 °C com 10 mM de EDTA.

3.7.4 Reação de ligação

O DNA referente a região codificadora da GSK-3 β e aos vetores de expressão foram quantificados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (item 3.6.6) para realização do cálculo de relação vetor/inserto 1:3.

À reação foi adicionada 2 U da enzima T4 DNA ligase e seu tampão correspondente, de acordo com o fabricante e mantida por 18 h a 16 °C.

Após a ligação, foi realizado uma transformação por eletroporação em Xl1Blue (item 3.2). Os clones transformantes foram extraídos por lise alcalina (item 3.6.5) e quantificados (item 3.6.6), para posterior transformação por choque térmico em linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) para expressão de proteínas recombinantes (item 3.2).

3.8. Teste de expressão da rGSK-3 β em pequena escala

Uma colônia de cada linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com o plasmídeo GSK-3 β -PAE, GSK-3 β -PET32b e GSK-3 β -PET14b foi inoculada em 3

mL de LB líquido contendo ampicilina e crescida por 16 h a 37 °C sob agitação constante. A suspensão de células foi centrifugada a 5.000 g por 5 min e o precipitado de células foi ressuspendido em 10 mL de meio fresco, incubados a 37 °C sob agitação, até atingirem DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8. Para indução, foi adicionado IPTG numa concentração final de 1 mM ou 0,5 mM e a cultura foi incubada a 37 °C ou 25 °C por 2h, 4h ou 18h. A cultura de células foi centrifugada e o precipitado foi ressuspendido em água. Para a lise das células a suspensão foi congelada e descongelada 2 vezes e sonicada 3 vezes a 30 volts. O lisado de células foi centrifugado a 10,000 g por 15 min e o sobrenadante foi separado do pellet para realização do SDS-PAGE.

3.8.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Os testes de expressão das construções da subclonagem da região codificadora da GSK-3 β foram avaliados por SDS-PAGE. Amostras do sobrenadante e pellet dos lisados de células foram analisadas por SDS-PAGE 12%. As frações de interesse foram misturadas a 25% do volume de tampão de amostra para SDS-PAGE (item 3.1.3), fervidas por 5 min e aplicadas no gel. Como controle foi utilizado um marcador de massa molecular pré-corado (item 3.1.3). O gel foi submetido à eletroforese em tampão de corrida com corrente de 100 volts e posteriormente corado com Coomassie Blue G-250.

- Coomassie-blue G-250: coomassie G-250 0,1%, metanol 25%, ácido acético 5%.

3.8.2 *Western blot*

Os lisados de células com tampão de amostra foram submetidas a SDS-PAGE 12% e eletro-transferido para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (item 3.1.1) a 70 volts por 60 min. A transferência foi monitorada corando-se a membrana com vermelho de Ponceau 0,5% (p/v) em PBS 1X por 10 minutos. Posteriormente, a membrana foi descorada por lavagem com PBS 1X. A membrana foi então bloqueada com solução de bloqueio (item 3.1.1) por 60 min a temperatura ambiente. Em seguida, foi incubada com anticorpo anti-cauda de histidina não marcado (diluição 1:1000) ou anti-GSK3 β (Sigma) na diluição 1:1000 em solução de bloto por 60 min. Após a incubação com o anticorpo primário a

membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) diluído 1:5000 em bloto, para a membrana que foi incubada com anti-GSK3 β e com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) diluído 1:5000 em bloto para a membrana incubada com anti-cauda de histidina. A membrana foi então lavada 3 vezes por 10 min com PBS 1X e revelada com uma solução de NBT 0,03 % (p/v) e BCIP 0,015 % (p/v) em tampão de revelação fosfatase (item 3.1.1).

3.9. Avaliação da transcrição relativa da GSK3 β por PCR quantitativo

O RNA total utilizado e o cDNA para a realização do PCR quantitativo estão descritos no item 3.6.2. Para a reação do qPCR foram utilizados primers para regiões específicas do gene de referência 40S e para GSK-3 β . A reação foi realizada com Máster SYBR Green, usando o programa de amplificação LightCycler® DX 400, de acordo com o fabricante (Roche).

Diluições seriadas do cDNA foram usadas para a confecção da curva de calibração. Além disso, As reações de eficiência ficaram entre 85 – 100% e foram determinadas pelas curvas de calibração de cada par de primer utilizados para qPCR.

A reação do qPCR para a GSK-3 β é de 95 °C por 10min, 40 ciclos com 95 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 72 °C por 5 seg com uma concentração de 3 pmol/ μ L dos *primers*. O gene do 40S foi utilizado como gene controle. A reação do qPCR para o 40S foi de 95 °C por 10min, 40 ciclos com 95 °C por 10 seg, 47 °C por 5 seg e 72 °C por 5 seg com uma concentração de 3 pmol/ μ L dos *primers*.

Os dados foram analisados pelo programa LightCycler 4.05 e pelo modelo matemático REST (Relative Expression Software Tool) (PFAFFL *et al.*, 2002).

3.9.1 Tratamento das células embrionárias BME26 para análise por qPCR

As células BME26 (1×10^6 células por poço) foram tratadas com meio L15 enriquecido com aminoácidos e vitaminas, além do soro fetal bovino por 24 horas até a adesão das células nos poços. Após as células foram tratadas com meio L15 sem soro fetal bovino adicionando 100 nM de insulina, 133 nM de SB216763, 40 nM de wortimanina ou 23-100 μ M de tirfostin. As células foram mantidas a 34

°C por 2 h. Após o período de incubação foi retirado o meio sem soro e as células foram descoladas com Trizol para a extração de RNA (item 3.6.2).

3.10. Inoculação dos inibidores específicos da GSK-3 β em teleóginas

As teleóginas foram separadas em grupos de 20 teleóginas, com peso total de aproximadamente 5 g, e a injeção foi aplicada na região dorsal das fêmeas, com uma seringa Halminton de 10 μ L, com um volume de 10 μ L. No grupo controle foi inoculado DMSO 1% (solvente dos inibidores). Os grupos dos tratamentos foram inoculados com alsterpaullone, bromo-indirubin-oxime 6 (BIO-6) ou indirubin-3'-oxime. Todos os grupos foram mantidos a 28 °C com 80% de umidade na estufa. Os ovos de cada grupo foram coletados e mantidos nas mesmas condições. Os parâmetros analisados foram: peso dos carrapatos, peso dos ovos, peso das larvas, redução na postura e redução da eclosão. Foram realizados 4 experimentos independentes.

3.11. Alimentação artificial por capilar

As partenóginas (10 fêmeas por grupo) foram coletadas diretamente do bovino para os testes de alimentação artificial. O sangue de um bovino não infestado com carrapato foi coletado para ser administrado nas partenóginas. O sangue foi coletado com sistema de coleta à vácuo, com o anticoagulante heparina.

As fêmeas foram fixadas em bandejas, separadas pelos grupos controle, alimentadas somente com sangue ou sangue e DMSO 1% e pelo grupo tratamento alimentados com sangue e o inibidor alsterpaullone.

A cada três horas o capilar era trocado e as fêmeas permaneciam alimentando-se por 28 h na estufa, a 28 °C, com 80% de umidade relativa.

Os ovos de cada grupo foram coletados e mantidos nas mesmas condições. Os parâmetros analisados foram: peso dos carrapatos, peso dos ovos, peso das larvas, redução na postura e redução da eclosão. Foram realizados 3 experimentos independentes.

4. RESULTADOS

4.1. Clonagem da região codificadora da GSK-3 β do carrapato *Rhipicephalus microplus*

A clonagem da região codificadora da GSK-3 β no vetor pGEM-TEasy foi analisada por hidrólise do plasmídeo com a enzima *EcoRI*, liberando o inserto de tamanho esperado (1230 pb). Além da hidrólise, a clonagem foi analisada por PCR utilizando os primers específicos para clonar a GSK-3 β de carrapato e uma região dos clones foram seqüenciados confirmando a presença do inserto correspondente a região codificadora da GSK-3 β (Figura 4).

Para expressar a proteína recombinante, foi realizada uma sub-clonagem da região codificadora da GSK-3 β em três vetores de expressão (pAE , pET-32b e pET-14b). Todas as construções possuem a seqüência codificadora para cauda de histidina (6 resíduos de histidina), a fim de facilitar a purificação da proteína recombinante, por cromatografia de afinidade.

As clonagens nos vetores de expressão (pAE, pET-32b e pET-14b) também foram analisadas por hidrólise com as enzimas referentes ao sítios de clonagem de cada vetor, pelo amplicon gerado no PCR com os primers específicos e confirmada por seqüenciamento.

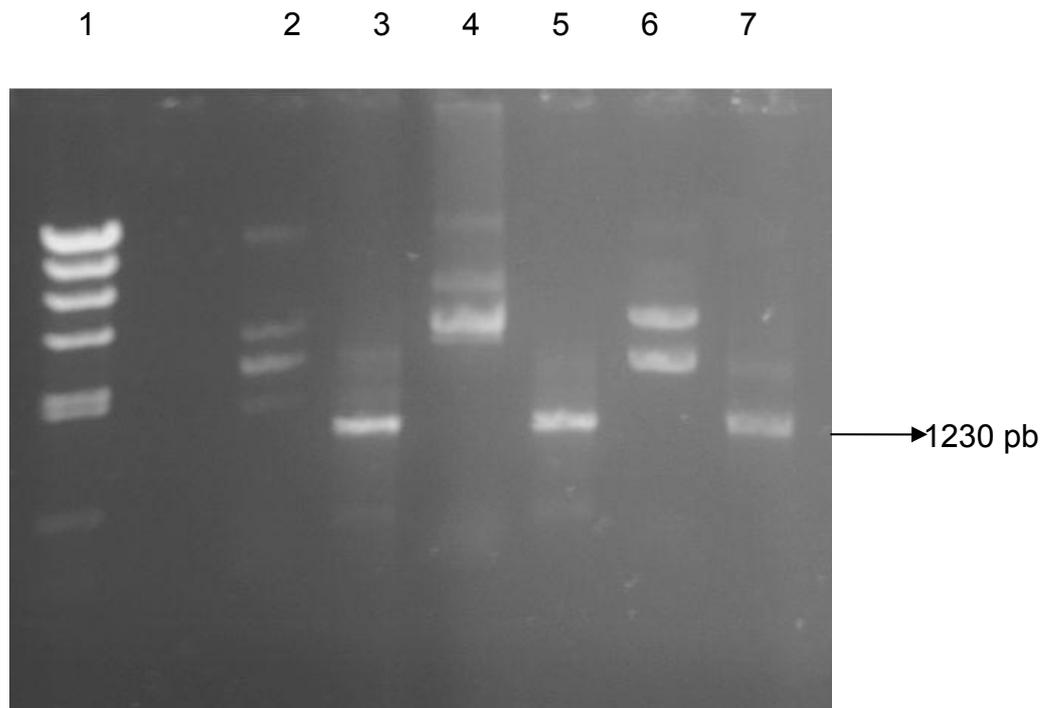


Figura 4: Análise de eletroforese em gel de agarose 0,8% da extração plasmidial das construções nos vetores de expressão e GSK-3 β e dos produtos de PCR de cada clonagem. Linha 1: Marcador Lambda/*Hind*III; linha 2: construção GSK-3 β /pAE; linha 3: produto do PCR gerado a partir do produto da extração plasmidial do clone GSK-3 β /pAE; linha 4: construção GSK-3 β /pET32b; linha 5: produto do PCR gerado a partir do produto da extração plasmidial do clone GSK-3 β /pET32b; linha 6: construção GSK-3 β /pET14b; linha 7: produto do PCR gerado a partir do produto da extração plasmidial do clone GSK-3 β /pET14b.

Pela análise da seqüência deduzida de aminoácidos da GSK-3 β foi possível identificar que a região codificadora da GSK-3 β compreende 410 aminoácidos com uma proteína de 45 kDa de massa molecular predita e com pI de 8,97. Pode-se também verificar a presença de um domínio de proteína quinase, entre os resíduos 55 e 339, uma região de ligação-ATP de proteína quinase, entre os aminoácidos 61 e 85, sendo importante ressaltar a presença de três aminoácidos específicos na seqüência do carrapato. Além desses foram encontrados sítios ativos de proteína quinase serina/treonina, entre os aminoácidos 176 e 188, possibilitando identificar a GSK-3 β de carrapato como pertencente à família das serino/treonina quinases, semelhante com GSK-3 de outros organismos (*D. rerio*, *A. mellifera*, *M. musculus*, *B. taurus*, *X. laevis* e *D. melanogaster*). Foi também identificado os resíduos regulatórios referente a ativação e inativação da enzima, o resíduo de serina 9 e o resíduo de tirosina 216.

Esses resíduos estão presentes na isoforma β da GSK-3. Na isoforma α o resíduo de serina está presente na posição 21 e o de tirosina na posição 276, não sendo encontrados nessa seqüência, onde na posição 21 encontra-se uma substituição de uma serina por uma asparagina (Figura 5).

Ao comparar a seqüência de aminoácidos da GSK-3 β de carrapato com GSK-3 β de outros organismos (*D. rerio*, *A. mellifera*, *M. musculus*, *B. taurus*, *X. laevis* e *D. melanogaster*) pode-se observar identidade entre 62-76% (Figura 5).

O número do acesso no GenBank das seqüências da GSK-3 usadas na análise filogenética são: *Drosophila melanogaster* AAM52705, *Xenopus laevis* AAC42224, *Apis mellifera* XP_392504, *Mus musculus* AAH60743, *Danio rerio* NP_571456 and *Bos taurus* XP878051. A seqüência da GSK-3 β de *R. microplus* foi depositada no GenBank e tem como número de acesso: ABO61882.

R. microplus MSGRPRTTSFAEGNKQPQQPNFLAGVKITS-----KDGAKVTTVLATPGQGPD 49
M. musculus MSGRPRTTSFAESCKPVQQPSAFGSMKVS-----DKDGSKVTTVVATPGQGPD 50
B. taurus MSGRPRTTSFAESCKPVQQPSAFGSMKVS-----DKDGSKVTTVVATPGQGPD 50
D. rerio MSGRPRTTSFAESCKPVQQPSAFGSMKVS-----DKDGSKVTTVVATPGQGPD 50
X. laevis MSGRPRTTSFAESCKPVQQPSAFGSMKVS-----DKDGSKVTTVVATPGQGPD 50
A. mellifera MSSRPRTTSFADCTNAPSNP-PLGGMRVSSHPAGGVTLKKDRDGNKVTVVATPGAGPD 59
D. melanogaster MSGRPRTTSFAEGNKQ-SPSLVLGGVKTCS-----RDGSKITVVATPGQGTDR 48
 ** . ****:***: : . :.:: : ** *:***:**** * . **

R. microplus PQEVSYCDTKVIGNGSFGVVYQARLLDSGQLVAIKKVLQDKRFKNRELQIMRRLDHCNIV 109
M. musculus PQEVSYTDTKVIGNGSFGVVYQAKLDCSGELVAIKKVLQDKRFKNRELQIMRKL DHCNIV 110
B. taurus PQEVSYTDTKVIGNGSFGVVYQAKLDCSGELVAIKKVLQDKRFKNRELQIMRKL DHCNIV 110
D. rerio PQEVSYTDTKVIGNGSFGVVYQAKLDCSGELVAIKKVLQDKRFKNRELQIMRKL DHCNIV 110
X. laevis QQEVTYTDTKVIGNGSFGVVYQAKLDCSTGELVAIKKVLQDKRFKNRELQIMRKL DHCNIV 110
A. mellifera PQEISYTDTKVIGNGSFGVVYLAKLCDTEELVAIKKVLQDKRFKNRELQIMRRL EHCNIV 119
D. melanogaster VQEVSYTDTKVIGNGSFGVVYQAKLDCSTGELVAIKKVLQDRRFKNRELQIMRKL EHCNIV 108
 : :* ***: * : * : :*****:*****: *: *****

R. microplus KLYFFYSYSSGDKKDEVYLNVLVLEYIPETVYRVARHYSKSKQTIPISFIKLYMYQLFRSLA 169
M. musculus RLRYFFYSYSSGDKKDEVYLNVLVDYVPETVYRVARHYSRAKQTLPIVYVLYMYQLFRSLA 170
B. taurus RLRYFFYSYSSGDKKDEVYLNVLVDYVPETVYRVARHYSRAKQTLPIVYVLYMYQLFRSLA 170
D. rerio RLRYFFYSYSSGDKKDEVYLNVLVDYVPETVYRVARHYSRAKQTLPMVYVLYMYQLFRSLA 170
X. laevis RLRYFFYSYSSGDKKDEVYLNVLVDYVPETVYRVARHYSRAKQALPIIYVLYMYQLFRSLA 170
A. mellifera KLYFFYSYSSGDKKDEVYLNVLVLEYIPETVYKVARHYNKSKQTIPINFILYMYQLFRSLA 179
D. melanogaster KLLYFFYSYSSGDKKDEVYLNVLVLEYIPETVYKVARQYAKTKQTIPINFIRLYMYQLFRSLA 168
 : * *****: *:***:*****: * :*****:***: * : :***: : : :*****

R. microplus YIHSFGICHARDIKPQNLLDPETAVLKLKDFGSAKLLIKGEPNVS YICSRYYRAPELIFG 229
M. musculus YIHSFGICHARDIKPQNLLDPDTAVLKLKDFGSAKQLVRGEPNVS YICSRYYRAPELIFG 230
B. taurus YIHSFGICHARDIKPQNLLDPDTAVLKLKDFGSAKQLVRGEPNVS YICSRYYRAPELIFG 230
D. rerio YIHSFGICHARDIKPQNLLDPDTAVLKLKDFGSAKQLVRGEPNVS YICSRYYRAPELIFG 230
X. laevis YIHSFGICHARDIKPQNLLDPETAVLKLKDFGSAKQLVRGEPNVS YICSRYYRAPELIFG 230
A. mellifera YIHSFGICHARDIKPQNLLDPESGVLKDFGSAKHLVKGEPNVS YICSRYYRAPELIFG 239
D. melanogaster YIHSFGICHARDIKPQNLLDPETAVLKLKDFGSAKQLLHGEPNVS YICSRYYRAPELIFG 228
 *****:*****: : . ***** * : :*****

R. microplus ATDYTTMIDVWSAGCVLAELLGQPIFPDGSVDQLVEI IKVLGTPSKEQIREMNRNYTE 289
M. musculus ATDYTSSIDVWSAGCVLAELLGQPIFPDGSVDQLVEI IKVLGTPTREQIREMNPNYTE 290
B. taurus ATDYTSSIDVWSAGCVLAELLGQPIFPDGSVDQLVEI IKVLGTPTREQIREMNPNYTE 290
D. rerio ATDYTSSIDVWSAGCVLAELLGQPIFPDGSVDQLVEI IKVLGTPTREQIREMNPNYTE 290
X. laevis ATDYTSSIDVWSAGCVLAELLGQPIFPDGSVDQLVEI IKVLGTPTREQIREMNPNYTE 290
A. mellifera AIDYTTKIDVWSAGCVVAELLGQPIFPDGSVDQLVEI IKVLGTPTRDQIREMNPNYTE 299
D. melanogaster AINYTTKIDVWSAGCVLAELLGQPIFPDGSVDQLVEI IKVLGTPTREQIREMNPNYTE 288
 * : ** : *****:*****:*****:*****:*****: : :***** ****

R. microplus FKFPQIKAHPWHKVFRRARTPGDAIELVSRLLLEYTPSARIGPLQACAHNFFNELREPG-TR 348
M. musculus FKFPQIKAHPWTKVFRPRTPEAIALCSRLLEYTPARLTPELCAHNSFFDELDPN-VK 349
B. taurus FKFPQIKAHPWTKVFRPRTPEAIALCSRLLEYTPARLTPELCAHNSFFDELDPN-VK 349
D. rerio FKFPQIKAHPWTKVFRPRTPEAIALCSRLLEYTPARLTPELCAHNSFFDELREP-VK 349
X. laevis FKFPQIKAHPWTKVFRARTPEAIALCSRLLEYTPSRLTPLDCAHNSFFDELDPN-LK 349
A. mellifera FKFPQIKAHPWQKVFRRARTPEAMELVAGLLEYTPSGRITPLECAHNSFFDELREQ-TR 358
D. melanogaster FKFPQIKSHPWQKVFRIPTPEAINLVSLLEYTPSARITPLKCAHPFFDELMEGNHT 348
 *****:*** **** * : * : *****: . : * . **** * :***

R. microplus LPNGRELPLFDFTPHELSPQLNATLIPAYLR-----GGEAVPTAGAA-----GSSSE 398
M. musculus LPNGRDTPALFNFTTQELSSNPPLATILIPPHARIQAAASPPANATAASD--TNAGDRGQ 407
B. taurus LPNGRDTPALFNFTTQELSSNPPLATILIPPHARIQAAASAPSNTTAASG--ENA----- 402
D. rerio LPNGREKPSLFNFTTQELSSNPPLASILIPAHARNQAGASTPTNPSATSD--ANSGDRSQ 407
X. laevis LPNGREFPALFNFTTQELSSNPSSLSSILIPAHARNQAAVSTTSNTTSTSD--SNTGERGS 407
A. mellifera LPNGRELPLFNFTTEYELRIQPSLNSILPKPKYMQTSENAGGQSEPVAGSS-----GNVSD 413
D. melanogaster LPNGRDMPLFNFTTEHEL SIQPSLVPQLLPKHLQNASGPGGNRPSAGGAASIAASGSTSV 408
 *****: * . ** : ** * : * * . * * : : . . . :

<i>R. microplus</i>	---TAEASTS-NSGPV-----	410
<i>M. musculus</i>	TNNAASASASNST-----	420
<i>B. taurus</i>	-----EVSSKNT-----	409
<i>D. rerio</i>	TTTAASASASNTST-----	421
<i>X. laevis</i>	TNNAASASASNSS-----	420
<i>A. mellifera</i>	NNVNATLSTSKNTDPGQSSMA-----	434
<i>D. melanogaster</i>	SSTGSGASVEGSAQPQSQGTAAAAGSGGGATAGTGGASAGGPGSGNNSSSGGASGAPSA	468

* . .

Figura 5: Alinhamento da seqüência de aminoácidos da GSK-3 β de *R. microplus* e outros organismos. A região de ligação-ATP de proteína quinase é demonstrada pelas letras em negrito e sublinhado. O sítio ativo de proteína quinase serina/treonina é demonstrado em itálico com duplo sublinhado. Dois sítios de fosforilação preditos (serina 9 e tirosina 216) estão indicados com a letra em negrito.

Apesar das clonagens nos vetores de expressão terem sido confirmadas não foi possível expressar a proteína recombinante nas diversas condições testadas, com temperaturas de indução diferentes (37 °C e 25 °C), concentrações de IPTG (0.1 M e 0.05 M) e diversas linhagens de BL21 (DE3) (Star, RIL, RP, C43, C41, Roseta, JM129). Além disso, a possível expressão da proteína recombinante foi analisada através de *Western blot* com os anticorpos anti-histidina e anti-GSK-3, não sendo reconhecida nenhuma banda correspondente a massa molecular predita da GSK-3 β de 45 kDa.

4.2. Análise da transcrição relativa por qPCR do gene da GSK-3 β de *Rhipicephalus microplus*

Órgãos de partenóginas e teleóginas

A transcrição relativa do gene da GSK-3 β foi avaliada em ovário, intestino e corpo gorduroso de partenóginas e teleóginas em comparação com a transcrição relativa do gene do 40S. Ao analisar a transcrição relativa do gene da GSK-3 β nos diferentes órgãos de partenóginas e teleóginas pode-se demonstrar que em ovário a transcrição foi maior, quando comparado ao intestino e corpo gorduroso e em relação ao gene constitutivo 40S (Figura 6).

Esses dados indicam que GSK-3 β pode estar relacionada com o desenvolvimento e formação dos oócitos, pois a transcrição relativa em ovário de partenóginas foi maior em comparação ao ovário de teleóginas (Figura 6).

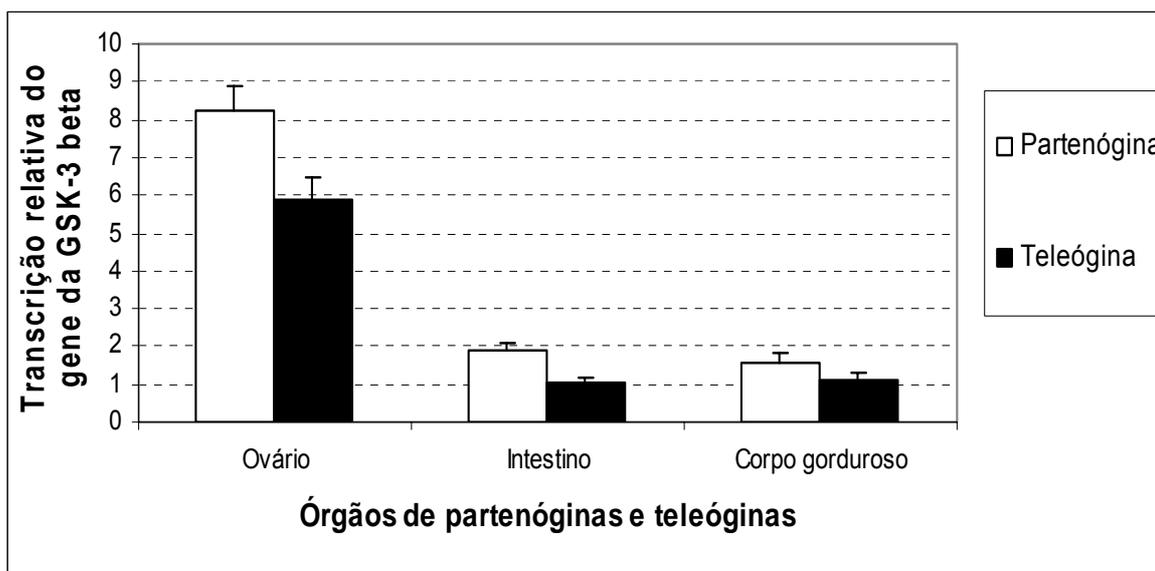


Figura 6: Análise da transcrição relativa do gene GSK-3 β por qPCR em ovário, intestino e corpo gorduroso de partenóginas e teleóginas em relação ao gene 40S ribossomal. Experimento referente a três ensaios representativos.

Embriogênese do carrapato

Os dias da embriogênese que foram analisados por qPCR foram 1,3,6,9,12,15,18 e 21 dias após o 1º dia de postura, em relação ao gene 40S ribossomal.

A análise demonstrou que ocorre um aumento gradativo da transcrição relativa da GSK-3 β a partir do 3º dia até o 12º dia com um pico no 15º dia, seguido de um decréscimo no 18º dia e novamente um aumento no final da embriogênese (Figura 7).

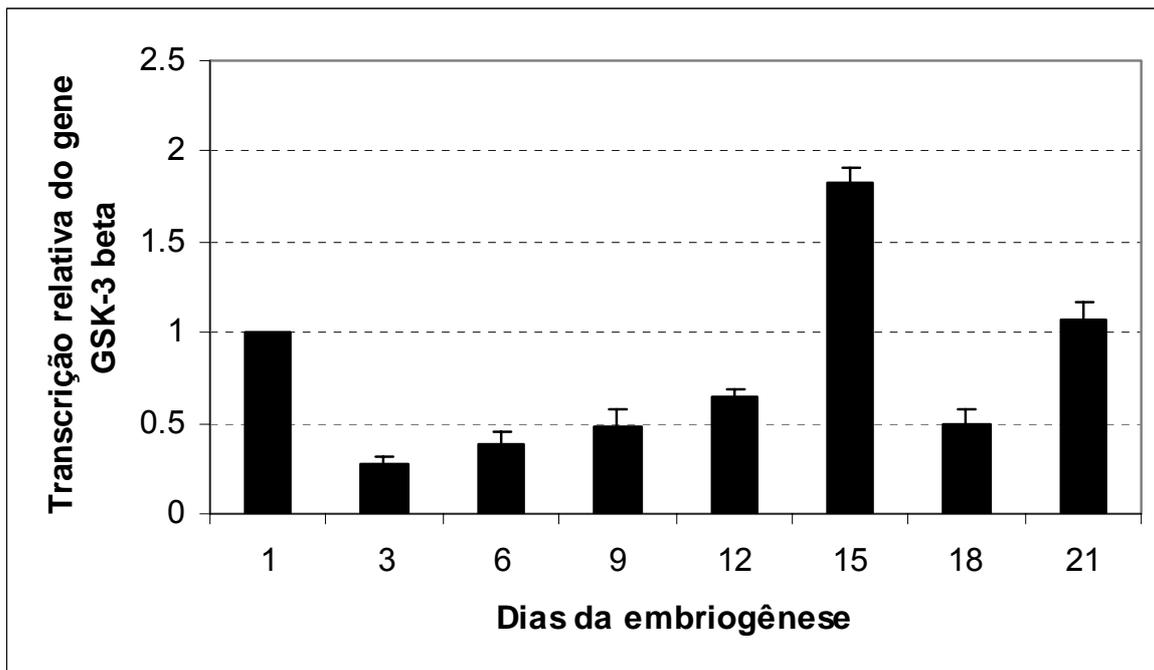


Figura 7: Análise da transcrição relativa do gene GSK-3 β por qPCR em ovos de diferentes dias da embriogênese após o primeiro dia de postura de fêmeas ingurgitadas, em relação ao gene 40S ribossomal. Experimento referente a 5 ensaios representativos.

Células embrionárias do carrapato (BME26) tratadas sob diferentes condições

A fim de avaliar o envolvimento da GSK-3 β durante o desenvolvimento embrionário e na cascata de insulina, as células embrionárias do carrapato (BME26) foram tratadas com inibidores de enzimas que atuam na via de insulina, como por exemplo, a wortmanina, o qual inibe a PI3K, enzima que está a montante da GSK-3 β e que quando inibida ativa a GSK-3 β . Outro tratamento foi com o inibidor tirfostin, inibidor do receptor de insulina, para inativar a cascata. Além desses as células foram tratadas com um inibidor específico da GSK-3 β , o SB216763, com insulina, para ativar a cascata e com o meio L15 na presença ou ausência de soro fetal bovino, o qual as células sem soro foram consideradas como calibrador da reação de qPCR.

As células embrionárias do carrapato (BME26) em cultura foram submetidas aos tratamentos com insulina, wortmanina, tirfostin e SB216763, separadamente por 2 h a 34 °C.

Quando as células foram tratadas com tirfostin, SB216763, soro e wortmanina constatou-se que a transcrição relativa do gene da GSK-3 β manteve-se semelhante às células incubadas sem soro. Apenas houve um aumento da transcrição relativa em células tratadas com insulina.

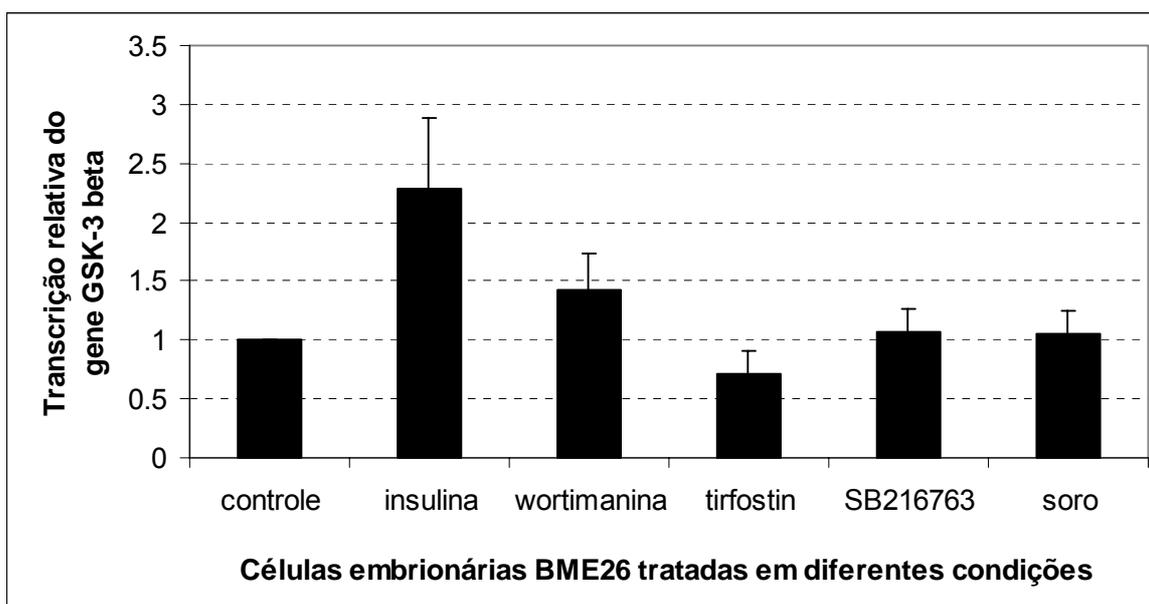


Figura 8: Análise da transcrição relativa do gene GSK-3 β por qPCR em células embrionárias BME26 tratadas sob diferentes condições, em relação ao gene 40S ribossomal. As células (1×10^6 células por poço) foram tratadas com meio L15 com soro fetal bovino ou meio L15 sem soro fetal bovino, 100 nM de insulina, 133 nM de SB216763, 40 nM de wortmanina, 23-100 μ M de tirfostin. As células foram mantidas a 34 °C.

4.3. Análise da inoculação do inibidor alsterpaullone em teleóginas

Para avaliar o papel da GSK-3 β na embriogênese as fêmeas ingurgitadas (teleóginas) foram inoculadas com inibidores específicos da GSK-3 β , com uma concentração de acordo com o IC₅₀ de cada inibidor por carrapato. O alsterpaullone é um inibidor específico e ATP competitivo, podendo também inibir a fosforilação da proteína tau (substrato da GSK-3). Outro inibidor utilizado é o bromo-indirubin-oxime o qual inibe a fosforilação do resíduo de tirosina, sítio ativo da GSK-3 e o último inibidor analisado é o indirubin-3-oxime também inibe a GSK por competição com ATP.

O grupo controle foi inoculado com DMSO 1%, solvente no qual o inibidor é solúvel e concentração no qual o DMSO foi aplicado em conjunto com o inibidor. O grupo do tratamento foi inoculado com 4nM de alsterpaullone por carrapato em DMSO 1%. Os parâmetros analisados foram o peso dos ovos e larvas, e a redução de postura e eclosão. Foram realizados 4 experimentos independentes e a análise estatística foi realizada a partir de média de cada experimento.

Após 30 dias do 1º dia de postura, no primeiro experimento, foi possível verificar o efeito visual negativo do alsterpaullone na postura. Os ovos das fêmeas tratadas com DMSO 1% apresentaram uma aparência normal, podendo ser visualizado larvas eclodidas. Já os ovos das fêmeas tratadas com alsterpaullone apresentaram uma aparência diferente, onde não visualizou-se a formação do embrião. Mesmo após 40 dias de postura não houve eclosão de larvas desses ovos, indicando que o desenvolvimento do embrião foi afetado (Figura 9).

Nos três experimentos seguintes, após 30 dias do 1º dia de postura, os ovos das fêmeas tratadas com DMSO 1% mantiveram semelhante ao controle do primeiro experimento, com eclosão de larvas normal. Mas no grupo tratado com o inibidor houve desenvolvimento de embriões, assim como eclosão de algumas larvas. Porém, essa eclosão foi menor quando comparada ao controle, sendo possível verificar que em alguns ovos não houve desenvolvimento do embrião.

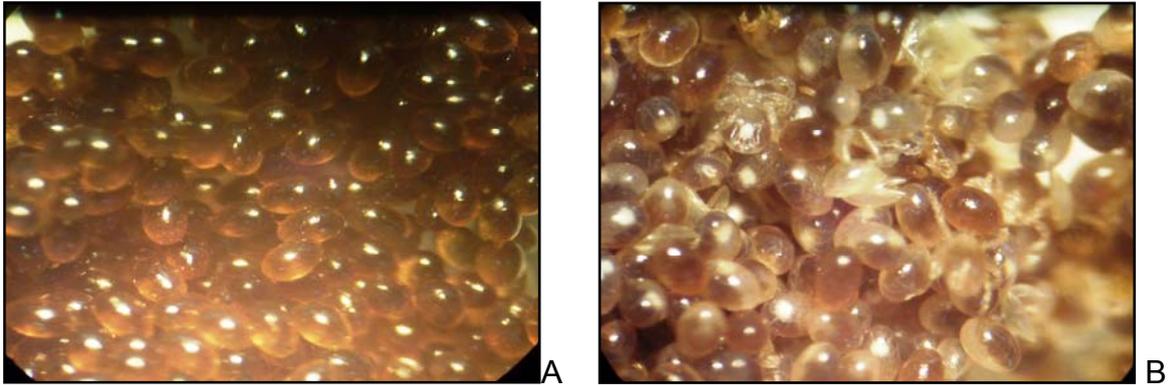


Figura 9: Efeito do inibidor alsterpaullone no desenvolvimento do embrião após 21 dias de postura. 9A) Ovos de fêmeas tratadas com 4 nM de alsterpaullone. 9B) Ovos de fêmeas tratadas com 1% de DMSO (controle).

De acordo com a tabela 2, o peso dos ovos não foi afetado com o tratamento do inibidor, mantendo um padrão gramas de ovos por carrapato semelhante ao controle. Já o peso das larvas, a redução da postura e a redução da eclosão foram afetadas significativamente, quando comparado ao controle.

A redução da postura nos 4 experimentos variou entre 10-18% tendo uma diferença significativa ao controle. Já no primeiro experimento a redução da eclosão foi de 100% e nos três experimentos seguintes houve uma redução significativa, porém não tão evidente, em torno de 54- 61%.

Tabela 2: Efeito do inibidor alsterpaullone em fêmeas ingurgitadas, postura e eclosão.

Grupos (20 carrapatos por grupo)	Peso dos carrapatos (g)	Peso dos ovos (g)	Peso das larvas (g)	Redução da postura (%)^b	Redução da eclosão (%)^c
Sem manipulação					
Experimento 1	4,82	2,38	0,96	-	-
Experimento 2	4,87	2,41	1,02	-	-
Experimento 3	5,01	2,25	0,99	-	-
Experimento 4	5,02	2,53	0,89	-	-
Somente com lesão da agulha					
Experimento 1	4,93	2,07	0,75	-	-
Experimento 2	4,86	2,04	0,74	-	-
Experimento 3	4,98	2,03	0,79	-	-
Experimento 4	5,02	2,45	1,01	-	-
PBS					
Experimento 1	4,89	2,18	0,9	-	-
Experimento 2	5,04	2,27	0,93	-	-
Experimento 3	5,08	2,34	1,01	-	-
Experimento 4	5,02	2,26	0,97	-	-
Controle^a					
Experimento 1	4,89	2,07	0,75	0	6,9*
Experimento 2	5,04	2,45	1,01	0	0
Experimento 3	5,08	2,4	0,87	0	6,85*
Experimento 4	5,02	2,67	0,71	0	31,67*
Alsterpaullone 4nM em DMSO 1%					
Experimento 1	5,09	1,8	0	18,01**	100**
Experimento 2	5,03	2,09	0,36	14,52**	58,21**
Experimento 3	5,02	2,38	0,33	0	61,74**
Experimento 4	5,01	2,39	0,29	10,32**	54,38**

* $p > 0,05$ (comparado ao controle- carrapato injetado com PBS)

** $p < 0,05$ (comparado ao controle- carrapato injetado com DSMO 1%)

^a O grupo controle foi inoculado com DMSO 1% em PBS.

^b A porcentagem na redução de postura foi calculada pela comparação com a eficiência de postura do tratamento em relação à eficiência da postura do controle.

^c A porcentagem na redução de eclosão foi calculada pela comparação com a eficiência de postura do tratamento em relação à eficiência da postura do controle.

Análise estatística referente a quatro experimentos, com a média de cada grupo com 20 teleóginas.

Os outros dois inibidores específicos, o bromo-indirubin-oxime 6 (BIO-6) e o indirubin-3-oxime foram inoculados com 5 nM e 22 nM (valores do Ic_{50}) em DMSO 1%, respectivamente. Nenhum dos inibidores afetou o desenvolvimento do embrião e também não afetaram a eclosão de larvas. Tanto a taxa de redução de postura como a taxa de redução de eclosão não tiveram diferença significativa em relação com o controle (Tabela 3).

Tabela 3: Efeito dos inibidores BIO-6 e indirubin-3-oxime em fêmeas ingurgitadas, postura e eclosão.

Grupos	(18 carrapatos por grupo)	Peso dos carrapatos (g)	Peso dos ovos (g)	Peso das larvas (g)	Redução da postura (%) ^b	Redução da eclosão (%) ^c
Sem manipulação						
Experimento 1		4,82	2,38	0,96	-	-
Somente com lesão da agulha						
Experimento 1		4,93	2,07	0,75	-	-
PBS						
Experimento 1		4,89	2,18	0,9	-	-
DMSO 1%^a						
Experimento 1		5,01	2,2	0,71	0	0
BIO-6						
Experimento 1		5,02	1,99	0,66	9,73*	-2,77*
Indirubin-3-oxime						
Experimento 1		5,03	1,97	0,67	10,81*	-5,38*

* $p \geq 0,05$ (comparado ao controle- carrapato injetado com DMSO 1%)

^a O grupo controle foi inoculado com DMSO 1% em PBS.

^b A porcentagem na redução de postura foi calculada pela comparação com a eficiência de postura do tratamento em relação à eficiência da postura do controle.

^c A porcentagem na redução de eclosão foi calculada pela comparação com a eficiência de postura do tratamento em relação à eficiência da postura do controle.

Análise estatística referente a 1 experimento, com a média de cada grupo com 20 teleóginas.

4.4. Análise do inibidor alsterpaullone em partenóginas via alimentação artificial por capilar

Em função de o alsterpaullone ter ocasionado um efeito negativo no desenvolvimento do embrião através do experimento com inoculação, testou-se se o inibidor teria algum efeito quando administrado por alimentação artificial (Figura 10). Com esse experimento avaliamos se através da administração do sangue em presença do inibidor poderia ter efeito na embriogênese, causando algum efeito deletério na formação e desenvolvimento do embrião.

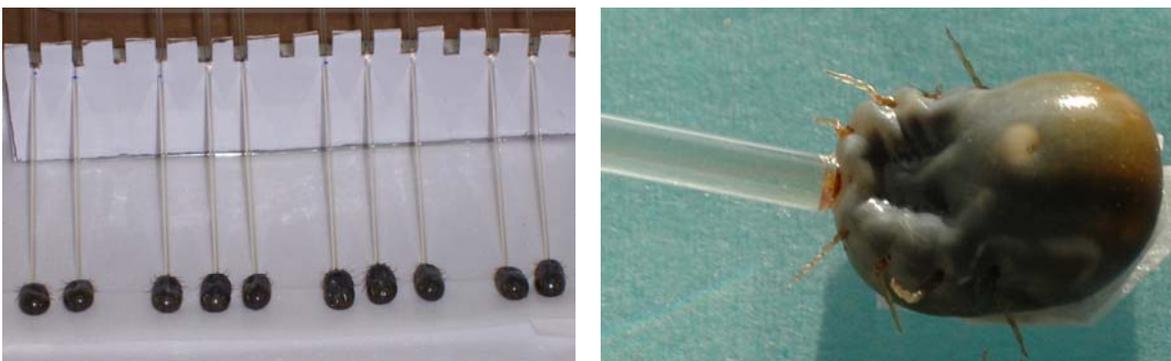


Figura 10: Foto ilustrativa da técnica de alimentação artificial por capilar.

Os grupos controle foram: 10 partenóginas para cada grupo, administradas somente com sangue e um grupo administrado com sangue e DMSO 1%, diluente do inibidor. O grupo tratamento foi administrado com sangue e alsterpaullone com uma concentração final de 4 nM (IC_{50}). Todos os grupos foram alimentados por 28 horas com quatro trocas de capilares (Figura 11).

Os parâmetros analisados foram: peso inicial e final de cada partenóquina alimentada, o ganho de peso após a alimentação, o peso dos ovos e larvas, e a redução de postura e eclosão.

Tanto nos grupos controles como no grupo com alsterpaullone o ganho de peso foi semelhante, indicando que o inibidor não interferiu negativamente na alimentação das partenóginas.

No grupo administrado com sangue na presença de alsterpaullone pode-se verificar que houve uma redução no peso das larvas, causando redução de postura e, além disso, houve uma redução significativa ($p < 0,05$) na eclosão das larvas, demonstrando que o inibidor também afetou o desenvolvimento do embrião via alimentação artificial (Tabela 4).

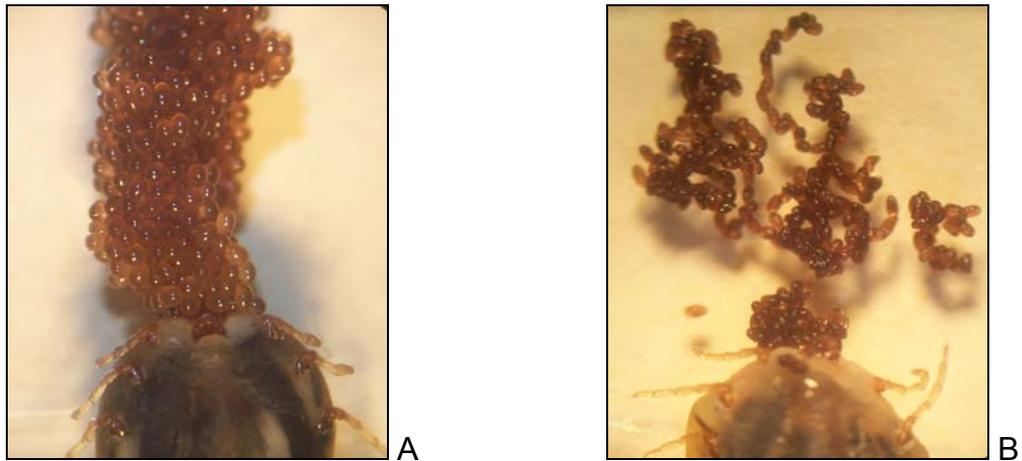


Figura 11: Efeito do inibidor alsterpaullone em partenóginas através da alimentação artificial por capilar. 11A) partenóginas alimentadas com sangue e DMSO 1%. 11B) partenóginas alimentadas com sangue e alsterpaullone (4 nM).

Tabela 4: Efeito do inibidor alsterpaullone na postura e eclosão de partenóginas, alimentadas artificialmente por capilar.

	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Ovos (mg)	Larvas (mg)	Ganho de peso (%)	Redução da Postura (%) ^b	Redução da eclosão (%) ^c
Sangue							
Experimento 1	33,2	65,3	16,1	12,9	107,9	-	-
Experimento 2	32	85,6	22,1	11,8	177,3	-	-
Experimento 3	52,2	93	32,5	18,4	80,1	-	-
DMSO 1%^a							
Experimento 1	28,6	56,9	15,8	9,8	100,9	0	22,59
Experimento 2	28,3	64,4	14,4	27,1	130,1	13,4	0
Experimento 3	65,9	112,8	45,1	19,6	80,9	0	23,24
Alsterpaullone							
Experimento 1	31	68,1	9,7	3,2	128,4*	48,7**	46,81**
Experimento 2	26,3	48,2	7,4	0	82,5*	31,3**	100**
Experimento 3	63,1	101,2	33,3	5,4	71,1*	17,7**	62,69**

* $p \geq 0,05$ (comparado ao controle – carrapato alimentado com sangue)

** $p < 0,05$ (comparado ao controle – carrapato alimentado com DMSO 1%)

^a O grupo controle foi alimentado com DMSO 1% e sangue.

^b A porcentagem na redução de postura foi calculada pela comparação com a eficiência de postura do tratamento em relação à eficiência da postura do controle.

^c A porcentagem na redução de eclosão foi calculada pela comparação com a eficiência de postura do tratamento em relação à eficiência da postura do controle.

Análise representativa referente a três experimentos, com 10 partenóginas em cada grupo.

5. Discussão

A embriogênese do *R. microplus* tem sido muito estudada, a fim de identificar e caracterizar proteínas envolvidas nessa fase e que possibilitem novas metodologias de controle desses vetores (SEIXAS *et al.*, 2008). Além disso, caracterizar proteínas que estejam envolvidas no metabolismo energético do embrião poderia permitir a identificação de possíveis alvos com potencial imunogênico para o controle desse parasita.

Segundo MORAES *et al.*, (2007) o conteúdo de glicogênio estocado nos oócitos, através de nutriente materno, é consumido nos primeiros 7 dias de desenvolvimento do embrião, e após esses dias ocorre uma re-síntese de glicogênio para ser consumido até o final da embriogênese. Para entender esse processo é essencial conhecer moléculas envolvidas nele, como por exemplo, a glicogênio sintase quinase-3 β (GSK-3 β).

A maioria das enzimas é encontrada em pequenas quantidades em suas fontes naturais e a purificação dessas é, em geral, difícil e dispendiosa. Para isso a produção de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos pode auxiliar na caracterização funcional e estrutural desses alvos, através da obtenção de grande quantidade de proteína (MANZUR *et al.*, 2006).

A clonagem da região codificadora da GSK-3 β , contendo um inserto de 1230 pb, tanto no vetor de clonagem (pGEM-TEasy), como nos três vetores de expressão foram confirmadas por seqüenciamento. E os produtos dos seqüenciamentos de cada clone também foram utilizados em programas de análises de seqüências, como por exemplo, BLAST e em programas de alinhamento de seqüência, como o CLUSTAW, para avaliar a similaridade da GSK-3 β do carrapato com outros organismos.

Com as análises foi possível observar uma similaridade de 76% com *D. rerio*, 76% com *A. mellifera*, 75% com *M. musculus*, 75% com *B. taurus*, 75% com *X. laevis* e de 62% com *D. melanogaster*. Com essa análise foi possível identificar regiões conservadas também presente na seqüência deduzida de aminoácidos da GSK-3 β de *R. microplus*, como por exemplo, as regiões que caracterizam sítios ativos das proteínas quinase serino/treonina. Também foi possível verificar que a

GSK-3 β de *R. microplus* possui os prováveis sítios de fosforilação presente em todos os organismos analisados.

A região codificadora da GSK-3 β contem 410 aminoácidos com uma massa molecular predita de 45kDa e um pI de 8,97. A seqüência deduzida de aminoácidos foi analisada com o auxílio do programa ScanProsite e foi encontrado um domínio de proteína kinase entre os resíduos 55 e 339. Também foram identificados uma região de ligação-ATP de proteína kinase e um sítio ativo de proteína kinase serina/treonina. Além dessas regiões foram identificados dois possíveis resíduos regulatórios nas posições 9 (serina) e 215 (tirosina). Esses aminoácidos estão correlacionados com sítios de fosforilação, responsáveis por inativação e ativação da enzima e somente são encontrados na isoforma β da proteína (FRAME & COHEN, 2001).

Nesse trabalho os testes para a expressão da proteína recombinante foram realizados em três vetores de expressão (pAE, pET-32b e pET-14b), todos possuindo região que codifica para cauda de histidina no primer ou na porção N-terminal da proteína e com alta taxa de níveis de expressão. A expressão foi testada em onze linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) diferentes, com duas temperaturas de indução diferente (37 °C e 25 °C) e duas concentrações de IPTG (0.1 M e 0.05 M). Apesar de testadas várias linhagens de *E. coli* e várias condições de expressão não foi possível observar a expressão da GSK-3 β recombinante.

Existem várias hipóteses para possíveis problemas de expressão de proteínas recombinantes em sistema procaríoto, entre elas estão: a instabilidade de plasmídeos, devido a genes tóxicos, a degradação proteolítica dos produtos protéico ou até o mRNA da GSK-3 β ser instável, impossibilitando a tradução da proteína (MAKRIDES, 1996; BANEYX, 1999).

Como não foi possível expressar a GSK-3 β recombinante em sistema heterólogo, resolveu-se analisar outras estratégias para conhecer mais especificamente a enzima do carrapato. Avaliou-se o padrão da transcrição relativa da proteína nativa durante e embriogênese e órgãos de fêmeas adultas e parcialmente alimentadas, além de avaliar o papel da enzima na oviposição, através de tratamento com inibidores específicos da GSK-3 β .

Ao analisar o perfil da transcrição relativa da GSK-3 β em órgãos de partenóginas e teleóginas, observou-se um nível maior de transcrito no ovário de partenógina e teleógina.

O alto nível de transcritos da GSK-3 β em ovário pode indicar que a síntese da proteína seja feita nesse órgão, e maior parte seja estocada nele, para auxiliar no desenvolvimento e maturação dos oócitos.

Algumas proteínas têm sua síntese em um órgão, como por exemplo, o corpo gorduroso, e depois são transportadas via hemolinfa para outros órgãos (BIANCHI *et al.*, 1985; CHINZEI & YANO, 1985). Uma dessas proteínas é a BYC, que tem sua síntese no corpo gorduroso e depois é transportada para o ovário e intestino (LOGULLO *et al.*, 1998). Entretanto, o alto nível de transcritos no ovário e de proteína (dados não mostrados) indica que a GSK-3 β é sintetizada no ovário e estocada nesse órgão. Além disso, um estudo de análise morfológica e histológica em ovário de *R. microplus*, observou a presença de retículo endoplasmático rugoso nos oócitos, indicando que as proteínas dos ovos podem ser sintetizadas dentro dos oócitos (SAITO *et al.*, 2005).

Durante a embriogênese verificou-se que a transcrição relativa da GSK-3 β não manteve um padrão semelhante ao longo dos dias analisados, sendo baixo no início e com um pico no final do desenvolvimento embrionário.

Segundo MORAES *et al.* (2007) no início da embriogênese, antes da formação do blastoderme celular do carrapato o embrião consome o glicogênio maternal estocado nos oócitos e isso pode explicar o baixo nível de transcritos do mRNA da GSK-3 β nessa fase. Após o período de blastoderme celular ocorre um aumento gradativo de transcrito com um pico no final da embriogênese. Esse aumento pode ser devido a importância da GSK-3 β na diferenciação e ciclo celular, permitindo a formação do embrião.

Segundo ACEVEDO *et al.* (2007), no início do desenvolvimento embrionário de camundongos, a GSK-3 β permanece fosforilada, mantendo a proteína inativa. Já após o estágio de blastocisto a proteína torna-se ativa, tendo o seu sítio desfosforilado. E ainda sua importância na embriogênese também foi constatada, pois ao injetar anticorpos anti-GSK-3 β ou inibidores específicos em embriões de camundongo verificou-se um comprometimento do desenvolvimento

nuclear, resultando em uma segregação da cromatina anormal (ACEVEDO *et al.*, 2007).

O padrão de transcrição da GSK-3 β é diferente tanto do padrão da atividade enzimática como do padrão de expressão da proteína nativa, o qual demonstrou que a proteína é encontrada ao longo de toda a embriogênese (dados não publicados). Esses dados podem indicar que além da regulação da atividade da proteína por desfosforilação, a mesma tenha outra via de regulação, já que a GSK-3 β é uma proteína envolvida em muitos processos, como por exemplo, diferenciação e ciclo celular (FRAME & COHEN, 2001). A ativação ou desativação da GSK-3 β pode estar ocorrendo de maneira semelhante a via Wnt, o qual ocorre a formação de um complexo entre a GSK-3 β , axina e β -catenina (RUEL *et al.*, 1999).

Dados recentes do nosso grupo demonstram que a cascata de insulina está envolvida na embriogênese do carrapato, pois enzimas que atuam nessa cascata, além da GSK-3 β , já foram identificadas, como a PI3 kinase e proteína kinase B (Akt) (dados não publicados) e conhecer essa via de sinalização durante o processo embrionário é uma etapa importante para saber como ocorre a síntese e manutenção de glicogênio no embrião.

Dois trabalhos que imunolocalizaram uma insulina-like em singânglio e ninfas *Dermacentor variabilis* e em *Ornithodoros parkeri* através de um anticorpo anti-insulina bovina (DAVIS *et al.*, 1994; ZHU *et al.*, 1991)

Ainda não é conhecida como a insulina atua no embrião do carrapato, porém dados indicam a presença de peptídeos insulina-like em embriões de vários invertebrados. Em *Drosophila melanogaster* existe uma família de genes que codificam sete peptídeos insulina-like (GAROFALO, 2002), em *Bombyx mori* foi identificado um peptídeo com características semelhantes à insulina (Nakahara *et al.*, 2006), e em *A. gambiae* também foram identificados genes que codificam peptídeos insulina-like. Além desses, um trabalho de BROWN *et al.* (2008), identificou um peptídeo de insulina-like de *Aedes aegypti* e esse peptídeo tem uma importante função na maturação dos oócitos.

No presente trabalho podemos ressaltar que o nível de mRNA de GSK-3 β aumentou após tratar as células embrionárias com insulina, o que não condiz com

a literatura, pois a cascata ativa, inibe a enzima. Um trabalho realizado com oócitos de camundongos demonstrou que os oócitos expostos a insulina por um curto período de tempo não interfere na expressão da GSK-3 β . Porém, quando os oócitos são expostos a insulina por um longo período de tempo resultou na fosforilação (inativação) da GSK-3 β , no resíduo de serina 9, prejudicando o remodelamento da cromatina e condensação durante a meiose (ACEVEDO *et al.*, 2007).

Além disso, em um trabalho realizado pelo grupo mostra que o conteúdo de glicogênio nas células embrionárias aumenta com concentrações progressivas de insulina, podendo sugerir que realmente a insulina interfere na síntese de glicogênio. Provavelmente esse aumento da transcrição relativa da GSK-3 β , ocorra por outra via de regulação, já que a GSK-3 β é uma enzima multifuncional e participa de vários processos ou também porque possa ocorrer uma regulação pós-transcricional da enzima.

Pode-se observar também que os inibidores utilizados para avaliar o padrão de transcrição relativa da GSK-3 β não interferiram na transcrição, que se manteve semelhante ao padrão visto nas células tratadas com meio sem soro, indicando que o inibidor irá atuar na ativação ou inativação da proteína e não na transcrição da mesma.

A fim de avaliar o possível papel da GSK-3 β na formação dos oócitos e na embriogênese do carrapato *R. microplus*, utilizou-se inibidores específicos da proteína para inocular em teleóginas e alimentar partenóginas. Nos experimentos de inoculação o único inibidor que teve um efeito negativo aparente na postura e eclosão das larvas foi o inibidor alsterpaullone. Aparentemente a inibição da GSK-3 β , nas fêmeas inoculadas, impossibilitou o desenvolvimento de alguns embriões. O efeito negativo na formação do embrião pode ser devido que a GSK-3 β inibida pode ter interferido em algum processo celular, como por exemplo, na diferenciação, ciclo celular e na síntese de glicogênio, impedindo o desenvolvimento de embrião. Esse resultado corrobora com o trabalho de ACEVEDO *et al.* (2007) onde ao tratar a cultura de zigotos com alsterpaullone pode-se verificar um dano no início da mitose, no desenvolvimento nuclear e na citocinese, causando má formação do embrião. Outro trabalho de SWAIN *et al.*,

(2007) também demonstrou que a inibição da GSK-3 β com o alsterpaullone prejudicou a condensação da cromatina do oócitos de camundongos.

Os outros inibidores, apesar de serem específicos a GSK-3 β , não tiveram um efeito aparente na inibição da proteína, pois o padrão de postura e eclosão foi semelhante às fêmeas dos grupos controles.

Quando as fêmeas foram alimentadas artificialmente por capilar na presença ou ausência do inibidor alsterpaullone, pode-se verificar um efeito maior, quando comparado as fêmeas inoculadas. Esse dado indica que a inibição da GSK-3 β durante o processo de alimentação e de formação dos oócitos possa ter um efeito mais drástico, impedindo ainda mais a postura e eclosão das larvas. Ainda pode-se demonstrar que o inibidor foi absorvido pela fêmea e posteriormente transportado para o ovário onde lá atuaria na inativação da proteína.

Esses resultados enfatizam a importância da GSK-3 β , pois é uma enzima envolvida no metabolismo de glicogênio, no ciclo e diferenciação celular e provavelmente é crucial para o desenvolvimento embrionário do carrapato *R. microplus*, regulando outros mecanismos durante essa fase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, N.; DING, J.; SMITH, G.D. Insulin signaling in mouse oocytes. *Biology of reproduction*, 77(5): 872-9, 2007.
- ACEVEDO, N.; WANG, X.; DUNN, R.L.; SMITH, G.D. Glycogen synthase kinase-3 regulation of chromatin segregation and cytokinesis in mouse preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 74(2): 178-88, 2007.
- ALI, A.; HOEFLICH, K.P.; WOODGETT, J.R. Glycogen Synthase Kinase-3: Properties, Functions and Regulation. *Chemical Reviews*, 101: 2527-2540, 2001.
- ALONSO-DÍAZ, M.A.; GARCÍA, L.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIERREZ, R.; ANGEL-SAHAGÚN, C.A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; FRAGOSO-SÁNCHEZ, H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 20;(3-4):336-340, 2007.
- ALVES-BRANCO, F.P.; ECHEVARRIA, F.A.M. & SIQUEIRA, A.S. Garça vaqueira *Egretta ibis* e o controle biológico do carrapato *Boophilus microplus*. Comunicado Técnico da EMBRAPA, 1: 1-4, 1983.
- ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K. C.; SASAKI, S. D.; SAMPAIO C. A.; TANAKA A. S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *International Immunopharmacology*. 2: 557-563, 2002.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology*, 10(5):411-21, 1999.

- BARILLAS, R.; FRIEHS, I.; DANH-CAO, H.; MARTINEZ, F.J.; DEL NIDO, J.P.
Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 β improves tolerance to ischemia in hypertrophied hearts. *The Annals of Thoracic Surgery*, 84: 126-133, 2007.
- BARRÉ, N.; LI, A.Y.; MILLER, R.J.; GAÏA, H.; DELATHIÈRE, J.M.; DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E. In vitro and in vivo evaluation of deltamethrin and amitraz mixtures for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in New Caledonia. *Veterinary Parasitology*, 155(1-2):110-119, 2008.
- BERGER, Z.; TTOFI, K. E.; MICHAEL, H.C.; PASCO, Y.M.; TENANT, S.; RUBINSZTEIN, C.D.; O'KANE, J.C. Lithium rescues toxicity of aggregate-prone proteins in *Drosophila* by perturbing Wnt pathway. *Human Molecular Genetics*, 14: 3003-3011, 2005.
- BERRIDGE, M. J.; DOWNES, C. P.; HANLEY, M. R. Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell* 59: 411-419, 1989.
- BIANCHI, A. G., COUTINHO, M., PEREIRA, S. D., MARINOTTI O. & TARGA, H. J. Vitellogenin and vitellin of musca domestica: quantification and synthesis of fat body and ovaries. *Insect Biochemistry*, 15: 77-84, 1985.
- BROWN, M.R.; CLARK, K.D.; GULIA, M.; ZHAO, Z.; GARCZYNSKI, S.F.; CRIM, J.W.; SUDERMAN, R.J.; STRAND, M.R. An insulin-like peptide regulates egg maturation and metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 15(15):5716-5721, 2008.
- BRUM, J.G.W. Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei*: etiopatogenia e sazonalidade. Tese (Doutor em ciências). Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio Janeiro, 1988.

- BUTTRICK, G.J.; BEAUMONT, L.M.; LEITCH, J.; YAU, C.; HUGHES, J.R.; WAKEFIELD, J.G. Akt regulates centrosome migration and spindle orientation in the early *Drosophila melanogaster* embryo. *Journal of Cell Biology*, 180(3):537-548, 2008.
- CAMPOS, E.; *et al.* Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. *Veterinary Parasitology*, 138: 349-357, 2006.
- CNPC, Conselho Nacional da Pecuária de corte. **Balanco da Pecuária Bovídea de corte- 1994 a 2007.** [online] Disponível na internet via WWW. URL: <http://www.abiec.com.br/estatísticas/14.pdf>. Arquivo capturado em 26 de novembro de 2008.
- CHINZEI, Y. & YANO, I. Fat body is the site of vitellogenin synthesis in the soft tick, *Ornithodoros moubata*. *Journal of Comparative Physiology*, 155: 671-678, 1985.
- DA SILVA VAZ JR, I.; LOGULLO, C.; SORGINE, M.; VELLOSO, F.F.; ROSA DE LIMA, M.; GONZALES, J.C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P.L.; MASUDA, A. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 66: 331-341, 1998.
- DA SILVA VAZ JR, I.; TORINO LERMEN, T.; MICHELON, A.; SANCHEZ FERREIRA, C. A.; JOAQUIM DE FREITAS, D. R.; TERMIGNONI, C.; MASUDA, A. Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S-transferase. *Veterinary Parasitology*, 119: 237-245, 2004.

- DAVIES, S. P.; REDDY, H.; CAIVANO, M.; COHEN, P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *The Biochemical journal*, 351: 95-105, 2000.
- DAVIS, H.H.; DOTSON, E.M.; OLIVER, J.H. JR. Localization of insulin-like immunoreactivity in the synganglion of nymphal and adult *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Experimental & applied Acarology* 18(2): 111-22, 1994.
- DE LA FUENTE, J.; RODRIGUES, M.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; GARCIA-GARCIA, J.C. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. *Genetic Analysis*, 15: 143-148, 1999.
- DE OLIVEIRA, P.R.; CAMARGO, M.I.M.; BECHARA, G.H. *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae): Morphological description of the ovary and of vitellogenesis. *Experimental Parasitology*, 113: 179-185, 2006.
- EMBRAPA. Carrapato-de-boi. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicações/divulga/GCD42.html>>. Acesso em: Julho de 2006.
- ESTEVES, E.; LARA, F.A.; LORENZINI, D.M.; COSTA, G.H.; FUKUZAWA, A.H.; PRESSINOTTI, L.N.; SILVA, J.R.; FERRO, J.A.; KURTTI, T.J.; MUNDERLOH, U.G.; DAFFRE, S. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(5): 568-580, 2008.
- FERKEY, D.M.; KIMELMAN, D. GSK-3: New Thoughts on an Old Enzyme *Developmental Biology*, 225: 471-479, 2000.

- FERNANDES, E.K.; BITTENCOURT, V.R. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Experimental & applied Acarology*, (Epub ahead of print), 2008.
- FERREIRA, C. A.; DA SILVA VAZ JR., I.; DA SILVA, S. S.; HAAG, K. L.; VALENZUELA, J. G.; MASUDA, A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. *Experimental Parasitology* 101: 25-34, 2002.
- FRAME, S.; COHEN, P. GSK-3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *The Biochemical journal*, 359:1-16, 2001.
- GAROFALO, R. S. Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila*. *Trends Endocrinology and Metabolism*, 13: 156-162, 2002.
- GEORGE, J.E.; POUND, J.M.; DAVEY, R.B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, 129: S353-S366, 2004.
- GONZALES, J. C. O carrapato do boi: vida, resistência e controle. São Paulo: Mestre Jou. 101p, 1975.
- HEDGEPEETH, M.C.; DEARDORFF, A.M.; RANKIN, K.; KLEIN, S.P. Regulation of Glycogen Synthase Kinase 3 β and Downstream Wnt Signaling by Axin *Molecular and Cellular Biology* 19: 7147-7157, 1999.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, v. 32, p. 1-35, 2004. [online] Disponível na internet via WWW. URL: <http://www.ibge.gov.br>. Arquivo capturado em 14 de abril de 2006.
- JONSSON, N.N.; MATSCHOSS, A.L.; PEPPER, P.; GREEN, P.E.; ALBBRECHT, M.S.; HUNGERFORD, J.; ANSELL, J. Evaluation of tick-GARD (PLUS), a

novel vaccine against *Boophilus microplus* in lactating Holstein-Friesian cows. *Veterinary Parasitology* 88: 275-285, 2000a.

LEAL, A.T.; SEIXAS, A.; POHL, P.C.; FERREIRA, C.A.; LOGULLO, C.; OLIVEIRA, P.L.; FARIAS, S.E.; TERMIGNONI, C.; DA SILVA, V.I., JR.; MASUDA, A. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114: 341-345, 2006.

LEOST, M.; SCHULTZ, C.; LINK, A.; WU, Y.Z.; BIERNAT, J.; MANDELKOW, E.M.; BIBB, J.A.; SNYDER, G.L.; GREENGARD, P.; ZAHAREVITZ, D.W.; GUSSIO, R.; SENDEROWICZ, A.M.; SAUSVILLE, E.A.; KUNICK, C.; MEIJER, L. Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta and cyclin-dependent kinase 5/p25. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267: 5983-5994, 2000.

LOGULLO, C.; DA SILVA VAZ JR., I.; SORGINE, M. H. F.; PAIVA-SILVA, G.O., FARIA, F. S.; ZINAGALI, R.; ROASA DE LIMA, M.; ABREU, L.; OLIVEIRA, E.F.; ALVES, E. W.; MASUDA, H.; GONZALES, J.C.; MASUDA, A.; OLIVEIRA, P.L. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology*, 116: 525-532, 1998.

MAKRIDES, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiology Review*, 60(3): 512-538, 1996.

MANZUR, M.J.; Production of recombinant enzymes of wide use for research. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 9(3): 291-296, 2006.

MARANGA, R.O.; HASSANALI, A.; KAAYA, G.P.; MUEKE, J.M. Performance of a prototype baited-trap in attracting and infecting the tick *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in field experiments. *Experimental & applied Acarology*, 38(2-3):21121-8, 2006.

- McKOSKER, P.L. The global importance of Babesiosis. In Babesiosis. Ristic, M. & J.P. Kreier, *Academic Press*. New York, 1981.
- MEDINA, M.; CASTRO, A. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors reach the clinic. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 11(4): 533-543, 2008.
- MEIJER, L.; FLAJOLET, M.; GREENGARD, P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacological Science*, 25(9):471-480, 2004.
- MORAES, J.; GALINA, A.; ALVARENGA, P. H.; REZENDE, G.L.; MASUDA, A.; VAZ JR, I.; LOGULLO, C. Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146: 528-533, 2007.
- MURREL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus Crutice*, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, 56: 169-172, 2003.
- NOLAN, J. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance, *Veterinary Parasitology*, 18: 155-166, 1985.
- OJEDA, C.M.M. Evaluacion in vitro del efecto entomopatogeno de las cepas Ma34, Ma14 y Ma2 del hongo *Metarhizum anisopliae* para el control de la fase larval y adulta de *Boophilus microplus* (Cannestrini) (tesis de licenciatura) Facultad de Medicina Veterinaria, 2007.
- PFAFFL, W. M.; HORGAN W. G.; DEMPFFLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative

expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30 (9):e36, 2002.

PRUETT, J. H. Immunological control of arthropods ectoparasites – a review. *International Journal for Parasitology* , 29: 25-32, 1999.

RAMOS, C.R.; ABREU, P.A.; NASCIMENTO, A.L.; HO, P.L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(8): 1103-1109, 2004.

REDONDO, M.; FRAGOSO.; HORTÍZ, M.; MONTERO, C.; LONA, J.; MEDELLÍN, J.A.; FRÍA, R.; HERNÁNDEZ, V.; FRANCO, R.; MACHADO, H.; RODRÍGUEZ, M.; DE LA FUENTE, J. Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac and amidine treatments. *Experimental & applied Acarology*, 23(10):841-849, 1999.

RENARD, G.; GARCIA, J. F.; CARDOSO, F. C.; RICHTER, M. F.; SAKANARI , J. A.; OZAKI, L. S.; TERMIGNONI, C.; MASUDA, A. Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 1017-1026, 2000.

ROBERTS, J.A. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II. Stages of the cycle of the parasite against which resistance is manifest. *Journal of Parasitology*, v. 54: 667-673, 1968.

ROSA DE LIMA M. F.; SANCHEZ FERREIRA C. A.; JOAQUIM DE FREITAS D. R.; VALENZUELA J. G.; MASUDA A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 747-754, 2002.

- ROSADO-AGUILAR JA, RODRIGUEZ-VIVAS RI, GARCIA-VAZQUEZ Z, FRAGOSO-SANCHEZ H, ORTIZ-NAJERA A, ROSARIO-CRUZ R. Development of amitraz resistance in field populations of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) undergoing typical amitraz exposure in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 152(3-4):349-353, 2008.
- RUEL, L., STAMBOLIC, V., ALI, A., MANOUKIAN, A. S. & WOODGETT, J. R. Regulation of the protein kinase activity of Shaggy (Zeste-white3) by components of the Wingless pathway in *Drosophila* cells and embryos. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 21790–21796, 1999.
- RYVES, W. J. & HARWOOD, A. J. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochemical and biophysical research communications*, 280: 720-725, 2001.
- SABATINI, G.A.; KEMP, D.H.; HUGHES, S.; NARI, A.; HANSEN, J. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 95(1): 53-62, 2001.
- SAITO, K.C.; BECHARA, G.H.; NUNES, E.T.; DE OLIVEIRA, P.R.; DENARDI, S.E.; & MATHIAS, M.I. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 129: 299-311, 2005.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2001.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. Molecular Cloning a laboratory manual. 2nd Edition. USA: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989.

- SAMISH, M. & GLAZER, I. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *Trends in Parasitology*, 17: 368- 371, 2001.
- SAPPINGTON, T.W. & RAIKHEL, A.S. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28: 277-300, 1998.
- SEIXAS, A.; DOS SANTOS, P. C.; VELLOSO, F. F.; DA SILVA VAZ JR., I.; MASUDA, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology*, 126: 155-63, 2003.
- SEIXAS, A.; FRIESEN, K.J.; KAUFMAN, W.R.; Effect of 20-hydroxyecdysone and haemolymph on oogenesis in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. *Journal of Insect Physiology*, 54(7):1175-1183, 2008.
- SONG, J. L., WONG, J.L., WESSEL, G.M. Oogenesis: Single cell development and differentiation. *Developmental Biology*, 300: 385-405, 2006.
- SORGINE M. H.; LOGULLO C.; ZINGALI R. B.; PAIVA-SILVA G. O.; JULIANO L.; OLIVEIRA P.L. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 28659-2865, 2000.
- THOMPSON, M.B. & STEWART, J.R. Embryonic metabolism and growth in lizards of the genus *Eumeces*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118A: 647-654, 1997.
- THULLNER, F.; WILLADSEN, P.; KEMP, D. Acaricide rotation strategy for managing resistance in the tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acarina: Ixodidae): laboratory experiment with a field strain from Costa Rica. *Journal of Medical Entomology*, 44(5):817-821, 2007.

- TSENG A.S.; ENGEL F.B.; KEATING M.T. The GSK-3 inhibitor BIO promotes proliferation in mammalian cardiomyocytes. *Chemistry & Biology*, 13(9): 957-63, 2006.
- WALADDE, S. M. & RICE, M. J. The sensory basis of tick feeding behaviour. In *Physiology of Ticks* (ed. F. D. Obenchain and R. Galun), pp. 71–118. Oxford: Pergamon, 1982.
- WIKEL, S.K. Tick Modulation of Host Cytokines. *Experimental Parasitology*, 84: 304-309, 1996.
- WILLADSEN, P. & KEMP, D. H. Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. *Parasitology Today*, 4: 196-198, 1988.
- WILLADSEN, P. Tick control: thoughts on a research agenda. *Veterinary Parasitology*, 138: 161-168, 2006.
- WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G.S.; HUNGERFORD, J. Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*, 110: S43-S50, 1995.
- YOUNG, A.S.; MORZARIA, S.P. Biology of *Babesia*. *Parasitology Today*, 2: 211-219, 1986.
- ZHU, X. X.; OLIVER, J. H. JR. Immunocytochemical localization of an insulin-like substance in the synganglion of the tick *Ornithodoros parkeri* (Acari: Argasidae). *Experimental & applied Acarology*, 13(2):153-9, 1991.

ANEXO

CURRICULUM VITAE resumido

ANDRADE, P. C.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Caroline Pinto de Andrade

Local e data de nascimento: Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil 22/12/1982

Endereço profissional: Avenida Bento Gonçalves 9500

Telefone profissional: 33086078

Email: carolandrade@cbiot.ufrgs.br

2. FORMAÇÃO

Graduação: Licenciatura Plena em Ciências Biológicas

Instituição: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Período: 03/2001 – 12/2004

Mestrado: Biologia Celular e Molecular

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (UFRGS)

Início: 03/2007

3. ESTÁGIOS

Estágio de Iniciação Científica: 07/2001- 07/2004 (PUCRS)

- Agência de Financiamento: bolsista - CNPq

Orientador: Carlos Graeff-Teixeira

Estágio não remunerado: 08/2004 – 07/2005 (PUCRS)

Orientador: Carlos Alexandre Sanchez Ferreira

Estágio (“mestrado sanduíche”) 10/2007-12/2007 (UENF-RJ)

Orientador: Carlos Logullo

Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos na Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Esse estágio foi realizado através do projeto PROCAD/CAPES.

4. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

ANDRADE, C. P., ANDRADE, J. G., SAIKI IMAMURA, E. ESTEVES, DAFFRE, S., MISAO ONUMA, AOI MASUDA, VAZ JUNIOR, I. S., LOGULLO, C. Role of Glycogen Synthase Kinase in vitellogenesis and embryogenesis of the Rhipicephalus microplus In: VI International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens, 2008, Buenos Aires.

COSTA, P. E., CAMPOS, E., ANDRADE, C. P., POHL, P., FAÇANHA, A., AOI MASUDA, VAZ JUNIOR, I. S., LOGULLO, C.

Partial biochemistry and molecular study about inorganic pyrophosphate of cattle tick Rhipicephalus microplus embryos In: VI International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens, 2008, Buenos Aires.

ANDRADE, J. G., ANDRADE, C. P., MENTZINGEN, L., VAZ JUNIOR, I. S., LOGULLO, C.

Expression of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in bovine tick Rhipicephalus microplus eggs and starvation larvae In: VI International Conference Ticks and Tick-borne Pathogens, 2008, Buenos Aires.

ANDRADE, C. P., ANDRADE, J. G., IMAMURA, S., ONUMA, M., DAFFRE, S., LOGULLO, C., MASUDA, A., VAZ JUNIOR, I. S.

Cloning and evaluation of the glycogen synthase kinase from *Rhipicephalus microplus* in vitellogenesis and embryogenesis In: XXXVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (SBBQ), 2008, Águas de Lindóia.

MENTZINGEN, L., ANDRADE, J. G., ANDRADE, C. P., VAZ JUNIOR, I. S., LOGULLO, C.

Nuclear glycogen synthase kinase 3 in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick embryogenesis In: XXXVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (SBBQ), 2008, Águas de Lindóia.

COSTA, P. E., CAMPOS, E., ANDRADE, C. P., POHL, P., FAÇANHA, A., MASUDA, A., VAZ JUNIOR, I. S., LOGULLO, C.

Partial biochemistry and molecular study about inorganic pyrophosphatase of cattle tick *Rhipicephalus microplus* embryos In: XXXVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (SBBQ), 2008, Águas de Lindóia.

ANDRADE, J. G., ANDRADE, C. P., MENTZINGEN, L., DAFFRE, S., E. ESTEVES, VAZ JUNIOR, I. S., LOGULLO, C.

Phosphoenolpyruvate carboxykinase in bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryogenesis and starvation larvae In: XXXVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (SBBQ), 2008, Águas de Lindóia.

ANDRADE, C. P., ANDRADE, J. G., IMAMURA, S., ONUMA, M., DAFFRE, S., LOGULLO, C., MASUDA, A., VAZ JUNIOR, I. S.

Cloning and characterization of the recombinant glycogen synthase kinase 3B from *Boophilus microplus* expressed in *E. coli* In: 8TH INTERNATIONAL VETERINARY IMMUNOLOGY SYMPOSIUM, 2007, Ouro Preto.

ANDRADE, C. P.; ANDRADE, J. G.; IMAMURA, S.; ONUMA, M.; DAFFRE, S.; LOGULLO, C.; MASUDA, A.; VAZ JUNIOR, I. S.

Cloning and expression in *E. coli* of the recombinant Glycogen Synthase Kinase (GSK-3B) from *Boophilus microplus* In: IX REUNIÃO ANUAL DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, 2007, Porto Alegre.

LOGULLO, C.; ANDRADE, C. P.; ANDRADE, J. G.; VAZ JUNIOR, I. S.; IMAMURA, S.; ONUMA, M.

GSK activity is involved to PEPCK gene expression during tick embryo development In: 8TH INTERNATIONAL VETERINARY IMMUNOLOGY SIMPOSIUM, 2007, Ouro Preto.

ANDRADE, J. G.; ANDRADE, C. P.; VAZ JUNIOR, I. S.; LOGULLO, C. Regulatory Mechanism of Glycogen Synthase Kinase-3B (GSK-3B) During *Boophilus microplus* Embryo Development In: XXXV REUNIÃO ANUAL DA SBBQ, 2006, Águas de Lindóia.

GAIDZINSKI, V. B.; ANDRADE, C. P.

Estudo da Reatividade Humoral Cruzada entre *Angiostrongylus costaricensis* e *Trypanosoma cruzi* In: VI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA PUCRS, 2005, Porto Alegre.

SILVA, A. C. A.; ANDRADE, C. P.; SOUZA, J. S.; TEIXEIRA, C. G.

Utilização de Clones de cDNA de *Angiostrongylus costaricensis* como ferramenta para imunodiagnóstico In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 2005, Porto Alegre.

ANDRADE, C. P.; TEIXEIRA, C. G.; PALADINI, A.; BARBOZA, R. K.; MAURER, R. L.; TEIXEIRA, C. F.; SICA, P.

Baixa prevalência de Angiostrongyliase em caracois do gênero *Achatina* de Florianópolis SC In: XL CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 2004, Aracaju.

ANDRADE, C. P.; TEIXEIRA, C. G.

Estudo da reatividade Humoral cruzada entre *Angiostrongylus costaricensis* e *Tripanossoma cruzi* In: V SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA PUCRS, 2004, Porto Alegre.

ANDRADE, C. P.; TEIXEIRA, C. G.; MAURER, R. L.; BARBOZA, R. K.; BEN, R.; PORTO, I.

Diversidade do Padrão de reatividade no seguimento sorológico de pacientes com diagnóstico suspeito ou confirmado de Agiostrongiliase Abdominal In: XXXIX CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 2003, Belém.

ANDRADE, C. P.; BEN, R.; SILVA, M. C. F.; BARBOZA, R. K.; TEIXEIRA, C. G.; SANTOS, V. G. T.

Estudo comparativo dos métodos de Kato-Katz, Lutz e de Lutz modificado pelo uso de gradiente de sucrose para identificação de ovos de *Trichuris trichiura* In: XXXIX CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 2003, Belém.

ANDRADE, C. P.; TEIXEIRA, C. G.

Estudo sobre o tratamento do estrato protéico de *Angiostrongylus costaricensis* com colagenase In: IV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA PUCRS, 2003, Porto Alegre.

PALOMINOS, P.; TEIXEIRA, C. G.; ANDRADE, C. P.; BARBOZA, R. K.; GASNIER, R.

Pesquisa de Anticorpos de Classe IgA na Saliva de Pacientes com Diagnóstico de Angiostrongiliase Abdominal. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 2003, Rio de Janeiro.

ANDRADE, C. P.; TEIXEIRA, C. G.; AGUSTINI, A.; RODRIGUEZ, R.; OLIVAIS, A.; PORTO, S.

Avaliação do modelo canino para estudos de patogenia na Angiostrongiliase abdominal In: III SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA PUCRS, 2002, Porto Alegre.

ANDRADE, C. P.; BEN, R.; SILVA, M. C. F.; BARBOZA, R. K.; MAURER, R. L.; TEIXEIRA, C. G.

Comparação de desempenho entre os métodos de Kato-Katz e Lutz no diagnóstico da Trichuriase humana In: III SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA PUCRS, 2002, Porto Alegre.

SILVA, M. C. F.; ANDRADE, C. P., BEN, R.; BARBOZA, R. K.; TERRACIANO, P. B.; BUBOLS, P. B.; SANTOS, V. G. T.; TEIXEIRA, C. G.

Descontaminação de larvas de *Angiostrongylus costaricensis* com água sanitária e detergente In: III SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA PUCRS, 2002, Porto Alegre.

BEN, R.; ANDRADE, C. P.; SILVA, M. C. F.; SANTOS, V. G. T.; TERRACIANO, P. B.; BUBOLS, P. B.; TEIXEIRA, C. G.

Eficácia do gradiente de Percol na descontaminação de suspensão de larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus costaricensis*. In: XXVIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 2002, Foz do Iguaçu - PR.

PRESTA, L. H.; ANDRADE, C. P.; BEN, R.; SILVA, M. C. F.; BARBOZA, R. K.; SANTOS, V. G. T.; TEIXEIRA, C. G.

Estabelecimento de uma colônia de *Olygorizomis nigripes* com isolamento individual dos roedores na estação de quarentena In: III SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA PUCRS, 2002,

BARBOZA, R. K.; ANDRADE, C. P.; SANTOS, V. G. T.; TEIXEIRA, C. G.; TERRACIANO, P. B.; SILVA, M. C. F.; ROMANZINI, J.

Padronização da criopreservação de larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus costaricensis* In: III SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA PUCRS, 2002, Porto Alegre.

ANDRADE, C. P.; BEN, R.; MAURER, R. L.; TEIXEIRA, C. G.; SANTOS, V. G. T.; SILVA, M. C. F.; BUBOLS, P. B.

Prevalência mensal da infecção por *Angiostrongylus costaricensis* em Nova Itaberaba - SC In: XXVIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 2002, Foz do Iguaçu.

5. CURSOS E PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS

- Curso de curta duração em Biossegurança.

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUC RS, Porto Alegre, Brasil

- Curso de curta duração em Polimorfismos de Genes Associados Ao Sistema Imune.

Sociedade Brasileira de Genética, SBGE, Brasil

- Curso de curta duração em Biologia Molecular Fundamentos e Aplicações. Sociedade Brasileira de Biologia Celular, SBBC, São Paulo, Brasil

- XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2008.

- 8th International Veterinary Immunology Symposium, Ouro Preto, Minas Gerais, 2007.
- XI Encontro Anual do Grupo Arthromint, Ouro Preto, Minas Gerais, 2007.
- VI Salão de Iniciação Científica da PUCRS, Porto Alegre, 2005.
- XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia/ Valorização e Rumos, Porto Alegre, 2005.
- I Encontro Gaúcho de Genética Biologia Molecular e Saúde, Porto Alegre, 2003.
- VII Encontro Gaúcho de Imunologia, Porto Alegre, 2003.
- Seminário de Atualidades Genéticas, Porto Alegre, 2002.
- XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular, Porto Alegre, 2002.
- 48º Congresso Nacional de Genética, Porto Alegre, 2002.