

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO - UENF

YOLANDA PORTO MUNIZ MARTINS

**ESTUDO DO CONTROLE GÊNICO RELACIONADO AO
METABOLISMO ENERGÉTICO EM CÉLULAS EMBRIONÁRIA
BME26 DO CARRAPATO *Rhipicephalus microplus***

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

DEZEMBRO – 2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF**

**Estudo do controle gênico relacionado ao metabolismo
energético em células embrionária BME26 do carrapato
*Rhipicephalus microplus***

YOLANDA PORTO MUNIZ MARTINS

Tese apresentada ao Centro de Biociências e
Biotecnologia da Universidade Estadual do
Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para obtenção do título de
Doutor em Biociências e Biotecnologia

Orientador: Prof. D.r Francisco José Alves Lemos

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

DEZEMBRO – 2022

YOLANDA PORTO MUNIZ MARTINS

Estudo do controle gênico relacionado ao metabolismo energético em células embrionária BME26 do carrapato *Rhipicephalus microplus*

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia

Aprovada em 6 de dezembro de 2022

Comissão Examinadora



Prof. D.r Victor Martin Quintana Flores - UENF



Prof. D.r Eldo Campos - UFRJ



Prof. D.r José Roberto da Silva - UFRJ



Prof. D.r Francisco José Alves Lemos – UENF (Orientador)

Ao meu amado marido. Eu te amo!

E a Nossa Senhora, Maria Santíssima, pois tudo o que tenho a vós pertence.

AGRADECIMENTOS

À Deus e à Maria, pela força, sabedoria e bençãos;

À minha família e amigos, pela motivação e apoio;

Ao meu amado marido Renato, literalmente por tudo, são tantos agradecimentos que seria impossível enumerá-las, você sabe o quanto é importante para mim;

Ao meu orientador, Francisco Lemos, por ter aceitado me orientar em meio a tantas adversidades e por ser paciente e compreensivo.

Ao meu coorientador e que também foi meu supervisor no doutorado sanduiche, Renato Martins, obrigado por estar sempre presente, pelo apoio e por ter me orientado em toda minha caminhada acadêmica, desde da iniciação científica até este momento, obrigada!

Aos professores colaboradores: Carlos Logullo, Satoru Konnai e Kazuhiko Ohashi, por terem aberto as portas dos seus laboratórios e assim permitido a realização deste trabalho.

As minhas bolsistas de Jovens Talentos: Amanda Vento, Danyella Oliveira e Wellen Francisco, por fazerem parte do meu crescimento profissional e acadêmico;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia e ao Laboratório de Biotecnologia, pela oportunidade de realização deste curso;

As agências de fomento: FAPERJ, CAPES, UENF, CNPq;

E aos membros da banca.

“Não há lugar para sabedoria onde não há paciência”

Santo Agostinho

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT	Proteína quinase B
EM-NADP+	Enzima málica
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GDE	Enzima desramificadora de glicogênio
GFP	Proteína verde fluorescente
GLU 4	Transportador de glicose 4
GLUT 1	Transportador de glicose 1
GP	Glicose-6-fosfatase
GSK3	Glicogênio sintase quinase 3
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HK	Hexoquinase
IDH-NADP+	Isocitrato desidrogenase dependente de NADP ⁺
NAD+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP+	Nicotinamida adenina dinucleotideo Fosfato oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo Fosfato reduzida
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PGM	Fosfoglicomutase
PHGPx	Glutationa Peroxidase de Hidroperóxido de fosfolípido
PK	Piruvato quinase
RNAi	RNA interferente ou interferência mediada por RNA
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TIM	Triose-Fosfato Isomerase

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 O carrapato bovino <i>Rhipicephalus microplus</i>	14
2.2 Metabolismo de carboidratos na embriogênese do carrapato <i>R. microplus</i>	17
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo Geral.....	21
3.2 Objetivo Específico.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Cultivo Celular (Linhagem celular BME26)	23
4.2 Extração de RNA Total)	24
4.3 Reação de Transcrição Reversa (RT) – Síntese de cDNA)	24
4.4 Obtenção dos pares de oligonucleotídeos.....	25
4.5 Análise transcricional por PCR (Polimerase Chain Reaction) em tempo real (qPCR) dos genes selecionados	25
4.6 Síntese do RNA de cadeia dupla (dsRNA) e silenciamento gênico	26
4.7 Administração da dsRNA em células BME26	26
4.8 Análises estatísticas.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

RESUMO

MARTINS, Yolanda Porto Muniz, D.ra, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, dezembro de 2022. Título: Estudo do controle gênico relacionado ao metabolismo energético em células embrionária BME26 do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Orientador: Prof. D.r Francisco José Alves Lemos.

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é um hematófago vetor de doenças de grande importância econômica em países tropicais e subtropicais, principalmente no Brasil. Atualmente, muitos estudos têm sido realizados na busca de alvos que possam ser utilizados para o controle deste vetor. Contudo, ainda não compreendemos muitos aspectos fisiológicos desse artrópode, principalmente sob condições de estresse. Nesse contexto, o presente trabalho busca investigar os mecanismos regulatórios do metabolismo de carboidratos em células embrionárias BME26 do carrapato *R. microplus*. Os resultados mostram uma estratégia de compensação das enzimas metabólicas IDH-NADP⁺ e G6PDH, o que contribui para manter integridade metabólica das células BME26. Os resultados também sugerem que o silenciamento da AKT pode afetar a via de sinalização de insulina e o uptake de glicose, e conseqüentemente a glicólise. Esses resultados em conjunto descrevem um panorama metabólico que conduz a um melhor entendimento da modulação do metabolismo de glicose em embriões desse importante vetor de doenças, além de contribuir para a identificação de novos alvos para vacinas que integrem estratégias para o controle da espécie.

ABSTRACT

MARTINS, Yolanda Porto Muniz, Sc.D, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, december 2022. Title: Study of gene regulation network related to energy metabolism in BME26 embryonic cells. Advisor: Prof. Sc.D Francisco José Alves Lemos.

The tick *Rhipicephalus microplus* is a hematophagous vector of diseases of great economic importance in tropical and subtropical countries, mainly in Brazil. Currently, many studies have been carried out in search of targets that can be used to control this vector. However, we still do not understand many physiological aspects of this arthropod, especially under stress conditions. In this context, the present work seeks to investigate the regulatory mechanisms of carbohydrate metabolism in BME26 embryonic cells of the tick *R. microplus*. The results show a compensation strategy for the metabolic enzymes IDH-NADP⁺ and G6PDH, which contributes to maintaining the metabolic integrity of BME26 cells. The results also suggest that AKT silencing may affect the insulin signaling pathway and glucose uptake, and consequently glycolysis. These results together describe a metabolic panorama that leads to a better understanding of the modulation of glucose metabolism in embryos of this important vector of diseases, in addition to contributing to the identification of new targets for vaccines that integrate strategies for the control of the species.

1. INTRODUÇÃO

As enfermidades infectocontagiosas são responsáveis pela morte de milhões de animais ao redor do mundo, causando inúmeros prejuízos na produção animal como na saúde pública, uma vez que também afetem humanos, principalmente em países em desenvolvimento. Dentre esses artrópodes, os hematófagos ganham particular importância, pois transmitem agentes infecciosos entre seres humanos ou entre animais e humanos durante o repasto sanguíneo realizado por esses vetores (FUNASA, 2000). Existe uma relação estreita entre a dinâmica da transmissão de doenças e as características biológicas e ecológicas destes vetores, como a capacidade reprodutiva, a longevidade e os hábitos desses organismos, e é claro, seu ciclo de vida (Montenegro, 1992).

O filo artrópoda é o maior do reino animal, ocupando um vasto nicho ecológico e habitando em quase todo tipo de ambiente no planeta, seja aquático ou terrestre. Esses organismos apresentam uma diversidade de tamanhos, formas e hábitos de vida, sendo muitas espécies encontradas em ambientes inóspitos às baixas temperaturas ou no calor extremo. Para sobreviver a essas condições adversas os artrópodes sofrem adaptações fisiológicas nas quais certos processos reprodutivos e comportamentais são alterados para garantir sua sobrevivência.

A importância econômica, médica e veterinária dos artrópodes hematófagos é reconhecida há muito tempo devido à sua capacidade de transmitir vários agentes patogênicos como vírus, bactérias, protozoários e outros parasitas para humanos e animais, causando grandes perdas econômicas, além de afetar adversamente os hospedeiros de diferentes formas. Os carrapatos são responsáveis pela redução do peso do animal e da produção de leite, danos ao couro e anemia em animais domésticos (Parizi *et al.*, 2012). No entanto, os maiores

prejuízos causados pelos carrapatos são através da infecção por riquetsias e doenças virais no gado.

As doenças transmitidas por esse artrópode afetam primariamente os animais (zoonoses), e os seres humanos são apenas eventualmente infectados, geralmente quando entram em contato com ambientes rurais ou com animais durante atividades de recreação ou de trabalho. Uma das principais espécies de importância médico-veterinária no Brasil e nas Américas é o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* (FUNASA 2000).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O CARRAPATO BOVINO *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*

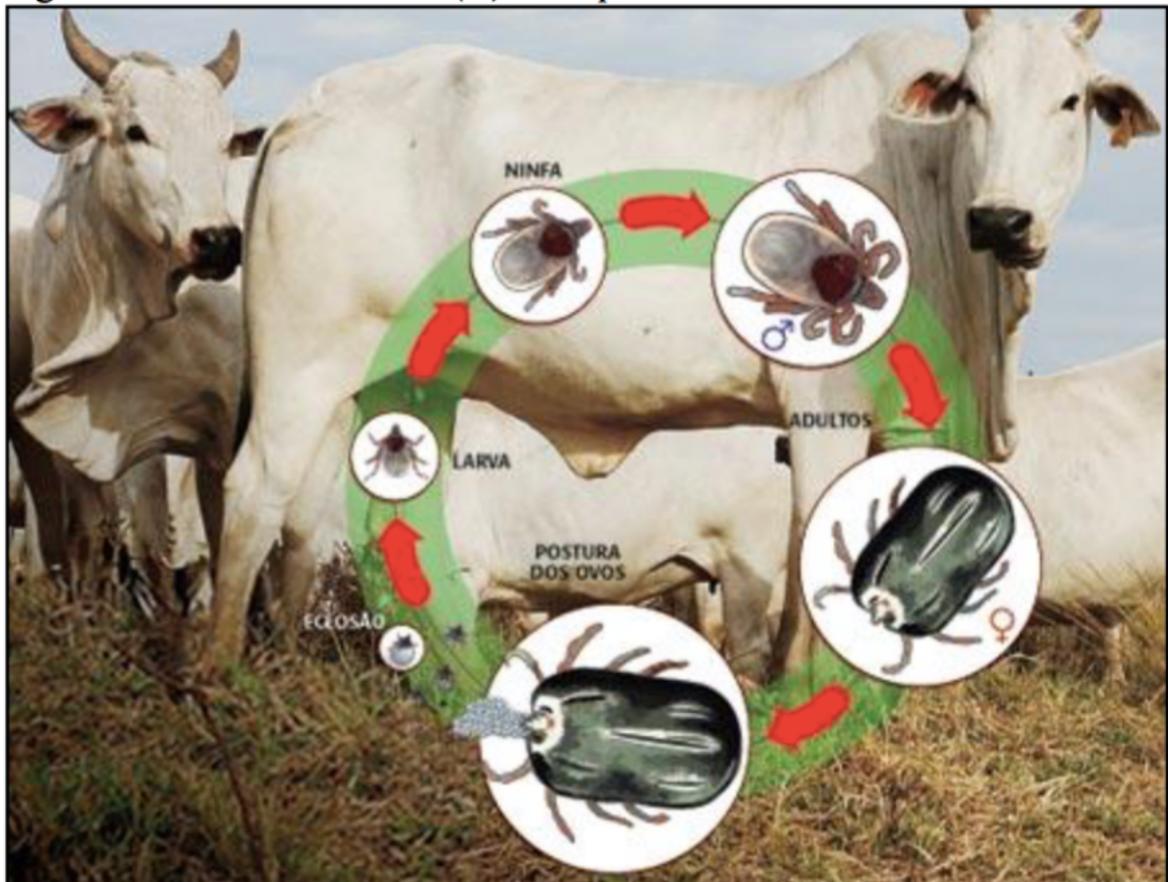
Carrapatos são ectoparasitos hematófagos pertencentes ao Filo Artropoda, Ordem Acari, e se distribuem mundialmente em 840 espécies diferentes, divididas em três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttallidae. Cada espécie de carrapato possui um habitat próprio, o que determina a sua distribuição geográfica e, conseqüentemente, o risco de aquisição de doenças (Keirans, 1992; Keirans e Robbins, 1999; Horak, Camicas & Keirans, 2002). O carrapato *R. microplus* pertence à Família dos Ixodídeos, caracterizada por um rápido e único ingurgitamento das fêmeas, durante seu ciclo de vida, e que resulta na postura de um grande número de ovos, aproximadamente 3.000 ovos por fêmea, e depois morrem (Flechtmann, 1977). No seu ciclo de vida o carrapato *R. microplus* apresenta duas etapas distintas: uma fase parasitária durante um período médio de 22 dias sobre um único hospedeiro e uma fase de vida livre que ocorre no solo podendo durar de dois a três meses, dependendo principalmente das condições climáticas existentes (Gonzales *et al.*, 1974).

O carrapato *R. microplus* é originário da Ásia e infesta preferencialmente bovinos, embora seja capaz de completar, eventualmente, o seu ciclo em búfalos, ovelhas, cavalos e veados, sendo responsável por grandes perdas econômicas para a pecuária (Sonenshine, 1991). É encontrado em quase todas as regiões do mundo, com predominância em áreas tropicais e subtropicais, abrangendo regiões com produção de gado de corte e leiteiro na América, África, Ásia e Austrália (Johnston *et al.*, 1986).

O *R. microplus* é considerado o carrapato de maior importância econômica nos rebanhos da América do Sul (González, 1995; Nari, 1995). Segundo estimativas realizadas pela EMBRAPA, os prejuízos econômicos causados por esta espécie no Brasil atingiram a ordem de dois bilhões de reais ao ano (EMBRAPA, 2005). Os prejuízos econômicos causados por carrapatos, apenas no setor agropecuário, incluem perdas na produção de leite e carne (Sutherst *et al.*, 1983) devido à perda de sangue do animal hospedeiro, depreciação do valor por danos no couro causados por reações inflamatórias nos locais de fixação (Seifert *et al.*, 1968), transmissão de doenças das quais o carrapato é vetor (Umehiya *et al.*, 2008) tais como: como a tristeza parasitária bovina, causada por protozoários do gênero *Babesia* e pela riquetsia do gênero *Anaplasma* (McCosker, 1981; Young e Morzaria, 1986), custos relacionados à mão-de-obra, despesas com instalações, compra dos carrapaticidas e de equipamentos de suporte para aplicação dos mesmos nos rebanhos (Corson *et al.*, 2004).

Cada fêmea de carrapato pode colocar dois a três mil ovos que eclodem em duas a três semanas, dependendo das condições de temperatura e umidade relativa do ar a embriogênese do *R. microplus* é completada após 21 dias e as larvas recém eclodidas não tem poder infestante, pois precisam de um tempo para fortalecimento da cutícula (quatro a seis dias). Após esse período, elas sobem nas hastes dos capins, aguardando a passagem do hospedeiro para parasitá-ló (Esquema 1). A fase parasitária inicia-se quando a larva infestante se instala no hospedeiro e dura em torno de 21 dias. O acasalamento ocorre a partir do 17º dia da infestação, durante o repasto sanguíneo da fêmea (Londt and Artur, 1975). Após a fertilização e ingurgitamento ocorre a queda da fêmea ao solo, onde fará a oviposição e depois morrerá.

As larvas como as ninfas e adultos dos carrapatos trioxenos (que realizam um ciclo de três hospedeiros) são estágios de resistência no ambiente, uma vez que sua sobrevivência é dependente das reservas energéticas adquiridas do estágio anterior do ciclo de vida. O adulto é o estágio que por mais tempo consegue sobreviver sem que encontre um hospedeiro, seguido pela ninfa, e por último a larva, que apresenta a menor sobrevivência em jejum. Os adultos de *Amblyomma spp*, por exemplo, podem sobreviver em jejum sob condições naturais por 12 a 24 meses, a ninfa por até 12 meses, e as larvas ao redor de 6 meses (Diamant & Strickland, 1965). O carrapato *R. microplus*, apesar de não haver relato na literatura que esta espécie entre em diapausa ou quiescência, suas larvas podem sobreviver longos períodos de jejum. Após a eclosão, a larva do carrapato *R. microplus* procura um hospedeiro para fixar-se, podendo permanecer em jejum no ambiente por mais de 120 dias se as condições climáticas forem amenas ou até 30 dias para os locais quentes, sobrevivendo apenas com as reservas energéticas provenientes do ovo (Guglielmone *et al.*, 2006).



Esquema 1: Ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus microplus*
(Revista Globo Rural,2013).

2.2 METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NA EMBIOGENESE DO CARRAPATO *R. MICROPLUS*

O processo da embriogênese do carrapato *R. microplus* ocorre em média de 21 dias, desde a postura dos ovos até a eclosão, em condições controladas de temperatura e umidade. O desenvolvimento dos embriões do carrapato bovino se dá de forma semelhante ao da mosca *Drosophila melanogaster*, onde na fase inicial da embriogênese, ocorre a formação do blastoderma sincicial, na qual muitos núcleos estão presentes em um citoplasma comum (Santos, *et.al.*, 2013). Durante

a embriogênese, antes da formação do blastoderma (marco do desenvolvimento embrionário), as reservas de glicogênio são preferencialmente mobilizadas para suprir a alta demanda energética do embrião. Posteriormente, a gliconeogênese aumenta concomitante com a degradação de proteínas, a fim de fornecer um suprimento adequado de glicose ao embrião, resultando na ressíntese do glicogênio. Dessa forma, o uso de aminoácidos como substratos gliconeogênicos e a subsequente ressíntese do glicogênio tem um importante papel durante os estágios de embriogênese do *R. microplus*. O glicogênio é a principal fonte de energia durante os primeiros estágios da embriogênese do *R. microplus*, e depois passa a mobilizar proteínas nos estágios finais da embriogênese do carrapato (Moraes *et al.*, 2007). O metabolismo de proteínas depende fortemente da expressão e atividade das enzimas do metabolismo de carboidratos.

Desse modo, alguns grupos de pesquisa têm focado na caracterização bioquímica e molecular de enzimas envolvidas direta ou indiretamente na embriogênese do carrapato *R. microplus* como possíveis alvos para interferência de sua proliferação. Nesse sentido, as células embrionárias de *R. microplus* da linhagem BME26, surgem como um bom modelo para estudos ainda não possíveis no carrapato, principalmente pelo fato do ciclo de vida do carrapato possuir uma fase obrigatória em seu hospedeiro bovino. Contudo, os sistemas de cultura *in vitro*, particularmente as linhagens de cultura de células contínuas, têm tido um papel inestimável e insubstituível em muitos aspectos da pesquisa sobre a biologia básica do parasita, genômica, proteômica, manipulação genética, relações entre hospedeiro-patógeno e controle de doenças (KURTTI *et al.*, 1988). As células embrionárias BME26 foram inicialmente caracterizadas por Esteves *et al.* (2008). Desde então, essas células são utilizadas no estudo dos reguladores do

metabolismo do glicogênio em condições experimentais (Abreu *et al.*, 2009; Esteves *et al.*, 2008).

Neste contexto, as células embrionárias BME26 do carrapato *R. microplus* funcionam como excelente modelo de estudo para o conhecimento molecular e metabólico da embriogênese do carrapato. Assim, tem sido possível a utilização de várias ferramentas de estudo nas células BME26, como genômica funcional, estudo de interações com patógenos e silenciamento de genes por RNA de interferência, para descrição de importantes vias metabólicas. (Abreu *et al.*, 2009; De Abreu *et al.*, 2013). Portanto, os trabalhos do grupo têm avançado muito em conhecimentos sobre a embriogênese do carrapato após a utilização das células BME26 em nossos laboratórios. Os conhecimentos desenvolvidos com as células servirão, certamente, como base para a definição de estratégias de obtenção de antígenos vacinais e abrindo a possibilidade para projetar drogas seletivas para enzimas envolvidas com a formação destes embriões.

O estudo das moléculas e enzimas envolvidas nas vias metabólicas tais como a glicólise, via das pentoses fosfato, gliconeogênese, síntese e degradação de glicogênio, e ciclo do ácido cítrico em carrapatos sob condições de estresse poderia ajudar no entendimento da regulação do metabolismo desse importante vetor. No entanto, apesar dos avanços na biologia molecular, a nossa compreensão dos mecanismos de regulação gênica, incluindo o controle do metabolismo energético, permanece incompleta. De fato, muitos aspectos relevantes ao metabolismo durante a embriogênese são escassos na literatura. Contudo, vias essenciais tais como as relacionadas ao metabolismo de carboidratos são altamente conservadas entre vetores de doenças, incluindo ácaros e carrapatos.

Estudar as moléculas envolvidas nas vias metabólicas durante a embriogênese pode revelar redes reguladoras que controlam o metabolismo durante o desenvolvimento embrionário em inúmeras espécies de organismos. Ao longo dos anos, estudar as moléculas envolvidas nas vias metabólicas durante a embriogênese foi capaz de revelar redes reguladoras que controlam o metabolismo durante o desenvolvimento embrionário em inúmeras espécies de organismos (Da Silva *et al.*, 2015; Moraes *et al.*, 2007; Abreu *et al.*, 2009). Trabalhos recentes investigaram certos os mecanismos subjacentes ao metabolismo energético durante o desenvolvimento embrionário em *R. microplus*, fornecendo alguns insights sobre os processos dinâmicos que acompanham a utilização de nutrientes durante a embriogênese do carrapato, a fim de obter fortes alvos para desenvolvimento de vacinas contra carrapatos (Moraes *et al.*, 2007; Logullo *et al.*, 2009; Fabres *et al.*, 2010; De Abreu *et al.*, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos regulatórios do metabolismo de carboidratos e sua relação com a alta tolerância ao estresse oxidativo em células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus microplus* (linhagem BME26).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o silenciamento gênico da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e da Isocitrato Desidrogenase (IDH-NADP+) nas células BME26 (silenciamento não simultâneo).
 - Avaliar o possível efeito compensatória entre as enzimas G6PDH e IDH na manutenção do equilíbrio redox.
- Realizar o silenciamento gênico da Isocitrato Desidrogenase (IDH-NADP+) nas células BME26.
 - Analisar as alterações no metabolismo de carboidratos através da expressão relativa (nível de transcritos) dos genes: HK, PK, GSK3, PGM, GDE, GP, AKT. (Tabela 1)
- Realizar o silenciamento gênico da proteína quinase B (AKT) nas células BME26.
 - Analisar as alterações do metabolismo de carboidratos através da expressão relativa (nível de transcritos) dos genes: HK, PK, TIM, PEPCK, GP, GDE, PGM, GSK3. (Tabela 1)

TABELA 1: Enzimas alvo para investigação de alterações do metabolismo de carboidratos.

ENZIMA	VIA METABÓLICA
Isocitrato desidrogenase (IDH-NADP+)	Ciclo de Krebs (produtora de NADPH)
Enzima desramificadora do glicogênio (GDE)	Degradação glicogênio
Fosfoglicomutase (PGM)	Glicogenólise e glicogênese
Hexoquinase (HK)	Glicólise
Piruvato quinase (PK)	Glicólise
Triose-Fosfato Isomerase (TIM)	Glicólise e glicogênese
Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK)	Gliconeogênese
Glicose-6-fosfatase (GP)	Gliconeogênese
Glicogênio sintase quinase 3 (GSK3)	Síntese de glicogênio
Glicose-6-fosfato desidrogenase(G6PDH)	Via das pentoses fosfato (produtora de NADPH)
Proteína quinase B (AKT)	Via de sinalização de insulina

4. MATÉRIAS E MÉTODOS

4.1 Cultivo Celular (Linhagem celular BME26)

As células BME26 foram mantidas em meio L-15 de Leibovitz (Gibco BRL) suplementado com aminoácidos, glucose, sais minerais e vitaminas (Munderloh and Kurtti, 1989). Durante a preparação do meio, a glucose foi adicionada em duas concentrações diferentes: 50 mM (controle - concentração padrão de glucose) e 100 mM (tratamento com alta concentração de glucose). O meio foi diluído em água esterilizada (3: 1), e após adição de triptose fosfato (10%), soro fetal bovino (10%) e penicilina/estreptomicina (100 U/ml e 100 ug/ml, respectivamente). As células confluentes a partir de frascos (25 cm²) foram ressuspensas em meio fresco completo utilizando uma agulha de calibre 22 com a ponta dobrada ligada a uma seringa de plástico de 5 ml. A densidade da cultura foi determinada usando um hemocitómetro Neubauer, e a viabilidade celular foi determinada usando a técnica de exclusão de azul de tripano (0,4%, Sigma). Uma alíquota de 1×10^7 células viáveis foi transferida para 5 ml (volume final) de meio completo fresco e incubadas a 34 ° C durante duas semanas para promover a proliferação celular. O meio foi substituído semanalmente até atingir uma elevada homogeneidade celular. Em seguida, as placas de 24 poços (5×10^5 células / poço) foram cultivadas com células em suspensão em 500 uL de meio normal, incubadas durante a noite para a aderência. Então, o meio normal foi completamente substituído por um outro meio sem a adição de 50 mM de glucose (glucose apenas presente no meio, chamado tratamento low-glucose), com uma concentração de glucose normal (control), ou com uma concentração de elevada de glicose (high-glucose). O meio pobre em glucose tem a glicose do próprio meio (3.125mM) (composição meio L-15 de Leibovitz, número L4386-Sigma). Todas estas concentrações de glicose foram

escolhidas com base na glicose presente no meio de controle, duplicando essa quantidade ou sem adição de glicose.

4.2 Extração de RNA Total

A extração do RNA total foi realizada utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante. Cada amostra foi homogeneizada em 1 mL de Trizol e incubada por cinco minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio com subsequente homogeneização em vortex e incubação de 15 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas à velocidade de 12.000 x g por 15 minutos e então a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, com descarte do material restante. Ao novo tubo foram adicionados 500 µL de isopropanol com posterior agitação e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, seguida de centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao pellet será adicionado 1 mL de etanol 75%. As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos, com posterior descarte do etanol. Para eluir o RNA, foram adicionados 20 µL de água livre de RNase.

4.3 Reação de Transcrição Reversa (RT) – Síntese de cDNA

A quantificação e determinação da pureza das amostras de RNA foram realizadas com o auxílio do espectrofotômetro picodrop (GE Healthcare). As amostras foram consideradas puras quando o resultado desta razão (entre a absorbância em 260nm e a absorbância em 280nm) foi igual ou superior ao valor de 1,7. Um micrograma de RNA total (1 µg) foi transcrito de forma inversa com o High-Capacity

cDNA Reverse Transcription-M-MLV kit (Biotechnology Takara). As ampliações foram realizadas na plataforma Step-one Plus (Applied Biosystems). As diluições em série do cDNA foram utilizados para uma curva de calibração. Eficiências de reação entre 85 e 100% foram determinados a partir da curva de calibração para cada conjunto de “primers” em reações de 10 ul. Foi utilizado um gene de referência como normalizador das reações.

4.4 Obtenção dos pares de oligonucleotídeos

Os pares de oligonucleotídeos específicos foram projetados de acordo com desenhos previamente descritos (Della Noce *et al.*, 2019; Da Silva *et al.*, 2015).

4.5 Análise transcricional por PCR (Polimerasis Chair Reaction) em tempo real (qPCR) dos genes selecionados

A análise transcricional em PCR quantitativo foi realizada na plataforma Step-one Plus (Applied Biosystems) utilizando-se o cDNA obtido da reação da transcriptase reversa. As diluições em série de cDNA foram usadas para a preparação da curva de calibração. Eficiências de reação entre 85 e 100% foram determinados a partir das curvas de calibração para cada conjunto de iniciadores em reações de 10 ul. A expressão relativa será determinada utilizando os valores de Cp de cada corrida no Relative Expression Software Tool (Pfaffl, 2001). As reações de qPCR foram realizadas em duplicatas. Para o estabelecimento do limiar de detecção, foi realizada uma curva padrão de expressão para cada gene alvo.

4.6 Síntese do RNA de cadeia dupla (dsRNA) e silenciamento gênico

O cDNA de células BME26 foi utilizado como molde para a síntese de dsRNA, utilizando o RiboMAX Express RNAi System Kit (Promega) com primers previamente descritos (Della Noce *et al.*, 2019). O dsRNA foi purificado de acordo com as instruções do fabricante, e a sua concentração foi medida a 260 nm. Uma alíquota de dsRNA foi analisada por electroforese em gel de agarose para verificar a existência de qualquer degradação. A dupla-fita de RNA para RmIDH e RmAKT foi sintetizada tal como descrito anteriormente. O controle negativo para o silenciamento de genes induzidos por RNAi foi um dsRNA não relacionado projetado para GFP. O tamanho dupla-fita de RNA para a G6PDH sintetizado foi de 553 pb e da dupla-fita de RNA para a IDH-NADP⁺ foi de 565 pb (Della Noce *et al.*, 2019).

Primers específicos foram desenhados com base nas sequências de *R. microplus* (Della Noce *et al.*, 2019). As dupla-fitas de RNA foram administradas diretamente às células BME26 mantidas em placas de 24 poços, conforme descrito (De Abreu *et al.*, 2013). Três dias após a adição das dsRNAs, as células foram coletadas para teste. O silenciamento dos genes de G6PDH e IDH-NADP⁺ foram confirmados por PCR quantitativo em tempo real.

4.7 Administração da dsRNA em células BME26

As suspensões de células BME26 foram semeadas em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço) para um volume final de 500 uL de meio completo. Após 24 horas de incubação a 34 ° C, o meio de cultura foi substituído por 200 ul de meio fresco

contendo 4,8 ug de dsRNA/poço, com mistura suave. As células foram incubadas durante 24 horas adicionais e foram colhidas para posterior processamento.

4.8 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes e analisados por one-way ANOVA ($p \leq 0,001$), seguido pelo teste T ($p \leq 0,05$) a fim de determinar diferenças entre os tratamentos e o controle. Os programas utilizados foram Excel e GraphPad Prism 8.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudar o desenvolvimento embrionário do carrapato *R. microplus* assim como a regulação do metabolismo energético, em particular de glicose auxilia no entendimento da fisiologia do carrapato e também na seleção de novos alvos moleculares que possam ser utilizados no controle desse importante vetor de doenças (Saramago *et al.*, 2012; Saramago *et al.*, 2018; Gomes *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2015; Moraes *et al.* 2007; Campos *et al.*, 2006; Abreu *et al.*, 2009). O estudo dessa fase de vida do carrapato possibilita entender como os embriões são capazes de coordenar todo o processo de obtenção de energia e o controle da mobilização e síntese das principais moléculas de reservas.

Uma importante enzima, integradora do metabolismo glicolítico e o ciclo do ácido cítrico, tem sido estudada nas células embrionários do carrapato *R. microplus*: a isocitrato desidrogenase NADP-dependente (IDH-NADP⁺). Essa enzima mitocondrial catalisa a descarboxilação oxidativa do isocitrato para formar alfa-cetoglutarato, usando NAD⁺ como aceptor de elétrons. A reação é o passo-crucial limitador da taxa de reação do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. No caso do carrapato *R. microplus* foi sugerido que essa enzima poderia ser de grande importância não só no metabolismo energético, mas também na manutenção do estado redox intracelular (Della Noce *et al.*, 2019).

As células embrionárias do carrapato *R. microplus* (BME26) quando tratadas com altas concentrações de H₂O₂ (2,2 mM) não apresentaram redução na viabilidade ou alterações morfológicas significativas (Della Noce *et al.*, 2019). Essa aparente tolerância ao H₂O₂ mostra-se maior do que outras células de linhagens de mamíferos, sugerindo um mecanismo diferenciado para eliminação do H₂O₂. Os diferentes tratamentos com H₂O₂ alteraram diferentemente a transcrição e

atividade de enzimas como catalase e PHGPx. Foi observada que a formação de ROS intracelular é transitória, diminuindo ao longo do tempo após o tratamento com H₂O₂. Curiosamente, o consumo de oxigênio e o transporte de glicose das células BME26 aumentaram no momento em que o superóxido mitocondrial diminuiu. Foi observado também que as células BME26 são capazes de ativar genes do metabolismo (glicolítico, gliconeogênico e do glicogênio) e aumentar conteúdo de NADPH em resposta ao tratamento com H₂O₂ (Della Noce *et al.*, 2019).

Este processo induziu alterações transcricionais e de atividade das enzimas redutoras de NADP⁺, como G6PDH, IDH-NADP⁺ e EM-NADP. Os dados sugerem que na exposição ao H₂O₂ por 2 horas a glicose disponível é preferencialmente direcionada para a via das pentoses fosfatos. Em 24 horas, a via glicolítica parece ser mais relevante, e observa-se também acúmulo de glicogênio nas células tratadas. Especificamente, o aumento da transcrição de G6PDH pode estar relacionado ao aumento do potencial redutor associado ao desafio pelo H₂O₂. Por outro lado, tanto a inibição química de G6PDH (com 6-ANAM) como o silenciamento gênico não alteraram a tolerância da BME26 ao H₂O₂. Nesta tese realizamos o silenciamento da G6PDH de aproximadamente 90% (Figura 1A) em células BME26. Com esse silenciamento o perfil de transcrição da IDH-NADP⁺ aumentou significativamente (Figura 1B), o que sugere a contribuição dessa enzima no equilíbrio redox, uma vez que ambas as enzimas são produtoras de poder redutor (na forma de NADH ou NADPH). Quando a G6PDH é silenciada, a transcrição de IDH-NADP⁺ aumenta para compensar a supressão ocorrida na G6PDH.

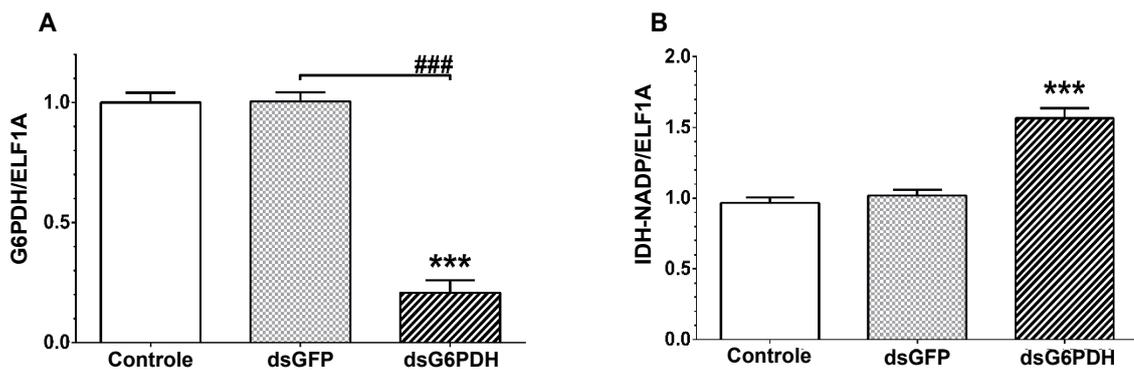


Figura 1. O silenciamento de G6PDH leva a um aumento no nível transcricional da IDH-NADP+ em células BME26. Validação do silenciamento de G6PDH (A) e análise transcricional de IDH-NADP+ em células BME26 não tratadas (controle), desafiadas com o RNAi para o gene-não relacionado GFP (dsGFP), e desafiadas com o RNAi para G6PDH (dsG6PDH) (B).

Portanto, para comprovar a hipótese que a IDH-NADP+ é essencial para o equilíbrio redox nas células embrionárias BME26, um RNAi para IDH-NADP+ foi sintetizado e administrado nas células BME26, obtendo assim um silenciamento de aproximadamente 90% (Figura 2A).

Após o silenciamento da IDH-NADP+ foi observado que o nível de transcrição da G6PDH aumentou significativamente (Figura 2B), sugerindo que a enzima IDH-NADP+ não é somente essencial ao equilíbrio redox na célula, mas que também poderia gerar um efeito compensatório na produção de NADPH quando G6PDH foi previamente silenciada.

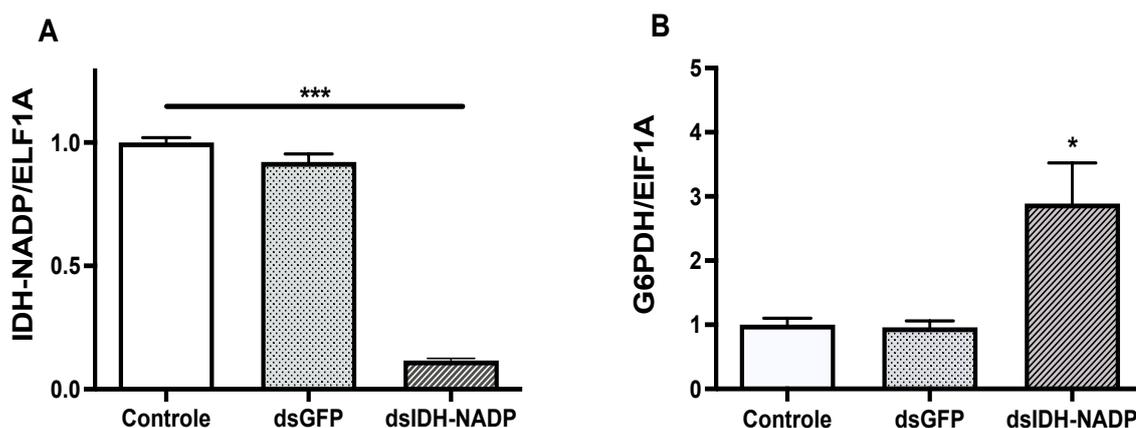


Figura 2. O silenciamento de IDH-NADP⁺ leva a um aumento no nível transcricional da G6PDH em células BME26. Validação do silenciamento de IDH-NADP⁺ (A) e análise transcricional de G6PDH em células BME26 não tratadas (controle), desafiadas com o RNAi para o gene-não relacionado GFP (dsGFP), e desafiadas com o RNAi para IDH-NADP⁺ (dsIDH-NADP) (B).

Na literatura, nota-se que diferentes condições de estresse levam a um aumento na expressão de genes de resistência ao estresse oxidativo e níveis de NADPH, como o observado em *Drosophila* sob condições de jejum, hiperóxia, hipóxia, ressecamento ou tratadas com paraquat (Rzezniczak e Merritt, 2012; Ristow e Zarse, 2010; Zhao e Haddad, 2011). O silenciamento de uma dessas enzimas, G6PDH ou IDH-NADP⁺, poderia gerar um desbalanço redox na célula, que por sua vez dispararia uma sinalização que levaria ao aumento da transcrição da outra devido ou o déficit de poder redutor gerado poderia disparar tal mecanismo.

Esses resultados indicam que a notável tolerância ao estresse oxidativo pelos carrapatos (Della Noce *et al.*, 2019), pode ser resultado de mecanismos regulados que compreendem a geração, eliminação e sinalização de ROS (Burdon, 1995; Trachootham *et al.*, 2008), ao qual poderia ter relação com o metabolismo de carboidratos.

O silenciamento da IDH-NADP⁺ também afetou a transcrição de outras enzimas reguladoras do metabolismo de glicose. Os genes glicolíticos foram significativamente suprimidos como podemos observar pela redução na transcrição da HK e PK (Figuras 3 A e B), assim como os genes envolvidos na regulação da síntese e degradação do glicogênio, GSK3, PGM e GDE (Figura 4 A, B e C).

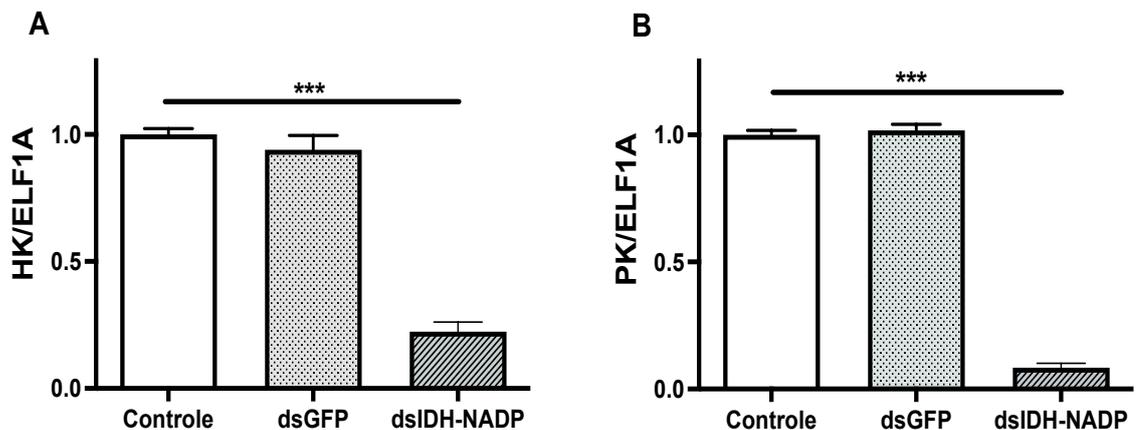


Figura 3. Análise transcricional dos genes reguladores da via glicolítica. Nível transcricional de hexoquinase (HK) (A), e da piruvato quinase (PK) (B) em células BME26 não tratadas (controle), desafiadas com o RNAi para o gene-não relacionado GFP (dsGFP), e desafiadas com o RNAi para IDH-NADP⁺ (dsIDH-NADP).

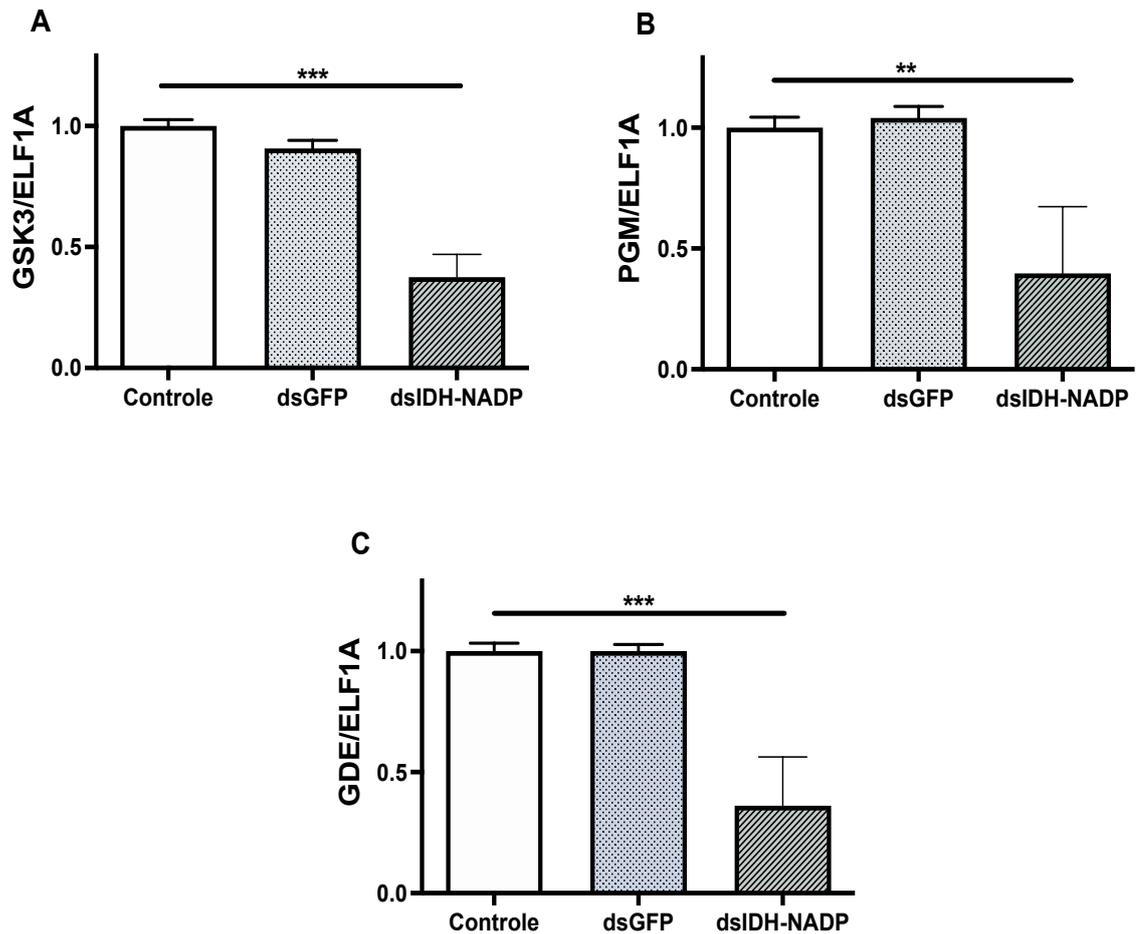


Figura 4. Análise transcricional dos genes envolvidos na regulação da síntese e degradação do glicogênio. Análise transcricional da glicogênio sintase quinase-3 (GSK3) (A), fosfoglicomutase (PGM) (B), e a enzima desramificadora do glicogênio (GDE) (C) em células BME26 não tratadas (controle), desafiadas com o RNAi para o gene-não relacionado GFP (dsGFP), e desafiadas com o RNAi para IDH-NADP+ (dsIDH-NADP).

Curiosamente, dois genes aumentaram seus níveis de transcrição após o silenciamento da IDH-NADP+, a GP e AKT (Figuras 5 A e B), sugerindo que a

gliconeogênese e a via de sinalização de insulina são transcricionalmente reguladas pela IDH-NADP+.

Foi demonstrado que a gliconeogênese contribui significativamente para manter o balanço energético nos estágios finais do desenvolvimento embrionário de *R. microplus* e *A. aegypti* (Fabres *et al.*, 2010; Logullo *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2007). Nesse caso, esses artrópodes utilizam compostos não glicosídicos, como lactato e aminoácidos, para ressintetizar o glicogênio por meio da gliconeogênese. Esses achados sugerem que a glicose pode formar uma ampla gama de substratos por essa via, garantindo que os precursores estejam disponíveis não só para os processos de biossíntese, mas também garantindo um fornecimento de poder redutor que explicaria a alta tolerância das células do carrapato *R. microplus* ao estresse oxidativo.

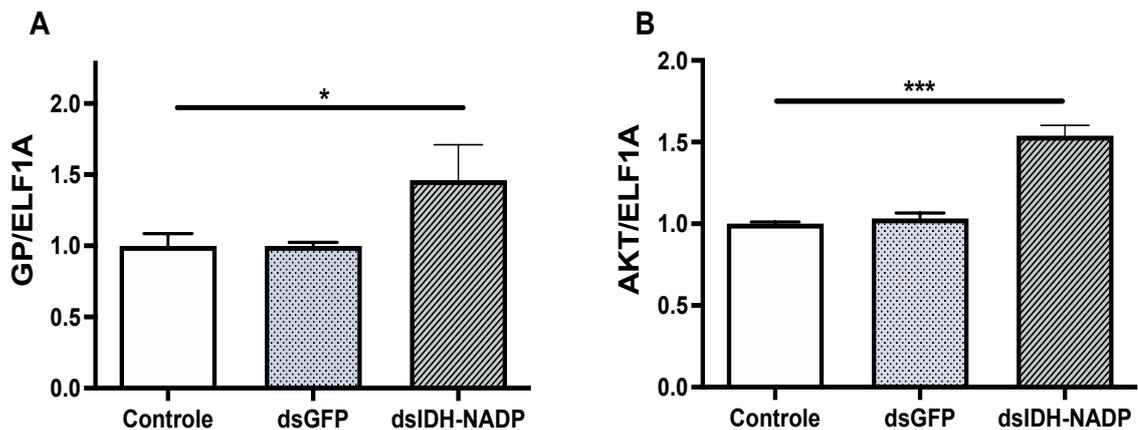


Figura 5. Análise transcricional da glicose-6 fosfatase e da proteína quinase

B. Perfil transcricional da glicose-6 fosfatase (GP), regulador da gliconeogênese (A) e de um componente da via de sinalização de insulina, proteína quinase B (AKT) (B) em células BME26 não tratadas (controle), desafiadas com o RNAi para o gene não relacionado GFP (dsGFP), e desafiadas com o RNAi para IDH-NADP+ (dsIDH-NADP).

No entanto, como a AKT é um componente da via de sinalização de insulina e conseqüentemente afeta inúmeras vias do metabolismo de glicose, a alteração dos perfis transcricionais dos genes controladores do metabolismo pode não ser uma consequência direta do silenciamento da IDH-NADP⁺, mas sim pelo fato da IDH-NADP⁺ afetar a transcrição de AKT propriamente dita, que por sua vez afetaria a transcrição dos demais genes do metabolismo de glicose. Para comprovar essa hipótese, um RNAi para AKT foi sintetizado e administrado, obtendo um silenciamento de aproximadamente 90% (Figura 6).

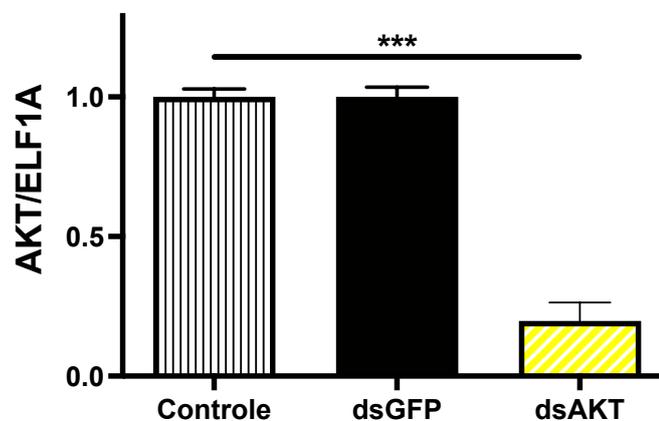


Figura 6. Validação do silenciamento da proteína quinase B (AKT). Análise transcricional da AKT em células BME26 não tratadas (control), desafiadas com o RNAi para o gene-não relacionado GFP (dsGFP), e desafiadas com o RNAi para AKT (dsAKT).

O nível transcricional da PK, reguladora da glicólise, foi significativamente reduzida após o silenciamento da AKT (Figura 7 A). Esses resultados sugerem que o silenciamento da AKT estaria suprimindo a via de sinalização de insulina e o

uptake de glicose, e conseqüentemente a glicólise. No caso do carrapato *R. microplus*, podemos fazer essa afirmação, uma vez que neste modelo a AKT responde à sinalização mediada por insulina. Abreu *et al.* (2009) demonstrou que a administração de insulina exógena aumentou o conteúdo de glicogênio celular na ausência de soro fetal de vitela (FCS) em células BME26 quando comparado a células sem tratamento. Além disso, na presença de inibidores da via de sinalização de insulina (Wortmannin ou LY294002) esses efeitos foram bloqueados.

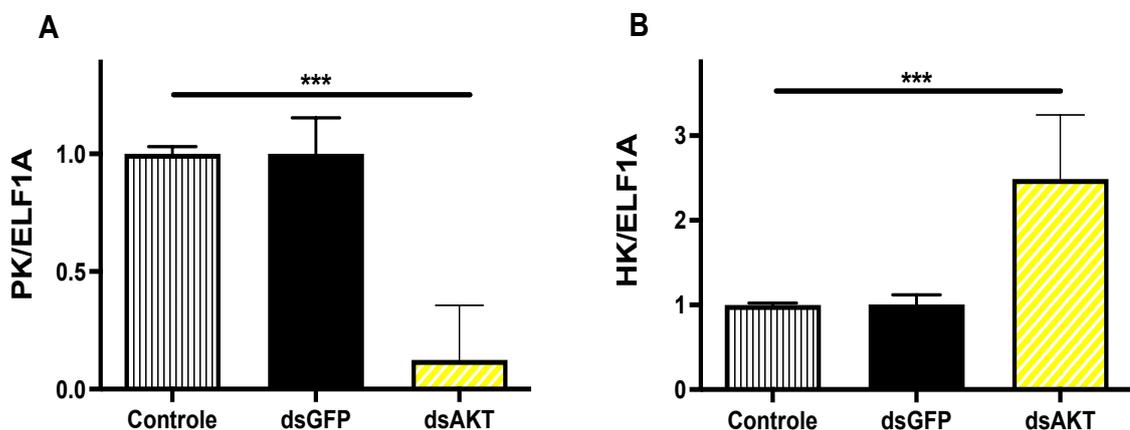


Figura 7. Análise transcricional dos genes reguladores da via glicolítica. Nível transcricional HK (A), e da PK (B) em células BME26 não tratadas (controle), desafiadas com o RNAi para o gene-não relacionado GFP (dsGFP), e desafiadas com o RNAi para AKT (dsAKT).

Após o silenciamento da AKT o nível transcricional da HK aumentou significativamente (Figura 7 B), sugerindo que em função da supressão da via de sinalização de insulina, outros mecanismos de internalização de glicose independentes da sinalização de insulina, possam conduzir ao aumento de HK na

célula. As proteínas de transporte de glicose (GLUT1 e GLUT4) facilitam o transporte de glicose para as células sensíveis à insulina (Pessin e Bell, 1992). GLUT1 é independente de insulina e está amplamente distribuído em diferentes tecidos, tanto em mamíferos quanto em artrópodes (Ebeling *et al.*, 1998; Pessin e Bell, 1992). Se a glicose estiver entrando pelo GLUT1 ela é fosforilada pela hexoquinase I, e a glicose 6-fosfato assim formada estará disponível para todas as vias metabólicas (Marshall *et al.*, 1993).

A transcrição de TIM não foi alterada pelo silenciamento da AKT (Figura 8 A), sugerindo que a primeira etapa da glicólise não foi severamente afetada pelo silenciamento. Assim como a TIM, a transcrição da PEPCK, reguladora da gliconeogênese não foi alterada pelo silenciamento da AKT (Figura 8 B). No entanto, a transcrição de GP, outra reguladora da gliconeogênese, sofreu redução nos seus níveis de transcritos (Figura 8 C). Da Silva *et al.* (2015) demonstrou que a transcrição de GP aumenta em células BME26 tratadas com alto teor de glicose. Massillon (2001) observou um aumento na transcrição de GP quando os níveis de glicose estavam elevados em cultura de células de hepatócitos, mostrando uma resposta dose-dependente. A captação de grandes quantidades de glicose e a conseqüente fosforilação da glicose inibem a atividade de HK como resultado de níveis elevados de glicose-6-fosfato, levando à geração de ROS pelas mitocôndrias (Seixas *et al.*, 2004). No contexto da cultura de células, a GP pode ser necessária para permitir a difusão do excesso de glicose no interior das células. No nosso estudo, observamos que a transcrição de GP sofre redução após o silenciamento da AKT, sugerindo que mesmo que a glicose possa estar entrando na célula por mecanismos independentes da sinalização de insulina como sugere a transcrição elevada de HK, ainda há um déficit de glicose no interior da célula, uma vez que a GP está com baixa transcrição.

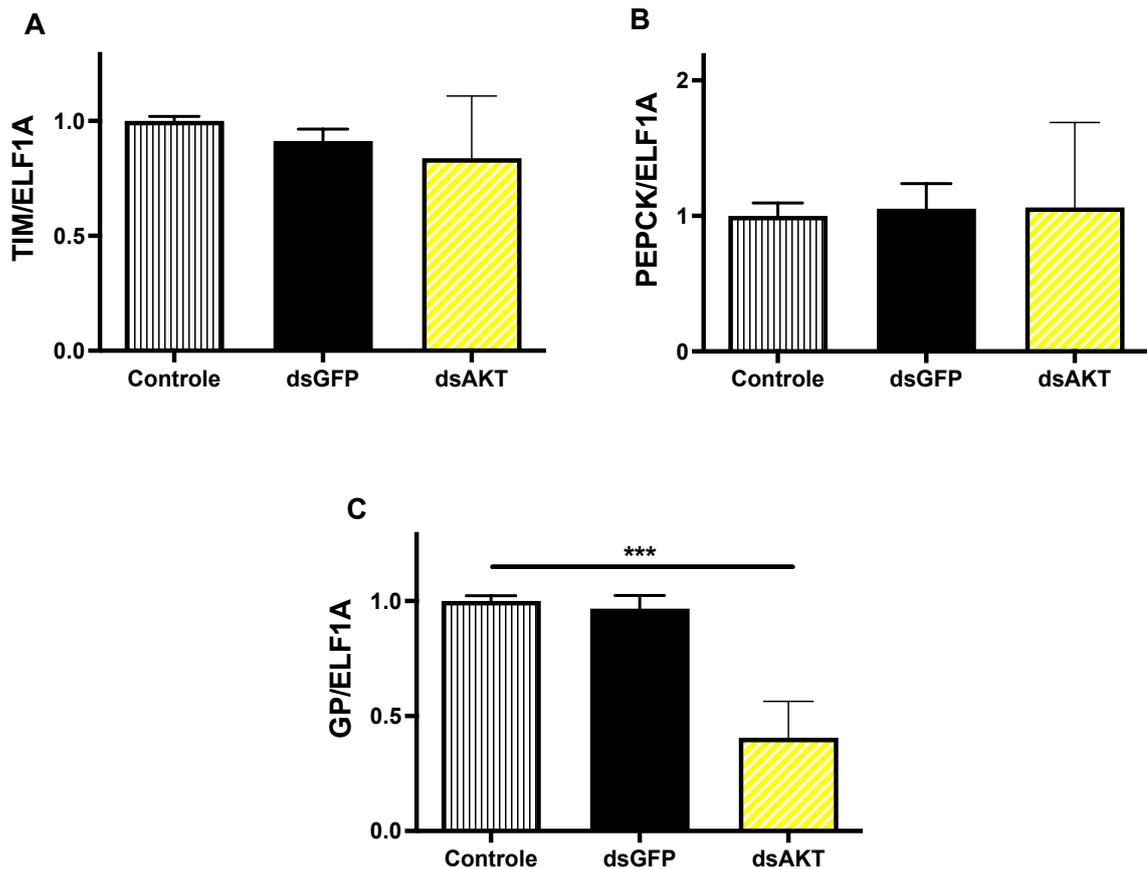


Figura 8. Análise transcricional dos genes reguladores da via gliconeogênica.

Nível transcricional da triose-fosfato isomerase (TIM) (A), da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) (B), e da GP (C) em células BME26 não tratadas (control), desafiadas com o RNAi para o gene-não relacionado GFP (dsGFP), e desafiadas com o RNAi para AKT (dsAKT).

A transcrição dos genes envolvidos na degradação do glicogênio também foi avaliada. A transcrição da GDE não sofre alteração no nível transcricional (Figura 9 A), contudo, o nível transcricional da PGM foi reduzido após o silenciamento da AKT (Figura 9 B), sugerindo uma possível redução parcial na degradação do

glicogênio, uma vez que excesso de G6P (como observada pela elevada transcrição de HK na fig. 7B), inibe a degradação de glicogênio.

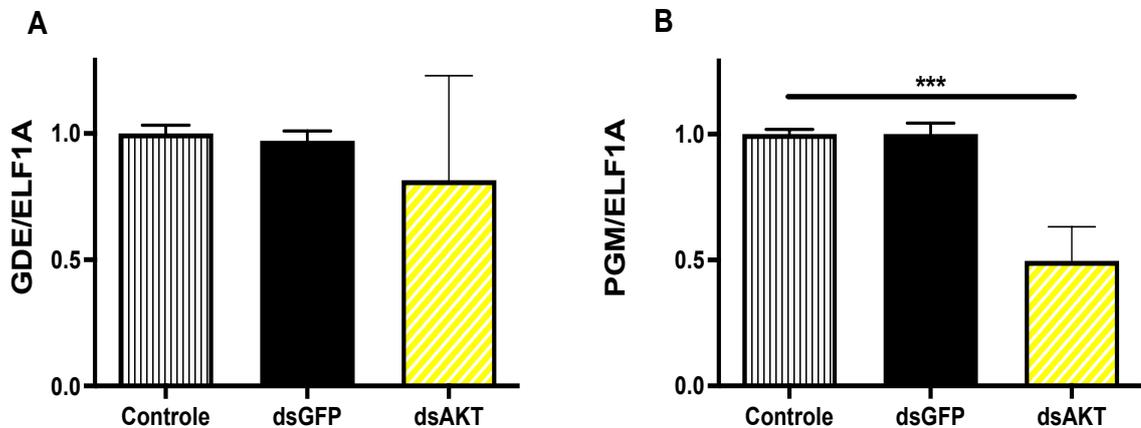


Figura 9. Análise transcricional dos genes envolvidos na regulação da síntese e degradação do glicogênio. Análise transcricional da GDE A), e da PGM (B) em células BME26 não tratadas (control), desafiadas com o RNAi para o gene-não relacionado GFP (dsGFP), e desafiadas com o RNAi para AKT (dsAKT).

A AKT é uma reguladora negativa da GSK3 à nível enzimático. Ao silenciar a AKT a transcrição de GSK3 sofre significativo aumento (Figura 10), sugerindo que essa regulação entre ambas as enzimas também ocorre em nível transcricional, o que até o momento não havia sido reportado na literatura. A GSK3 é inibidora da glicogênio sintase (GS), enzima reguladora da síntese de glicogênio. A GS é ativada quando a via de sinalização de insulina está ativa, por exemplo, ao se alimentar, uma vez que a glicose que está entrando na célula via GLUT4 precisa ser estocada como glicogênio. Nesse contexto, os dados aqui apresentados descrevem um mecanismo compensatório entre G6PDH e IDH-NADP+, o que

poderia explicar a alta tolerância das células do carrapato *R. microplus* ao ROS, e que isso é realizado via AKT.

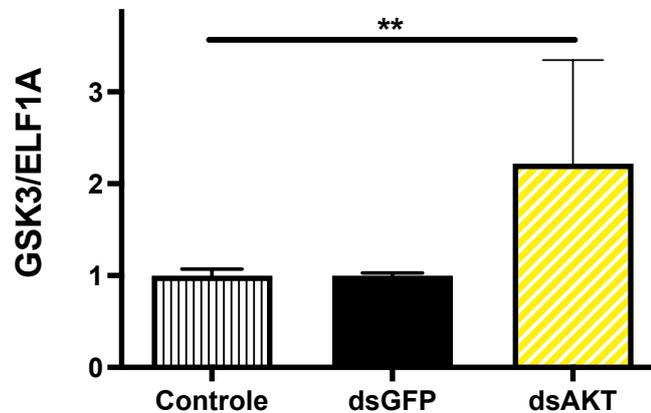


Figura 10. Análise transcricional da glicogênio sintase quinase-3 (GSK3) após o silenciamento de AKT em células BME26. Perfil transcricional da GSK3 em células BME26 não tratadas (control), desafiadas com o RNAi para o gene-não relacionado GFP (dsGFP), e desafiadas com o RNAi para AKT (dsAKT).

Esse estudo descreve alguns dos mecanismos metabólicos associados à manutenção do estado energético da célula nas células BME26, auxiliando na compreensão da tolerância destas ao estresse oxidativo. Tal compreensão pode ainda ser estendida a outros aspectos relevantes do carrapato, e permite a identificação de novos e potenciais alvos moleculares para estratégias de pesquisa e/ou controle.

6. CONCLUSÕES

Um grande progresso foi alcançado com sistemas de modelos de artrópodes para estudar vários distúrbios humanos, incluindo diabetes, esclerose múltipla e epilepsia (Schindelin *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1985). Assim, linhagens celulares de artrópodes atuam como excelentes modelos experimentais para estudar fisiologia, redes reguladoras de genes, fluxos metabólicos e regulação da homeostase energética (Ren *et al.*, 2018; Hietakangas e Cohen, 2009; Oldham e Hafen, 2003; Teleman, 2010; Hanahan e Weinberg, 2011; Heiden *et al.*, 2009; Pfaffl, 2001). O presente estudo demonstrou um panorama metabólico que conduz a um melhor entendimento da modulação do metabolismo de glicose em células embrionárias desse importante vetor de doenças, ajudando a contribuir para a identificação de novos alvos para vacinas que integrem estratégias para o controle da espécie.

Atualmente métodos de controle alternativo interferem em fases preferenciais do ciclo de vida do carrapato, como as ninfas, adultos e finalmente o embrião (Thompson e Stewart, 1997). Embora esse último estágio seja negligenciado, novos estudos na embriogênese de artrópodes, em particular focados no metabolismo de carboidratos, têm conduzido a um melhor entendimento da dinâmica de utilização de nutrientes desde a formação do ovócito até a mobilização de reservas durante a formação do embrião (Campos *et al.*, 2006; Vital *et al.*, 2010; Moraes *et al.*, 2007). Por fim, é importante determinar se o mecanismo adaptativo descrito aqui é um fenômeno espécie-específico ou também pode ser estendido à fisiologia de outros artrópodes hematófagos.

Esse estudo também contribui para preencher essa lacuna na literatura e mostrar que a regulação do metabolismo de glicose na embriogênese é processo mais dinâmico do que atualmente apreciado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, L., Fabres, A., Esteves, E., Masuda, A., Vaz Jr, I.S., Daffre, S., Logullo, C., 2009. Exogenous insulin stimulates glycogen accumulation in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* embryo cell line BME26 via PI3K/AKT pathway. *Comp. Biochem. Physiol. Part B. Biochem. Mol. Biol.* 153, 185–190.

Burdon, R. H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biology and Medicine* 18, 775–794 (1995).

Campos, E., Moraes, J., Façanha, A., Moreira, E., Valle, D., Abreu, L., Manso, P., Lenzi, H., Masuda, A., Vaz Jr, I.S., Logullo, C., 2006. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. *Vet. Parasitol.* 138, 349–357.

Da Silva, R. M., Della Noce, B., Fernanda Walthero, C., Costa, E. P., de Abreu, L. A., Githaka, N. W., Moraes, J., Gomes, H. F., Konnai, S., da Silva Vaz, I., Ohashi, K., and Logullo, C. (2015) Non-classical gluconeogenesis- dependent glucose metabolism in *Rhipicephalus microplus* embryonic cell line BME26. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 1821–1839.

De Abreu, L. A., Calixto, C., Walthero, C. F., Della Noce, B. P., Githaka, N. W., Seixas, A., Parizi, L. F., Konnai, S., Vaz, I. da S. J., Ohashi, K., and Logullo, C. (2013) The conserved role of the AKT/GSK3 axis in cell survival and glycogen metabolism in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* embryo tick cell line BME26. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 2574–258217.

Della Noce B. P., Uhl M. V. C. , Machado J., Walthero C. F., de Abreu L. A., Silva R. M., Fonseca R. N., de Barros C. M., Sabadin G., Konnai S., Vaz Jr. I. S.,

Ohashi K. and Logullo C., 2019. Carbohydrate Metabolic Compensation Coupled to High tolerance to oxidative stress in ticks. *Scientific Reports*, 9:4753.

Della Noce, B., de Carvalho Uhl, M. V., Machado, J., Waltero, C. F., de Abreu, L. A., da Silva, R. M., da Fonseca, R. N., de Barros, C. M., Sabadin, G., Konnai, S., da Silva Vaz, I., Ohashi, K., and Logullo, C. (2019) Carbohydrate metabolic compensation coupled to high tolerance to oxidative stress in ticks. *Sci. Rep.* 9, 1–16.

Ebeling P, Koistinen HA, Koivisto VA. Insulin-independent glucose transport regulates insulin sensitivity. *FEBS Letters*. 1998 Oct;436(3):301-303. DOI: 10.1016/s0014-5793(98)01149-1. PMID: 9801136.

Fabres, A., De Andrade, C. P., Guizzo, M., Sorgine, M. H. F., Paiva-Silva, G. de O., Masuda, A., Da Silva vaz, I., and Logullo, C. (2010) Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi on tick oviposition and egg hatching. *Parasitology* 137, 1537–1546.

FUNASA, 2000. Doenças Infecciosas e Parasitárias. Aspectos Clínicos, Vigilância Epidemiológica e Medidas de Controle. 2º Edição Revisada e Ampliada.

Gomes H, Romeiro NC, Braz GR, de Oliveira EA, Rodrigues C, da Fonseca RN, Githaka N, Isezaki M, Konnai S, Ohashi K, da Silva Vaz I Jr, Logullo C, Moraes J. Identification and structural-functional analysis of cyclin-dependent kinases of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *PLoS One*. 2013 Oct 11;8(10):e76128. doi: 10.1371/journal.pone.0076128. PMID: 24146826; PMCID: PMC3795742.

Logullo, C., Witola, W. H., Andrade, C., Abreu, L., Gomes, J., da Silva Vaz, I., Imamura, S., Konnai, S., Ohashi, K., and Onuma, M. (2009) Expression and

activity of glycogen synthase kinase during vitellogenesis and embryogenesis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.* 161, 261–269.

Marshall, B.A., Ren, J.-M., Johnson, D.-W., Gibbs, E.M., Lillquist, J.S., Soeller, W.C., Holloszy, J.O. and Mueckler, M. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 18442–18445.

Massillon, D. Regulation of the glucose-6-phosphatase gene by glucose occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms, differential effect of glucose and xylitol. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 4055–4062.

McCOSKER, P. L.. The global importance of babesiosis. In: RISTIC, M. & KREIR, J. P. (Eds.) *Babesiosis*. New York, Academic Press. 1981.

Montenegro-James, S. (1992) Prevalence and control of babesiosis in the Americas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87, 27–36.

Moraes, J., Galina, A., Alvarenga, P. H., Rezende, G. L., Masuda, A., da Silva Vaz, I., and Logullo, C. (2007) Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 146, 528–533.

Moraes, J., Galina, A., Alvarenga, P., Rezende, G., Masuda, A., Vaz Jr, I.S., Logullo, C., 2007. Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol.* 146, 528–533.

Munderloh, U.; Kurtti, T. Formulation of medium for tick cell culture. *Exp. Appl. Acarol.* 1989, 7, 219–229.

Pavlova, N. N., and Thompson, C. B. (2016) The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab.* 23, 27–47.

Pessin, J.E. and Bell, G.I. (1992) *Annu. Rev. Physiol.* 54, 911–930.

Ristow, M. & Zarse, K. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Experimental Gerontology* 45, 410–418 (2010).

Rzezniczak, T. Z. & Merritt, T. J. S. Interactions of NADP-reducing enzymes across varying environmental conditions: a model of biological complexity. *G3 (Bethesda)*. 2, 1613–23 (2012).

Saramago, L., Franceschi, M., Logullo, C., Masuda, A., Vaz Jr, I.S., Estrazulas, S., Moraes, J., 2012. Inhibition of enzyme activity of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Triosephosphate Isomerase and BME26 cell growth by monoclonal antibodies. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 13118-13133.

Saramago L, Gomes H, Aguilera E, Cerecetto H, González M, Cabrera M, Alzugaray MF, da Silva Vaz Junior I, Nunes da Fonseca R, Aguirre-López B, Cabrera N, Pérez-Montfort R, Merlino A, Moraes J, Álvarez G. Novel and Selective *Rhipicephalus microplus* Triosephosphate Isomerase Inhibitors with Acaricidal Activity. *Vet Sci.* 2018 Aug 23;5(3):74. doi: 10.3390/vetsci5030074. PMID: 30142944; PMCID: PMC6163981.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., *et al.* (2012) Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.

Seixas, W.; Gomes-Puyou, A.; Tuena, M.; Moreno-Sanchez, R.; de Felice, F.; de Meis, L. Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 39846–39855.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.

Thompson, M. B., e Stewart, J. R., Embryonic metabolism and growth in lizards of the genus *Eumeces*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118A: 647-654. 1997.

Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Nilasa, R.-D. V. & Huang, P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1343–74 (2008).

Vital, W., Rezende, G., Abreu, L., Moraes, J., Lemos, F., Vaz Jr, I.S., Logullo, C, 2010. Germ band retraction as a landmark in glucose metabolism during *Aedes aegypti* embryogenesis. *BMC Dev. Biol.* 10, 25.

Young, A.S. and Morzaria, S. P. Biology of Babesia. *Parasitology Today.* v. 2, n. 8, p. 211-219, 1986.

Zhao, H. W. & Haddad, G. G. Review: Hypoxic and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster*. in *Placenta* 32 (2011).

Zou, C., Wang, Y., and Shen, Z. (2005) 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J. Biochem. Biophys. Methods* 64, 207–215.