

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

NEWTON RUIZ SANCHES JUNIOR

Os efeitos do silenciamento gênico do eixo AKT/GSK via eletroporação em embriões de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO DE 2014

NEWTON RUIZ SANCHES JUNIOR

Os efeitos do silenciamento gênico do eixo AKT/GSK via eletroporação em embriões de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO - 2014

NEWTON RUIZ SANCHES JUNIOR

Os efeitos do silenciamento gênico do eixo AKT/GSK via eletroporação em embriões de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Aprovado em: 19 / 02 / 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dsc. Carlos Jorge Logullo (Orientador) – UEA/UENF

Prof. Dsc. Rodrigo Nunes da Fonseca – LBIHM/NUPEM/UFRJ - Macaé

Prof. Dsc. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira – LSA/CCTA/UENF

Dsc. Evenilton Pessoa Costa – UEA/UENF

LISTA DE ABREVIÇÕES

RNAi: RNA de interferência

dsRNA: Dupla fita de RNA

GSK: Glicogênio Sintase Cinase

GS: Glicogênio Sintase

AKT: Proteína Cinase B

PI3K: Fosfatidilinositol-3-cinase

Dedico este trabalho a minha família, pelo amor e apoio incondicional que sempre me deram. Aos amigos, colegas de laboratório e professores que sempre me ajudaram nesta jornada que chamamos de Ciência.

"É verdade que não podemos encontrar a pedra filosofal, mas é bom que ela seja procurada; procurando-a, descobrem-se muitos bons segredos que se não procuravam."

Bernard le Bovier de Fontenelle

RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é uma espécie originária do Sudeste Asiático e introduzida no Brasil durante a colonização portuguesa. Atualmente, este ectoparasita possui uma distribuição ampla no país e causa prejuízos econômicos na ordem de bilhões de dólares. O controle do *R. microplus* baseia-se na aplicação de acaricidas, porém a adoção desta única estratégia de controle tem tornado o fenômeno da resistência a antiparasitários mais frequente. O conhecimento mais aprofundado da biologia do carrapato possibilita a criação de estratégias de controle mais eficientes, além da obtenção de novos alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos. Uma das ferramentas moleculares utilizadas para o estudo de funções gênicas é o RNA de interferência (RNAi). Neste trabalho, foi avaliada uma nova forma de entrega de dsRNA em ovos de *R. microplus*, utilizando uma técnica conhecida como eletroporação. Este método consiste na aplicação de pulsos elétricos curtos de alta voltagem que aumentam o potencial de transporte de membrana, promovendo uma formação transitória de poros aquosos na bicamada lipídica, permitindo que macromoléculas migrem através desses poros. O alvo escolhido para este silenciamento foi o eixo AKT/GSK, pela sua importância no metabolismo e desenvolvimento embrionário. Por meio de estratégias de *design* de *primers*, foram comprovados a entrada da dupla fita de RNA e o silenciamento gênico em dois momentos, antes da transição materno-zigótica (1º dia de desenvolvimento embrionário) e após a transição (7º dia de desenvolvimento). Também foram avaliados os efeitos do silenciamento de AKT na transcrição de GSK e *de GSK na expressão AKT*. Além de análises do metabolismo dos embriões silenciados pela quantificação de glicogênio, no 1º e 7º dias, ocorreu a taxa de eclosão dos mesmos. Nas amostras eletroporadas, houve um aumento do sinal nas amostras tratadas com dsAKT em comparação com o do controle tratado com a dupla fita de β galactosidase. Nas amostras eletroporadas, no 1º dia de desenvolvimento, foi observado um aumento de 7 vezes na intensidade de fluorescência e, no 7º dia, de 3,5 vezes, sugerindo a entrega e entrada de dsRNA por meio da estratégia da eletroporação. Além da redução da transcrição de AKT em ovos tratados para dsAKT, no 1º dia, foi de aproximadamente 90% e no, 7º dia, de

80%. Nos embriões silenciados para GSK, em ambos os momentos, a redução foi de aproximadamente 80%. Houve também mudanças no perfil de transcrição de GSK em amostras silenciadas para AKT e também quando foi analisada a transcrição de AKT em amostras silenciadas para GSK, além de mudanças na taxa de eclosão dos ovos silenciados, em ambos os momentos, e na quantidade de glicogênio nos embriões foi observada uma variação no conteúdo de glicogênio em embriões tratados em comparação com a do controle eletroporado com β gal. O uso da eletroporação pode ser considerado uma abordagem útil para o silenciamento gênico de ovos de carrapatos e uma importante ferramenta para o estudo das funções de um genes na biologia e no desenvolvimento embrionário de outros organismos.

Palavras-chave: AKT, GSK, *Rhipicephalus microplus*, eletroporação em ovos.

ABSTRACT

The *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is a species originated in Southeast Asia and introduced in Brazil with colonization. Currently, this ectoparasite has a wide distribution in the country and causes considerable economic losses. Control of *B. microplus* based on the application of acaricides but the adoption of this unique control strategy has become the phenomenon of resistance to antiparasitic more frequent. The understanding of the biology of the tick enables the development of more effective control strategies, and help to finding new molecular targets for drug development. One of the molecular tools used for studying gene functions is RNA interference (RNAi). In this study evaluated a new method of delivery of dsRNA in eggs of *R. microplus*, using a technique known as electroporation. That is the application of short pulses of high electrical voltage that increases the potential for membrane transport, promoting formation of a transient aqueous pores in lipid bilayer, allowing macromolecules migrate through these pores. The target chosen for this silencing was the AKT / GSK axis, due to its importance in metabolism and embryonic development. Through strategies of primers designer was used to confirming the entry of double-stranded RNA and gene silencing in two stages after the maternal- zygotic transition (first day of development) and after the transition (7th day of development). We also evaluated the effects of AKT in transcriptional silencing of GSK and vice versa. In addition to analyzes of the metabolism of embryos silenced by quantifying glycogen silenced in the first and seventh days and hatching rate of larvae. In electroporated samples there was observed an increase the signal of dsAKT treated samples compared to the control treated with the double-stranded β galactosidase. In 1st day was nearly 7-fold increase in the electroporated eggs and on the seventh day electroporated was 3.5 times, suggesting the delivery of dsRNA by electroporation strategy. In addition to reducing the transcription of AKT in dsAKT eggs processed for the first day was approximately 90 % on the seventh day of 80%. In silenced for GSK, in both moments the reduction was approximately 80%. There were also changes in the transcription profile of GSK silenced AKT and

vice versa, was observed changes in the hatching rate of the silenced both times and embryo's glycogen was changed in compared with the control eletroporado with β gal. The use of electroporation can be considered a useful approach for gene silencing of ticks eggs and an important tool for the study of the function of genes in biology and embryonic development of other organisms.

Keywords: AKT, GSK, *Rhipicephalus microplus*, electroporation in eggs

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 – O Carrapato <i>Rhipicephalus (boophilus) microplus</i>	3
2.2 – Ciclo de vida do <i>Rhipicephalus microplus</i>	3
2.3 – Controle do carrapato	5
2.4–Mudanças morfológicas do embrião durante o desenvolvimento do <i>R. microplus</i>	5
2.4.1–Metabolismo energético durante o desenvolvimento embrionário	6
2.4.2 – IMPORTÂNCIA DO EIXO ENZIMÁTICO AKT/GSK-3B	9
2.4.3 – CONTROLE GÊNICO NA EMBRIOGÊNESE	11
2.4.4 – TRANSIÇÃO MATERNO-ZIGÓTICA	11
2.5 – Técnica de silenciamento gênico por meio do RNAi	13
2.6 – Eletroporação dos ovos de <i>R. microplus</i>	14
3. OBJETIVO	16
3.1 – Objetivo geral	16
3.2 – Objetivos específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODO	17
4.1 –O carrapato <i>Rhipicephalus (boophilus) microplus</i>	17

4.2 – Síntese da dupla fita de RNA (dsrna).....	17
4.3 – Remoção da cera e entrega de dsRNA em embriões de carrapatos por eletroporação	18
4.4 – Validação do silenciamento por RNAi utilizando PCR em tempo real	18
4.5 – Determinação da quantificação do glicogênio nos ovos silenciados	19
4.6 – Análise estatística.....	19
5. RESULTADOS	20
5.1 Entrega dsRNA para os ovos de R. microplus.....	20
5.2 Validação do silenciamento da AKT e GSK por PCR em tempo real.	21
5.3 Análise dos efeitos causados pelo silenciamento de AKT na expressão de GSK e de GSK na expressão AKT.	23
5.3.1 O efeito do silenciamento de AKT na expressão de GSK.	23
5.3.2 o efeito do silenciamento de GSK na expressão de AKT	24
5.4 O silenciamento por meio da eletroporação leva a mudanças no conteúdo de glicogênio.....	25
5.5 A taxa de eclosão dos ovos silenciados para AKT e GSK.....	26
6. DISCUSSÃO.....	27
7. CONCLUSÃO	31
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o objeto deste estudo pela sua importância na saúde pública e econômica como transmissor de patógenos e causador de prejuízos econômicos na pecuária brasileira. A principal forma de controle contra o carrapato é por meio do uso de fármacos. Porém, o uso incorreto ou indiscriminado leva ao fenômeno da resistência. O estudo do metabolismo e do desenvolvimento embrionário visa ao desenvolvimento de novas formas de controle contra o carrapato *Rhipicephalus (boophilus) microplus*, auxiliando na busca de novos alvos e desenvolvimento de vacinas e novos fármacos.

No *R. microplus*, a embriogênese tem uma duração de aproximadamente 21 dias em condições de laboratório, havendo uma pequena variação, dependendo das condições ambientais de temperatura e de umidade, sendo a embriogênese, morfológicamente, dividida em 14 estágios. A etapa da embriogênese é a fase em que há multiplicação do parasita no ambiente e formação do embrião; as mudanças morfológicas e do metabolismo observadas neste estágio são regidas mediante um controle gênico, e essas mudanças possuem uma grande importância na biologia do parasita.

No início da embriogênese, o controle gênico é realizado basicamente pelas proteínas e RNA mensageiros herdados maternalmente, o que garante que os processos iniciais da embriogênese ocorram sem qualquer interferência. Depois, começa a ocorrer uma transição, em que há a degradação do material gênico e das proteínas maternas, e ativação do genoma zigótico, que resultará na independência gênica. Este processo é conhecido como transição materno-zigótica.

Uma das ferramentas utilizadas para o estudo gênico é o RNA de interferência (RNAi), que consiste na síntese *in vitro* de uma dupla fita de RNA, composta de uma sequência parcial do gene a ser silenciado, que se inicia numa cascata de sinalização intracelular e que resulta no silenciamento pós-transcricional do gene estudado. Existem diferentes formas de entrega da dupla fita de RNA (dsRNA) como a microinjeção, imersão, associados a bactérias e vírus.

O eixo AKT/GSK foi escolhido como alvo para o silenciamento gênico, por ser um eixo envolvido em diversas vias metabólicas como: metabolismo de carboidratos, morfogênese, apoptose, formação de eixo, morte celular, síntese proteica e proliferação celular.

Neste trabalho, foi testada uma nova forma de entrega, a eletroporação. Esta consiste na utilização de pulsos elétricos que levam a uma reorganização na membrana plasmática e ao aparecimento de poros temporários que permitem a entrada da dsRNA. Diante deste panorama, o silenciamento gênico por RNAi, via eletroporação, foi testado em dois momentos diferentes, antes da transição materna (1^o dia de desenvolvimento) e após, (7^o dia de desenvolvimento), quando foram observados os efeitos do silenciamento gênico dos elementos do eixo, no desenvolvimento embrionário do *R. microplus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Carrapatos são ectoparasitas hematófagos obrigatórios, parasitando um grande número de espécies de vertebrados terrestres sejam animais selvagens ou domésticos e homem (Peters, 2005). O carrapato é considerado o segundo maior vetor de doenças no mundo (Parola & Raout, 2001), estando distribuídos em três famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae (Keirans 1992; Keirans & Robbins, 1999).

O carrapato *R. microplus* pertence à família dos Ixodídeos, um parasita comumente encontrado em bovinos. Em bovinos, é um vetor de doenças como *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*, responsáveis pelo complexo de doenças conhecido como Tristeza Parasitária Bovina. Os sintomas clínicos são: febre, icterícia, fraqueza, depressão, falta de apetite, membranas mucosas pálidas e esplenomegalia. Estão associados à mortalidade, queda na produção, ao atraso no ganho de peso e, além dos custos com o tratamento, podem ser encontradas ainda perturbações da coagulação e no sistema nervoso. Os achados laboratoriais mais frequentes são: anemia, aumento dos níveis de bilirrubina no sangue, presença de bilirrubina e hemoglobina na urina e diminuição do número de plaquetas. É muito comum a presença de quadros de insuficiência renal aguda.

Por ser um vetor de doenças e parasitar aproximadamente 80% do rebanho bovino de leite no mundo (Bowman & Nuttall, 2004), está associado a grandes perdas econômicas, estimadas em 1 bilhão de reais (Grisi *et al.*, 2002). São parasitas que apresentam um grande poder de disseminação no ambiente, uma única fêmea pode gerar até 3 mil larvas (Gonzales, 2003).

2.2 – Ciclo de vida do *Rhipicephalus microplus*

O ciclo de vida do *R. microplus* é considerado monóxeno, isto é, depende apenas de um hospedeiro em seu ciclo de vida. Este ciclo apresenta quatro momentos distintos: ovo, larva, ninfa e adulto. Na fase de ovo, ocorre o

desenvolvimento embrionário que possui uma duração de aproximadamente 21 dias, dependendo das condições ambientais de temperatura e umidade; nesta fase, ocorre a formação do novo indivíduo. Após este período, ocorre a eclosão das larvas que aguardam a vinda de um hospedeiro para a realização da primeira alimentação sanguínea, podendo sobreviver a longos períodos de escassez; durante este período, utilizam reservas energéticas na forma de vitelogenina (Campos *et al.*, 2006). Após a alimentação sanguínea, as larvas retornam ao ambiente e realizam uma mudança morfológica e fisiológica, denominada de ecdise, tornando-se ninfas. Depois, as mesmas procuram um novo hospedeiro onde realizam um novo repasto sanguíneo e ecdise, tornando-se adultos, quando ocorre a diferenciação sexual de machos e fêmeas, e é nesta fase do ciclo de vida que ocorre a cópula, normalmente, no próprio hospedeiro. As fêmeas adultas ingurgitadas realizam a ovipostura reiniciando o ciclo (Sonenshine, 1993).

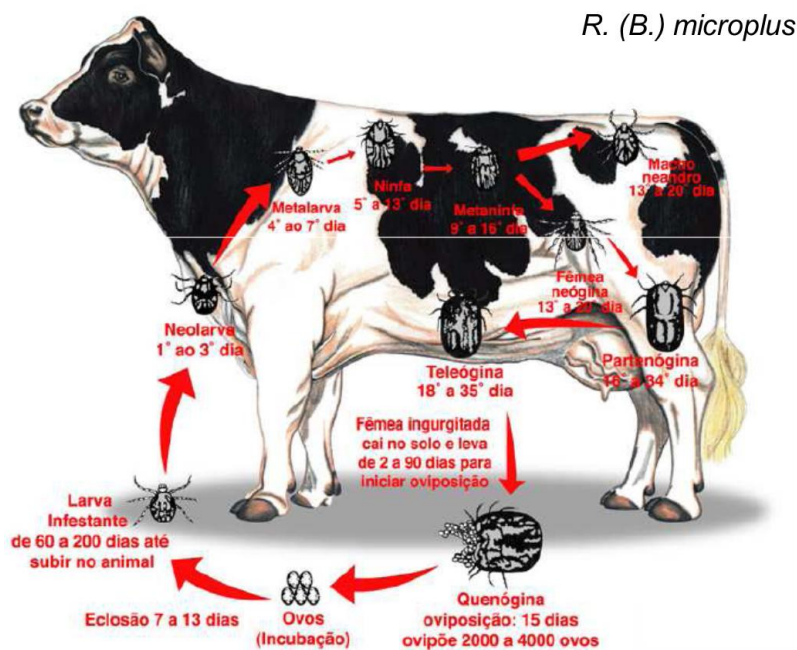


Figura 1. Ciclo de vida do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

2.3 – Controle do carrapato

O controle de *R. microplus*, no Brasil, tem como base a aplicação de fármacos (Norval, 2004), conhecidos como acaricidas. A sua utilização ocorre frequentemente de forma incorreta e empírica, possibilitando o aparecimento do fenômeno da resistência dos carrapatos aos diversos princípios ativos utilizados comercialmente (Lovis, 2013; Lifschitz, 2008). Novas associações têm sido criadas entre os fármacos já existentes (Horak, 2012), de forma que novos produtos sejam desenvolvidos e tenham grande seletividade em sua ação sobre o carrapato, na tentativa de evitar reações adversas sobre o hospedeiro vertebrado.

Uma das estratégias alternativas para o seu controle está no desenvolvimento de vacinas contra proteínas presentes em seu intestino. A primeira vacina comercial foi desenvolvida contra o *B. microplus* e teve como alvo (antígeno) uma proteína de célula intestinal, conhecida como a Bm86 (Willadsen, 1995), lançada no mercado australiano com o nome comercial de “TickGARD” em 1994, e 2 anos depois, houve uma nova formulação e o lançamento da “TickGARD PLUS” (Jonsson, 2000). No mesmo ano, em Cuba, foi lançada uma vacina desenvolvida com o nome comercial de “GAVAC” (Rodrigues *et al.*, 1995).

2.4 – Mudanças morfológicas do embrião durante o desenvolvimento do *R. microplus*

O desenvolvimento embrionário de carrapatos tem sido estudado por ser uma etapa no ciclo de vida com grande potencial estratégico para o controle contra o carrapato. Esta é uma fase em que o ectoparasita não apresenta mobilidade e, com isso, torna-se mais susceptível às intempéries do ambiente que o cerca. É uma etapa de multiplicação do vetor no ambiente, podendo chegar à proliferação de milhares de ovos em uma única postura. Estratégias de controle, evitando ou inibindo o seu desenvolvimento, são cada vez mais necessárias, além da descoberta de novos alvos para a interferência ou interrupção do desenvolvimento embrionário.

O desenvolvimento embrionário do *R. microplus* dura aproximadamente 21 dias em condições laboratoriais (Sonenshine, 1993). Pode ser dividido

morfologicamente em 14 estágios ou fases distintas. No primeiro estágio que corresponde às primeiras 24 horas de desenvolvimento, a partir de um aglomerado celular, inicia-se o processo de celularização; no segundo estágio, há uma grande quantidade de células (aproximadamente 512 células) que migram para a periferia do ovo. No estágio 3, existe o quádruplo de número de células que existia anteriormente, ainda não uma distinção entre os grupos celulares; este evento ocorre no estágio 4, em seu eixo mais curto (transversal); a diferenciação celular, no eixo mais longo (longitudinal), ocorre no estágio 5. Nos estágios 6 e 7, há a divisão de duas regiões que se diferenciam pelo tamanho dos núcleos e pela formação da banda germinal.

Os estágios seguintes começam a delimitar a forma do novo indivíduo, como a formação dos futuros pares de patas (estágio), o aparecimento do sulco ventral, a distinção e involução do quarto par de patas (estágio 9), retração do opistossoma (estágio 10), retração da região anteroventral (estágio 11). Durante os estágios 12 e 13, há a migração do opistossoma e do prosoma, e o posicionamento das futuras quelíceras, respectivamente; no estágio 14, ocorrem o fechamento dorsal e o crescimento do embrião até sua futura eclosão que, em *R. microplus*, ocorre no 21º dia (Santos *et al.*, 2013).

2.4.1 – Metabolismo energético durante o desenvolvimento embrionário

Em trabalhos sobre o desenvolvimento embrionário visando ao entendimento do metabolismo energético, foram observados que, em *Drosophila megalogaster* (Brogiolo *et al.*, 2001) e *C. elegans* (Gregoire *et al.*, 1998), a insulina possui um papel importante, atuando como um regulador-chave de crescimento, reprodução e senescência (Riehle & Brown, 2007). Tem sido mostrado que a insulina humana estimula a proliferação e a diferenciação neural em células embrionárias de *Drosophila* (Pimentel *et al.*, 1996). Abreu e colaboradores (2009), estudando a resposta à insulina em linhagem de células embrionárias BME26 de *R. microplus*, observaram que o hormônio estimulou o acúmulo de glicogênio via PI3K/AKT. E quando utilizados os inibidores de PI3K a expressão relativa da sua

subunidade reguladora (P85) foi afetada. E também foi observada a uma variação da expressão relativa durante a embriogênese de P85.

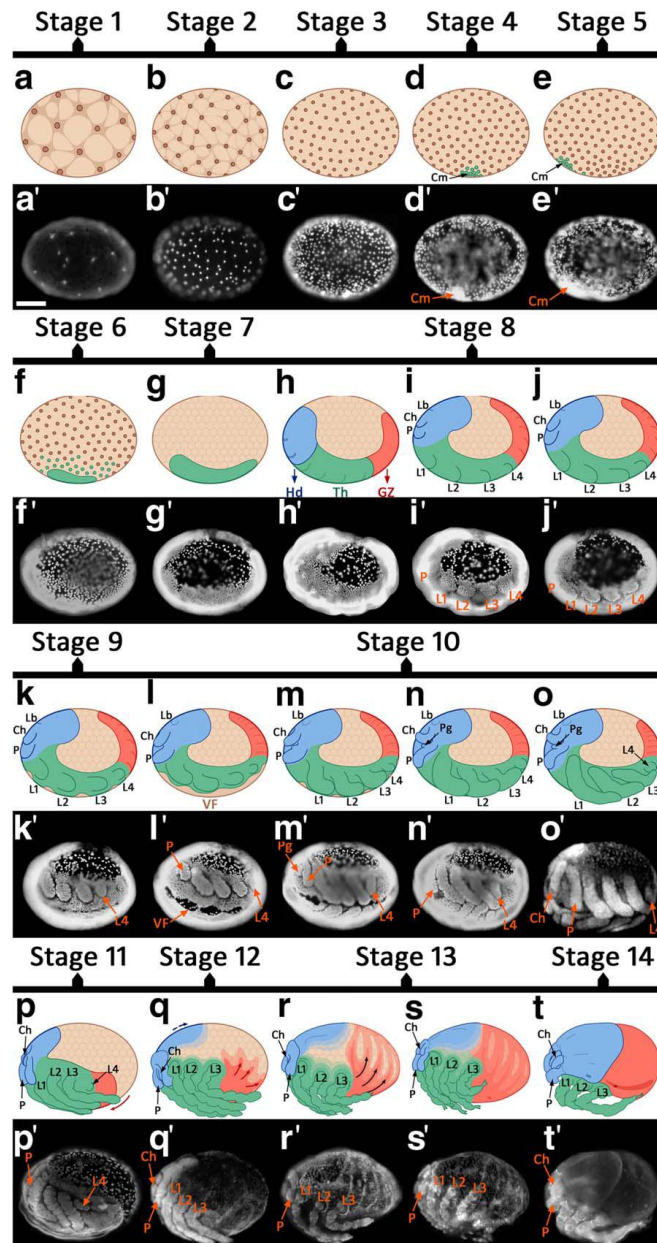


Figura 1. Desenvolvimento embrionário do *R. microplus*. Na barra preta, estão os diferentes estágios de desenvolvimento embrionário. No último conjunto de imagens, foram realizadas, nos diferentes estágios do desenvolvimento, as marcações, com uma sonda fluorescente DAPI, Lb, Lábio; Ch, Quelicera; P, pedipalpo; Pg, Gnatostoma do pedipalpo; VF, sulco ventral; L1–L4, pares de patas 1° até 4° par; Hd, cabeça; Th, Tórax; GZ, Zona de crescimento. A barra de escala representa 100 mm. Retirado de Santos e colaboradores (2013).

Em *R. microplus*, os trabalhos indicam que o metabolismo da glicose durante embriogênese está intensamente relacionado ao desenvolvimento celular. O papel da insulina no controle de crescimento e desenvolvimento embrionário tem sido associado à estimulação do metabolismo da glicose por meio das vias das pentoses e fosfato, para a síntese de DNA e replicação celular (Ceddia *et al.*, 2003). O glicogênio é mobilizado para apoiar as demandas energéticas do embrião nos primeiros estágios do desenvolvimento. Depois disso, a degradação de proteínas é intensificada e, mediante a ativação da via da gliconeogênese para aumentar os níveis de carboidratos, leva à ressíntese de glicogênio e ao acúmulo do carboidrato (Campos *et al.*, 2006; Moraes *et al.*, 2007). Estas observações sugerem a presença de um mecanismo para permitir não só a captação de glicose após estágios iniciais, mas também do glicogênio acumulado durante o início da embriogênese. A variação das fontes energéticas utilizadas pelo embrião do carrapato demonstra a versatilidade e o poder adaptativo dos embriões frente a variadas diversidades. (Moraes *et al.*, 2007).

Este mecanismo é tão diversificado e eficiente que há pouca utilização da vitelina (VT), que é a proteína encontrada em maior quantidade nos embriões ovíparos, sendo que, em *R. microplus*, em 80% das proteínas totais do embrião, cerca de 60% deste total é mantido e, após a eclosão dos ovos, garantirão um aporte energético para a futura larva. Por meio da utilização de fontes energéticas não glicídicas como os lipídeos, o indivíduo consegue manter boa parte dos recursos energéticos. (Campos *et al.*, 2006)

O estudo do metabolismo glicídico pode ser uma importante estratégia para a descoberta de futuros alvos para o controle do carrapato. Dentre as principais fontes energéticas, os carboidratos possuem um papel muito importante durante a embriogênese. Campos e colaboradores (2006) demonstram que há uma importante dinâmica do metabolismo de glicogênio nos processos de desenvolvimento embrionário em *R. microplus*. Um dos genes envolvidos com o metabolismo glicídico

são a Glicogênio Sintase Cinase 3 β (GSK-3 β) e a Proteína Cinase B (conhecida como AKT).

2.4.2 – Importância do eixo enzimático AKT/GSK-3 β

A GSK-3 β é uma serina/treonina Kinase. Em mamíferos, ocorrem duas isoformas chamadas de GSK-3 α e GSK-3 β , mas até o momento, em carrapatos, só foi encontrada a isoforma β (Wang *et al.*, 1994, Lesort *et al.*, 1999). Originalmente, reconhecida como um componente da via de sinalização da insulina, a isoforma β está envolvida em diversos processos fundamentais para a célula, como o ciclo celular, a transcrição gênica e a integridade do citoesqueleto (Grimes & Jope, 2001), por ser capaz de fosforilar enzimas-chave que coordenam esses processos (Grimes & Jope, 2001). A GSK-3 β encontra-se ativa em células não estimuladas, sendo inativada por várias cascatas de sinalização intracelular, e sua atividade é classicamente descrita como regulada pelo grau de fosforilação em resíduos de serina e tirosina. (Wang *et al.*, 1994).

Outros grupos de pesquisa têm relatado o importante papel da GSK-3 β , durante a organogênese de embriões de insetos (Fabres, 2009), e a sua inibição e/ou superexpressão que geram prejuízos ao desenvolvimento embrionário. Em *Drosophila megalogaster*, foram realizadas mutações para provocar a disfunção da GSK-3 β e, em função disto, foi observada a perda das cerdas (Siegfried *et al.*, 1992). Em *Xenopus laevis*, foi realizado o silenciamento gênico da GSK-3 β e observou-se que ocorreu a duplicação do eixo dorsal (He *et al.*, 1995), provocando mudanças morfológicas que interferiram no desenvolvimento embrionário

A atividade da GSK-3 β é aumentada pela fosforilação no resíduo Tyr²¹⁶, que consiste em um dos mecanismos regulatórios e pode ser resultado de autofosforilação (Goode *et al.*, 1992) e de mecanismos de sinalização intracelular (Wang *et al.*, 1994; Lesort *et al.*, 1999). Inversamente, a fosforilação do resíduo Ser⁹ inibe a atividade da GSK-3 β . A via Fosfatidilinositol-3 Cinase (PI3K)/Proteína Cinase B (AKT) é um dos sistemas que levam à inativação da GSK-3 β neste sítio (Fabres *et*

al., 2010). Nessa via de sinalização, a PI3K é ativada por fatores de crescimento, como IGF-1 (insulin-like growth factor-1), que levam à fosforilação e à ativação de AKT. Subsequentemente, AKT fosforila a Ser⁹ da GSK-3 β . Adicionalmente, a Ser⁹ da GSK-3 β pode ser fosforilada pela Proteína Cinase C (Goode *et al.*, 1992). Assim, múltiplas cinases podem ser utilizadas para regular a ativação da GSK-3 β . Além da fosforilação, a atividade da GSK-3 β pode ser modulada pela sua distribuição subcelular (He *et al.*, 1992), sendo a GSK-3 β capaz de fosforilar algumas proteínas nucleares (Caracciolo *et al.*, 1998).

A interação da GSK-3 β com outras proteínas também faz parte do repertório regulatório sobre a sua atividade. Observa-se que, na via de sinalização Wnt, a GSK-3 β se liga à anexina e fosforila a β -catenina (Dajani *et al.*, 2003). Esta ligação específica mostra que existem diferentes motivos de reconhecimento para cada substrato, mas o reconhecimento desses domínios está restrito à via Wnt (Bax *et al.*, 2001; Fraser *et al.*, 2002). Assim, pouco se sabe sobre estes domínios de ligação da GSK-3 β .

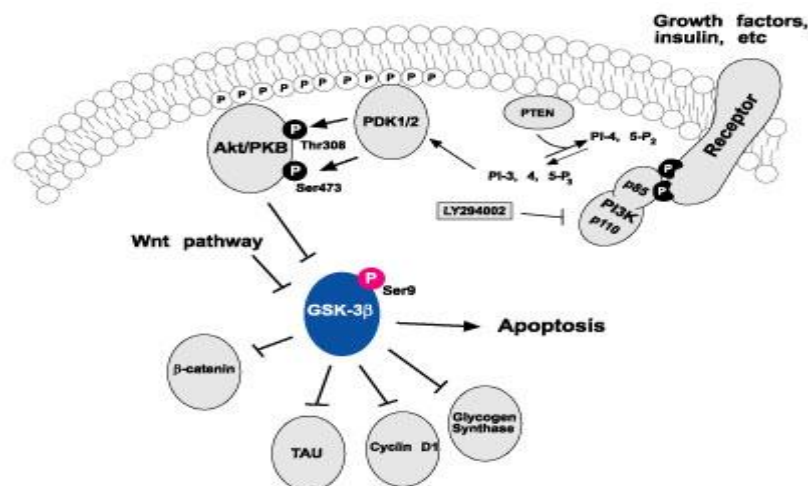


Figura 2. Representação da participação do eixo AKT/GSK na via de sinalização da insulina. Estão sendo representadas outras vias que sofrem influência da AKT e GSK. Fonte:

<http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/Cell%20Signaling%20Technology/9336.htm>

2.4.3 – Controle gênico na embriogênese

O controle gênico e a transcrição diferencial de alguns grupos de genes, durante a embriogênese, são importantes mediadores que auxiliam como elementos funcionais e elementos regulatórios na sincronização dos eventos morfológicos (Chiaromonte *et al.*, 2003; Waterston *et al.*, 2002).

Em *R. microplus*, o silenciamento gênico do GSK por meio de RNA de interferência, em fêmeas ingurgitadas, provocou uma diminuição na ovipostura dos animais silenciados e, em sua prole, uma queda na eclosão de ovos (Fabres *et al.*, 2010).

2.4.4 – Transição materno-zigótica

No início do desenvolvimento embrionário, o genoma maternal controla grande parte dos eventos relacionados aos estágios de desenvolvimento, isto é, por meio da transferência de transcritos, proteínas e enzimas estocados no citoplasma do ovócito (Tadros & Lipshitz, 2009). Após alguns dias, este controle materno é gradativamente substituído pelo mando zigótico. Este processo é conhecido como Transição Materno-Zigótica (MZT), sendo um evento bem caracterizado em equinodermas (*Strongylocentrotus purpuratus*), nematoides (*Caenorhabditis elegans*), insetos (*Drosophila melanogaster*), peixe (*Danio rerio*), anfíbios (*Xenopus laevis*) e mamíferos (*Mus musculus*).

Este evento (MZT) possui uma importante função, a de garantir que o início do desenvolvimento embrionário ocorra independentemente da situação vivida pelo zigoto. Esta garantia existe até o momento em que o genoma embrionário é ativado (Tadros & Lipshitz, 2009). Este processo é classicamente dividido em dois: no primeiro momento, um conjunto de RNAs mensageiros (mRNAs) maternos é degradado e, no segundo, o genoma zigótico é ativado (Tadros & Lipshitz, 2009). Neste processo, também é observada a transcrição do genoma zigótico, levando-o à

produção de microRNAs (miRNAs) que aumentam ainda mais a degradação de transcritos maternos, garantindo maior eficiência do processo (Tadros & Lipshitz, 2009). Os primeiros mRNAs transcritos do zigoto são ativadores de transcrição que, por sua vez, aumentam a eficiência da transcrição zigótica.

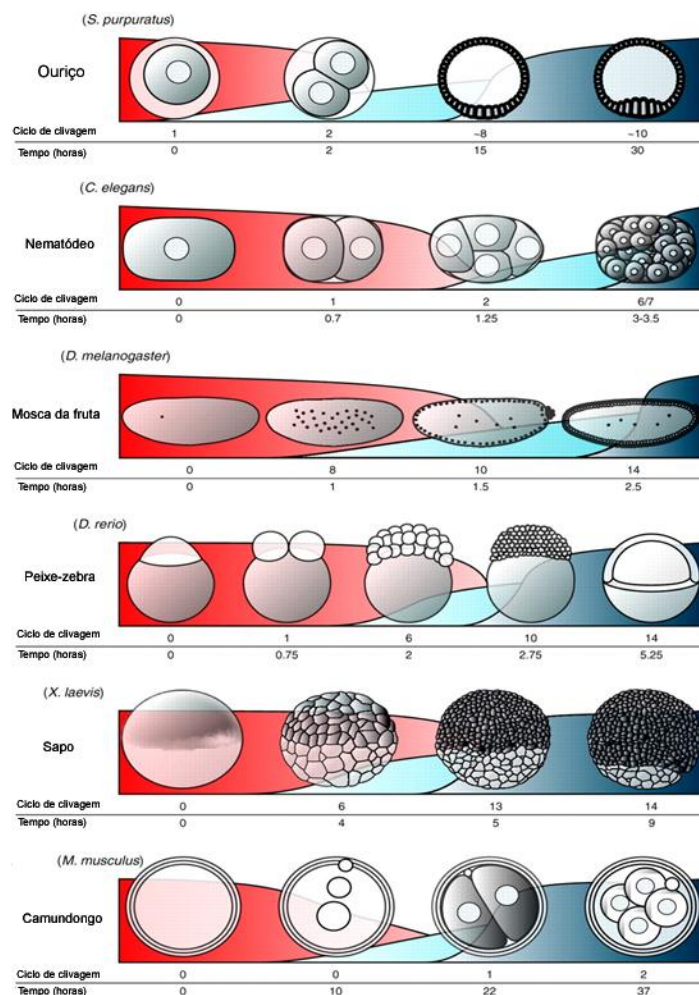


Figura 3. Comparação da Transição materno-zigótica em vários organismos modelo. São representados os principais ciclos de clivagem correspondentes e tempo após fertilização. As curvas vermelhas representam a degradação dos transcritos maternos em cada espécie. As curvas azuis claras e escuras representam a intensidade menor ou maior da ativação do genoma zigótico. Retirado de Tadros & Lipshitz, 2009.

2.5 – Técnica de silenciamento gênico por meio do RNAi

A descoberta realizada por Napoli e Lemieux, em 1990, com a introdução do transgene de chalcona sintase (CHS) em petúnias, resultou no silenciamento do gene endógeno da CHS. Observou-se que pequenas moléculas de RNA podem regular a expressão de um gene, possibilitando estudos mais aprofundados e o surgimento de novas técnicas e abordagens terapêuticas.

Somente em 1998, foi descrita a via de sinalização responsável pelo silenciamento gênico seletivo por meio do emprego de dupla fita de RNA, por Fire e colaboradores (1998) em *C. elegans*. Estudos envolvendo RNAi têm sido muito utilizados em diversos modelos, tais como: *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* (Fire *et al.*, 1998), inclusive em carrapatos (de la Fonte, 2007).

O princípio do RNAi baseia-se na utilização de um mecanismo endógeno da célula para a síntese *in vitro* de uma dupla fita de RNA (dsRNA), que é idêntica à fita de RNA mensageiro, a qual codifica a proteína-alvo, de forma que, quando houver o reconhecimento da dupla fita pelo maquinário celular, será iniciada uma cascata de sinalização que ativará os complexos enzimáticos que degradarão esta dupla fita de RNA e também as duplas fitas endógenas da sequência-alvo. Estas enzimas de degradação são denominadas Dicer ou Argonauta, dependendo do modelo estudado. A degradação das fitas de mRNA leva ao silenciamento pós-transcricional da proteína-alvo.

Classicamente, esta via de sinalização é dividida em duas fases, a iniciadora e a efetora (Hammond, 2005). A fase iniciadora começa quando o dsRNA é reconhecido por uma proteína ligadora de RNA dupla fita (dsRBM), a proteína endonuclease do tipo III, chamada Dicer ou Argonauta, que promove a clivagem de dsRNA em pequenos RNAs de interferência (siRNAs) de aproximadamente 21 pares de base (pb) de comprimento (BERNSTEIN *et al.*, 2001; HANNON & CONKLIN, 2004). A fase efetora começa quando os siRNAs são incorporados ao complexo de

silenciamento induzido por RNA, a proteína RISC (Filipowicz, 2005; Filipowicz *et al.*, 2005; Hammond *et al.*, 2000).

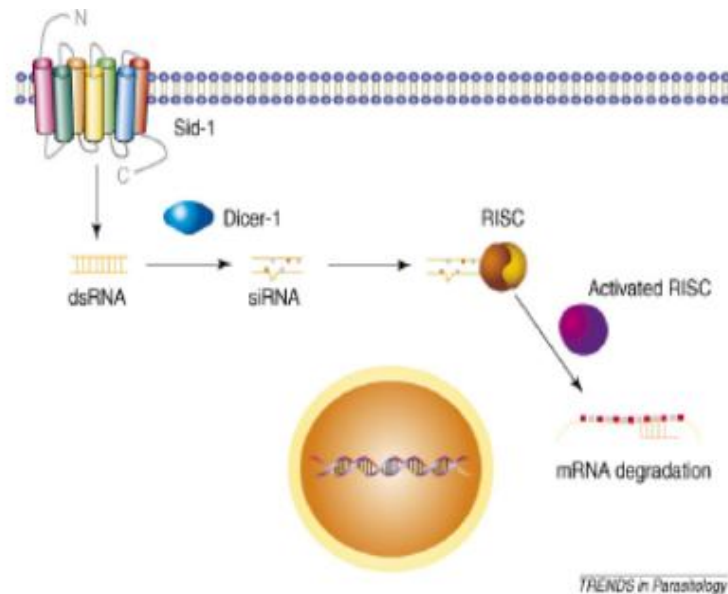


Figura 4. Representação da maquinaria celular e do mecanismo de silenciamento pós-transcricional realizado pela técnica de RNAi. Retirado de la Fuente e colaboradores (2007).

2.6 – Eletroporação dos ovos de *R. microplus*

A aplicação de fortes impulsos formando campos elétricos para as células e tecidos é conhecida como eletroporação, em cujo processo ocorre um rearranjo estrutural da membrana celular (Chang *et al.*, 1992). Alguns destes rearranjos consistem de vias aquosas temporárias (poros), com o campo elétrico de dupla função: (1) Causar a formação do poro, (2) Proporcionar força motriz iônica e molecular para transportar a dsRNA através dos poros (Chang, *et al.*, 1992).

Por ter a vantagem de ser uma técnica pouco invasiva, já foi utilizada em diversos modelos, como células de mamíferos (Neumann *et al.*, 1982; Wong & Neumann, 1982; Potter *et al.*, 1984; Smithies *et al.*, 1985), células de plantas (Fromm *et al.*, 1985; Yang, 1985) e bactérias (Miller *et al.*, 1988), em diferentes

aplicações como: nucleotídeos, anticorpos e fármacos (Neumann *et al.*, 1982; Wong *et al.*, 1982; Gharthey-Tagoe, 2006; Karim, 2010)

No primeiro momento, é formado um sulco na membrana fosfolipídica, resultando em um poro hidrofílico que permite a entrada de substâncias polarizadas, como os íons, que são rapidamente sucedidos por um poro hidrofóbico. Na composição deste poro, estão presentes uma ou mais proteínas de membrana. (Chang *et al.*, 1992)

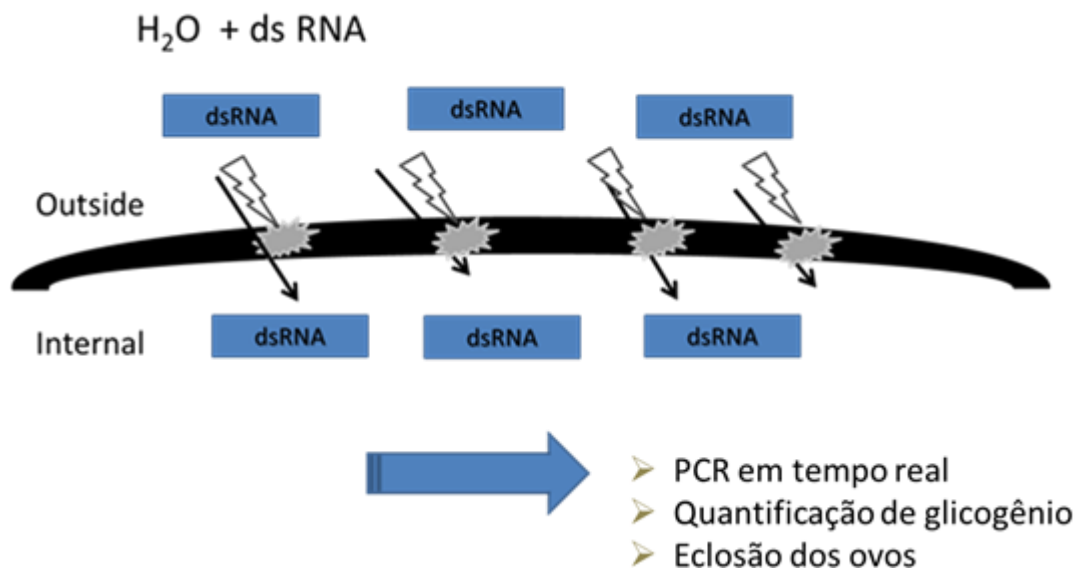


Figura 6. Esquema representativo de entrega da dupla fita de RNA via eletroporação. (1) Síntese de dsRNA; (2) eletroporação; (3) validação do silenciamento do gene via PCR em tempo real; (4) Validação das mudanças provocadas pelo silenciamento, taxa de eclosão e glicogênio.

3. OBJETIVO

3.1 – Objetivo Geral

Utilizar a eletroporação para realizar o silenciamento gênico por RNAi dos genes AKT e GSK-3 β durante o desenvolvimento embrionário do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

3.2 – Objetivos específicos

- 1) Confirmar a entrega de dsRNA, via eletroporação, por meio de PCR em tempo real;
- 2) Validar o silenciamento dos genes AKT e GSK em ovos de *R. microplus* por meio de PCR em tempo, real em diferentes estágios de desenvolvimento (1° e 7° dia);
- 3) Observar mudanças na transcrição de GSK provocadas pelo silenciamento de AKT, além de mudanças na transcrição de AKT provocadas pelo silenciamento de GSK;
- 4) Avaliar as mudanças fenotípicas provocadas pelo silenciamento, como: taxa de eclosão das larvas dos ovos silenciados e quantificação dos níveis glicogênio nos ovos.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 – O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Os carrapatos utilizados neste estudo foram obtidos, a partir de uma colônia mantida em bovinos, no laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. As fêmeas foram alimentadas e mantidas até seu ingurgitamento completo e, após a queda, foram mantidos por 10 dias a 28°C e 80% de umidade relativa. Os ovos foram coletados diariamente e mantidos sob as mesmas condições, até a eclosão das larvas.

4.2 – Síntese da dupla fita de RNA (dsRNA)

A síntese de dsRNA para AKT e GSK-3 β foi realizada usando o sistema de RNAi T7 RiboMAX™ Express (Promega, EUA), conforme estabelecido por Abreu e colaboradores (2013). O molde para o dsRNA foi amplificado, utilizando-se RmAKTiT7f 5'-taatacgactcactatagggTCAGCCTGGACAACCTTTGAGTTCCTC-3' e RmAKTiT7r 5'- taatacgactcactatagggATTTTCATACATGACCACGCCAGC-3'. A validação dos dsRNAs para os genes-alvo foi realizada pelos programas baseados em web: dsCheck (<http://dscheck.rnai.jp/>) e DEQOR (http://deqor.mpi-cbg.de/deqor_new/input.html). Aproximadamente 2 μ g do produto de PCR foram purificados e utilizados para a transcrição *in vitro* de dsRNA, como descrito previamente por Fabres e colaboradores (2009). O controle negativo (gene não relacionado) foi realizado com dsRNAs contra o gene da β -Galactosidase de *E. coli* (gentilmente doado pelo Prof. Doutor Marcos H. Sorgine da UFRJ/IBqM). Os dsRNAs produzidos, neste trabalho, possuem os seguintes tamanhos: dsAKT (635 pb), dsGSK-3 β (798 pb) e ds β Gal (800 pb).

4.3 – Remoção da cera e entrega de dsRNA em embriões de carrapatos por eletroporação

Os ovos do 1^o e 7^o dias de desenvolvimento de *R. microplus* foram pesados e colocados em uma placa de Petri; para cada grupo, foram pesados 10 mg de ovos. Para a retirada da cera, foram adicionados aproximadamente 40 µL de heptano 100%. Os ovos foram embebidos com heptano por 15 min. Em seguida, os ovos foram cobertos com 30 µL de água, contendo 3,33 ng/µL dos dsRNAs, sendo realizado o mesmo procedimento para o controle negativo (dsβGal) e para todos os dos tratamentos que tinham dsAKT ou dsGSK-3β. A eletroporação foi realizada com o equipamento ECM 2001 Electro Cell Manipulator (BTX Instrument Division, USA). O programa utilizado para aplicação dos pulsos elétricos foi: 50V, 10 pulsos com intervalos de 1 s entre os pulsos.

Após a eletroporação, os ovos foram acondicionados em BOD a uma temperatura de 28°C e umidade relativa de 80%, por um período de 7 dias. Para a taxa de eclosão dos ovos, estes foram mantidos sob estas condições até o dia de incubação e, em seguida, foram congelados para a contagem. O RNA total foi extraído a partir de 50 mg de ovos, utilizando-se Reagente Trizol® (Invitrogen, USA). Dois microgramas de RNA total foram transcritos para cDNA, utilizando-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Invitrogen, USA).

4.4 – Validação do silenciamento por RNAi utilizando PCR em tempo real

As análises de transcrição relativa foram realizadas, utilizando-se o equipamento Step One Plus (Applied Biosystems, USA) e, para as curvas de calibração, foram realizadas diluições seriadas do cDNA (de 1.000 a 0,1 ng). Os valores de eficiência, para cada gene estudado, acima de 85% foram aceitos para o cálculo de transcrição relativa. Para todas as reações, foram padronizadas quantidades de CDNA de 200ng de massa total. Os iniciadores utilizados para o RmAKT foram: 5'- GAAGTTGGCGAGTGAGGAGGA-3' (Forward), 5'- CGCGTCGAGATGCTGAACTTGT-3' (Reverse) para (T_m = 56°C, produto com 86

bp). Os *primers* específicos utilizados, para o gene *housekeeping*, foram os do gene que codifica o Alongamento Fator 1A (Elf1A) (número de acesso EW679365) (Nijhof *et al.*, 2009) para verificar a expressão relativa por PCR em tempo real; e, para o gene da GSK RmGSK3 (número de acesso EF142066) (Logullo *et al.*, 2009), foram os mesmos descritos anteriormente. A expressão relativa foi determinada, utilizando-se os valores de Ct de cada corrida na expressão relativa Software Tool-REST (Pfaffj *et al.*, 2001). Elf1A foi utilizado como cDNA de gene de referência, a partir de ovos eletroporados com β galactosidase, foi utilizado como calibrador.

4.5 – Determinação da quantificação do Glicogênio nos ovos silenciados

O total de proteína foi extraído dos ovos em tampão acetato (200 mM, pH 4,8). Os ovos foram rompidos em tampão em microtubos e micropilão. Subsequentemente, o homogeneizado de ovo foi centrifugado a 4000 x g, durante 6 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos, e a proteína total foi quantificada usando o ensaio de Bradford.

Aproximadamente 1.200 μ g de proteína de ovo total (em triplicata) foram incubadas com uma unidade α - amiloglucosidase em tampão acetato (200 mM, pH 4,8) durante 4 h a 40°C. A reação foi parada com tampão de fosfato (100 mM, pH 7,4). A Glicose liberada foi detectada com um kit comercial para a concentração de glicose (Glucox ®, Doles) em 510 nm. As condições de controle (sem α - amiloglucosidase) foram utilizadas para determinar o nível de glicose basal e do subtraído de condições de teste. O glicogênio foi determinado, utilizando-se uma curva-padrão apresentada nas mesmas condições, e normalizada pela quantidade de proteína total. Os resultados são apresentados como média e desvio-padrão de três experimentos independentes.

4.6 – Análise Estatística

Teste t Student não paramétrico ($P > 0,005$) foi usado para determinar se as diferenças entre os tratamentos foram significativas. O programa GraphPad Prism 5.03 Software (GraphPad Software, Inc.) foi utilizado em todas as análises.

5. Resultados

5.1 Entrega dsRNA para os ovos de *R. microplus*

Após o tratamento da retirada da cera dos ovos com heptano, foi empregada uma estratégia de desenhos de *primers*, para confirmar que a eletroporação foi que permitiu a entrada da dupla fita. Para isso, foram desenhados dois pares de *primers*: um par de *primers*, dentro do segmento utilizado para construção da fita dupla de RNA, servindo para confirmar a entrega da dupla fita; e um par de *primers*, fora desta construção, para a confirmação do silenciamento (Figura 7).

Observou-se um aumento no sinal nas amostras tratadas com dsAKT em comparação com o do controle tratado com a dupla fita de β galactosidase (Figura 8). Esta análise foi realizada em dois momentos distintos da embriogênese, no 1º dia e no 7º dia após a ovopostura, e foram analisados 7 dias após a eletroporação em ambos os tempos. Nos ovos de 1º dia, analisados no 7º dia, foi observado um aumento do sinal de aproximadamente 7 vezes maior em comparação com o do controle (β gal) (Figura 8, A) e, em ovos de 7º dia de desenvolvimento, analisados no 14º dia, a diferença foi de 3,5 vezes maior (Figura 8, B). Estas observações sugerem que houve entrega e entrada de dsRNA pela estratégia da eletroporação.

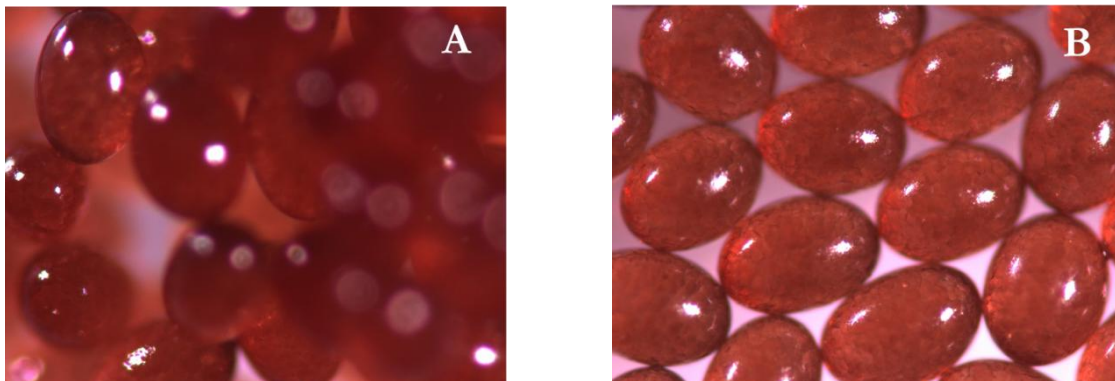


Figura 5. Ovos de *R. microplus* antes (A) e depois (B) do tratamento da retirada da cera com heptano.

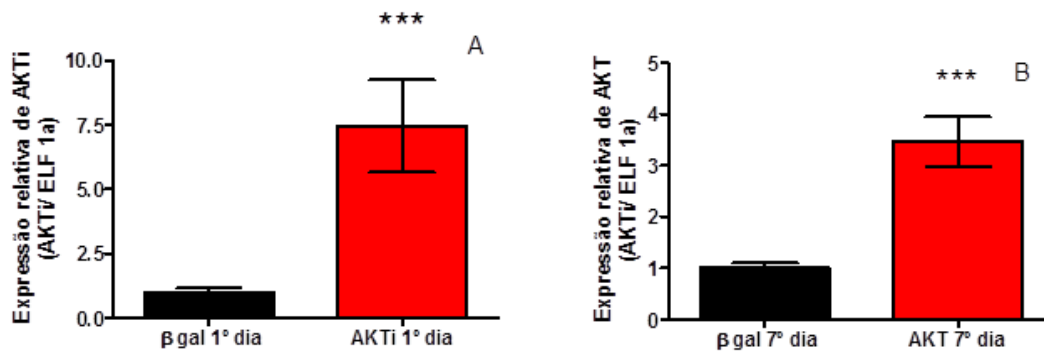


Figura 7. Validação da entrega da dupla fita de AKT foram utilizados, no 1º dia de desenvolvimento (A) e, no 7º dia (B), ovos de *R. microplus* via eletroporação. O controle utilizado foi uma dupla fita que codifica β galactosidase. As configurações da eletroporação foram: 50V, 10 pulsos com o intervalo de 1 s entre os pulsos. A massa total de dsRNA foi de 100 ng por cada grupo. O teste estatístico utilizado foi o t-student ($P > 0.005$).

5.2 Validação do silenciamento da AKT e GSK por PCR em tempo real

Foi observado, por meio de PCR em tempo real, o *knowdown* dos genes AKT e GSK em momentos distintos do desenvolvimento embrionário, no 1º dia, analisado no 7º dia e, no 7º dia, analisado no 14º dia de desenvolvimento. A eletroporação foi bem sucedida em silenciar ambos os genes nos dois momentos distintos (Figura 9). Nos ovos de silenciados no 1º dia, houve um silenciamento de cerca de 90% (Figura 9, A1) e, nos ovos de 7º dia, de cerca de 80% (Figura 9, A2). Nos embriões silenciados para GSK, em ambos os momentos, foi de aproximadamente 80% (Figuras B1 e B2).

ATGATGGAAGGCCAATTGGCGCCGAACAGCGTGCCTCGTCCGGAATGCATCCAGGAGGCTTAGGCATGGCT
 CCCTTCGGCATCGAGCCCATCGCTGCCGACCTGAGCCGTCATCGTCAAGGAAGGCTGGCTCAACAAGCGA
 GGGAAACACATCAAGAACTGGCGGAAACGCTACTTTGTGTACGCGAGGACGGCAGCTGATTGGTTCAAG
 CTTAAGCCTGAGCATAGCCACGCCACCTCTGAACAATTACTGTAAAAGGCTGCCAGCTGATGAAGTCC
 GAGCGGCCAAGCCATTACCTTCATCATTGTTGGCTGCAGTGGACGACGGTCATTGAACGCATGTTCTGC
 GTTGACTCTGAAGATGACCGGGAGGTTGGTGCCAGGCCATCCAGCAGTGTCTGAGAAGTTGGCGAGTGA
 GAGGACGTCGAGATGGCAGGCCAAGGACGAGCAGTCCGTGCCGCAAGTTGAGCATCTCGACGGCCAG
 TAGCGCAGCGGCCAACCGCTCAGCCTGGACAATTGAGTTCCTCAAGTGTCTCGGCAAGGGCACCTTTGGC
 AAGTGGTGTGTGTGCGGAGAAGTCCACGGAGTCCCTGTACGCGATCAAGATCCTCAAGAAGAAGTGGTC
 ATAGACAAGGATGAGTGGCCACACGCTGACTGAGAACAGAGTGTGCGCAGCAAAAGCACCCGTTCCCTC
 ATCTCGTGCCTACTCCTCCAGACGGCCGACCGGCTCTGCTTCGTATGGAGTACGTCATGGCGGCGAG
 CTCTTCTTCCACTTGTACGCGACCGGCTCTTACGGAGGAGCGCACCCGCTTCTACTCGGCCGAGATCTG
 CTCGCCCTCGAGTATCTGCACAGCCAGGGCATTAFTACCGGGACCTGAAGTTGGAGAACCCTCTGCTGGAC
 AGGAGGGGCCACGTCAGGATTGCAGACTTTGGCCTCTGCAAGGAGGACATCTCTTTGGTTCGACGACAAG
 ACCTTCTGGCCAGCCCGAGTACCTCGCACCCGAGGTGCTGGAGGACACCGACTACGGCCGGGCCGTTGAC
 TGGTGGGGCTGGCCCTGCTCATGTACGACATGATGTGTGGCCGCTTGCCCTTCTACAGCCGAGACCAAG
 GTACTGTTGAACTGATCCTGTGCGAGGAAGTCAAGTACCCCAAGAGCATGAGTCCCGAAGCGAGGCACCTG
 CTCTCGGGCCTGCTCGTCAAGAACCCGAGGCACCGGCTGGCGGCTCGGTCAACGACCGCCGACATCAAG
 GTGACCCCTTCTTCCGACCCGTCATTTGGACGATGTGGCCAGAAAGGTGACACCGCCCTTCAAGCCG
 CTGGTACTTCCGACACGACACGCGCTACTTCACCAAGAGTTCACGGGCGAGACCGTCGAACTGACACCG

<p>RmAktqFOR</p> <p>5'-GAGAAGTTGGCGAGTGAGGAGG-3'</p> <p>ANALYSIS:</p> <p>5'-GAG AAG TTG GCG AGT GAG GAG G-3'</p> <p>COMPLEMENT:</p> <p>5'-CCT CCT CAC TCG CCA ACT TCT C-3'</p> <p>LENGTH: 22</p> <p>GC CONTENT: 59.1 %</p> <p>MELT TEMP: 62.3 °C</p> <p>RmAktqREV</p> <p>5'-CGCGTCGAGATGCTGAACCTG-3'</p> <p>ANALYSIS:</p> <p>5'-CGC GTC GAG ATG CTG AAC TTG-3'</p> <p>COMPLEMENT:</p> <p>5'-CAA GTT CAG CAT CTC GAC GCG-3'</p> <p>LENGTH: 21</p> <p>GC CONTENT: 57.1 %</p> <p>MELT TEMP: 61.6 °C</p> <p><i>Amplicon: 86 bp</i></p>	<p>RmAktqFOR</p> <p>5'-TAT CTA CCG GGA CCT GAA GC-3'</p> <p>LENGTH: 20</p> <p>GC CONTENT: 55.0 %</p> <p>MELT TEMP: 55.8 °C</p> <p>RmAktqREV</p> <p>5'-CCC GAA AGA GAT GTC CTC CT-3'</p> <p>COMPLEMENT:</p> <p>5'-AGG AGG ACA TCT CTT TCG GG-3'</p> <p>LENGTH: 20</p> <p>GC CONTENT: 55.0 %</p> <p>MELT TEMP: 56.1 °C</p> <p><i>Amplicon: 100 bp</i></p>	<p>RmAktqFOR</p> <p>5'-TCAGCCTGGACAACCTTTGAGTTCCTC-3'</p> <p>LENGTH: 26</p> <p>GC CONTENT: 50.0 %</p> <p>MELT TEMP: 60.5 °C</p> <p>RmAktqREV</p> <p>5'-ATT TCA TAC ATG ACC ACG CCC AGC-3'</p> <p>COMPLEMENT:</p> <p>5'-GCT GGG CGT GGT CAT GTA TGA AAT-3'</p> <p>LENGTH: 24</p> <p>GC CONTENT: 50.0 %</p> <p>MELT TEMP: 59.8 °C</p> <p>SEQUENCE:</p> <p>5'-ATC TCG TAC ATG ACC ACG CCC AGC-3'</p> <p>COMPLEMENT:</p> <p>5'-GCT GGG CGT GGT CAT GTA CGA GAT-3'</p> <p>LENGTH: 24</p> <p>GC CONTENT: 58.3 %</p> <p>MELT TEMP: 63.0 °C</p> <p><i>Amplicon: 589 bp</i></p>
--	---	--

Figura 6. Estratégia de design dos primers para a utilização da estratégia de silenciamento de RNAi, por meio da eletroporação. Na sequência parcial de AKT de *R. microplus*, a indicada de amarelo representa o par de primers usado para a validação do silenciamento por PCR em tempo real; em verde, estão representados os pares de primers utilizados para a amplificação no cDNA, molde para a síntese da dupla fita de RNA de AKT (dsAKT); em vermelho, os pares utilizados para a verificação da entrega da dupla fita via eletroporação nos ovos.

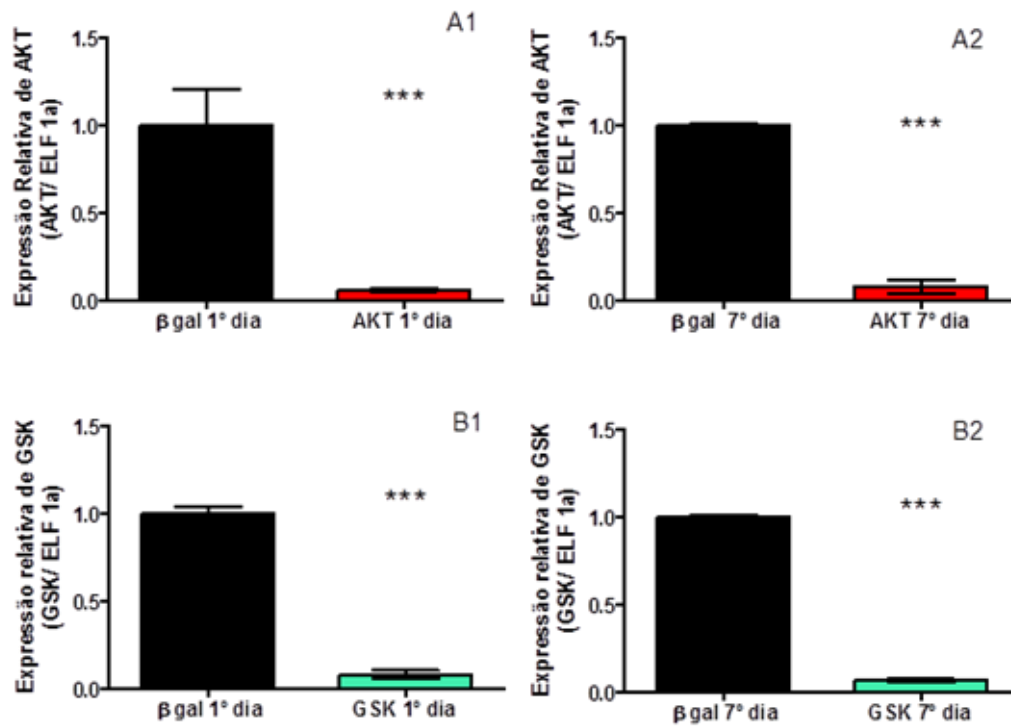


Figura 8. Validação do silenciamento de AKT (A1 e A2) e GSK (B1 e B2) por meio da eletroporação dos ovos de *R. microplus* no 1º dia (A1 e B1) e 7º dia (A2 e B2). O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total que foi extraído. Aproximadamente 100 ng de dsRNA foram utilizados em cada grupo. O teste estatístico utilizado foi o t-student. ($P > 0.005$).

5.3 Análise dos efeitos causados pelo silenciamento de AKT na expressão de GSK e de GSK na expressão AKT

5.3.1 O efeito do silenciamento de AKT na expressão de GSK

Quando a expressão de GSK, nos embriões silenciados para AKT, foi avaliada, por meio de PCR em tempo real, no 1º e 7º dias, foram observados diferentes perfis de expressão, dependendo do momento metabólico e da fase de desenvolvimento em que o embrião se encontrava (Figura 10); nas amostras silenciadas no 1º dia, a expressão de GSK acompanhou a queda na expressão de AKT em comparação com a do controle (β gal) (Figura 10 A); porém, no segundo momento (7º dia), a expressão de GSK não apresentou qualquer alteração em comparação com a do controle. (Figura 10, B).

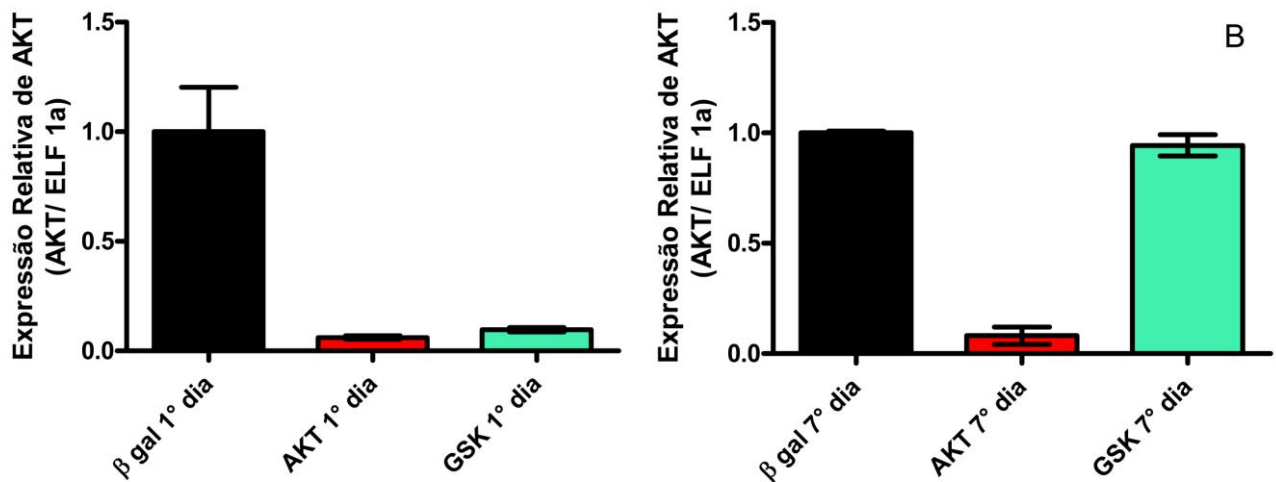


Figura 10. O silenciamento de AKT provoca mudança no perfil de expressão de GSK no início do desenvolvimento embrionário do *R. microplus*. No gráfico A, estão representados os ovos eletroporados no 1º dia e, no gráfico B, os embriões silenciados no 7º dia. Para o PCR em tempo real, foram utilizados os cDNA sintetizados a partir de 2 μ g de RNA total extraído; para a reação de PCR foi realizado como o descrito em materiais e métodos.

5.3.2 O efeito do silenciamento de GSK na expressão de AKT

Foi também avaliada a interferência do silenciamento de GSK na expressão gênica de AKT, nos ovos eletroporados com a dupla fita de GSK; foram observadas mudanças no perfil da expressão de AKT nos ovos silenciados nos momentos iniciais de desenvolvimento. (Figura 11, A), porém, o mesmo não foi observado nas amostras silenciadas no 7º dia e observado no 14º dia. (Figura 11, B).

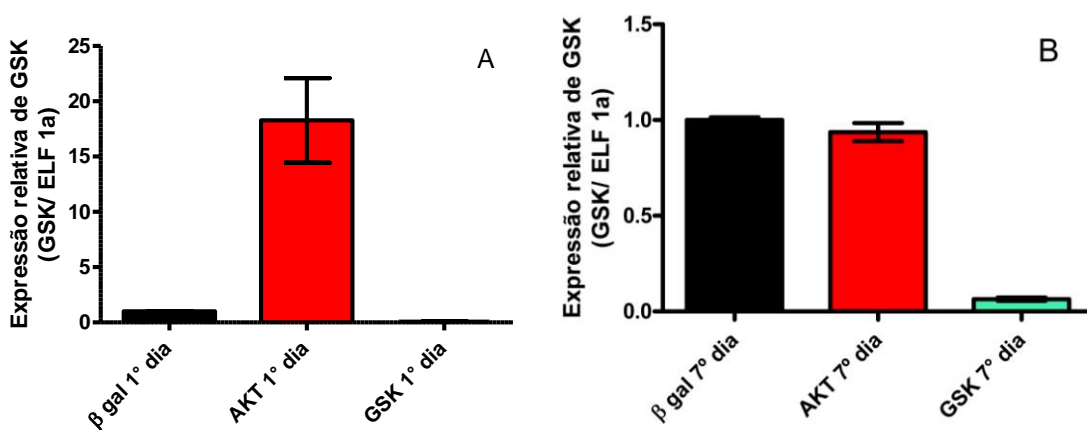


Figura 11. O silenciamento de GSK provoca mudanças no perfil de expressão de AKT no início do desenvolvimento embrionário do *R. microplus*. No gráfico A, está representado o perfil de expressão relativa de GSK em ovos silenciados para AKT e GSK no 1º dia; e, no gráfico B, as mesmas condições, porém, com ovos silenciados no 7º dia.

5.4 O silenciamento por meio da eletroporação leva a mudanças no conteúdo de glicogênio

O silenciamento da AKT e GSK leva a diferentes mudanças no conteúdo de glicogênio (Figura 12), nos momentos anteriores à transição materno-zigótica (silenciados no 1º dia) e posteriores (silenciados no 7º dia). Os ovos silenciados para AKT, tanto nas amostras de 1º quanto de 7º dias, sofreram uma redução dos níveis de glicogênio em comparação com a do controle (Figura 12, A1 e A2). No entanto, nos ovos silenciados no 1º dia para GSK, foi observado aumento dos níveis de glicogênio no período que corresponde à transição materno-zigótica (Figura 12, B1), mas o mesmo fenômeno não foi observado após a transição (Figura 12, B2).

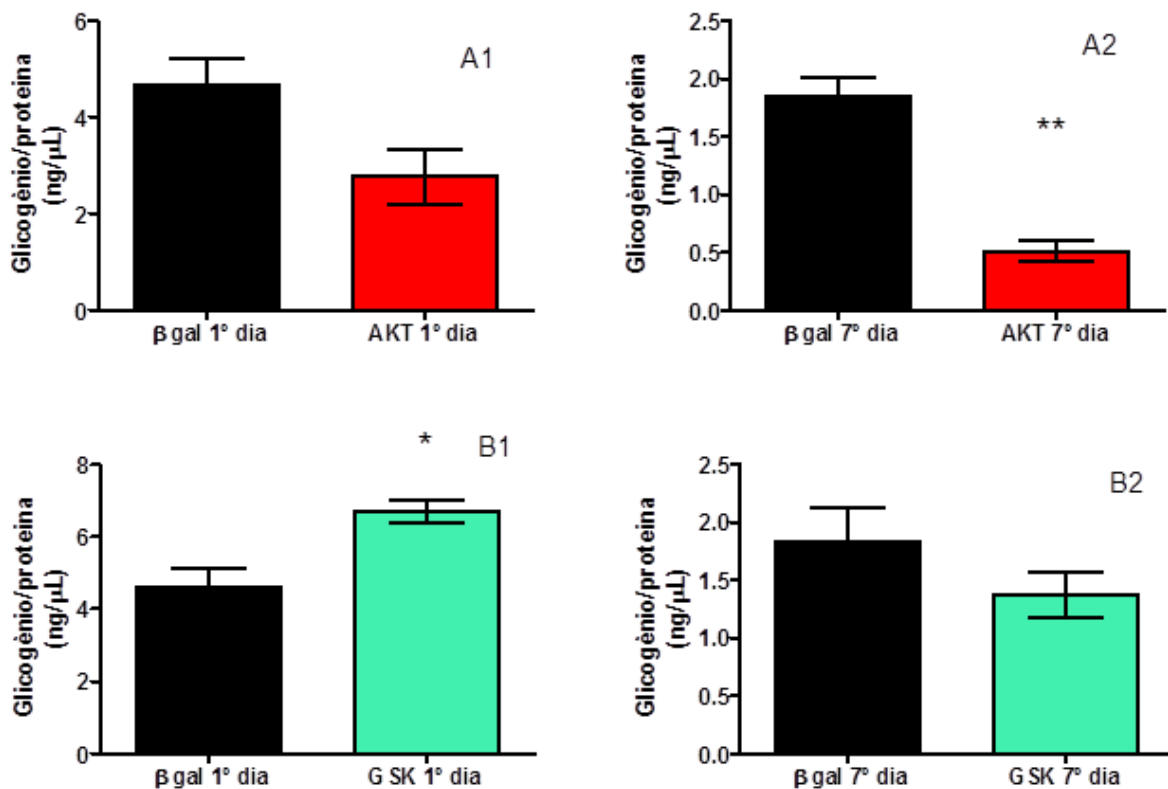


Figura 12. O silenciamento de AKT e GSK induz mudanças nos níveis de glicogênio nos ovos. O silenciamento de AKT no 1º dia (A1) e 7º dia (A2); e de GSK no 1º dia (B1) e 7º (B2). Em ambos os genes, houve mudanças no conteúdo de glicogênio em AKT, os níveis de glicogênio foram reduzidos; e, nos embriões silenciados para GSK, os níveis de glicogênio foram aumentados.

5.5 A taxa de eclosão dos ovos silenciados para AKT e GSK

Em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, os ovos silenciados para AKT e GSK tiveram as taxas de eclosão significativamente menores nos ovos silenciados no 1º dia, uma redução de aproximadamente 30% em ambos os genes (Figura 13, A1 e B1). No entanto, nas amostras silenciadas no 7º dia, as taxas de eclosão não apresentaram diferença em comparação com as do grupo-controle (Figura 13, A2 e B2).

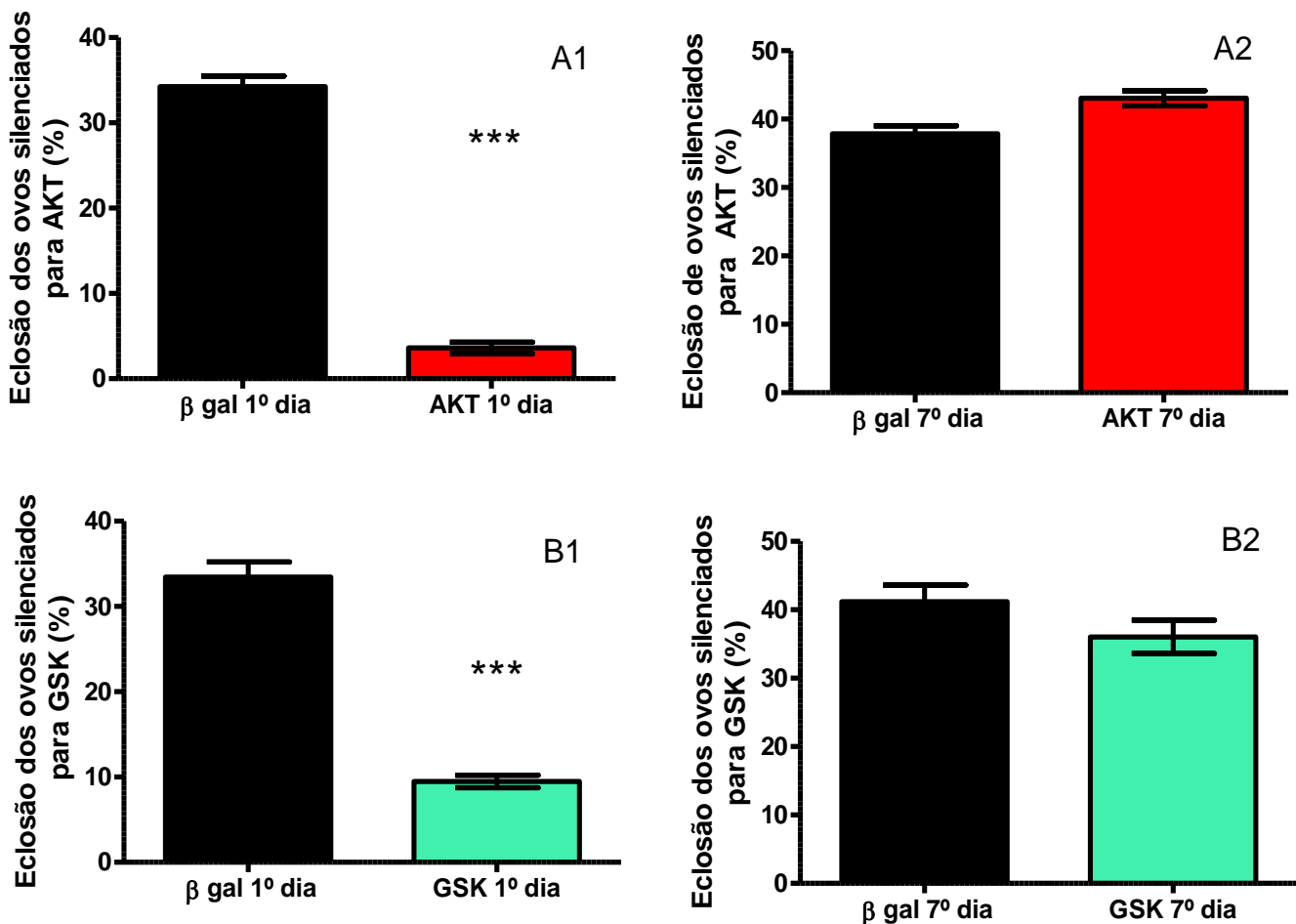


Figura 13. O silenciamento de AKT e GSK reduziram significativamente a taxa de eclosão dos ovos de *R. microplus* em ovos silenciados no 1º dia de desenvolvimento. Após a eletroporação com dsRNA, os ovos foram incubados a 28°C com 80% de umidade relativa até a eclosão dos ovos. Nos gráficos A1 e A2, estão representados os ovos silenciados para AKT no 1º e 7º dias respectivamente; e em B1 e B2, as amostras silenciadas para GSK também nos 1º e 7º dias. Logo após a eclosão dos ovos, as larvas foram congeladas em freezer até -20°C e foram contadas. O teste estatístico utilizado foi o t-student ($P > 0.005$).

6. DISCUSSÃO

A utilização da técnica do RNA de interferência é uma ferramenta utilizada para o estudo da função de um gene já adotada no estudo de vários organismos. Este método permite um silenciamento gênico específico por meio da síntese *in vitro* e entrega de uma dupla fita de RNA. Existem variadas formas de entrega da dsRNA incluindo injeção, imersão em solução contendo a dsRNA, alimentação, eletroporação ou em associação com vírus, bactérias e lipoproteínas (Kocan *et al.*, 2011; de La Fuente *et al.*, 2007; Karim *et al.*, 2010; Fire *et al.*, 1998).

O rendimento da entrega de RNAi e eficiência do silenciamento pode ser influenciado pelo tipo de material que está sendo silenciado, em *Blattella germanica* no silenciamento do receptor de lipoforina a resposta foi muito mais rápida e em tecidos mais lipídicos, como corpo gorduroso no ovário. A intensidade de expressão e características próprias de cada gene também podem influenciar nos resultados de RNAi (Ciudad *et al.*, 2007). Entretanto, mecanismos de regulação e feedback podem modificar os níveis de mRNA interferindo nas taxas de transcrição. Porém, genes que apresentam uma expressão pronunciada em um curto intervalo de tempo dificultam a utilização dos procedimentos convencionais como injeção sistêmica. (Irles *et al.*, 2009).

A técnica de eletroporação já foi empregada em outros organismos como *Haemonchus contortus*, embrião de galinha, *Ixodes scapularis* (Karim *et al.*, 2010; Leber *et al.*, 1996; Zawadzki, 2012; Ando, 2013; Thomas, 2003). Em outros modelos em que foi utilizado a eletroporação para a entrega da dupla fita para a realização do silenciamento gênico como em *Haemonchus contortus* (Zawadzki, 2012) não foi possível realizar o silenciamento gênico de modo eficiente provavelmente devido a cutícula do verme (Zawadzki, 2012). Já em *R. microplus* a utilização desta estratégia de entrega mostrou ser eficiente no silenciamento gênico em ovos. Esta forma de entrega não evasiva de nucleotídeos utilizando pulsos elétricos, que promovem a formação de microporos na membrana (Figura 6) permitindo a entrada da dupla fita de RNA levando a ativação da via de sinalização do RNAi (Figura 6). Após o

silenciamento gênico, as mudanças encontradas do carrapato ajudam a entender a função daquele gene na fisiologia do organismo estudado (Figura 6).

A entrega da dsRNA por meio da eletroporação mostrou ser uma opção viável e muito eficaz na promoção do silenciamento gênico em ovos de *R. microplus*, promovendo um silenciamento de aproximadamente 90% (Figura 8) em ambos os genes estudados e nos diferentes momentos estudados (1° e 7° dias), possibilitando um estudo da função gênica mais específico, por permitir a escolha de que momento irá iniciar o silenciamento mais objetivo do papel do gene em um determinado estágio da embriogênese.

Nos estudos sobre a função de genes específicos envolvidos com o desenvolvimento embrionário, a estratégia convencional de injeção de dsRNA em fêmeas não pode ser sempre aplicada, visto que tal procedimento interfere na transição materno-zigótica, modificando os processos posteriores e dificultando a análise dos efeitos provocados somente pelo silenciamento dos genes estudados. Karim em 2010 utilizou a mesma estratégia em carrapatos conseguindo realizar o silenciamento em ovos, larvas e adultos, porém não conseguiu observar mudanças fenotípicas provocadas pelo silenciamento (Karim *et al.*, 2010).

O eixo AKT/GSK foi escolhido para o silenciamento pela técnica de RNAi utilizando como entrega a eletroporação pela importância destas proteínas durante o desenvolvimento embrionário, por estar envolvido em diversos processos celulares e do desenvolvimento embrionário (Grimes & Jope, 2001). A GSK é uma proteína envolvida em diversas vias de sinalização como: a via da insulina, crescimento epidérmico, crescimento de fibroblastos e ligantes de Wnt (Grimes & Jope, 2001; Frame & Cohen, 2001). O silenciamento da GSK via injeção de dsRNA provocou mudanças no metabolismo do embrião de *R. microplus* como redução da taxa de eclosão e mudanças morfológicas no embrião como alteração do eixo ventral induzindo a duplicação do eixo dorsal (Fabres *et al.*, 2009), Em *Drosophila melanogaster* a GSK ou *zw3/shaggy* (gene homólogo a GSK em algumas espécies de insetos) possui um papel essencial no desenvolvimento do coração e do

mesoderma (Park *et al.*, 1998), em *Xenopus laevis* a GSK auxilia na regulação da diferenciação neural (Marcus *et al.*, 1998).

No metabolismo de glicose a GSK atua como um regulador da atividade de GS (Glicogênio Sintase) através de fosforilação esta enzima ativa ou inibidor da síntese de glicogênio via GS. Um dos efeitos observados no metabolismo energético quando a GSK é silenciada é o acúmulo do glicogênio na célula pelo descontrole da enzima Glicogênio Sintase (GS) (REF) como também foi o observado depois da entrega da dupla fita via eletroporação (figura 12). Esta enzima atua neste processo através de uma casacata de sinalização que tem como a sua fosforiladora uma proteína quinase B, mais conhecida como AKT. A AKT é uma enzima reguladora negativa da GSK através do fosforilação do sítio regulador localizado no início da sequência de aminoácidos no resíduo da Serina 9, além de auxiliar na organização durante o desenvolvimento embrionário *D. melanogaster* (Buttrick, 2008). Com isso AKT regula de forma direta ou indireta em diversos processos celulares inclusive o metabolismo de glicogênio. Em células embrionárias de *R. microplus* BME26 o silenciamento de AKT levou a mudanças como redução da viabilidade celular e quantidade de glicogênio (Abreu *et al.*, 2009).

Quando foram analisados os efeitos do silenciamento de AKT na transcrição de GSK, surpreendentemente foi observada uma diferença no perfil de transcrição nos ovos silenciados para o 1° e 7° dia, nos ovos silenciados no 1° dia de desenvolvimento observamos um perfil de expressão de GSK acompanhando o perfil de expressão de AKT que foi silenciada e no 7° dia para AKT a expressão de GSK não seguiu o mesmo perfil observado no 1° dia seguindo o perfil encontrado no controle, sugerindo uma maior dependência dos elementos do eixo no início da embriogênese, a mesma suspeita é sustentada quando observamos o comportamento da transcrição de AKT nos ovos silenciados para GSK no primeiro momento analisado (1° dia) há um aumento de aproximadamente 10 vezes em comparação com o controle mostrando ser uma forma de compensação pela redução da transcrição de GSK, o mesmo comportamento não é observado quando

é analisamos ovos silenciados no 7° dia em que os níveis de transcrição de AKT são semelhantes ao controle.

A ativação da transição materno-zigótica em células tronco embrionárias pode ocorrer pelas modificações específicas de histonas. No modelo de peixe-zebra, as histonas adquirem padrões que se assemelham as células embrionárias pluripotentes no início de desenvolvimentos anteriores a transição materno zigótica. Como marcações de histona H3 no início da transcrição, as histomas foram inicialmente utilizadas como agentes estabilizadores do genoma para a diferenciação de células troncam embrionárias humanas (Vastenhouw *et al.*, 2010).

Em embriões de *R. microplus*, observamos uma diferença no perfil da taxa de eclosão nos ovos silenciados para AKT e GSK nos dois momentos que foram silenciados (1° e 7° dia). Estes resultados reforçam a possibilidade de diferentes papéis da AKT e GSK em momentos distintos do desenvolvimento embrionário. Antes da transição materno-zigótica estes genes possuem uma função de orientação e organização do desenvolvimento embrionário ajudados pelo RNAm e proteínas de origem materna. Em um segundo momento após a transição materno-zigótica, atuam auxiliando mais diretamente no metabolismo energético embrionário uma vez que o embrião já possui autonomia gênica e utiliza diferentes fontes energéticas como: proteínas, lipídeos e glicogênio (Campos *et al.*, 2006) envolvidos também no crescimento embrionário. O silenciamento de AKT e GSK produz efeitos negativos no desenvolvimento embrionário tornando este eixo um possível alvo para novas metodologias de controle do carrapato.

O silenciamento mostrou ser suficiente para provocar mudanças fenotípicas no metabolismo nos embriões como o acúmulo de glicogênio nos embriões silenciados para GSK e diminuição dos níveis de glicogênio nos embriões silenciados para AKT. Estas alterações metabólicas também se refletiram na taxa de eclosão dos ovos, havendo também mudanças no perfil de expressão de AKT quando era silenciado GSK, o oposto também ocorria quando GSK era silenciada foi possível observar mudanças na expressão de AKT como um possível fator de

compensação pela diminuição da população de um dos seus substratos a GSK, porém estas alterações só eram significativas quando o silenciamento ocorria nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. Sendo necessários novos estudos para a possibilidade de haver uma relação entre a expressão de AKT e GSK.

7. Conclusão

A eletroporação é um método muito eficaz na entrega e no silenciamento de genes em embriões de *R. microplus*, promovendo o silenciamento em todas as amostras testadas independentemente dos estágios de desenvolvimento ou se transição materno-zigótica já tivesse ocorrido ou não.

O eixo AKT/GSK participa de forma ativa no metabolismo enérgico do embrião de *R. microplus*. Além de também influenciar de forma indireta o desenvolvimento embrionário principalmente nas primeiras do desenvolvimento.

O silenciamento via eletroporação é uma ferramenta para o estudo de função dos genes no desenvolvimento embrionário, possibilitando escolher o momento do desenvolvimento em que será realizado o knockout dos genes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU L. A.; FABRES, E.; ESTEVES, A.; MASUDA, I.; DA SILVA VAZ JR., S.; DAFFRE, C.; LOGULLO, C. **Exogenous insulin stimulates glycogen accumulation in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo cell line BME26 via PI3K/AKT pathway**, *Comp.Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 153, 185–190. 2009.

ABREU, L. A.; CALIXTO, C.; WALTERO, C. F.; DELLA NOCE, B. P.; GEHAKA, N. W.; SEIXAS, A.; PARIZI, L. F.; KONNAI, S.; VAZ IDA S.; OHASHI, K.; LOGULLO, C. **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.* Mar.1830(3):2574-82. 2013.

ANDO T., FUJIWARA H. **Electroporation-mediated somatic transgenesis for rapid functional analysis in insects**. *Development* 140, 454-458. 2013.

BAX B., CARTER P.S., LEWIS C., GUY A.R., BRIDGES A., TANNER R., PETTMAN, PETTMAN G, MANNIX C, CULBERT AA, BROWN MJ, SMITH DG, REITH AD. **The structure of phosphorylated GSK-3 β complexed with a peptide, FRATtide, that inhibits beta-catenin phosphorylation**. *Structure.* Dec;9(12):1143-52. 2001.

BERNSTEIN, E. CAUDY AA, HAMMOND SM, HANNON GJ. **Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference**. *Nature*, v. 409, n. 6818, p. 363-6, Jan 18. 2001.

BOWMAN, A. S.; NUTTALL, P. A. **Ticks: biology, disease and control**. *Parasitology*, Nova York, v. 129, n. S1, p. S1, 2004.

BUTTRICK GJ, BEAUMONT LM, LEITCH J, YAU C, HUGHES JR, WAKEFIELD JG. **AKT regulates centrosome migration and spindle orientation in the early *Drosophila melanogaster* embryo**. *J Cell Biol.* Feb 11;180(3):537-48. 2008.

BROGIOLO W, STOCKER H, IKEYA T, RINTELEN F, FERNANDEZ R, HAFEN E. **An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control**. *Zoologisches Institut, Universität Zürich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057, Zürich, Switzerland.* *Curr Biol.* Feb 20;11(4):213-21. 2001.

CAMPOS ELDO, JORGE MORAES, ARNOLDO R. FAÇANHA, ÉRICA MOREIRA, DENISE VALLE, LEONARDO ABREU, PEDRO P.A. MANSO, ALINE NASCIMENTO, MARCELO PELAJO-MACHADO, HENRIQUE LENZI, AOI MASUDA, ITABAJARA DA SILVA VAZ JR., CARLOS LOGULLO. **Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development**. *Veterinary Parasitology*138, 349–357. . (2006)

CEDDIA RB, WILLIAM WN JR, LIMA FB, FLANDIN P, CURI R & GIACOBINO JP. **Leptin stimulates uncoupling protein-2 mRNA expression and Krebs cycle activity and inhibits lipid synthesis in isolated rat white adipocytes.** European Journal of Biochemistry 267 5952–5958. 2000

CARACCILO, M. R., BERLIN, W. K., MILLER, M. W., HANOVER, J.A. **Nuclear Glycogen Synthase Kinase 3.** Biochim. Biophys. Acta 249, 422-427. 1998

CIUDAD, L.; BELLES, X.; PIULACHS, M. D. **Structural and RNAi characterization of the German cockroach lipophorin receptor, and the evolutionary relationships of lipoprotein receptors.** BMC Mol Biol, v. 8, p. 53. 2007

CHIAROMONTE, F. WEBER RJ, ROSKIN KM, DIEKHANS M, KENT WJ, HAUSSLER D. **The share of human genomic DNA under selection estimated from human-mouse genomic alignments.** Cold Spring Harb Symp Quant Biol, v. 68, p. 245-54. 2003.

CHANG D. C., CHASSY B. , SAUNDERS J. A. , ARTHUR E. SOWERS A. E. **Guide to Electroporation and Electrofusion.** Academic Press, Inc . 1997

DATTA S.R., H. DUDEK, X. TAO, S. MASTERS, H.A. FU, Y. GOTOH, M.E. GREENBERG. **AKT phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery.** Cell 91 231–241. 1997

DAJANI, R., FRASER, E., ROE, S. M., YEO, M., GOOD, V. M., THOMPSON, V., DALE, T.C., PEARL, L. H. **Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3 beta to the axin-APC scaffold complex.** Embo Journal, 494-501. 2003

DE LA FUENTE J, KOCAN K.M., ALMAZAN C, BLOUIN E.F. **RNA interference for the study and genetics manipulation of ticks.**Trends Parasitol 23, 427-433. 2007

DE LA FUENTE J, KOCAN K.M., ALMAZAN C, BLOUIN E.F. **RNA interference for the study and genetics manipulation of ticks.** Trends Parasitol 23, 427-433. 2007

FABRES A, DE ANDRADE CP, GUIZZO M, SORGINE MH, PAIVA-SILVA GDE O, MASUDA A, VAZ IDA S JR, LOGULLO C. **Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi on tick oviposition and egg hatching.** Parasitology. 2010 Sep;137(10):1537-46. doi: 10.1017/S0031182010000284. 2010

FRAME, S. AND COHEN, P. **GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery.** Biochem.J. 359, 1-16; 2001.

FRASER E, YOUNG N, DAJANI R, FRANCA-KOH J, RYVES J, WILLIAMS RS, YEO M,WEBSTER MT, RICHARDSON C, SMALLEY MJ, PEARL LH, HARWOOD A, DALE TC. **Identification of the Axin and Frat binding region of glycogen synthase kinase-3.** J Biol Chem 277, 2176-2185. 2002

FROMM, M. L., P. TAYLOR, AND V. WALBOT. **Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation.** *Nature (Lond.)*. 319:791-793. 1986.

FIRE ANDREW, SIQUN XU, MARY K. MONTGOMERY, STEVEN A. KOSTAS, SAMUEL E. DRIVER & CRAIG C. MELLO. **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 391, 806-811. 1998

FILIPOWICZ, W. **Rnai: the nuts and bolts of the RISC machine.** *Cell*, v. 122, n. 1, p. 17-20, 2005.

FILIPOWICZ, W. **Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs.** *Curr Opin Struct Biol*, v. 15, n. 3, p. 331-41, 2005.

GREGOIRE F M, CYNTHIA M. SMAS, AND HEI SOOK SUL. **Understanding Adipocyte Differentiation** *Physiol Rev* January 7, vol. 78 no. 3 783-809. 1998

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; BORJA, G. E. M.; PEREIRA, J. B.. **Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil.** *A Hora Veterinária*, v. 21, n. 125, p. 8-10. 2002

GHARTEY-TAGOE EB, BABBIN BA, NUSRAT A, NEISH AS, PRAUSNITZ MR **Plasmid DNA and siRNA transfection of intestinal epithelial monolayers by electroporation.** *Int J Pharm* 315:122–133. 2006

GRIMES, C.A. AND JOPE, R.S. **The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 beta in cellular signaling.** *Progress in Neurobiology* 65, 391–426. 2001.

GOODE, N., HUGHES, K., WOODGETT, J. R., AND PARKER, P. J. **Differential Regulation of Glycogen Synthase Kinase-3P by Protein Kinase C Isozymes** *J. Biol. Chem.* 267, 16878–16882. 1992.

GONZALES J.C. **O Controle do Carrapato do Boi.** 3ª ed. Universidade de Passo Fundo, RS. 128p. 2003.

HAMMOND, S. M. **Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway.** *FEBS Lett*, v. 579, n. 26, p. 5822-9, Oct 31 2005.

HANNON, G. J.; CONKLIN, D. S. **RNA interference by short hairpin RNAs expressed in vertebrate cells.** *Methods Mol Biol*, v. 257, p. 255-66, 2004.

HE, X., SAINT-JEANNET, J.P., WOODGETT, J.R., VARMUS, H.E. AND DAWID, I.B. **Glycogen synthase kinase-3 and dorsoventral patterning in *Xenopus* embryos.** *Nature* 374, 617-622.1995.

HORAK IG, LUTERMANN H, MEDGER K, APANASKEVICH DA, MATTHEE CA. **Natural hosts of the larvae of *Nuttalliella* sp. (*N. namaqua*?)** (Acari:

Nuttalliellidae). Onderstepoort J Vet Res. Feb 2;79(1):E1-2. doi: 10.4102/ojvr.v79i1.405. 2012.

JONSSON, N.N. ; MAYER, D. G; GREEN, P. E. **Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (boophilus microplus).** Vet Parasitology, v. 88, p.72-92, 2000.

KARIM S, TROIANO E, MATHER TN. **Functional genomics tool: gene silencing in Ixodes scapularis eggs and nymphs by electroporated dsRNA.** BMC Biotechnol. 2010.

KEIRANS, J.E. **Tick Vector Biology.** Medical and Veterinary Aspects (1992) 1-24;

KEIRANS, J.E. E ROBBINS, R.G J. Vector Ecol. (1999) 24, 115-129;

KOCAN KM, BLOUIN E, DE LA FUENTE J. **RNA interference in ticks.** J Vis Exp. 2011

LEBER, S.M., YAMAGATA, M. AND SANES, J.R. **Gene transfer using replication-defective retroviral and adenoviral vectors.** Methods Cell Biol 51:162–183. 1996

LIFSCHITZ A., S. NAVA, A.A. GUGLIELMONE, F. IMPERIALE, C. FARIAS, A.J. MANGOLD, C. LANUSSE. **Failure of ivermectin and eprinomectin to control. Amblyomma parvum in goats: Characterization of acaricidal activity and drug pharmacokinetic disposition.** Veterinary Parasitology 156, 284–292. 2008

LOGULLO C. , W.H. WITOLA, C. ANDRADE, L. ABREU, J. GOMES, I. DA SILVA VAZ JR., S.IMAMURA, S. KONNAI, K. OHASHI, M. ONUMA, **Expression and activity of glycogen synthase kinase during vitellogenesis and embryogenesis of Rhipicephalus (Boophilus) microplus,** Vet. Parasitol. 161 261–269. 2009

LESORT M, JOPE RS, JOHNSON GV. **Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase.** J Neurochem. 72, 576–584.1999.

MANNIX C.; CULBERT A.A.; BROWN M.J.B.; SMITH D.G.; REITH A.D.. **The Structure of Phosphorylated GSK-3 Complexed with a Peptide, FRATtide, that Inhibits -Catenin Phosphorylation.** Structure.1143-1152. 2001.

MEARES GP, ZMIJEWSKA AA, JOPE RS. **HSP105 interacts with GRP78 and GSK3 and promotes ER stress-induced caspase-3 activation.** Cell Signal. 20: 347-58. 2008.

MILLER, J. F., W. J. DOWER, AND L. S. TOMKINS. **High voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of Camphylobacter jejuni with plasmid DNA.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:856-860. 1988.

MORAES J., A. GALINA, P.H. ALVARENGA, G.L. REZENDE, A. MASUDA, I. DA SILVA VAZ JR., C.LOGULLO. **Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus***, *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 146. 528–533. 2007.

NAPOLI C, LEMIEUX C, JORGENSEN R. **Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans.** *Plant Cell.* Apr;2(4):279-289. 1988.

NEUMANN, E., M. SCHAEFER-RIDDER, V. WANG, AND P. N. HOFSCHEIDER. **Gene transfer into mouse myeloma cells by electroporation in high electric fields.** (*EMBO Eur. Mol. Biol. Organ.*) J. 1:841-845. 1982.

NORVAL RAI, HORAK IG: **Vectors: ticks.** In. **In Infectious diseases of livestock.** Volume 1 2nd edition. Edited by Coetzer JAW JAW, Tustin RC. Cape Town: Oxford University Press. 2004.

NIJHOF A.M., J.A. BALK, M. POSTIGO, F. JONGEJAN, **Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks and determination of the expression profile of Bm86**, *BMC Mol. Biol.* 10. 2009

PAROLA P, RAOULT D. **Tick-bourne bacterial diseases emerging in Europe.** *Clin Microbiol Infect.* 2005

PETERS RJ, VAN DER BOSSCHE P, PENZHORN BL, SHARP B. **Tick, fly and mosquito control-lesson from the past, solution for the future.** *Vet Parasitol* (2005) 132: 205-215.

PFAFFL M.W., **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR**, *Nucleic Acids Res.* 29. 1–6. 2006

POTTER, H., L. WEIR, AND P. LEDER. **Enhancer-dependent expression of human immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 81:7161-7165. 1984

RIEHLE M.A., MOREIRA C.K., LAMPE D., LAUZON C., AND JACOBS-LORENA M. **Using bacteria to express and display anti-*Plasmodium* molecules in the mosquito midgut.** *International Journal of Parasitology* 37(6): 595-603. 2007

RODRÍGUEZ M, PENICHER ML, MOURIS AE, LABARTA V, LUACES LL, RUBIERA R, CORDOVÉS C, SÁNCHEZ PA, RAMOS E, SOTO A, **Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation.** *Vet Parasitol.*57(4):339-49. 1995

SANTOS V T, RIBEIRO L, FRAGA A., MONTEIRO CB. CAMPOS E., MORAES J, FONTENELE MR, MARCOLLA H A.FEITOSA NM, LOGULLO C, FONSECA RN.

The Embryogenesis of the Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: The Establishment of a New Chelicerate Model System. *Genesis* 00:1–15. 2013.

SMITHIES, O., R. G. GREGG, S. S. BOGGS, M. A. KORALEWSKI, AND R. S. KUCHERLAPATI. **Insertion of DNA sequences into the human chromosomal fl-globin locus by homologous recombination.** *Nature (Lond.)*.3 17:230-233. 1985.

SIEGFRIED, E., CHOU, T. AND PERRIMON, N. **Wingless signaling acts through zeste-white 3, the *Drosophila* homolog of glycogen synthase kinase-3, to regulate engrailed and establish cell fate.** *Cell* 71, 1167- 1179. 1992.

SONENSHINE, D.E.,. **Biology of Ticks.** Springer, Berlin, vol. 1. 1991.

TADROS, W.; WESTWOOD, J. T.; LIPSHITZ, H. D. **The mother-to-child transition.** *Dev Cell*, v. 12, n. 6, p. 847-9, Jun 2007.

THOMAS J-L. **Electroporation, an alternative to biolistics for transfection of *Bombyx mori* embryos and larval tissues.** 12pp. *Journal of Insect Science*, 3:17. 2003

VASTENHOUW, N. L. **Chromatin signature of embryonic pluripotency is established during genome activation.** *Nature*, v. 464, n. 7290, p. 922-6, Apr 8 2010.

WATERSTON, R. H. **Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome.** *Nature*, v. 420, n. 6915, p. 520-62, Dec 5 2002.

WANG QM, FIOL CJ, DEPAOLI-ROACH AA, ROACH PJ. **Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation.** *J Biol Chem*. 269, 14566– 14574.1994

WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G.S. & HUNGERFORD, J. **Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*.** *Parasitology*, 110, 843-850. 1995

WONG, T. K., AND E. NEUMANN. **Electric field-induced gene transfer.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107:584-587. 1982

YANG, N. S. **Transient gene expression in electroporated plant cells.** *Trends Biotechnol.* 3:191-192. 1985.

ZAWADZKI K, FEENDERS C, VIANA MP, KAISER M, COSTA LDA F. **Morphological homogeneity of neurons: searching for outlier neuronal cells.**;10(4):379-89.