

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO - UENF

**BÁRBARA PITTA DELLA NOCE**

**METABOLISMO DE NADPH PARA O CONTROLE DO EQUILÍBRIO  
REDOX APÓS DESAFIO OXIDATIVO EM CÉLULAS  
EMBRIONÁRIAS DO CARRAPATO BOVINO *Rhipicephalus*  
*microplus* (BME26)**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
NOVEMBRO/2017

**BÁRBARA PITTA DELLA NOCE**

**METABOLISMO DE NADPH PARA O CONTROLE DO EQUILÍBRIO  
REDOX APÓS DESAFIO OXIDATIVO EM CÉLULAS EMBRIONÁRIAS  
DO CARRAPATO BOVINO *Rhipicephalus microplus* (BME26)**

“Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal, na área de concentração de Sanidade Animal”

**ORIENTADOR Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

NOVEMBRO/2017

BÁRBARA PITTA DELLA NOCE

METABOLISMO DE NADPH PARA O CONTROLE DO EQUILÍBRIO  
REDOX APÓS DESAFIO OXIDATIVO EM CÉLULAS EMBRIONÁRIAS  
DO CARRAPATO *Rhipicephalus microplus* (BME26)

“Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal, na área de concentração de Sanidade Animal”

Aprovada em 09 de Novembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Thiago Motta Venancio – LQFPP - CBB / UENF

---

Dra. Rosane Aparecida Ribeiro – NUPEM / UFRJ-Macaé

---

Dra. Gabriela de Oliveira Paiva e Silva – Instituto de Bioquímica Médica / UFRJ

---

Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira – LSA / UENF  
(ORIENTADOR)

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho com muito carinho a minha família:  
à minha mãe, por todo seu esforço para que eu tivesse uma excelente educação;  
ao meu padrasto, pelo apoio e compreensão; e à grande família do Laboratório, com quem  
passamos a maior parte de nosso tempo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao meu orientador Carlos Logullo por todas as orientações. Agradecimento especial ao Professor Leonardo Abreu, que sempre me acompanhou desde minha iniciação científica, meu eterno coorientador.

Aos professores Thiago Venancio, Rosane Ribeiro e Gabriela Paiva, membros da banca, por aceitarem participar da minha banca de defesa de tese do doutorado, pela contribuição e dedicação a ciência, muito obrigada!

Agradecimento com muito carinho aos meus amigos e já recém colaboradores Josias, Marcelle, Camila e Renato, que me ajudaram no período do meu doutorado sanduiche me enviando amostras e contribuíram ativamente na bancada e nas discussões regadas a café para o artigo que estamos submetendo.

E a todos os amigos do Lab, cada um à sua maneira, contribuiu de diversas formas para um convívio de muita colaboração, seja nas discussões no journal nosso de cada semana, seja no convívio social de ajuda e compreensão, seja nos lanches, diversões, brincadeiras e churrascos comemorativos onde muitas vezes nos reunimos. Adrian, Christiano, Claudinha, Drika, Jhenifer, Luan, Mickaela, Natan, Newton, Niltinho, Yolanda, Muito Obrigada!

Ao professor Itabajara Vaz da UFRGS pela ajuda na obtenção das sequências de bancos de dados particulares e importantes contribuições para o artigo;  
E à professora Cintia pela recente contribuição nos ensaios de marcação de carboidratos e Ki67.

Agradeço também à todas as coisas e fatos existentes no universo.  
Obrigada, Obrigada, Muito Obrigada!

*“As pessoas queixam-se da infidedignidade da ciência, do modo como ela anuncia como lei hoje o que a geração seguinte identifica como erro e substitui por uma nova lei cuja validade aceita não perdura por mais tempo. Mas isso é injusto e, em parte, inverídico. As transformações da opinião científica são desenvolvimentos, progressos, e não revoluções. (...)*

*Não, nossa ciência não é uma ilusão. Ilusão seria imaginar que aquilo que a ciência não nos pode dar, podemos conseguir em outro lugar.”*

*(Sigmund Freud, no livro O futuro de uma ilusão, 1927)*

## RESUMO

O potencial redox desempenha um papel importante em diferentes aspectos celulares, sendo o NADPH o principal redutor intracelular. Mecanismos adicionais de proteção atuam para evitar danos celulares, mantendo concentrações de superóxido e peróxido de hidrogênio sob controle, o que leva ao equilíbrio redox. As células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus microplus*, linhagem BME26, quando tratadas com 2,2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não apresentaram redução na viabilidade ou alterações morfológicas significativas. Essa aparente tolerância ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é o objeto de estudo desta tese, onde tal característica mostra-se maior do que outras células de linhagens de mamíferos, sugerindo um mecanismo diferenciado para eliminação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os diferentes tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alteraram diferentemente a transcrição e atividade de enzimas como catalase e PH-GPx. Foi observada que a formação de ROS intracelular é transitória, diminuindo ao longo do tempo após o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Curiosamente, o consumo de oxigênio e o transporte de glicose das células BME26 aumentaram no momento em que o superóxido mitocondrial diminuiu. Neste trabalho, observou-se 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este processo induziu alterações transcricionais e de atividade das enzimas redutoras de NADP<sup>+</sup>, como G6PDH, IDH-NADP<sup>+</sup> e EM-NADP<sup>+</sup>. Os dados sugerem que na exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por outro lado, tanto a inibição química de G6PDH (com 6-ANAM) como o silenciamento gênico não alteraram a tolerância da BME26 ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O perfil de transcrição de IDH-NADP<sup>+</sup> mostrou-se elevado nas células silenciadas para G6PDH, o que sugere a contribuição dessa enzima no equilíbrio redox. Esses dados desvendam alguns dos mecanismos metabólicos associados à manutenção do equilíbrio redox nas células BME26 e auxiliam na compreensão da tolerância destas frente a concentrações milimolares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 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.

**Palavras-chave:** *Rhipicephalus microplus*, célula embrionária BME26, Adaptação metabólica, metabolismo redox e tolerância oxidativa.



## ABSTRACT

Redox potential exerts an important role in diverse cellular aspects and NADPH is considered the main intracellular reducing agent. Additional protective mechanisms avoid cell damages by controlling superoxide and hydrogen peroxide concentrations, which leads to redox balance. Morphological modifications and decreased viability were not significant in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated BME26 cells. Such apparent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance, the focus of the present thesis, and is greater than in other mammalian cell lines, suggesting a distinct mechanism to eliminate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Diverse H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments lead to differentially regulation in both transcription and activity of enzymes such as catalase and PH-GPx. Transient intracellular ROS formation was observed and decreased in prolonged H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure. Curiously, oxygen consumption and glucose uptake were increased when mitochondrial superoxide production was lower in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated cells. Moreover, BME26 cells are able to activate metabolic (glycolytic, gluconeogenesis and glycogen metabolism) genes and increase NADPH content in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This process induced transcriptional and catalytic alterations for NADP<sup>+</sup> reducing enzymes such as G6PDH, IDH-NADP<sup>+</sup> and EM-NADP<sup>+</sup>. Our data suggest that upon 2 hours H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure available glucose flows preferentially via Pentose Phosphate Pathway. Upon 24 hours exposure, Glycolytic Pathway flow appears to be favored and coincides with increased glycogen content in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated cells. Pointedly, increased G6PDH transcription may be correlated with a boosted reducing potential associated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge. On the other hand, neither chemical inhibition (with 6-ANAM) nor gene silencing for G6PDH altered BME26 response towards H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Transcriptional analysis for IDH-NADP<sup>+</sup> illustrates a relevant contribution towards redox balance in G6PDH silenced cells. These results unravel some of the metabolic mechanism combined with redox balance maintenance in BME26 cells and improve our understanding its tolerance towards milimolar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations. Such comprehension may broaden other relevant tick conditions and allow the identification of novel and potential targets for study and/or control.

**Keywords:** *Rhipicephalus microplus*, embryo cell BME26, metabolic adaptation, redox metabolism and oxidative tolerance.

## LISTA DE FIGURAS E TABELA

<b>Figura 1</b>	O ciclo biológico do <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	<b>19</b>
<b>Figura 2</b>	Morfologia dos embriões de <i>R. microplus</i> nas diferentes etapas do desenvolvimento da embriogênese.....	<b>20</b>
<b>Figura 3</b>	Características das células BME26.....	<b>23</b>
<b>Figura 4</b>	Geração de ROS por transferência de energia.....	<b>29</b>
<b>Figura 5</b>	Desequilíbrio entre geração de ROS e antioxidantes leva a danos em macromoléculas.....	<b>30</b>
<b>Figura 6</b>	Sensibilidade das células AH927 ao estresse oxidativo, induzido pelo peróxido de hidrogênio.....	<b>31</b>
<b>Figura 7</b>	A manutenção do nível basal de ROS em células é essencial para uma função celular adequada.....	<b>34</b>
<b>Figura 8</b>	Tolerância ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em diferentes linhagens de células.....	<b>55</b>
<b>Figura 9</b>	Tolerância ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em BME26 e S2.....	<b>56</b>
<b>Figura 10</b>	Perfil de susceptibilidade das células BME26 em miliMolar de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>57</b>
<b>Figura 11</b>	Perfil de viabilidade ao longo do tempo das células BME26 em miliMolar de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>58</b>
<b>Figura 12</b>	Alterações morfológicas após tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em células BME26.....	<b>59</b>
<b>Figura 13</b>	Contagem de células BME26 viáveis 5 dias após tratamento com 4,4 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>60</b>
<b>Figura 14</b>	Capacidade proliferativa após tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> foi mantida em células BME26.....	<b>62</b>
<b>Figura 15</b>	Aumento transitório de ROS induzido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> exógeno em células tolerantes.....	<b>64</b>
<b>Figura 16</b>	Participação da catalase, transcrição e atividade após adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em células BME26 tolerantes ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>65</b>
<b>Figura 17</b>	Mecanismos de controle oxidativo de peroxidases envolvidas em células BME26 tolerantes a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>66</b>

<b>Figura 18</b>	Aumento transitório do consumo de oxigênio em células BME26 tolerantes ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>68</b>
<b>Figura 19</b>	Células BME26 após 2h de tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> diminui o superóxido mitocondrial.....	<b>69</b>
<b>Figura 20</b>	Células BME26 tolerantes ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induzem a produção de NADPH como uma estratégia adaptativa.....	<b>71</b>
<b>Figura 21</b>	Aumento a nível Transcricional e da Atividade da Enzima G6PDH em Células BME26 tolerantes ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>72</b>
<b>Figura 22</b>	Participação Transcricional e da Atividade da Enzima IDH-NADP <sup>+</sup> em Células BME26 tolerantes ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>73</b>
<b>Figura 23</b>	Atividade de EM-NADP <sup>+</sup> em células tolerantes ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , se mantem ao nível do controle ao longo do tempo.....	<b>73</b>
<b>Figura 24</b>	Aumento da entrada de glicose 2h após a adição de 2,2 mM e 4,4 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>75</b>
<b>Figura 25</b>	Participação Transcricional e da Atividade da Enzima HK em Células BME26 tolerantes ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>76</b>
<b>Figura 26</b>	Participação Transcricional e da Atividade da Enzima PK em Células BME26 tolerantes ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>76</b>
<b>Figura 27</b>	Perfil transcricional de enzimas da via gliconeogênica em Células BME26 tolerantes ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>78</b>
<b>Figura 28</b>	Perfil transcricional de enzimas do metabolismo de glicogênio da via gliconeogênica em Células BME26 tolerantes ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>80</b>
<b>Figura 29</b>	Quantificação de glicogênio em células BME26.....	<b>81</b>
<b>Figura 30</b>	Marcação de glicogênio nas células BME26.....	<b>81</b>
<b>Figura 31</b>	Aumento da expressão da proteína Glicogênio Sintase em células BME26 após 2h tratadas com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>83</b>
<b>Figura 32</b>	Silenciamento de G6PDH em células BME26.....	<b>86</b>
<b>Figura 33</b>	Silenciamento de G6PDH em células BME26 aumentou a transcrição da IDH-NADP <sup>+</sup> .....	<b>86</b>
<b>Figura 34</b>	Viabilidade de células tratadas com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> após o silenciamento de G6PDH.....	<b>87</b>
<b>Figura 35</b>	Viabilidade de células tratadas com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> após a inibição de G6PDH.....	<b>88</b>

<b>Figura 36</b>	Representação da adaptação celular para manter a produção de NADPH e tolerância ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>89</b>
<b>Figura 37</b>	Representação da homeostase oxidativa no estado redox comparativo entre culturas de células de mamífero e BME26.....	<b>97</b>
<b>Tabela 1</b>	Enzimas alvo para investigação de alterações do metabolismo de carboidratos após o desafio com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>38</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>6PGDH</b>	6-fosfogluconato
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>CAT</b>	Catalase
<b>DHE</b>	Dihidroetídio
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose letal a 50%
<b>EDG</b>	Enzima desramificadora de glicogênio
<b>ELF1a</b>	Elongation factor 1-alpha
<b>EM-NADP<sup>+</sup></b>	Enzima málica
<b>G6Pase</b>	Glicose 6 fosfatase
<b>G6PDH</b>	Glicose-6 fosfato desidrogenase
<b>GP</b>	Glicogênio Fosforilase
<b>GPx</b>	Glutaciona Peroxidase
<b>GR</b>	Glutaciona Redutase
<b>GS</b>	Glicogênio Sintase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>HK</b>	Hexoquinase
<b>IDH-NADP<sup>+</sup></b>	Isocitrato desidrogenase dependente de NADP <sup>+</sup>
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleotideo Fosfato oxidada
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotideo Fosfato reduzida
<b>PCarbox</b>	Piruvato carboxilase
<b>PEPCK</b>	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
<b>PHGPx</b>	Glutaciona Peroxidase de Hidroperóxido de fosfolípido
<b>PK</b>	Piruvato Kinase
<b>PMG</b>	Fosfoglicomutase
<b>PRX</b>	Peroxiredoxina
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio, do inglês Reactive Oxygen Species
<b>TR</b>	Tioredoxina redutase
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1- Carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> e as Células Embrionárias BME26.....	18
2.2- Controle do Metabolismo Energético.....	24
2.3- Estresse Oxidativo e Equilíbrio Redox.....	28
2.4- O NADPH e a Manutenção de Equilíbrio Redox.....	35
<b>3.OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
3.1- Objetivo Geral.....	37
3.2- Objetivos específicos.....	37
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
4.1- Células Embrionárias do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> linhagem BME26 e o Tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	39
4.1.1- Preparo do meio Leibovitz L-15 para Células BME26	40
4.2- Linhagens celulares usadas para testes comparativos de suscetibilidade ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	40
4.3- Ensaio de Viabilidade Celular.....	41
4.4- Análise da Morfologia Celular.....	42
4.4.1- Marcação com Hoestch e Phaloidina.....	42
4.4.2- Coloração com Panótico.....	42
4.5- Determinação do nível de ROS intracelular com DHE.....	43
4.6- MitoSOX™-Red Indicador de superóxido mitochondrial para imagens de células vivas.....	43
4.7- Ensaio de entrada de glicose na célula (2-NBDG).....	44
4.8- Imunolocalização Ki67 ou GS-total ou GSP (SER641).....	45

4.9- Marcação e quantificação de glicogênio.....	45
4.10- Atividades Enzimáticas em células BME26.....	47
4.10.1- Atividade da Catalase (CAT).....	47
4.10.2- Atividade da Glicose-6-fosfato Desidrogenase (G6PDH).....	47
4.10.3- Atividade da Isocitrato Desidrogenase (IDH).....	48
4.10.4- Atividade da Enzima Málica (EM).....	48
4.10.5- Atividade de Hexoquinase (HK).....	49
4.10.6- Atividade de Piruvato kinase (PK).....	49
4.10.7- Atividade de Peroxidasas por Amplex Red.....	50
4.10.8- Determinação de Proteínas.....	51
4.11- Consumo de Oxigênio.....	51
4.12- Quantificação de NADPH.....	51
4.13- Extração de RNA e quantificação relativa de transcrição de genes por PCR em tempo real.....	52
4.14- Síntese e adição de RNA de cadeia dupla (dsRNA) em células BME26 (Silenciamento gênico por RNAi).....	53
4.15- Análise estatística.....	54
<b>5.RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
5.1- Perfil de tolerância das Células BME26 ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : Sobrevivência e Proliferação.....	55
5.2- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> exógeno em células BME26 leva a um aumento da produção de ROS transitória e da transcrição gênica de catalase e PH-GPx.....	63
5.3- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> exógeno em células BME26 leva a um aumento do consumo de O <sub>2</sub> e redução do superóxido mitocondrial transitórios.....	67
5.4- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> exógeno aumenta a produção de NADPH e Regula enzimas produtoras de NADPH em células BME26 tolerantes ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	69
5.5- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> exógeno aumenta a entrada de glicose e atividade de Hexoquinase em células BME26 tolerantes ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	74

5.6- Perfil transcricional de enzimas sugere uma participação Gliconeogênese, em resposta a adaptação das células BME26 ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	77
5.7- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> exógeno aumenta a transcrição gênica de GS, expressão de GS-P (ser641) e quantificação de glicogênio regulados em diferentes momentos após o tratamento.....	79
5.8- O silenciamento da G6PDH é compensado pela IDH-NADP <sup>+</sup> em resposta a adaptação das células BME26 ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	85
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>90</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>98</b>
<b>8. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>100</b>
APÊNDICE I: Sequência e Alinhamento da G6PDH.....	110
APÊNDICE II: Sequência e Alinhamento da IDH-NADP <sup>+</sup> .....	112
ANEXO 1: Preparo do meio L15.....	114
ANEXO 2: Lista de primers.....	116
ANEXO 3 Manuscrito submetido.....	117



## 1. INTRODUÇÃO

O carrapato *R. microplus* é originário da Ásia e infesta preferencialmente bovinos, sendo responsável por grandes perdas econômicas para a pecuária. Sua incidência é maior nos grandes rebanhos da América, África, Ásia e Austrália, sendo considerado o carrapato de maior importância econômica nos rebanhos da América do Sul (GONZÁLES, 1995; NARI, 1995). Segundo estimativas realizadas no ano de 2005, os prejuízos econômicos causados por esta espécie no Brasil atingiram a ordem de dois bilhões de reais (EMBRAPA, 2005). Os prejuízos econômicos causados por carrapatos, apenas no setor agropecuário, incluem perdas na produção de leite e carne (SUTHERST et al., 1983), 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 (UMEMIYA et al., 2008), 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).

Observa-se sistematicamente que o controle do metabolismo energético é condição primária para todos os eventos biológicos. Dentro deste contexto, o presente estudo se apresenta como uma alternativa para o entendimento da fisiologia deste importante vetor de doenças veterinárias e humanas, o carrapato. Neste sentido, a interferência na proliferação de novos indivíduos pode representar uma estratégia de combate a estes carrapatos. Esta abordagem tem sido usada no desenvolvimento de vacinas. Sendo assim, existe a necessidade de se conhecer os aspectos fisiológicos e bioquímicos que regem a formação dos embriões deste parasita, para que seja possível eleger com acurácia os antígenos e/ou drogas a serem utilizados como alternativas de controle.

O nosso grupo já avançou no desenvolvimento de uma vacina que tem como base a interferência no processo de desenvolvimento do carrapato *R. microplus*. Os primeiros testes foram feitos com a BYC (*Boophilus* Yolk pro-Cathepsin), uma pro-proteínase aspártica de ovos (LOGULLO et al., 1998). Com este antígeno obtivemos uma eficiência de aproximadamente 25%, o que é bastante representativo se compararmos as únicas duas vacinas que foram lançadas no mercado, uma

australiana e outra cubana. Efetivamente, em bovinos de nossa região essas vacinas apresentam eficiência equivalente a BYC (VAZ et al., 1998).

Uma vez que a imunização de bovinos com a proteína BYC inibiu funções dependentes desta proteína, como o desenvolvimento do embrião (VAZ et al., 1998, LEAL et al., 2006), supõe-se que a vacinação com outras proteínas possa ser eficiente para interferir nas fases embrionárias e larvais do carrapato. A constatação de que os ovos acumulam grande quantidade de heme ligado à VT (vitelina), suporta a hipótese de que a degradação da vitelina durante o desenvolvimento embrionário seja fonte de estresse oxidativo e que sejam necessárias adaptações capazes de prevenir ou controlar a geração de espécies reativas de oxigênio durante a embriogênese.

Neste contexto, as células BME26 que são células embrionárias 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; 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 nosso laboratório. 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.

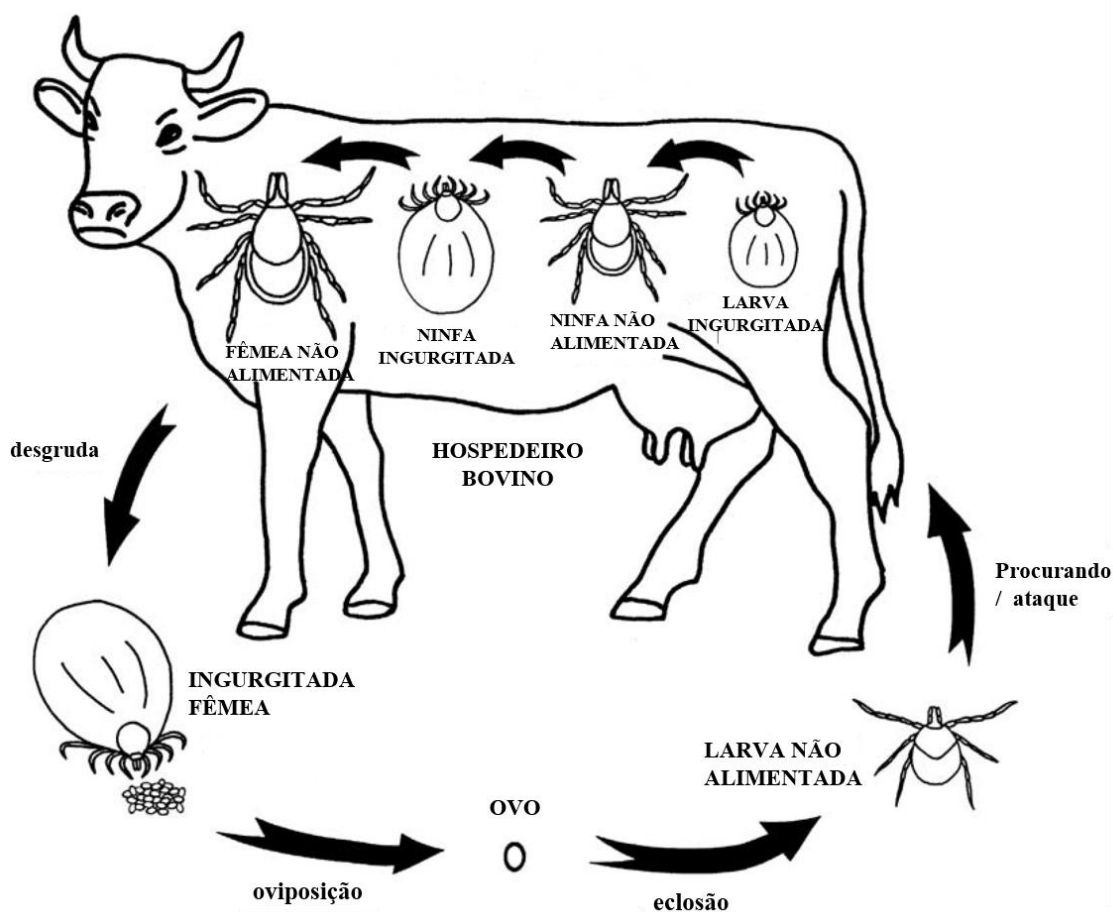
No presente trabalho, as células do carrapato bovino *R. microplus* demonstraram uma notável resistência a altas concentrações não fisiológicas de  $H_2O_2$ . Usamos a linhagem de carrapato BME26 desafiada com  $H_2O_2$  para investigar uma estratégia adaptativa até então desconhecida, regulando tanto a transcrição quanto a atividade de enzimas associadas ao metabolismo aeróbio e anaeróbio de carboidratos e a produção de NADPH. Essa compensação metabólica confere uma notável tolerância oxidativa às células do carrapato que pode estar relacionado a manutenção do equilíbrio redox. Esta descoberta abre uma perspectiva para um entendimento maior destes mecanismos para a definição de estratégias moleculares de interferência da embriogênese e controle do carrapato bovino em questão.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- Carrapato *Rhipicephalus microplus* e as células embrionárias BME26

Carrapatos são ectoparasitos hematófagos pertencentes ao Filo Artropoda, Sub-filo Chelicerata, Sub-classe Acarina da Classe Arachnida, Ordem Acari, descritos em três Famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae (KEIRANS, 1992; KEIRANS E ROBBINS, 1999). São encontrados em quase todas as regiões do mundo, com predominância em áreas tropicais e subtropicais. Possuem grande importância econômica e médico-veterinária em todo o mundo, por causarem prejuízos à saúde animal e por serem vetores de bactérias, vírus, fungos e protozoários, os quais usualmente resultam em infecções letais (JONGEJAN E UILENBERG, 2004).

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) (Fig. 1).

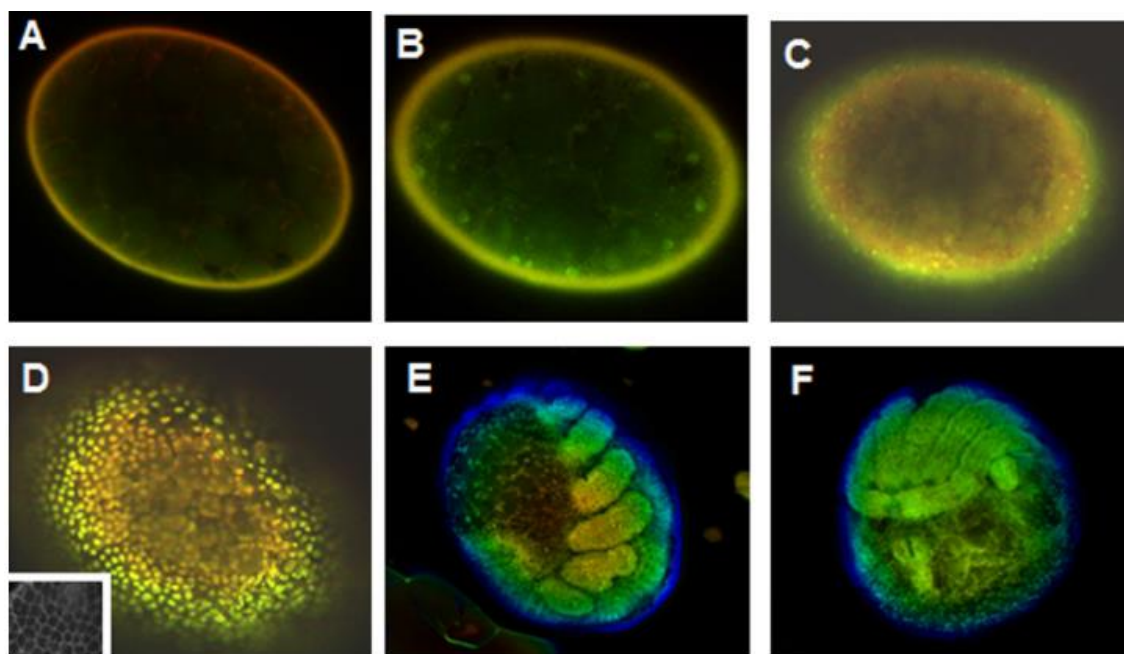


**Fig. 1:** O ciclo biológico do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Desenvolvimento dividido em duas fases: fase de vida livre e fase parasitária, em seu hospedeiro bovino, adaptado de (SONENSHINE E ROE, 2014).

Os ovos começam a eclodir em aproximadamente 21 dias após a postura. As larvas ainda não alimentadas passam por um período de maturação de aproximadamente uma semana para estarem aptas a fixarem-se no hospedeiro e continuarem o desenvolvimento (GONZALES et al., 1974). A larva alimenta-se e inicia o processo de desenvolvimento e crescimento tegumentário. Em torno do sexto dia a larva vira ninfa adquirindo uma nova estrutura com mais um par de patas, ficando agora com 4 pares. Esta fase dura em média dois a quatro dias, até que ao final do processo surja o indivíduo adulto, sexualmente diferenciado, que acontece em torno do décimo segundo dia. Em torno do décimo sétimo dia os machos já estão aptos à cópula, podendo fecundar as fêmeas. Após a fecundação, as fêmeas, em um período de três dias, passam a partenógina (parcialmente engurgitada), e em mais dois dias a teleógina (engurgitamento máximo), quando

ocorre uma grande ingestão de sangue, levando ao aumento de até 100 vezes do seu próprio peso inicial (SONENSHINE E ROE, 2014). O carrapato bovino suga, em média, 2 mL de sangue do seu hospedeiro (GONZALES et al., 1974). As fêmeas apresentam tamanho cerca de 10 vezes superior ao dos machos. Aproximadamente aos 22 dias, a maioria das fêmeas cai ao solo. Os machos podem permanecer no bovino por mais de 38 dias fecundando inúmeras fêmeas (GONZALES et al., 1974) (Fig. 1).

Dado o grande número de ovos posto pela fêmea de *R. microplus*, e a etapa de desenvolvimento embrionário dos ovos levarem a uma média de 90% de eclosão em larvas, a interferência na proliferação de novos indivíduos pode representar uma ótima estratégia de combate a estes carrapatos. 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 (Fig. 2) (SANTOS, et.al., 2013).



**Fig. 2: Morfologia dos embriões de *R. microplus* nas diferentes etapas do desenvolvimento da embriogênese.** Ovos permeabilizados em diferentes dias após a oviposição foram observadas por microscopia confocal de varredura a laser. (A) 1º dia após a

oviposição (DAO). (B) 3º DAO. (C) 4º DAO - estágio sincicial. (D) 5º DAO - estágio de blastoderma celular. (E) 7º DAO - estágio de fechamento dorsal. (F) 12º DAO - fase tardia da embriogênese (SEIXAS *et al.*, 2012).

Desse modo, nosso grupo de pesquisa tem 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).

O cultivo de células de carrapatos alcançou o estabelecimento da sua primeira linhagem há mais de três décadas (VARMA *et al.*, 1975) e, hoje, as linhagens estabelecidas são valiosas ferramentas, sendo utilizadas para a propagação de muitos patógenos. Elas fornecem também modelos de estudo de interações carrapato-patógeno em nível celular e molecular (BELL-SAKYI *et al.*, 2007). Aproximadamente 50 linhagens foram estabelecidas nos últimos 30 anos, a partir de 13 espécies de carrapatos Ixodídeos, além de outras linhagens estabelecidas de Argasídeos (MATTILA *et al.*, 2007).

A maioria das linhagens de células de carrapatos atualmente disponíveis foram estabelecidas a partir de células embrionárias. Como resultado, as linhagens celulares de carrapatos geralmente compreendem dois ou mais tipos de células que podem estar presentes em proporções variáveis tanto em diferentes momentos dentro de uma única cultura, como em diferentes níveis de passagens, conforme previamente reportado (BELL-SAKYI *et al.*, 2007). Esta mistura de células parece ser essencial para a sobrevivência da cultura, pois as tentativas de selecionar e clonar estes diferentes formatos de células falharam (MUNDERLOH, *et al.* 1994).

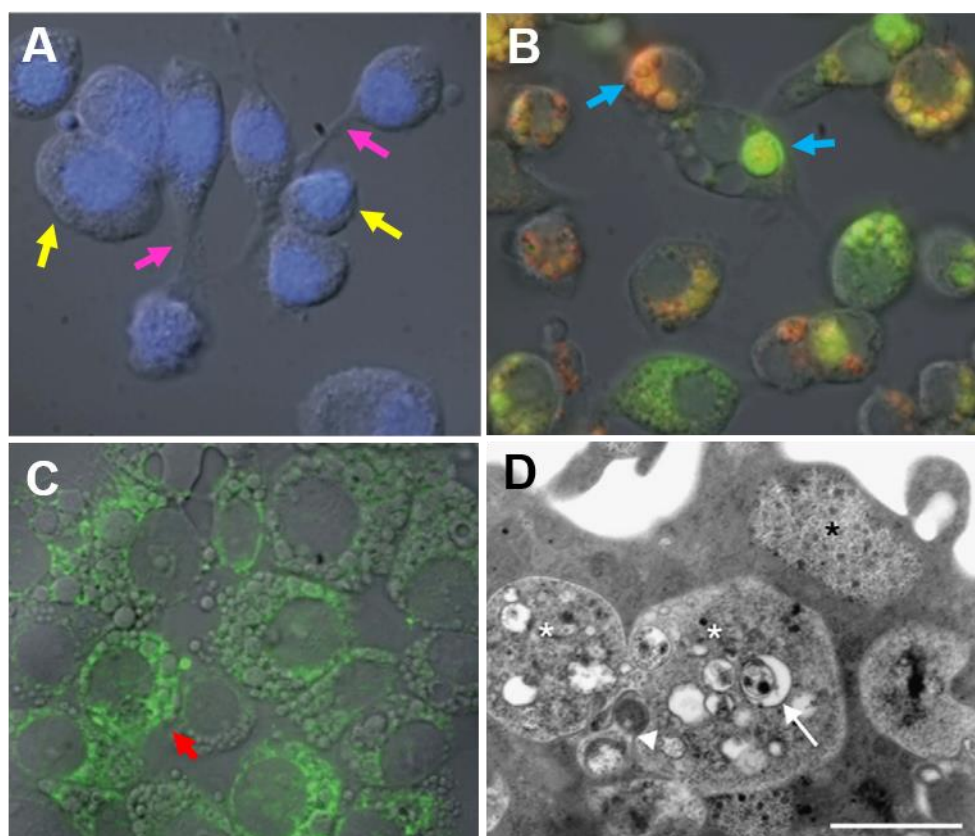
Segundo Bell-Sakyi e colaboradores (2007), as linhagens celulares de carrapatos compartilham várias características com os artrópodes dos quais foram

derivadas. Conforme os parasitos hematófagos, eles crescem em meios de cultura suplementados com soro de mamífero (no caso, soro fetal bovino), as temperaturas de incubação são entre 28 °C e 34 °C, embora algumas linhagens também cresçam a 37 °C. Algumas linhagens celulares de carrapatos prosperam em condições ácidas (pH 6,5 - 6,8) semelhante ao ambiente de células proliferativas, no entanto, algumas culturas de células de carrapatos precisam ser propagadas em pH neutro a alcalino, possibilitando o crescimento de agentes patogênicos acidológicos. As células de carrapato não exibem inibição por contato e a maioria crescerá prontamente em três dimensões. Geralmente não são fortemente aderentes, crescendo como uma combinação de monocamada incompleta e cultura de suspensão. Elas se dividem relativamente devagar, levando em torno de uma semana, e podem ser mantidas em altas densidades celulares ( $10^6$  - $10^7$  células/ml). As culturas celulares de carrapatos podem ser extremamente duradouras, resistem naturalmente a um período de um pouco mais que uma semana sem troca de meio, refletindo a capacidade dos carrapatos Ixodídeos para períodos extremamente longos entre as refeições de sangue na natureza (BELL-SAKYI et al. 2007).

A cultura primária da linhagem BME26 foi desenvolvida em Agosto de 1981 usando uma massa de ovos de até 17 dias de desenvolvimento de uma única fêmea ingurgitada (HOLMAN et al., 1980). Como essa linhagem teve origem em fragmentos de tecidos embrionários, a origem tecidual e o nível de diferenciação dessa linhagem ainda não são conhecidos. Esteves e colaboradores (2008) confirmaram a origem da linhagem de células BME26 através do sequenciamento parcial do gene mitocondrial 16S. A sequência desse gene é 100% idêntica a seqüência do gene de *R. microplus*, mostrando que essa linhagem realmente foi derivada dessa espécie. Posteriormente, esse mesmo grupo realizou a propagação *in vitro* de *Anaplasma marginale* em células BME26 (ESTEVES et al., 2008, 2009). O carrapato *R. microplus* é o principal vetor de *A. marginale*, o agente etiológico da borreliose em regiões tropicais e subtropicais (DE LA FUENTE et al., 2007).

Assim como outras linhagens de células de carrapato, as células BME26 possuem um crescimento relativamente lento, o tempo de duplicação dessa linhagem é de 5 a 10 dias dependendo de fatores como temperatura de incubação, histórico de passagens e suplementação do meio (MUNDERLOH E KURTTI, 1989). A linhagem BME26 se adere ao substrato de forma semelhante às outras linhagens de cultura de células de carrapatos sendo caracterizadas como semi-aderentes e é

morfologicamente heterogênea, apresentando núcleos de diferentes tamanhos (Fig. 3A, núcleo marcado com DAPI, setas amarelas). Culturas iniciais, pouco confluentes, possuem a aparência fusiforme com vários prolongamentos celulares (setas rosas, indicando os prolongamentos). À medida que aumenta a confluência as células vão se tornando arredondadas, maiores e com uma grande quantidade de vesículas que ficam dispersas no citoplasma e apresentam diferentes graus de acidificação (Fig. 3B, vesículas marcadas com laranja de acridina, setas azuis). Essas vesículas, possuem alto teor lipídico, e variam de célula para célula com relação a quantidade e tamanhos. Além disso, apresentam numerosas mitocôndrias (Fig. 3C, mitocôndria marcada com rodamina, seta vermelha) e inclusões de glicogênio dispersas no citoplasma (Fig. 3D, marcado por asterisco preto)



**Fig. 3: Características das células BME26.** Figuras A-C, mostram imagens de microscopia de fluorescência em sobreposição com DIC (contraste de interferência diferencial). Em A, mostra marcação de núcleos por DAPI (seta amarela). Em B, mostra as vesículas coradas com Laranja de Acridina (seta azul). Em C, observa-se marcação de mitocôndria por rodamina (seta vermelha). A figura D, mostra inclusão de glicogênio marcada por um asterisco preto



(\*), imagem de microscopia eletrônica de transmissão (Modificado de ESTEVES et al., 2008).

Estudos anteriores do grupo, ainda não publicados, mostraram que as células BME26 eram altamente tolerantes a inúmeros tratamentos quando comparadas com outras linhagens celulares de mamíferos. Tratamentos como a exposição à radiação ultravioleta, ausência de soro fetal bovino, incubação com peróxido de hidrogênio, não causaram morte celular expressiva nas células BME26, em doses semelhantes às letais em outras linhagens celulares de mamíferos (BATISTA et al., 2009; CHARLES et al., 2005; DASH et al., 2008; KULKARNI E MCCULLOCH, 1994). Geralmente, as BME26 suportaram tempos e/ou quantidades maiores de exposição. Possíveis mecanismos associados a essa tolerância, nas células BME26, ainda são desconhecidos. No entanto, com as publicações e a disponibilidade crescentes de células de artrópodes, diversas questões vêm sendo estudadas e elucidadas sobre o metabolismo, a proliferação, a sinalização, as interações vetor-patógenos e o estresse oxidativo (ABREU et al., 2013; BOTTINO-ROJAS et al., 2015; ESTEVES et al., 2009; HAMBARDE, SINGH E CHANDNA, 2013; POHL et al., 2014).

## **2.2- Controle do Metabolismo Energético**

Todo ser vivo é formado por biomoléculas que, em sua maioria, são sintetizadas pelos sistemas biológicos para manutenção de toda a estrutura celular. No curso da evolução, os seres vivos desenvolveram a capacidade de degradar moléculas para disponibilizar energia (FOTHERGILL-GILMORE et al., 1993). De maneira geral, processos catabólicos estão relacionados com o fornecimento de energia retirada de alimentos como carboidratos, lipídeos e proteínas, para organismos manterem suas funções vitais (SANCHES et al., 2012). A utilização destas moléculas tem como objetivo principal a obtenção de ATP para as células. A hidrólise do ATP é capaz de liberar uma grande quantidade de energia, contida nas suas ligações de éster fosfato, permitindo que reações importantes,

termodinamicamente desfavoráveis *in vivo*, aconteçam com muita facilidade nos seres vivos. Porém, nas células, a degradação de moléculas energéticas como a glicose não acontece apenas em um passo, mas de forma coordenada e em múltiplas etapas, denominadas de vias metabólicas (KRESGE et al., 2005).

Deste modo, vias geradoras de ATP respondem proporcionalmente ao seu substrato energético e a processos de demanda fisiológica. O metabolismo de glicose tem um papel essencial na fisiologia e no desenvolvimento de quase todos os seres vivos (FOTHERGILL-GILMORE et al., 1993). Com a entrada da glicose na célula, ela é então fosforilada a glicose-6 fosfato, numa reação catalizada pela hexoquinase, podendo ser oxidada (via das pentoses fosfatos, via glicolítica) ou armazenada (formação de glicogênio). A glicose-6-fosfato, pode ser proveniente também da quebra do glicogênio e/ou de precursores não glicídicos pela gliconeogênese (KRESGE et al., 2005; SANCHES et al., 2012).

A ocorrência da glicólise, uma via central do catabolismo de carboidratos que ocorre no citoplasma, está relacionada com a necessidade de produção de energia e somente será viabilizada se houver disponibilidade de glicose e da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada ( $\text{NAD}^+$ ). A degradação da glicose é catalizada por uma série de reações enzimáticas para formar duas moléculas de piruvato, sendo parte da energia livre liberada durante o processo convertida para a formação de ATP e NADH. O piruvato quando convertido a acetil-CoA pela descarboxilação oxidativa catalizada pelo complexo multienzimático mitocondrial, piruvato desidrogenase, pode ter um dos destinos metabólicos ao ciclo de Krebs, e através das reações do ciclo de Krebs cada grupo de acetila leva a formação de 3 moléculas de NADH. Em várias das reações enzimáticas do ciclo, ocorre redução dos cofatores  $\text{NAD}^+$  e FAD. Deste modo, o ciclo de Krebs é responsável pela produção de potencial redutor na forma de NADH e  $\text{FADH}_2$ . A reoxidação destes cofatores é importante para a transferência de elétrons através de reações de oxidorredução com os complexos da cadeia transportadora de elétrons. Esses elétrons são conduzidos até o oxigênio molecular (aceptor final) e permitem a formação do gradiente eletroquímico de prótons, que impulsiona a síntese de ATP pela ATP sintase na mitocôndria (SANCHES et al., 2012; NELSON; LEHNINGER; COX, 2015).

Durante a embriogênese do carrapato *R. microplus* foram observadas diversas mudanças metabólicas associadas ao desenvolvimento do embrião. Por

exemplo, a formação do blastoderma celular marca uma mudança metabólica na embriogênese do carrapato, entre o sexto e o sétimo dia de desenvolvimento, onde conteúdos de glicose e glicogênio são mobilizados e ressintetizados. Também foi observado que no início da embriogênese ocorre um aumento considerável na atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, atingindo pico no quinto dia após a oviposição, mostrando o direcionamento da glicose-6-fosfato formada pela hexoquinase para a via das pentoses fosfato. Este perfil metabólico se associa diretamente à intensa necessidade de proliferação celular nesta primeira etapa da embriogênese, onde é necessário o fornecimento de ribose-5-fosfato para síntese de nucleotídeos e disponibilidade de NADPH para a biossíntese de fosfolípidos. Após estes momentos, no sétimo dia de desenvolvimento, há redução drástica da atividade de G6PDH, permanecendo em níveis baixos até o final da embriogênese (MORAES et al., 2007; CAMPOS et al., 2006).

O glicogênio é a principal fonte de energia durante os estágios iniciais da embriogênese de *R. microplus*, e durante a embriogênese tardia foi visto que a degradação da proteína aumenta. De tal modo que, os aminoácidos servem como substrato para a gliconeogênese e a subsequente ressíntese de glicogênio (MORAES et al., 2007). Comparativamente, o metabolismo na fase tardia da embriogênese do mosquito *Aedes aegypti*, também apresentou uma etapa gliconeogênica, com aumento da concentração de glicose livre e do conteúdo de glicogênio, diminuição de proteínas totais, e aumento concomitante na atividade da PEPCK, enzima chave na gliconeogênese (VITAL et al., 2010).

Como o embrião em desenvolvimento requer alta demanda energética, a mobilização coordenada das principais fontes de energia e o aumento do consumo de oxigênio são bem definidas em função do crescimento e das mudanças morfogênicas (CAMPOS et al., 2006), principalmente em indivíduos que são desenvolvidos em um sistema fechado quase autossuficiente (ovos cleidóicos) (ROMBOUGH, 2011). Moraes e colaboradores (2007) mostraram que a mobilização seletiva de reservas do ovo de carrapato representa uma estratégia metabólica adotada por esses parasitas para atender a sua demanda biossintética durante a embriogênese. Nesse contexto, os carboidratos atuam como principal fonte de energia, e são mobilizados durante todo o processo para a rápida segmentação do embrião em diferentes modelos de artrópodes (MARTINS, et al., 2017; FRAGA, et al., 2013; VITAL et al., 2010; MORAES et al., 2007).

Trabalhos recentes forneceram algumas informações sobre os processos dinâmicos metabólicos usando a célula BME26 como modelo para futuros estudos no carrapato (ABREU et al., 2013; SARAMAGO et al., 2012; da SILVA, et al., 2015). Foi observado em células BME26 que a incubação com anticorpos monoclonais para triosefosfato isomerase (TIM) inibiram o crescimento de células BME26, fornecendo evidências da importância do metabolismo da glicose na proliferação celular (SARAMAGO et al., 2012). Esse é um exemplo de trabalho com foco em alvos proteicos distintos envolvidos no metabolismo energético do carrapato. No entanto, poucos estudos abordaram os mecanismos moleculares que controlam a expressão de genes que são fundamentais para o metabolismo energético.

De acordo com da SILVA e colaboradores (2015), o metabolismo de glicose das células BME26 depende da gliconeogênese diferentemente do clássico descrito células de mamíferos. Sabendo-se que a concentração normal do meio L15 para células BME26 foi estabelecida como 80 mM (MUNDERLOH E KURTTI, 1989); as células mantidas em meio com alta concentração de glicose (160 mM) apresentaram um aumento na transcrição de enzimas gliconeogênicas simultâneo à atividade de enzimas glicolíticas, especialmente a piruvato quinase. Além disso, neste estudo observou-se que o silenciamento da GSK3, importante reguladora da GS, aumenta a transcrição de genes da gliconeogênese, como a PEPCK. Esses dados também são importantes pois fornecem ferramentas para compreensão de como o metabolismo de glicose é regulado em nível transcricional nestas células de carrapato.

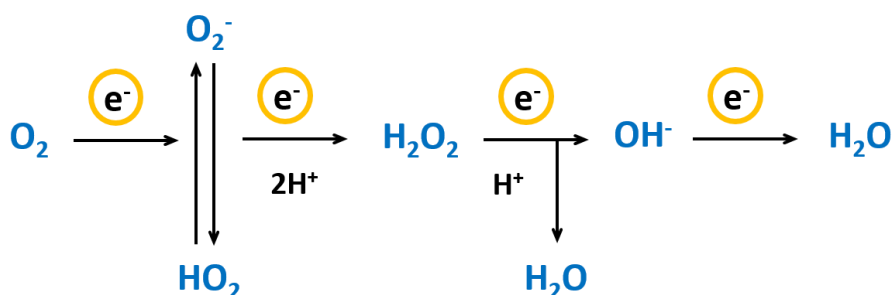
Numa outra abordagem, a via de sinalização de insulina e seu possível papel durante a embriogênese foram investigados, utilizando as células BME26 como modelo (ABREU et al., 2009). A insulina exógena aumentou o conteúdo de glicogênio celular na ausência de soro fetal bovino. Nas células tratadas com insulina, quando incubadas previamente com inibidores da via de sinalização (inibidores de PI3K, wortmannin ou LY294002, ou inibidor de AKT, 10-DEBC), o efeito do aumento de glicogênio foi bloqueado. Posteriormente, foi visto a conservação do eixo AKT-GSK3 $\beta$  na viabilidade celular e no metabolismo de glicogênio em células BME26 (ABREU et al., 2013). Estes resultados sugerem fortemente a presença de um maquinário enzimático responsivo à insulina em células BME26, que pode estar correlacionada com o metabolismo de carboidratos e/ou glicogênio durante a embriogênese do carrapato *R. microplus*.

O impacto do metabolismo energético para a produção e controle de ROS tem sido estudado principalmente em células cancerosas (KANG, LEE E LEE, 2015). Como vimos aqui o metabolismo de carboidratos tem demonstrado ser essencial para a embriogênese do *Rhipicephalus microplus*, atuando como principal fonte e mobilização de energia. Por isso, tem se tornado interessante estudar o impacto do metabolismo energético e do metabolismo redox no desenvolvimento embrionário, usando células BME26 como modelo. Deste modo, a caracterização de homeostase de ROS em tais células embrionárias de carrapato é um importante passo para a compreensão de processos essenciais para obter novos alvos como objetivos de estudo e controle (MEHLHORN et al., 2012).

### **2.3- Estresse Oxidativo e Equilíbrio Redox**

A evolução para um processo metabólico aeróbico como a respiração e fotossíntese, teve como consequência a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês Reactive Oxygen Species) nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos. Este processo metabólico leva à formação de diferentes tipos de ROS produzidos na célula. Além disso, muitos artigos foram publicados demonstrando que o ROS em altas concentrações, e produzido de modo descontrolado, possui capacidade de causar dano oxidativo em proteínas, DNA e lipídeos (APEL E HIRT, 2004; FORMAN E TORRES, 2002).

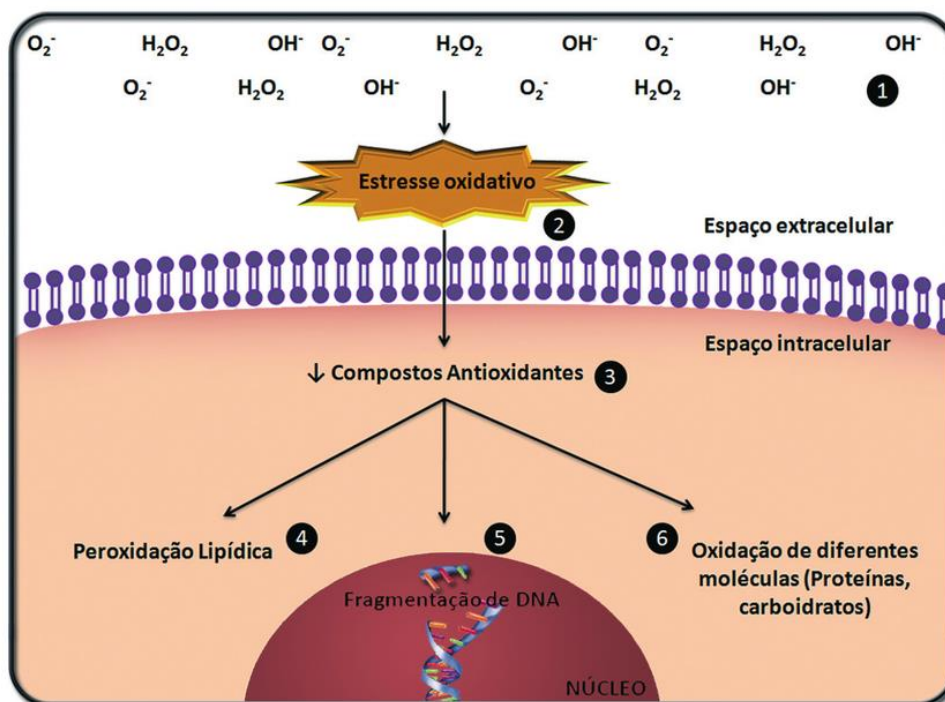
O oxigênio intracelular pode ser convertido a várias formas reativas por transferência de energia ou por transferência de elétrons, levando à formação de oxigênio parcialmente reduzido, resultando em redução sequencial de superóxido para peróxido de hidrogênio e então radical hidroxil (APEL E HIRT, 2004) (Fig. 4).



**Fig. 4: Geração de ROS por transferência de energia.** Redução sequencial da molécula de oxigênio. (adaptado LUZ, et al., 2011).

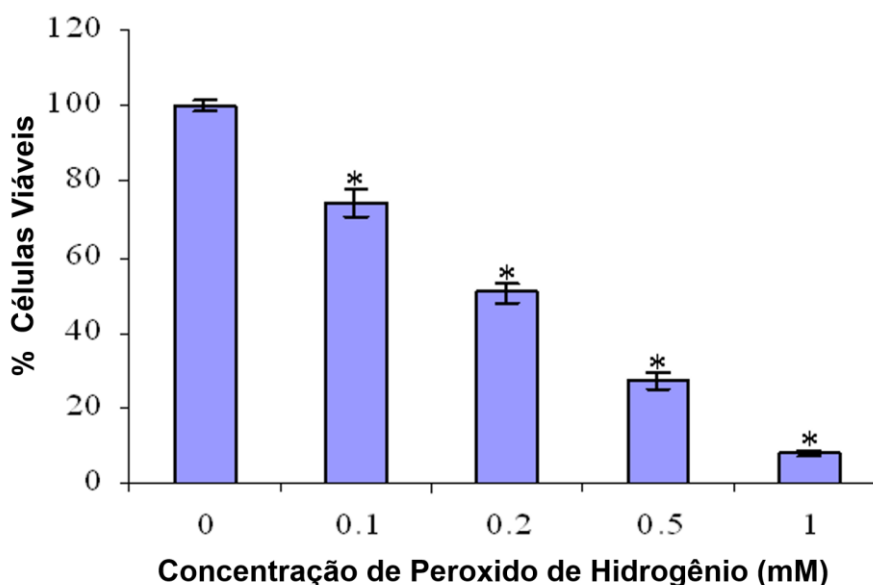
O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é uma substância química instável descrita como poderoso oxidante que pode reagir com elétrons gerando radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) ou água ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Pode ser decomposto pela ação da luz solar na água (fotorreação), em presença de substâncias húmicas (material orgânico dissolvido), e sua decomposição libera oxigênio molecular e calor. Em soluções diluídas, o calor é facilmente absorvido pela água presente; em soluções mais concentradas, o calor aumenta a temperatura e acelera a taxa de decomposição do reagente. Sob temperatura ambiente, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é estável, se devidamente armazenado (MATTOS et al., 2003). Na presença de íons de metais de transição, como o Ferro e Cobre, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser reduzido para radical hidroxil, sendo o superóxido e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  muito menos reativos que o radical hidroxil (APEL E HIRT, 2004). Portanto, o principal risco para a célula que produz essas duas formas de ROS intermediárias é a interação com fatores que podem gerar radicais hidroxil altamente reativos (INDO et al., 2007).

A geração de ROS em células vivas devem estar em equilíbrio com a capacidade dos sistemas de defesa antioxidantes do organismo para tamponá-los (SANZ et al., 2010). Desequilíbrios causados tanto pela geração excessiva de ROS quanto pela reduzida eficiência dos sistemas de defesa antioxidantes levariam ao acúmulo desses radicais livres e dano oxidativo associado a macromoléculas, e morte celular (SANZ et al., 2010; BARBOUTI et al., 2002 e DASH et al., 2008). Aumento dos níveis de ROS pode danificar vários processos celulares (Fig. 5).



**Fig. 5: Desequilíbrio entre geração de ROS e antioxidantes leva a danos em macromoléculas.** (1) Alta produção de ROS levando ao estresse oxidativo (2). Neste caso em que os compostos antioxidantes não são suficientes para manter o equilíbrio redox (3), o desequilíbrio leva a danos em diversas macromoléculas: peroxidação lipídica (4), fragmentação do DNA (5) e oxidação de diferentes moléculas (Proteínas, carboidratos) (6), levando a célula à morte (LUZ, et al., 2011).

Dash e colaboradores demonstraram a sensibilidade ao  $H_2O_2$  em cultura de fibroblasto epitelial (linhagem AH927), onde a viabilidade celular diminuiu notavelmente de forma dependente da concentração, após tratamento com várias concentrações de  $H_2O_2$ . A  $DL_{50}$  (dose letal para 50% das células) durante 24 horas de exposição foi de 0,2 mM (Fig. 6).



**Fig. 6: Sensibilidade das células AH927 ao estresse oxidativo, induzido pelo peróxido de hidrogênio.** A adição de  $H_2O_2$  reduziu a viabilidade das células de fibroblasto epitelial (linhagem AH927), o qual foi avaliado pelo ensaio de MTT. Adaptado DASH et al., 2008.

É importante ressaltar que o estresse oxidativo é resultado quando a geração de ROS excede a capacidade do sistema de defesa antioxidante celular. Deste modo, o estresse oxidativo assim chamado, é um desequilíbrio intracelular que causa dano oxidativo em macromoléculas resultando em lipoperoxidação, oxidação de aminoácido podendo levar a desestruturação e degradação de proteínas, e danos no DNA gerando mutações e fragmentações, que em conjunto podem levar à morte celular (BIRBEN et al., 2012).

Uma vez que concentrações elevadas de  $H_2O_2$  são tóxicas para uma ampla gama de macromoléculas, o sistema de detoxificação de  $H_2O_2$  deve ter sido desenvolvido no início da evolução. Para evitar a destruição celular, por um aumento da quantidade de ROS, as células possuem estratégias sofisticadas que mantêm sob controle as concentrações de superóxido,  $H_2O_2$ , e a disponibilidade de metais de transição (APEL E HIRT, 2004; INDO et al., 2007).

Uma das formas de controle destas espécies reativas é por mecanismos enzimáticos, tendo como principais a superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase (APEL E HIRT, 2004). A superóxido dismutase é a primeira enzima a atuar contra ROS, eliminando o superóxido pela formação de  $H_2O_2$ . A catalase, localizada principalmente nos peroxissomos, e a glutathiona peroxidase, localizada no



citoplasma, eliminam o  $H_2O_2$  gerando molécula de água e oxigênio estável (CHANCE, SIES E BOVERIS, 1979; SCHRINER et al., 2005)(Chance, Sies e Boveris, 1979; Schriener *et al.*, 2005). A glutathione redutase transfere o potencial redutor do NADPH, proveniente principalmente da via das pentoses, para o substrato oxidado, gerando glutathione reduzida. A glutathione peroxidase oxida a glutathione reduzida, com o potencial oxidativo do  $H_2O_2$ . O equilíbrio de atividade destas duas enzimas reflete a importância da glutathione no sistema redox (ARTHUR, 2000; BIRBEN, et al., 2012; FORMAN E TORRES, 2002)

Em insetos os estudos de defesas antioxidantes começaram no início de 1990, e tem sido demonstrado que existe um sistema de defesa antioxidante semelhante aos de outros organismos existentes (SANZ et al., 2010). Também foi observado que a enzima superóxido dismutase de insetos faz parte das primeiras defesas enzimáticas contra ROS, que são principalmente gerados pelo metabolismo aeróbio (DATKHILE et al., 2009). Parker e colaboradores (2004) sugerem então um padrão geral de defesa da superóxido dismutase para todos os metazoários.

Em geral, os insetos possuem uma alta atividade de catalase, que normalmente, coincide com baixos níveis de glutathione peroxidase e glutathione redutase (SANZ et al., 2010) como sistema de defesa contra xenobióticos, possivelmente a superóxido dismutase e a catalase são as duas principais enzimas envolvidas na proteção antioxidante (AHMAD E PARDINI, 1990). Datkhile e colaboradores (2009) verificaram um aumento na atividade destas duas enzimas em *Chironomus ramosus* submetidos à radiação ionizante, enquanto que na atividade de glutathione peroxidase e glutathione redutase não houve resposta. O estudo do estado oxidativo dos animais em geral, e insetos em particular, pode ser uma ferramenta para indicar peculiaridades fisiológicas na atividade metabólica, que estão diretamente relacionados com a produção de ROS e hábitos alimentares (SANZ et al., 2010).

Apesar do poder de reação, o  $H_2O_2$  é um metabólito natural nos seres vivos. A concentração de  $H_2O_2$  dentro da célula é definida pelo influxo e formação intracelular, e também pela eliminação do  $H_2O_2$  e pelo seu efluxo. Desta forma, foi possível determinar a concentração do  $H_2O_2$  mitocondrial. Em mamíferos, a concentração fisiológica de  $H_2O_2$  pode ser mínima de  $0,001\mu M$ . E a máxima, que pode ser gerada para fins de sinalização, seria entre  $0,5 - 0,7\mu M$  de  $H_2O_2$  (STONE E YANG, 2006). De acordo com algumas publicações, o  $H_2O_2$  é uma importante

molécula de sinalização celular, relatada como sendo produzida continuamente em estado estacionário na concentração entre 0,1  $\mu\text{M}$  e 0,001  $\mu\text{M}$  em células de mamíferos (CHANCE, SIES E BOVERIS, 1979; D'AUTRÉAUX E TOLEDANO, 2007; SADIDI, LENTZ E FELDMAN, 2009; SIES, 2014).

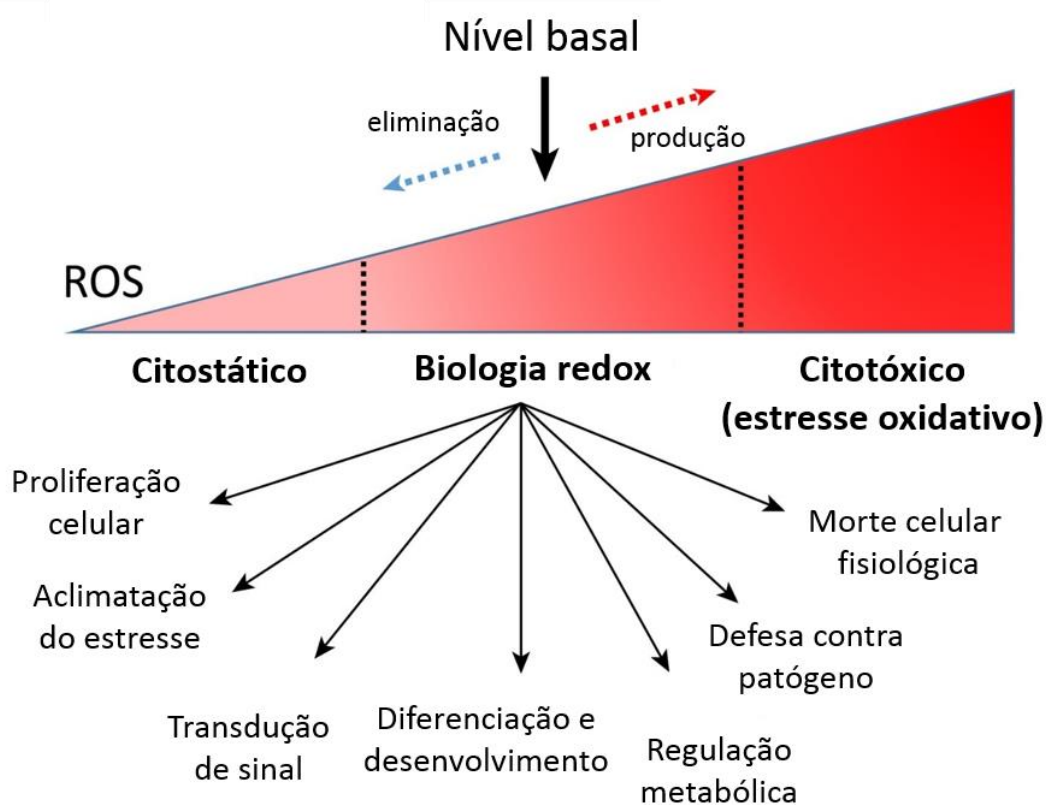
Acredita-se que o transporte de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ocorre por livre difusão através da bicamada lipídica das membranas. No entanto, alguns trabalhos têm relatado que o transporte de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser regulado e que esta regulação constitui o fator principal na determinação da concentração do  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular (BIENERT et al., 2006). A partir de evidências diretas de que homólogos de aquaporina, selecionados a partir de plantas e mamíferos, têm a capacidade de canalizar  $\text{H}_2\text{O}_2$  através das membranas, mostrou-se que a difusão do  $\text{H}_2\text{O}_2$  através das membranas pode ser limitada (BIENERT et al., 2007). Esse possível controle da entrada de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na célula, corrobora com artigos que tem defendido a possibilidade de que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  também funcione como molécula de sinalização para o controle de diferentes processos essenciais em plantas e mamíferos. Portanto, tem-se uma nova visão sobre o papel do  $\text{H}_2\text{O}_2$  como uma molécula sinalizadora, deixando de ser apenas um vilão causador de danos oxidativos. Curiosamente, muitos desses alvos estão envolvidos na produção de energia (RHEE, 2006).

Neste sentido, algumas pesquisas apontaram que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em baixos níveis fisiológicos estimula a proliferação e/ou a sobrevivência de células, enquanto que o aumento da atividade de catalase inibe proliferação e/ou sobrevivência celular (BROWN et al., 1999; PRESTON, MULLER E SINGH, 2001; SADIDI, LENTZ E FELDMAN, 2009). O outro fato é que as células de mamíferos geram  $\text{O}_2^-$  e/ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  em resposta a vários estímulos fisiológicos, e a família de enzimas NADPH oxidase (NOX), foi identificada, como tendo a função principal de gerar  $\text{O}_2^-$  e/ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de uma forma regulada (SEGAL, 2008; STONE E YANG, 2006). Além disso, muitos tipos de células produzem  $\text{H}_2\text{O}_2$  em resposta a fatores de crescimento celular, insulina, e a fatores de sobrevivência celular (Fig. 7) (RHEE, 2006; MITTLER, 2017). Sadidi e colaboradores demonstraram que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em pequenas concentrações atua como segundo mensageiro na via de sinalização de sobrevivência celular, aumentando a sobrevivências das células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) via PI3K e AKT (SADIDI, LENTZ E FELDMAN, 2009). Assim, alguns trabalhos têm mostrado que o efeito de diferentes níveis de ROS na célula pode estar associado a regulação de diferentes processos, por exemplo, como citado acima proliferação

celular, sinalização, defesa contra patógeno, regulação metabólica, diferenciação e desenvolvimento (DEYULIA et al., 2005; FORMAN, MAIORINO E URSINI, 2010; MITTLER, 2017; RISTOW E ZARSE, 2010; SIES, 2014; TEMPLE, PERRONE E DAWES, 2005).

Na figura 7, as células aonde o nível de ROS está muito baixo podem estar citostáticas (ou seja, por inibição do metabolismo normal, ocorre uma redução do crescimento, desenvolvimento e multiplicação celular); enquanto que, em células onde o nível de ROS está muito alto, acaba sendo citotóxico (um processo de toxicidade que por danificar macromoléculas, leva a morte celular). No entanto, para sinalização redox nas células é necessário a concentração basal de ROS, que é mantido pelo equilíbrio entre a produção de ROS e a eliminação de ROS (MITTLER, 2017).

Deste modo, trazemos para esta tese a importância de compreender a natureza exata da gama fisiológica para diferentes concentrações de  $H_2O_2$ , seus mecanismos de adaptação e controle redox em células BME26.



**Fig. 7: A manutenção do nível basal de ROS é essencial para funcionamento celular adequado.** O efeito de diferentes níveis de ROS na regulação de diferentes processos celulares. Adaptado MITTLER, 2017.

#### 2.4- O NADPH e a Manutenção de Equilíbrio Redox

Mecanismos de metabolismo energético atuam em processos de demanda de energia, mas também na manutenção da homeostase fisiológica e na prevenção de danos oxidativos causados por ROS (FRAGA et al., 2013; LIEMBURG-APERS et al., 2015; YOBOUE et al., 2014). O metabolismo de carboidratos explica tanto a geração quanto a eliminação de ROS (LIEMBURG-APERS et al., 2015). Por exemplo, a atividade da hexoquinase depende do ATP gerado pela ATP-sintase mitocondrial, mantendo o fluxo de elétrons através da fosforilação oxidativa devido ao suprimento de ADP. Essa manutenção do fluxo de elétrons é importante para que o elétron chegue ao seu acceptor final ( $O_2$ ) no complexo IV da cadeia transportadora de elétrons, dificultando o escape de elétrons e impedindo o aumento de produção de ROS na forma de superóxido mitocondrial (DA-SILVA et al., 2004; WU et al., 2012).

A via das pentoses fosfato é outro importante caminho para a modulação do potencial redox. A glicose-6-fosfato, no sentido oxidativo, é irreversivelmente convertida em ribulose 5-fosfato,  $CO_2$  e NADPH, um cofactor que atua na manutenção redox de muitas enzimas antioxidantes (YING, 2008). A G6PDH é a enzima reguladora da via das pentoses fosfato, que tem como seu substrato a glicose-6-fosfato (KUEHNE et al., 2015; MAILLOUX E HARPER, 2010; WANG et al., 2014)(Kuehne *et al.*, 2015; Mailloux e Harper, 2010; Wang *et al.*, 2014). Foram encontrados na literatura dois inibidores competitivos de G6PDH, a 6-aminonicotinamida e um esteróide adrenal, dehidroepiandrosterona (DHEA). Consequentemente os inibidores reduzem os níveis de NADPH (SCHWARTZ E PASHKO, 2004). Existe também outras enzimas que podem controlar a demanda do NADPH com proporcional intracelular potencial de redução para reações de biossíntese e proteção contra compostos oxidativos, através da isocitrato desidrogenase (IDH-NADP<sup>+</sup>) e enzima málica (EM- NADP<sup>+</sup>) (RZEZNICZAK E MERRITT, 2012; SMOLKOVÁ E JEŽEK, 2012).

Um bom exemplo de manutenção do equilíbrio redox é o sistema de oxidoredução da glutatona, onde a glutatona oxidada é reciclada a glutatona reduzida, pelo potencial redutor do NADPH, que é regenerado principalmente por enzimas da via das pentoses fosfatos. Portanto, a glutatona peroxidase (Gpx) catalisa a reação de redução de  $H_2O_2$  à água usando os elétrons do NADPH. Além disso, a peroxiredoxina (Prx) faz a mesma reação usando NADPH acoplada com tiorredoxina redutase (TrxR) e tiorredoxina (Trx). Assim, como descrito no item 1.3 desta tese, o equilíbrio redox é o balanço intracelular entre moléculas nas formas oxidada e reduzida (LIEMBURG-APERS et al., 2015).

Deste modo, é importante caracterizar a homeostase de ROS em sistemas biológicos para a compreensão dos mecanismos relacionados a esse processo fisiológico, visando a obtenção de novos alvos para estudo e controle no carrapato *Rhipicephalus microplus* (MEHLHORN et al., 2012).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1- Objetivo Geral

Comprovar uma relação de resposta de compensação metabólica acoplada a uma alta tolerância oxidativa em células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus microplus* (linhagem BME26).

#### 3.2- Objetivos Específicos

- 1- Determinar a tolerância das células BME26 ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em concentrações micromolares e comparar o perfil de viabilidade em linhagens celulares de artrópodes e mamíferos.
- 2- Analisar a sobrevivência, morfologia e capacidade proliferativa das células BME26 após o desafio com milimolar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. E análise do consumo de oxigênio após o desafio com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- 3- Avaliar o perfil de ROS intracelular e a eliminação por ação enzimática após o desafio com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- 4- Investigar o papel de enzimas produtoras de NADPH, para manutenção do equilíbrio redox, após o desafio com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (ver Tabela 1)
- 5- Investigar alterações do metabolismo de carboidratos para equilíbrio redox após o desafio com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
  - a- Quantificação da expressão genica e / ou atividade enzimática dos alvos listados na Tabela 1.
  - b- Quantificação de glicogênio após o desafio com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
  - c- Verificar a captação de glicose pela célula após o desafio com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 6- Investigar a importância da G6PDH através do silenciamento gênico por RNA de interferência, para manutenção do equilíbrio redox e sobrevivência celular.

Tabela 1: Enzimas alvo para investigação de alterações do metabolismo de carboidratos após o desafio com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

<i>Enzima</i>	<i>Via Metabólica</i>
Enzima desramificadora do glicogênio (EDG)	Degradação Glicogênio
Enzima Málica (EM)	Descarboxilação de malato a piruvato (produtora de NADPH)
Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK)	Gliconeogênese
Fosfoglicomutase (PGM)	Glicogenólise e glicogênese
Glicogênio Sintase (GS)	Síntese de Glicogênio
Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)	Via das pentoses fosfato (produtora de NADPH)
Glicose-6-fosfatase (G6Pase)	Gliconeogênese e glicogenólise
Hexoquinase (HK)	Glicólise
Isocitrato Desidrogenase (IDH-NADP <sup>+</sup> )	Ciclo de Krebs (produtora de NADPH)
Piruvato carboxilase (PCarbox)	Gliconeogênese
Piruvato quinase (PK)	Glicólise

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1- Células Embrionárias do carrapato *Rhipicephalus microplus* linhagem BME26 e o Tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A linhagem BME26 é mantida conforme descrito por Esteves e colaboradores (2008). As garrafas de cultura de célula confluentes (25 cm<sup>2</sup>) foram ressuspensas em 5 mL de meio completo usando uma agulha de calibre 22 (0,70 x 25mm) anexada a uma seringa de plástico de 5 mL. A densidade da cultura foi determinada utilizando hemocitometro Neubauer, e a viabilidade celular foi determinada usando a técnica de exclusão de células mortas marcadas pelo corante Azul de Tripán (Trypan Blue 0,04% - Sigma-Aldrich). Para realizar todos os experimentos desta tese a densidade de célula em garrafas de cultura (25 cm<sup>2</sup>) foi normalizada em uma alíquota inicial de 10<sup>7</sup> células por garrafa em 5 mL de meio (2x10<sup>6</sup> células / mL), para ser usada 14 dias depois, com uma concentração celular esperada de aproximadamente 2x10<sup>7</sup> células por garrafa (~ 4x10<sup>6</sup> células / ml), para manter características homogêneas entre as garrafas de cultivo celular utilizada em todos os experimentos (ABREU et al., 2013).

Em seguida, as células ressuspensas da garrafa normalizada de cultura de células foram contadas e plaqueadas em 5x10<sup>5</sup> células por poço em uma placa de 24 poços em 500 µL de meio, incubadas a 34 °C num período de 12-16 horas para adesão celular. Com exceção dos experimentos, <sup>(1)</sup> para microscopia com células fixadas, 2,5x10<sup>5</sup> células foram colocadas sobre lamínulas redondas por poço em uma placa de 24 poços com 500 µL de meio. <sup>(2)</sup> Microscopia para marcação in vivo, em células intactas (Mitosox e 2-NBDG) onde 2,5x10<sup>5</sup> células foram plaqueadas em placa de tipo Petri para microscopia confocal (SPL life sciences, Model: 200350), em 2 mL de meio. <sup>(3)</sup> Para teste de consumo de oxigênio os tratamentos foram feitos em garrafas de cultura (25 cm<sup>2</sup>) normalizadas como descritas acima (com aproximadamente 2x10<sup>7</sup> células). <sup>(4)</sup> Para avaliar a viabilidade a longo prazo (5 dias), foram plaqueadas 2,5x10<sup>5</sup> células em 500 µL de meio / poço em uma placa de 24 poços.

Em seguida, o tratamento foi realizado com uma adição única de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para verificar a suscetibilidade celular, as células foram tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a



concentrações de 62  $\mu\text{M}$  a 1000  $\mu\text{M}$  e a viabilidade celular foi verificada 24 horas após a incubação a 34 °C. Em seguida, para encontrar a  $DL_{50}$ , as células foram incubadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  a concentrações de 2,2 mM - 13 mM e a viabilidade celular foi verificada 24 horas após o tratamento. Seguindo, para os outros experimentos foram escolhidas as concentrações de 2,2 mM e 4,4 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , com incubações para os períodos indicados (geralmente 2 h e 24 h). As células BME26 foram utilizadas entre as passagens 40 a 60. Os resultados representados nesta tese foram feitos com no mínimo três experimentos independentes.

#### **4.1.1- Preparo do meio Leibovitz L-15 para Células BME26**

O meio Leibovitz L-15 (Sigma-Aldrich, #L4386) é suplementado com aminoácidos, glicose, sais minerais e vitaminas, detalhados no ANEXO 1, de acordo com (MUNDERLOH E KURTTI, 1989). O meio foi diluído em água estéril (3: 1) e depois adicionados 10% de caldo triptose fosfato (Sigma-Aldrich, #T8782), 10% de soro fetal bovino (Nutricell®, inativado por aquecimento) e Penicilina/ Estreptomicina a 100 U/mL e 100  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Gibco, #15140122). As células foram mantidas a 34 °C, com meio de cultura substituído semanalmente.

#### **4.2- Linhagens celulares usadas para testes comparativos de suscetibilidade ao $\text{H}_2\text{O}_2$**

Tanto a linhagem Aag2 (cultura contínua de células embrionárias de *Aedes aegypti*) quanto as células Schneider 2; células S2 (cultura contínua de células embrionárias de *Drosophila melanogaster*) foram mantidas em meio Schneider 2 com L-glutamina (Gibco, #21720024) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell®, inativado por aquecimento) e Penicilina / Estreptomicina (Gibco, #15140122) a 100 U/mL e 100  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. As células foram mantidas a 28 °C, com troca de meio de cultura 2-3 vezes por semana. Para o experimento, as células foram plaqueadas em  $5 \times 10^5$  células por poço em uma placa de 24 poços em 500  $\mu\text{L}$  de meio.

As placas de 24 poços com células de mamífero foram fornecidas pelo setor de cultura celular do Instituto Carlos Chagas Filho de Biofísica - UFRJ apenas para a realização do teste comparativo de suscetibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por tanto, as células epiteliais renais do macaco Rhesus (linhagem contínua LLC-MK2) foram mantidas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> no meio Dulbecco's modified Eagle's (DME) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Para os experimentos, as células tripsinizadas e ressuspensas foram contadas e plaqueadas em 4x10<sup>5</sup> células por poço em uma placa de 24 poços em 500 µL de meio. Macrófagos peritoneais foram obtidos por lavagem intraperitoneal de ratos C57Black/6. Para os experimentos, as células ressuspensas foram contadas e plaqueadas em 8x10<sup>4</sup> células por poço em placa de 24 poços com 500 µL de meio.

Para verificar a suscetibilidade celular, o tratamento foi realizado com uma adição única de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em concentrações indicadas de 62 µM a 1000 µM. E a viabilidade celular foi verificada 24 horas após o tratamento.

### **4.3- Ensaio de Viabilidade Celular**

A viabilidade celular foi determinada utilizando hemocitometro Neubauer pela técnica de exclusão de células mortas marcadas pelo corante Azul de Tripán (Trypan Blue 0,04% - Sigma-Aldrich) por método manual (CADENA-HERRERA et al., 2015). Após o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as placas de 24 poços com células foram cuidadosamente lavadas com 0,5 mL de PBS pH 7,0. E descoladas em 1 ml solução de tripsina com azul de tripan, na proporção de 3,5 mL de PBS pH 7,0, para 1 mL de tripsina (2,5%, sem fenol red, #15090046) e 0,5 mL de azul de tripan 0,4% (Sigma-Aldrich). E então, 10 µL da mistura foram adicionados em cada câmara do hemocitometro. O procedimento experimental e o cálculo foram realizados de acordo com a metodologia padrão (John M. Walker, 2013), focando nas regiões de grade de 1x1mm de dimensão usando a objetiva de 10x foi feita imagens usando a câmera AxioCam 503 color acoplada no microscópio Axio Imager 2 (zeiss). E as células foram contadas pelo ImageJ no plugin cell counter contagem manual (FERREIRA E RASBAND, 2012).

Outro ensaio de viabilidade celular foi realizado utilizando o ensaio MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Resumidamente, após o

tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o meio foi substituído, em 0,5 mL de novo meio foram adicionados em cada poço 50 µL de MTT (5 mg/mL em PBS). Após 2 h de incubação a 34 °C, o meio foi completamente descartado e adicionou-se 1 mL de álcool ácido-isopropílico (0,15% de HCl em álcool isopropílico) para dissolver cristais de formazan. A mistura foi transferida para tubos de 1,5 mL e centrifugada (centrifuga hettich-universal320) a 6000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante transparente foi recolhido para medições de absorbância a 570 nm, espectrofotometro UVmini-1240 UV-Vis Shimadzu (Kyoto, Japão). Os valores de absorbância do controle (células sem tratamento) foram utilizados para a normalização (viabilidade 100%) (ABREU et al., 2013).

#### **4.4- Análise da Morfologia Celular**

##### **4.4.1- Marcação com Hoestch e Phalloidina**

Após o tratamento as células plaqueadas em placa 24 poços sobre lamínula redonda no fundo de cada poço foram lavadas 2 vezes com PBS pH 7,0 e fixadas em 4% de solução paraformaldeído por 20 minutos a temperatura ambiente. Após 2 lavagens, as células foram incubadas com a solução de acetona a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, e então lavadas 5 vezes com PBS pH 7,0. As células foram incubadas com a solução preparada no uso 165 nM Texas Red Phalloidin (Molecular Probes) por 20 minutos, no escuro, a 34°C, seguido de mais 5 minutos com 25 µg/mL de Hoestch 33342 (Aldrich Chem), em temperatura ambiente. Após serem lavadas mais 2 vezes as lamínulas foram preparadas em lâminas com glicerol para serem observadas. As imagens foram feitas no microscópio confocal Zeiss LSM710, utilizando objetiva com aumento de 40x (Water Plan-Apochromat 40x/1.0 DIC), através do programa ZEN 2.3 (black edition).

##### **4.4.2- Coloração com Panótico**

Após o tratamento as células plaqueadas em placa 24 poços sobre lamínula redonda no fundo de cada poço foram lavadas 1x com PBS pH 7,0. A coloração por panótico foi feita de acordo com o fabricante (Laborclin, #620529), um kit para rápida

coloração de células. As células foram incubadas por 1 minuto na solução-1 (triarilmetano a 0,1%) e 1 minuto na solução-2 (xantenos a 0,1%). Após 2 lavagens com água destilada as células foram incubadas por 3 minutos na solução-3 (tiazinas a 0,1%) e lavadas 3 vezes em água destilada. As lâminas foram preparadas em glicerol para serem observadas. As imagens de microscopia foram capturadas em campo claro usando o microscópio de luz polarizada Axio Scope.A1, Zeiss através do software Blue Zeiss.

#### **4.5- Determinação do nível de ROS intracelular com DHE**

Foi utilizado a sonda DHE (Dihydroethidine; Sigma-Aldrich, #D7008) para verificar geração *in situ* de ROS. Após o tratamento as células plaqueadas em placa 24 poços sobre lamínula redonda no fundo de cada poço foram lavadas 2x com PBS pH 7,0. E incubadas durante 15 minutos com 300µL de solução de DHE 50 µM em PBS, no escuro, sob leve agitação. As células foram fixadas durante 20 minutos com paraformaldeído 4% após a marcação. As lamínulas foram lavadas 2x com PBS pH 7,0 e preparadas em glicerol para serem observadas. A aquisição das fotos foi feita utilizando-se o microscópio confocal Zeiss LSM710, com objetiva aumento de 40x (Water Plan-Apochromat 40x/1.0 DIC), através do programa ZEN 2.3 (black edition) (excitação 450-490nm/ emissão 515-565nm). A quantificação da Intensidade média de Fluorescência (I.F.) por área da célula em mm<sup>2</sup>, foi calculada pelo software ZEN 2.3 (Blue edition) da Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011. A sonda DHE é um marcador fluorogênico que tem sido usado por mais de 15 anos na detecção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular. DHE ao interagir com ROS forma dois produtos, o dihidroetídio e o etídio, e o aumento na fluorescência vermelha é atribuído à formação desses produtos (ZHAO et al., 2003).

#### **4.6- MitoSOX™-Red Indicador de superóxido mitochondrial para imagens de células vivas**

Foi utilizado a sonda fluorescente MitoSOX (Molecular probes, #M36008) para verificar geração do superóxido mitocondrial em células vivas, todo o procedimento

foi realizado de acordo com o fabricante. Após o tratamento, células aderentes na lamínula da placa (de tipo Petri para microscopia confocal) foram lavadas 2x com 500µL de solução HBSS (preparada conforme recomendado pelo fabricante). E então incubadas com 500µL de Mitosox 5µM, diluídas em solução HBSS, durante 10 minutos, a 34 °C, no escuro. Após três lavagens com solução HBSS, as células foram observadas em microscopia confocal. A aquisição das fotos foi feita utilizando-se o microscópio confocal Zeiss LSM710, com objetiva aumento de 63x (LD plan-neofluar 63x /1.0 DIC), através do programa ZEN 2.3 (black edition)

#### **4.7- Ensaio de entrada de glicose na célula (2-NBDG)**

Análogo fluorescente de D-glicose, 2-NBDG (2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-d-glucose) (Molecular probes, #N13195) foi utilizado como um indicador para medição direta da absorção de glicose pela célula BME26 (ZOU, WANG E SHEN, 2005). As células foram aderidas na lamínula da placa de tipo Petri para microscopia confocal, durante 24h, no meio completo como descrito acima. No dia seguinte, as células foram lavadas 2x com 500µL de meio L15 sem suplementação de glicose (ANEXO 1). As células foram incubadas em 500µL de meio L15 sem suplementação de glicose durante 2 h com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 2,2mM ou 4,4mM. Nos últimos 15 minutos de incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi diluído 100 µM do análogo de glicose 2-NBDG, a 34 °C, no escuro. Após 2 lavagens com 500µL de meio L15 sem suplementação de glicose, as células foram observadas vivas em microscopia confocal (Ex. 488 nm; ~Em. 520 nm). Um adicional controle positivo do ensaio de entrada do análogo de glicose, 2-NBDG, foi feito pelo uso de insulina. Durante 1 h de incubação na presença ou ausência de 1 mM de insulina em meio L15 (sem glicose) com 100 µM de 2-NBDG. A aquisição das fotos foi feita utilizando-se o microscópio confocal Zeiss LSM710, objetiva no aumento de 40x (Water Plan-Apochromat 40x/1.0 DIC), através do programa ZEN 2.3 (black edition). A quantificação da Intensidade média de Fluorescência (I.F.) por área da célula em mm<sup>2</sup>, foi calculada pelo software ZEN 2.3 (Blue edition) da Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011.

#### 4.8- Imunolocalização Ki67 ou GS-total ou GSP (SER641)

Após o tratamento as células plaqueadas em placa 24 poços sobre lamínula redonda no fundo de cada poço foram lavadas 2 vezes com PBS pH 7,0 e fixadas em 4% de solução paraformaldeído (em PBS pH 7,0) por 25 minutos a temperatura ambiente, em seguida lavadas 2 vezes com PBS pH 7,0. A permeabilização foi feita em acetona absoluta a  $\leq -20$  °C, durante 5 minutos, e lavadas com PBS por 5x. As células foram incubadas durante 1 hora com 1% de BSA (diluída em PBS, solução de bloqueio) seguido por uma incubação de 16 horas (*over night*) com os respectivos anticorpos primários: Anticorpo anti-Ki67 (Abcam, #ab15580); ou anticorpo anti-Glicogênio-Sintase (Cell signaling, #3893); ou anticorpo anti-Fosfo-Glicogênio-Sintase (Ser641) (Cell signaling, #3891), diluídos 1:200, em solução de bloqueio. Depois disso, as células foram lavadas 3 vezes, incubadas com o anticorpo secundário IgG anti-coelho conjugado-Alexa Fluor 555, Ex: 555nm, Em: 565nm (Cell Signaling, #4413), diluído 1:1000 em solução de bloqueio, durante 2 horas, seguido da incubação com DAPI (1  $\mu\text{g}$  / mL) por 15 min. As lâminas foram preparadas em glicerol, após 2 lavagens, e observados por microscopia. A aquisição das fotos foi feita utilizando-se o microscópio confocal Zeiss LSM710, objetiva no aumento de 40x (Water Plan-Apochromat 40x/1.0 DIC), através do programa ZEN 2.3 (black edition). Para a marcação de Ki67, as células foram contadas pelo contador de células do plugin ImageJ, Manual Counting (FERREIRA E RASBAND, 2012). Entre os núcleos marcados com anti-Ki67 (marcação vermelha) foram separados os graus de intensidade (suave e intensa identificados nas figuras por asteriscos e setas, respectivamente) da marcação (proteína Ki67) e por núcleo total para normalização de 100% (corados com DAPI).

#### 4.9- Marcação e quantificação de glicogênio

Para marcar glicídios foi desenvolvida a técnica histoquímica do ácido periódico-Schiff (periodic acid-Schiff), abreviadamente PAS. Estruturas ricas em açúcares assumem uma coloração magenta (violeta/avermelhada) após serem submetidas ao PAS. Após o tratamento as células plaqueadas em placa 24 poços sobre lamínula redonda no fundo de cada poço foram lavadas 2 vezes com PBS pH

7,0 e fixadas em 4% de solução paraformaldeído (em PBS pH 7,0) por 25 minutos a temperatura ambiente, em seguida lavadas 5 vezes com PBS pH 7,0. Os carboidratos das células fixadas foram oxidados na solução de ácido periódico por 5 minutos, em seguida lavado em água corrente 2 vezes com água destilada. Seguido da incubação com 300 $\mu$ L do reagente Schiff por 5 minutos. E então lavado em água corrente por 10 minutos. Para localização do núcleo algumas lamina foram escolhidas para marcação com solução de hematoxilina de Harris por 6 minutos. E novamente lavado com água de corrente por 5 minutos. Para montagem as lamina foram desidratadas e clarificadas através de etanol 95%, etanol absoluto, e xileno; 2 trocas de 2 minutos em cada. E montadas em resina (Entelan). As imagens de microscopia foram capturadas em campo claro usando o microscópio de luz polarizada Axio Scope.A1, Zeiss através do software Blue Zeiss.

Para a quantificação de glicogênio, após o tratamento, as células foram lavadas 1x com PBS, e ressuspensa em 1000  $\mu$ L de PBS. E então foi separado 20  $\mu$ L para contagem celular, 10  $\mu$ L foi adicionado em cada lado da câmara Neubauer, o procedimento experimental e o cálculo foram realizados de acordo com a metodologia padrão (JOHN M. WALKER, 2013). Após a contagem de cada poço, os 980  $\mu$ L restantes, foram centrifugados em ependorfs, por 15 minutos de centrifugação (centrifuga hettich-universal320) a 6000 rpm 15 °C, o sobrenadante foi descartado. O pelete de células (em triplicatas) foram lisados em 250  $\mu$ L do tampão de lise (preparado com 980  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,8; 10  $\mu$ L de Triton-X100, concentração final de 0,1%; 10  $\mu$ L de coquetel de inibidores de proteases - Sigma aldrich #P8340). E então o homogenato foi para o vortex por 10 segundo, depois passado 20 vezes pela seringa de 1ml com agulha de 26G, para lise mecânica das células. Em triplicatas para cada condição nos tubos de ensaio, 40  $\mu$ L do homogenato foi incubado com 1 unidade de  $\alpha$ -amiloglucosidase (e triplicatas sem  $\alpha$ -amiloglucosidase, condições de controle, para determinar nível basal de glicose e subtraído das condições de teste), em tampão acetato (200 mM, pH 4,8) no volume final de 200  $\mu$ L, durante 4 h a 40 °C. A reação foi parada com 300  $\mu$ L de PBS gelado (pH 7,4). A glicose liberada foi detectada com um kit comercial para concentração de glicose (Glucox®, Doles) a 510 nm. Conteúdo de glicogênio foi determinado usando uma curva padrão de glicogênio submetida às mesmas condições, e normalizado pelo número de células.

## **4.10- Atividades Enzimáticas em células BME26**

### **4.10.1- Atividade da Catalase (CAT)**

Após o tratamento com  $H_2O_2$ , as células plaqueadas em placa 24 poços foram lavadas duas vezes com 500  $\mu$ l de PBS pH 7,0 e descoladas em PBS. Células de cada poço ressuspendidas foram transferidas para um tubo eppendorf identificado e centrifugado (centrífuga universal Hettich 320) a 6000 rpm durante 15 minutos a 15 °C. Três tubos eppendorf com o mesmo tratamento foram reunidos e lisados em 200  $\mu$ l do tampão de lise: preparado com 980  $\mu$ L do tampão de reação usado na atividade específica de cada enzima; 10  $\mu$ l de Triton-X100 (na concentração final de 0,1%); 10  $\mu$ L de coquetel de inibidores de proteases (Sigma aldrich #P8340). O homogeneizado foi misturado por vortex durante 10 segundos, seguido de lise mecânica passando 20 vezes pela seringa de 1 ml com agulha 26G. O lisado celular foi centrifugado (centrífuga universal Hettich 320) para remover debris de células não lisadas a 6000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi coletado em um novo tubo eppendorf, sempre mantido em gelo antes dos ensaios de atividades.

Em seguida, 50  $\mu$ l de lisado celular foi utilizado para o ensaio de atividade de catalase em 420  $\mu$ l de tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 e 230  $\mu$ l de  $H_2O_2$  60 mM. A atividade do CAT foi determinada espectrofotometricamente (UVmini-1240 UV-Vis Shimadzu - Kyoto, Japão) monitorando a absorbância a 240 nm, a 25 °C. A taxa de reação foi determinada pelo consumo de  $H_2O_2$  por minuto, onde uma unidade de enzima é a quantidade necessária para converter 1 mol de  $H_2O_2$  em  $H_2O + O_2$ . A atividade enzimática foi normalizada com base na quantificação total da proteína, U / mg de proteína total. Após a normalização por proteína, a atividade foi calculada ajustando cada atividade da condição controle como 100%. A atividade enzimática foi expressa em porcentagem.

### **4.10.2- Atividade da Glicose-6-fosfato Desidrogenase (G6PDH)**

As amostras foram preparadas como descrito acima na atividade de catalase. A atividade de G6PDH foi medida em tampão Tris-HCl 55 mM contendo



MgCl<sub>2</sub> 3,3 mM pH 7,8; 3,5 mM de glicose-6-fosfato e 2 mM de β-NADP<sup>+</sup>, em 700 μl de volume final. A reacção foi iniciada com 30 μl de adição de lisado de células homogeneizadas. A formação de β-NADPH foi monitorada por espectrofotometria a 340 nm, 30 °C (UVmini-1240 UV-Vis Shimadzu - Kyoto, Japão) durante 7 minutos, utilizando um coeficiente de extinção molar de 6,22 M<sup>-1</sup>. A atividade enzimática foi normalizada com base na quantificação total da proteína, U / mg de proteína total. Após a normalização por proteína, a atividade foi calculada ajustando cada atividade da condição controle como 100%. A atividade enzimática foi expressa em porcentagem.

#### **4.10.3- Atividade da Isocitrato Desidrogenase (IDH)**

As amostras foram preparadas como descrito acima na atividade de catalase. A atividade de IDH-NADP<sup>+</sup> foi medida em tampão MOPS 50 mM, contendo 4 mM de MgCl<sub>2</sub> a pH 8,0; 3,5 mM de isocitrato e 2 mM de β-NADP<sup>+</sup>, em 700 μl de volume final. A reacção foi iniciada com 30 μl de adição de lisado de células homogeneizadas. A formação de β-NADPH foi monitorada por espectrofotometria a 340 nm, 30 °C (UVmini-1240 UV-Vis Shimadzu - Kyoto, Japão) durante 7 minutos, utilizando um coeficiente de extinção molar de 6,22 M<sup>-1</sup>. A atividade enzimática foi normalizada com base na quantificação total da proteína, U / mg de proteína total. Após a normalização por proteína, a atividade foi calculada ajustando cada atividade da condição controle como 100%. A atividade enzimática foi expressa em porcentagem.

#### **4.10.4- Atividade da Enzima Málica (EM)**

As amostras foram preparadas como descrito para a atividade de catalase. A atividade da enzima málica foi medida em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 contendo MnCl<sub>2</sub> 1 mM, L-malato 3,5 mM e NADP<sup>+</sup> 2 mM. O NADPH foi medido por espectrofotometria a 340 nm, 30 °C (UVmini-1240 UV-Vis Shimadzu - Kyoto, Japão) durante 7 minutos, utilizando um coeficiente de extinção molar de 6,22 M<sup>-1</sup>. A atividade enzimática foi normalizada com base na quantificação total da proteína, U /

mg de proteína total. Após a normalização por proteína, a atividade foi calculada ajustando cada atividade da condição controle como 100%. A atividade enzimática foi expressa em porcentagem.

#### **4.10.5- Atividade de Hexoquinase (HK)**

As amostras foram preparadas como descrito para a atividade de catalase. 30  $\mu$ l do homogeneizado da lise celular, foram usados no ensaio de atividade de HK em tampão Tris-HCl 20 mM a pH 7,5 contendo  $MgCl_2$  6 mM, ATP 1 mM,  $NAD^+$  0,5 mM e NaF 10 mM. A reação enzimática foi iniciada com 2 mM de glicose. A glicose 6-fosfato produzida foi medida indiretamente adicionando um volume igual de 1 unidade / mL de glicose-6-fosfato desidrogenase de *Leuconostoc mesenteroides* e 0,3 mM de  $\beta$ - $NAD^+$ , em 700  $\mu$ l de volume final. A produção de  $\beta$ -NADH foi determinada a 340 nm, 30 °C (UVmini-1240 UV-Vis Shimadzu - Kyoto, Japão) utilizando um coeficiente de extinção molar de 6,22  $M^{-1}$ , conforme descrito anteriormente (da SILVA et al., 2015). A atividade enzimática foi normalizada com base na quantificação total da proteína, U / mg de proteína total. Após a normalização por proteína, a atividade foi calculada ajustando cada atividade da condição controle como 100%. A atividade enzimática foi expressa em porcentagem.

#### **4.10.6- Atividade de Piruvato kinase (PK)**

O preparo de amostras foi feito de acordo com o descrito em atividade de catalase. A atividade de PK utilizando 30  $\mu$ l de homogeneizado foi medida em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5,  $MgCl_2$  5 mM, ADP 1 mM, NADH 0,4 mM e 1 U / mL de lactato desidrogenase e a reação foi iniciada com fosfoenolpiruvato 1 mM, em 700  $\mu$ l volume final. O consumo de  $\beta$ -NADH foi avaliado por espectrofotometria (UVmini-1240 UV-Vis Shimadzu - Kyoto, Japão) a 340 nm, 25 °C. Usando um coeficiente de extinção molar de 6,22  $M^{-1}$ , conforme descrito anteriormente (da SILVA et al., 2015). A atividade enzimática foi normalizada com base na quantificação total da proteína, U / mg de proteína total. Após a normalização por

proteína, a atividade foi calculada ajustando cada atividade da condição controle como 100%. A atividade enzimática foi expressa em porcentagem.

#### 4.10.7- Atividade de Peroxidases por Amplex Red

Após o tratamento,  $2 \times 10^6$  células foram lavadas e ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de PBS pH 7,0. A suspensão celular foi transferida e identificadas em tubo tipo eppendorf de 1,5 mL foi centrifugada a 6000 rpm durante 10 minutos, 15 °C (centrífuga universal de Hettich 320). Depois que o sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas foram suspensas em 250  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (100  $\mu\text{L}$  de aminotriazole 20 mM (Sigma-aldrich #A8056), 10  $\mu\text{L}$  de coquetel de inibidores de proteases (Sigma-aldrich #P8340) e tampão de reação do kit AmplexRed (Invitrogen # A22188), para volume final de 1 mL). O homogeneizado foi misturado por vortex durante 10 segundos, seguido de lise mecânica passando 20 vezes pela seringa de 1 ml com agulha 26G. O lisado celular foi centrifugado (centrífuga universal Hettich 320) para remover debris de células não lisadas a 6000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi coletado em um novo tubo eppendorf, sempre mantido em gelo antes dos ensaios de atividade. Todo o procedimento seguido foi realizado de acordo com o fabricante para o Ensaio de Peroxidase (kit AmplexRed Invitrogen #A22188). Uma curva padrão foi preparada com concentrações da peroxidase horseradish peroxidase (HRP) de 0 a 6 mU / mL, em 50  $\mu\text{L}$ . As amostras de cada tratamento foram preparadas em triplicata, sendo que 50  $\mu\text{L}$  de cada homogeneizado foram diluídos no tampão de reação do kit fornecido. As reações contendo reagente AmplexRed 50  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM e HRP (no caso da curva padrão) ou amostras no tampão de reação foram incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente. A absorbância a 560 nm foi então medida usando o espectrofotômetro de microplacas Thermo Scientific Multiskan GO UV/Vis. O *'background'* foi determinado a partir de uma reação de controle na ausência de enzima, e subtraído de cada valor. A normalização dos resultados foi feita com base na quantificação total da proteína. Após a normalização por proteína, a atividade foi calculada definindo cada atividade de controle como 100%.

#### **4.10.8- Determinação de Proteínas**

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o protocolo do fabricante do Kit de Bicinchoninic Acid (Sigma-aldrich Produto # BCA-1), utilizando albumina bovina como padrão.

#### **4.11- Consumo de Oxigênio**

O tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi feito diretamente em garrafas de cultura celular (com quantidade inicial de células normalizadas conforme descrito em 4.1) e incubado por diferentes tempos a 34 °C. Após o tratamento, o meio foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com 2 mL de PBS pH 7,0 e ressuspensas em 2 ml de PBS pH 7,0. As células foram contadas em câmara de Neubauer (CADENA-HERRERA et al., 2015) e 10<sup>7</sup> células em 1 mL de PBS foram adicionadas na cubeta do oxígrafo. O oxigênio total consumido pelas células BME26 após o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, medido por 10 minutos, foi determinado usando um eletrodo de tipo Clark (por eletrodo de fase líquida Oxytherm, Hansatech Instruments Ltd). O processo de calibração foi executado usando o tampão PBS completo saturado de ar a 28 °C como 100%. As medições foram realizadas em 1,5 mL de PBS pH 7,0 e a taxa de consumo de oxigênio foi calculada em  $\mu\text{mol O}_2 / \text{minuto} / 10^7$  células. Uma solução contendo KCN 7 mM para inibir a citocromo oxidase foi utilizada como controle negativo para confirmar a respiração celular. Três ensaios foram realizados utilizando  $1 \times 10^7$  células / mL para três experimentos independentes em triplicata.

#### **4.12- Quantificação de NADPH**

As amostras foram preparadas como descrito acima para a atividade de catalase. O lisado celular foi utilizado para o ensaio de quantificação usando o Kit de Quantificação NADP/NADPH (Sigma Aldrich). A quantificação de NADPH nas amostras foi determinada espectrofotometricamente monitorando a absorbância a 450 nm de acordo com o protocolo do fabricante.

#### 4.13- Extração de RNA e quantificação relativa de transcrição de genes por PCR em tempo real

Após os tratamentos o RNA total foi extraído de células BME26 a partir de placas de 24 poços utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Um micrograma de RNA total foi transcrito reversa usando o kit Transcription reverso-M-MLV de alta capacidade cDNA (Takara Biotechnology, Shiga, Japão). A transcrição relativa foi analisada com molde de cDNA em uma PCR quantitativa usando a plataforma LightCycler 480 II (Roche, Mannheim, Alemanha) e os *primers* descritos no ANEXO 2. Diluições em série do cDNA foram utilizadas para construir uma curva de calibração. As eficiências de reação entre 85% e 100% foram determinadas a partir de curvas de calibração para cada conjunto de primers em reações de 10 µL. O gene de *R. microplus* elongation factor-alpha (Elf1A) foi utilizado como gene de referência (NIJHOF et al., 2009) para normalizar as reações. cDNA controle foi obtido de células BME26 não tratadas, utilizado como um calibrador para os ensaios. Para a expressão relativa dos calibradores foi atribuído o valor de 1 unidade. As análises estatísticas (média e desvio padrão) foram realizadas em dados de três experimentos independentes. A expressão relativa foi determinada usando valores de Cp de cada corrida na tabela do software Relative Expression Software Tool (PFAFFL, 2001). Para a confirmação do silenciamento genico de G6PDH por PCR-tempo real, 1 µg de RNA total foi usado para transcrição reversa com o kit High Capacity cDNA Reverse transcription (Invitrogen, USA). Transcrição relativa foi analisada usando cDNA como modelo para PCR quantitativo (qPCR) na plataforma StepOne Plus (Applied Biosciences).

As sequências de genes para Isocitrato Desidrogenase-NADP<sup>+</sup> (NADP-ICDH) e catalase (CAT) de diferentes espécies foram buscadas no banco de dados GenBank e usadas para realizar uma pesquisa BLAST no banco de dados do transcriptoma de *R. microplus*, gerado pela plataforma de sequenciamento Illumina Solexa (BioProject ID PRJNA232001 no banco de dados Transcriptome Shotgun Assembly (TSA), GenBank). As demais sequências do gene de *R. microplus* utilizadas nesta tese foram obtidas de GenBank. Os primers específicos para os

genes foram projetados com base nessas seqüências de *R. microplus* (ver ANEXO 2).

#### **4.14- Síntese e adição de RNA de cadeia dupla (dsRNA) em células BME26 (Silenciamento gênico por RNAi)**

Os Primers de oligonucleotídeos contendo sequência promotora de T7 foram sintetizados para a transcrição e síntese *in vitro* de dsRNA utilizando o Kit RiboMAX™ Express RNAi System (Promega, Madison, WI, EUA). O cDNA das células BME26 foi utilizado para a síntese de dsRNA, utilizando os primers listados no ANEXO 2. 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 eletroforese em gel de agarose para verificar a integridade e não degradação. Uma sequência de dsRNA não relacionado para GFP foi usada como controle negativo para o experimento de silenciamento induzido por RNAi. O tamanho do complexo sintetizado de dsRNA G6PDH foi de 553 pb.

O RNA de cadeia dupla foi aplicado conforme descrito anteriormente (ABREU et al., 2013). Após a aderência das células BME26 plaqueadas em placas de 24 poços foram adicionados 4 µg de dsRNA em 200 µL de meio por poço. Após 24 h de incubação, adicionaram-se 300 µL de meio completo a cada poço, e as placas foram incubadas a 34 °C por mais 48 h. Neste ponto (3 dias após a adição de dsRNA), as células foram coletadas para ensaios. O silenciamento do gene G6PDH foi confirmado por RT-qPCR (PCR quantitativo em tempo real), bem como pelo ensaio da atividade enzimática. Para verificar a persistência do silenciamento do gene G6PDH após os 3 dias iniciais, o meio de cultura foi totalmente substituído por 500 µL de meio completo e incubado por mais 72 h. As células foram então coletadas para analisar a atividade enzimática de G6PDH (ensaio de exposição prolongada, 6 dias após a adição de dsRNA). Para o desafio com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, células BME26 (3 dias após a adição de dsRNA) tiveram seu meio substituído (500 µL) e foram tratados com uma única adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 2,2 mM ou 4,4 mM. A viabilidade celular foi medida após 24 h de incubação.

#### 4.15- Análise estatística

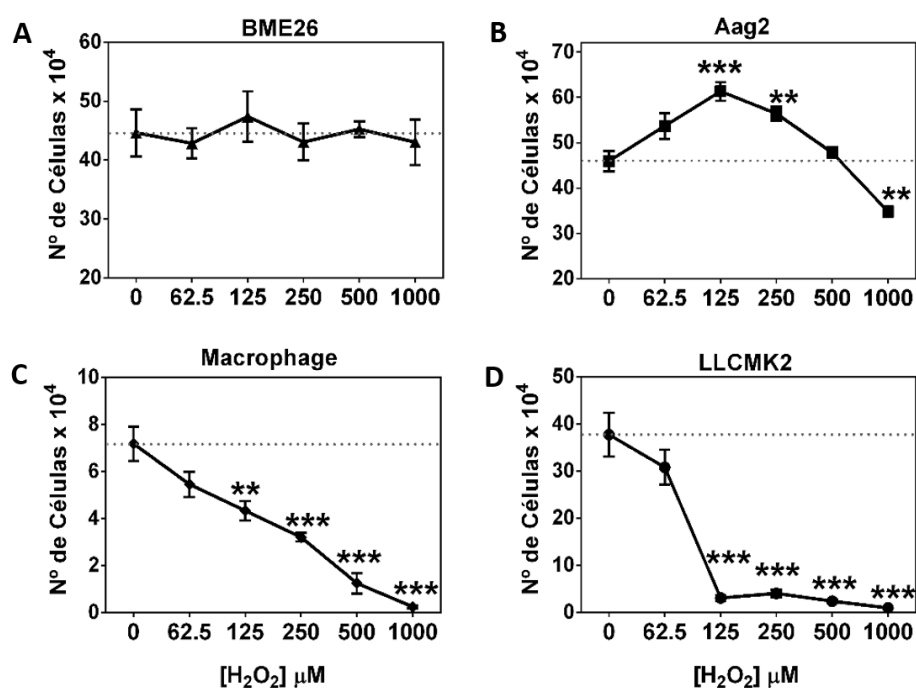
Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, para obter a média. Todos os valores são expressos como média  $\pm$  S.D. Os dados foram verificados para distribuição normal, usando o teste de Shapiro-Wilk. Quando a normalidade foi confirmada, a significância estatística foi avaliada por ANOVA unidirecional e bidirecional para determinar diferenças significativas entre os grupos. O teste de Tukey foi usado para comparar dados entre grupos. A significância foi estabelecida em \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$ . n.s., não significativo (Comparado com controle); e # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.0001$  (Comparado dentro da mesma concentração, entre os diferentes tempos 2 e 24 horas)

A análise das imagens foi feita com base em três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais (lamínulas). Três ou mais imagens de cada repetição foram gravadas por microscópio confocal de varredura laser LSM 710, Zeiss. Para análises de imagens, a média de intensidade de fluorescência (IF) por área celular em  $\text{mm}^2$  foi calculada usando o software ZEN 2.3 (edição blue) da Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011, ou para a contagem de células e núcleos foi realizada usando o plugin Cell Counter no software ImageJ. Os cálculos de porcentagem, bem como as análises estatísticas e gráficas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 6.

## 5. RESULTADOS

### 5.1- Perfil de tolerância das Células BME26 ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Sobrevivência e Proliferação.

O papel do peróxido de hidrogênio no perfil de sobrevivência celular foi comparado entre 4 tipos celulares diferentes. A linhagem BME26 exibiu alta tolerância à exposição entre 62,5 - 1000  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, assim como foi também observado uma determinada tolerância ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na linhagem celular embrionária de *Aedes aegypti*, Aag2. Ambas as linhagens celulares de artrópodos (BME26 e Aag2) apresentaram uma maior tolerância ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em comparação às células de mamíferos testadas: as células de macrófagos de camundongos BLACK6 (cultura primária), e células epiteliais renais do macaco Rhesus (LLCMK2) (Fig. 8A-D).

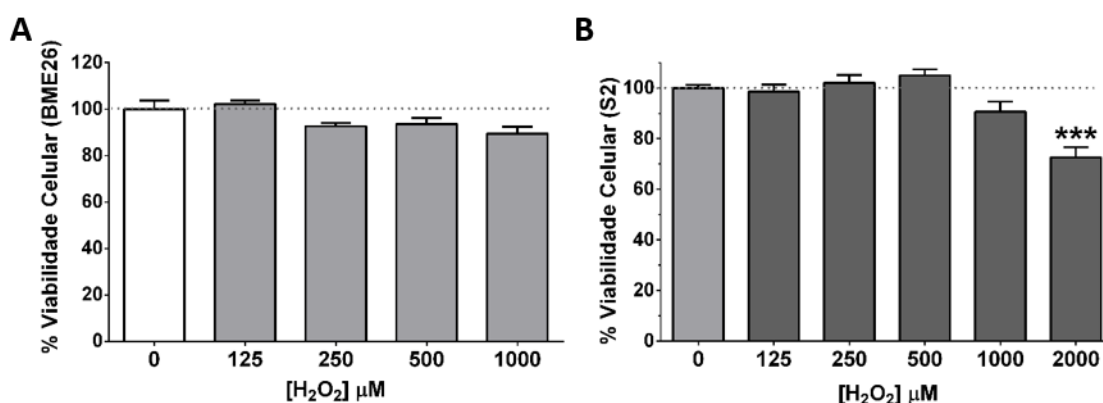


**Fig. 8: Tolerância ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes linhagens de células.** A viabilidade celular foi comparada em quatro tipos de células diferentes após 24h com concentrações crescentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (62,5  $\mu$ M - 1000  $\mu$ M). (A) Linhagem de célula embrionária do carrapato *Rhipicephalus microplus* (BME26); (B) linhagem de células embrionárias *Aedes aegypti* (Aag2); (C) células de macrófagos de camundongo BLACK6 (cultura primária); (D) células epiteliais renais de macaco Rhesus (LLMCK2). A linha pontilhada demonstra o controle, sem adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100% das células). Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas



independentes em três repetições experimentais cada, onde \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ , comparado ao controle; no teste de comparações múltiplas de Tukey.

Em ambas as células de mamífero testadas o  $H_2O_2$  induz efeitos citotóxicos promovendo redução na viabilidade celular, atingindo a  $DL_{50}$  na concentração entre 125 -250  $\mu M$   $H_2O_2$  (Fig. 8C e D). Contudo, as células Aag2 exibem um aumento do número de células com um pico de aproximadamente 30% na faixa de concentração 125 - 250  $\mu M$   $H_2O_2$ , e somente na maior concentração testada (1mM) o  $H_2O_2$  foi letal a 20% das células Aag2 (Fig.8B). Já para a BME26, na mesma faixa de concentração entre 62,5 -1000  $\mu M$   $H_2O_2$  não houve alteração na viabilidade comparando com controle, quando analisados por métodos utilizados para examinar a viabilidade celular, seja pelo método de contagem com exclusão por azul de tripan (Fig. 8A) como por análise de MTT (Fig. 9A)



**Fig. 9: Tolerância ao  $H_2O_2$  em BME26 e S2.**

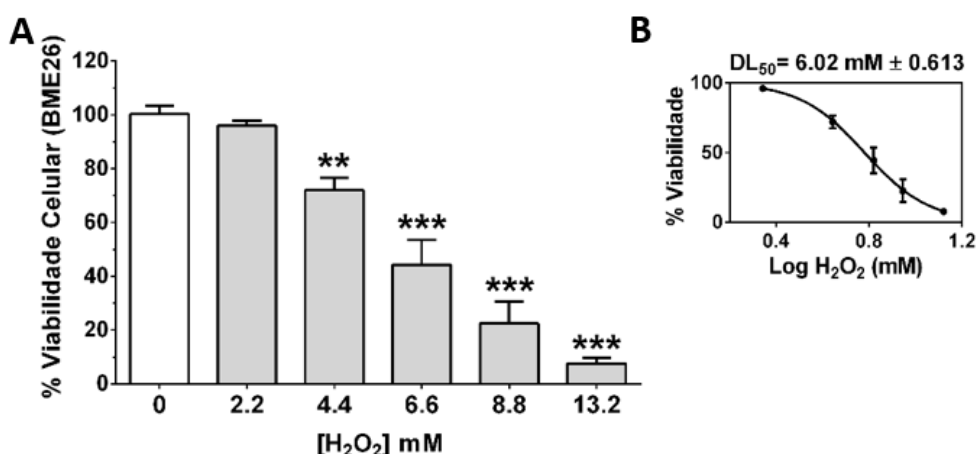
(A) Viabilidade celular por MTT após 24h tratamento com  $H_2O_2$  em BME26; e (B) linhagem celular *Drosophila Schneider 2* (S2). Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \*\*\*  $p < 0,0001$ ; comparado ao controle; no teste de comparações múltiplas de Tukey.

Em comparação, a linhagem de célula *Drosophila Schneider 2* (células S2) também não apresentou alteração na viabilidade na faixa de 125 -1000  $\mu M$   $H_2O_2$ , um resultado similar às células BME26. Observou-se uma queda na viabilidade de aproximadamente 20%, quando exposta a uma concentração de  $H_2O_2$  de 2000  $\mu M$  (2mM)  $H_2O_2$  (Fig. 9B).

Diante destes resultados, apesar das comparações adicionais com outras linhagens celulares, a investigação apenas com a linhagem de células BME26 foi

uma decisão para analisar a capacidade dessas células de tolerar a exposição de altas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Deste modo, o próximo passo foi evidenciar a susceptibilidade das células BME26 sob concentrações crescentes na escala de milimolar de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Após 24 horas de tratamento entre 2,2 - 13,2 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , observou-se a redução da viabilidade celular a partir de 4,4 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que foi progressiva até cerca de 90% de morte celular com 13,2 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig. 10A). A  $\text{DL}_{50}$  após 24h de exposição ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi de 6,0 mM (Fig. 10B). Assim, para avaliar os eventos bioquímicos e moleculares associados a tolerância das células BME26 ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ , foram estabelecidas uma concentração não letal de 2,2 mM e uma concentração de  $\text{DL}_{25}$  de 4,4 mM.

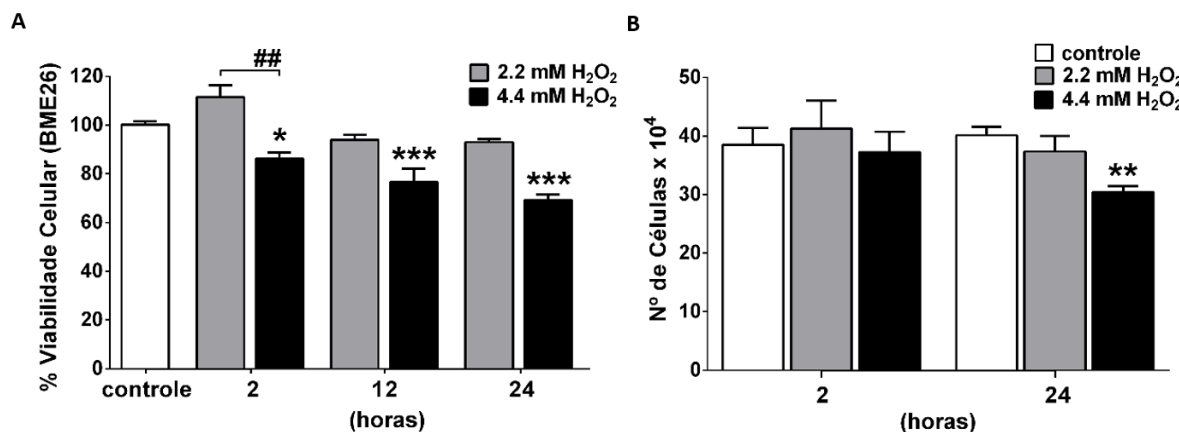


**Fig. 10: Perfil de susceptibilidade das células BME26 em miliMolar de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .**

(A) Viabilidade celular por MTT após 24h tratamento com  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2,2mM – 13.2 mM) em BME26; e (B)  $\text{DL}_{50}$  calculada de 6,02 mM. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; comparado ao controle; no teste de comparações múltiplas de Tukey.

A partir destas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (uma não letal e uma próxima à  $\text{DL}_{25}$ ) foi feito um curso temporal para avaliar a viabilidade das células BME26, sendo um tempo curto de 2h, e os tempos longos de 12 e 24h. Então observamos que os tratamentos promoveram pequenas alterações na viabilidade das células BME26 e por isso foram definidos dois tempos de tratamento, de 2 e 24h, para as futuras análises (Fig. 11). Tanto pelo ensaio de MTT, quanto pela contagem celular em hemocitômetro, o tratamento com 2,2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  não representou alterações significativas na viabilidade celular ao longo do intervalo observado. Já na

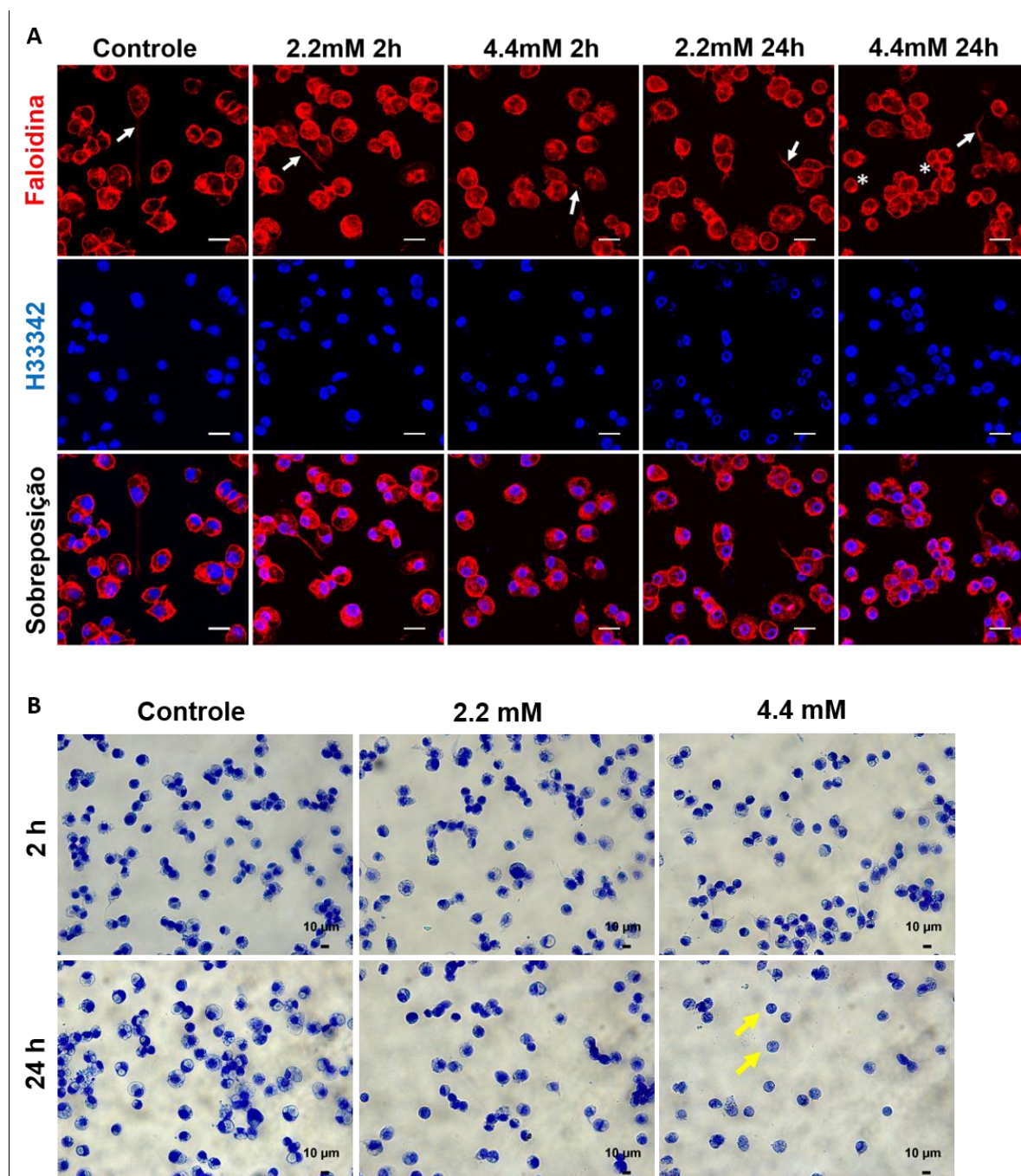
concentração de 4,4 mM de  $H_2O_2$  observou-se uma resposta dependente do tempo de tratamento (Fig. 11 A e B).



**Fig. 11: Perfil de viabilidade ao longo do tempo das células BME26 em miliMolar de  $H_2O_2$ .** (A) Viabilidade celular por MTT; (B) viabilidade celular por contagem em hemocitometro, nas concentrações de 2,2mM e 4,4mM, após 2, 12 e 24h de incubação com  $H_2O_2$ . Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ , comparado ao controle; e ##  $p < 0,01$  comparando diferentes concentrações em mesmo tempo, no teste de comparações múltiplas de Tukey.

Com o objetivo de compreender o comportamento das células BME26 frente ao tratamento de curta (2h) e longa (24hs) duração com  $H_2O_2$ , foi realizada a análise morfológica por microscopia em campo claro, e por fluorescência.

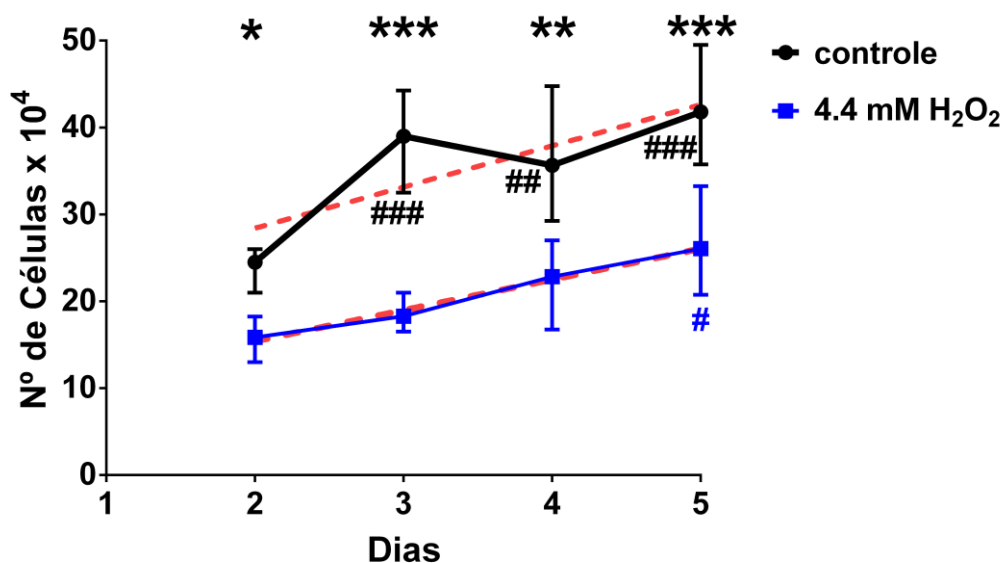
Através da marcação de filamentos de actina, observamos uma retração dos prolongamentos citosólicos (asterisco branco) em células BME26 tratadas com 4,4 mM de  $H_2O_2$  após 24h (Fig. 12A), assim como pela marcação com panótico (Fig 12B). Este fenômeno nos leva a dois possíveis eventos celulares: um correlaciona a retração celular com alterações morfológicas geralmente associadas à redução da viabilidade celular (RELLO et al., 2005); outro evento celular um pouco mais específico às linhagens de células de artrópodes, mostra que esse tipo de alteração morfológica pode estar relacionado a uma forma de adaptação destas células. Já que naturalmente apresentam dois ou mais tipos celulares, estaria ocorrendo uma redução do tipo celular com prolongamento ou uma transdiferenciação celular visando uma estratégia de sobrevivência ainda não descrita para estas células.



**Fig. 12: Alterações morfológicas após tratamento com  $H_2O_2$  em células BME26.**

(A) Morfologia das células BME26 observada pelo microscópio confocal de varredura a laser, LSM 710, Zeiss. Arquitetura do citoesqueleto e o núcleo das células BME26 foram visualizados usando os marcadores Phalloidin-Texas Red e Hoechst 33342, respectivamente. Setas brancas apontam os prolongamentos do tipo filopodia na marcação do citoesqueleto e os asteriscos brancos indicam as células mais arredondadas sem estes prolongamentos. Barra de escala: 10  $\mu$ m. (B) Exibição do aspecto morfológico por microscopia histológica com coloração por panótico. Setas amarelas apontam para o tamanho reduzido do citosol em 4,4mM após 24h. As imagens de microscopia foram capturadas no campo claro usando o microscópio de luz polarizada Axio Scope.A1, Zeiss, através do software Blue Zeiss. A análise das imagens foi feita com base em três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais, então três ou mais imagens foram capturadas de cada repetição.

Devido aos eventos mencionados anteriormente, e com o intuito de compreender futuros destinos destas células tolerantes ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  com relação à sua viabilidade, foi realizado um experimento com  $2,5 \times 10^5$  células iniciais para observar a contagem de células pelo hemocitômetro entre 2 e 5 dias após a adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na dose letal a 25% das células BME26, quando incubadas por 24h ( $\text{DL}_{25}$  4,4mM), em comparação com um controle sem a adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig. 13).

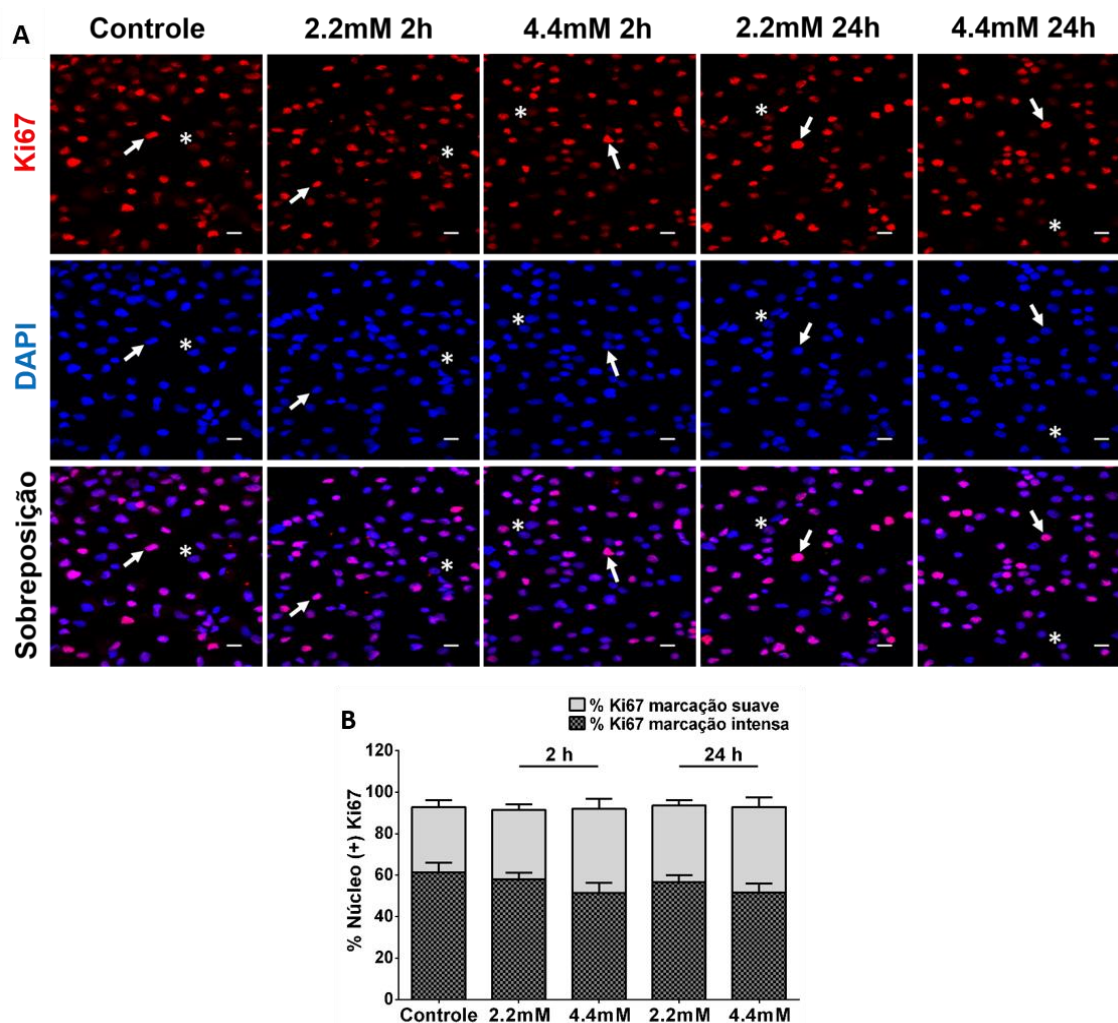


**Fig. 13: Contagem de células BME26 viáveis 5 dias após tratamento com 4,4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** A viabilidade celular foi verificada, por contagem de células com exclusão de azul de tripan, em tempos prolongados de 2, 3, 4 e 5 dias após a exposição com 4,4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A linha vermelha pontilhada representa a inclinação da linha de crescimento celular mostrada nas condições controle ( $4,738 \pm 1,27$ ) e tratado ( $3,545 \pm 0,68$ ). Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ , comparando o tratamento de 4,4 mM ao controle; e #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,0001$  comparando mesmo tratamento ao longo do tempo, no teste de comparações múltiplas de Tukey.

Observou-se um aumento significativo de aproximadamente 40% do número de células BME26 entre o segundo e o quinto dia após a adição de 4,4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig. 13, linha azul). Ao comparar o crescimento celular ao longo dos 5 dias das células tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  em relação ao controle, observamos pela inclinação da reta que o tratamento não alterou a capacidade proliferativa. O coeficiente angular das linhas de tendência de crescimento celular no controle (Fig. 13, linha preta) e

tratado (Fig. 13, linha azul) mostrou uma inclinação semelhante, sendo  $4,738 \pm 1,27$  e  $3,545 \pm 0,68$ , respectivamente. (Figura 13, linhas vermelhas).

De modo a verificar que mesmo após o tratamento com  $H_2O_2$  as células BME26 mantinham a capacidade proliferativa, estas foram marcadas para Ki-67 e observadas por microscopia de fluorescência. Ki-67 é uma proteína que está presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), porém está ausente nas células em repouso (G0) e em processo de morte celular. Por isso, a utilização dessa proteína como um excelente marcador para determinar a fração de crescimento é apresentada neste trabalho pela primeira vez nas células BME26. A proteína Ki-67 foi originalmente definida pelo anticorpo monoclonal tipo anti-Ki67 (GERDES et al., 1983), que foi gerada pela imunização de ratos com núcleos da linhagem celular de linfoma de Hodgkin L428. A técnica utilizada para analisar a proliferação das células BME26 foi imunohistoquímica com anticorpos anti-Ki67, e mostrou que o tratamento com  $H_2O_2$  não alterou a capacidade proliferativa das células aderidas nas lamínulas observadas pelo microscópio confocal (Fig. 14A). O gráfico apresentado na figura 14B é referente à análise quantitativa das imagens. Este resultado foi obtido com o uso da ferramenta Cell Counter, um *plugin* do *software* ImageJ, sendo o núcleo corado com DAPI (ou seja, núcleo total) por núcleo marcado com anti-Ki67 (separado os graus de intensidade da marcação). Este resultado sugere que eventuais danos celulares causados pela exposição com 4,4mM de  $H_2O_2$  por 24h não alteraram a capacidade de proliferação celular.



**Fig. 14: Capacidade proliferativa após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi mantida em células BME26.** (A) Imunolocalização com anti-Ki67 e a coloração do núcleo por DAPI em células BME26 observada pelo microscópio confocal de varredura a laser, LSM 710, Zeiss (Asteriscos indicam um exemplo de marcação suave e as setas indicam um exemplo de marcação intensa). (B) Contagem de núcleos marcados com Ki67 em relação à coloração com DAPI de núcleos totais. A contagem foi realizada com o uso da ferramenta Cell Counter, do software ImageJ, considerando 4 imagens de cada condição nas 3 repetições, e não foi observado diferença estatística no teste Tukey de comparações múltiplas.

Observa-se então que as células embrionárias do carrapato *R. microplus* toleram concentrações milimolares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que aparentemente é uma característica conservada entre células embrionárias de artrópodes. Porém ainda são necessários maiores estudos para abordar um contexto tão amplo. Na faixa de milimolar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> escolhemos uma concentração não letal e uma letal a 25% das células BME26, para que deste modo pudéssemos avaliar sobrevivência e proliferação de uma célula com capacidade de adaptação ao ambiente oxidativo

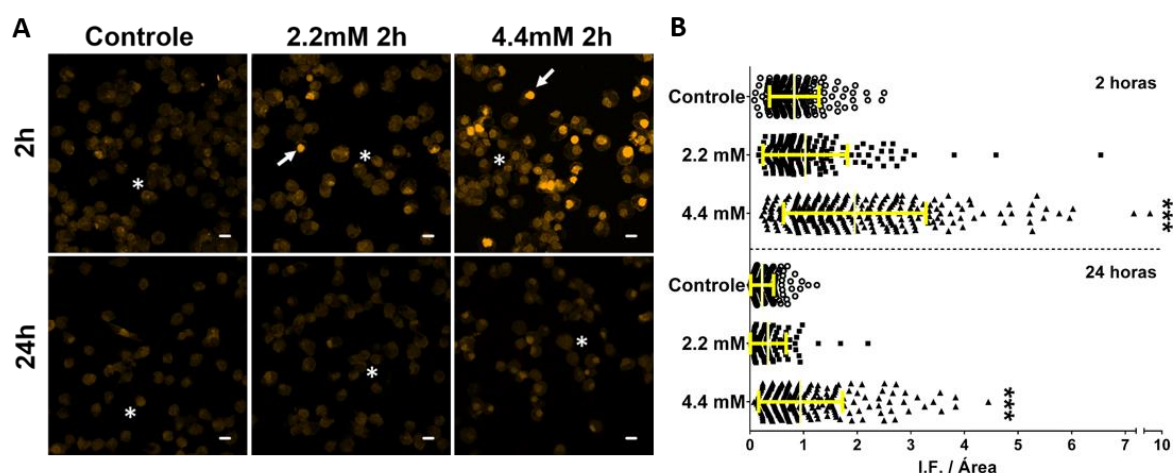
extracelular. A partir de então o foco deste trabalho tem sido compreender os possíveis mecanismos desta adaptação associados ao metabolismo energético. Neste sentido, os próximos resultados mostram o perfil de espécies reativas de oxigênio intracelular, transcrição gênica e atividade de enzimas decompositoras de  $H_2O_2$ .

### **5.2- $H_2O_2$ exógeno em células BME26 leva a um aumento da produção de ROS transitória e da transcrição gênica de catalase e PH-GPx**

Devido à alta tolerância das células BME26, ao  $H_2O_2$ , em comparação às células de mamíferos, a produção endógena de ROS foi investigada em células BME26 usando uma sonda fluorescente. Para marcar a quantidade de ROS intracelular, foi utilizada a sonda DHE (Dihidroetideo), uma molécula que quando oxidada forma dois produtos fluorescentes com afinidade pelo núcleo (por serem intercalantes de DNA), o 2-hidroxi-etídeo relacionado com a formação de ânion radical superóxido, e etídeo, que reflete a geração de  $H_2O_2$  (ZHAO et al., 2003).

O aumento da produção de ROS foi detectado após 2 horas de tratamento. Com a concentração de 2,2 mM a marcação de ROS é muito sutil. No entanto, na concentração de 4,4 mM de  $H_2O_2$  observa-se uma intensa marcação de DHE em algumas células BME26 representando um grande aumento de ROS em relação ao controle. Porém, 24h após a adição de ambas as concentrações de  $H_2O_2$ , os sinais positivos gerados de superóxido ou peróxido são muito sutis (Fig. 15A). Esse resultado está representado também em gráfico de Média da Intensidade de Fluorescência (I.F.) por área em  $mm^2$ , calculado pelo *software* ZEN 2.3 (blue edition) da Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011 (Fig. 15B).

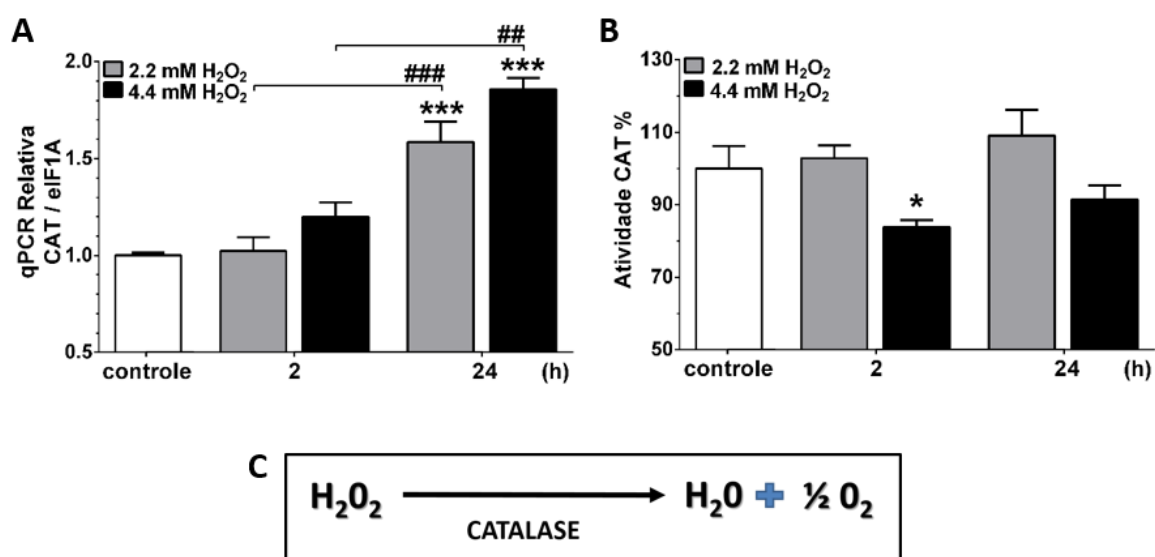




**Fig. 15: Aumento transitório de ROS induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno em células tolerantes.** (A) Geração de ROS em exposição curta (2h) e prolongada (24h) com concentrações de 2,2mM e 4,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram medidas usando a sonda fluorescente DHE, a intensidade de fluorescência foi observada e (B) a análise quantitativa da intensidade de fluorescência foi realizada usando microscópio confocal de varredura a laser, LSM 710 com o software Zeiss Zen Black 2011. A análise das imagens foi feita com base em três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais, onde \*\*\* p < 0,0001 comparado ao controle; no teste de comparações múltiplas de Tukey. Asteriscos brancos, indicam um exemplo de intensidade de fluorescência sutil, e as setas brancas, indicam um exemplo de alta intensidade de fluorescência.

Esses resultados sugerem que o aumento transitório de ROS observado após o tratamento de 2h foi causado pelo potencial oxidativo induzido pela adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno. O aumento de ROS endógeno não se manteve 24h após a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, portanto, pode-se sugerir que um ou mais sistemas de controle de produção desses ROS endógenos poderiam estar envolvidos, uma vez que as células BME26 permaneceram viáveis nestas condições.

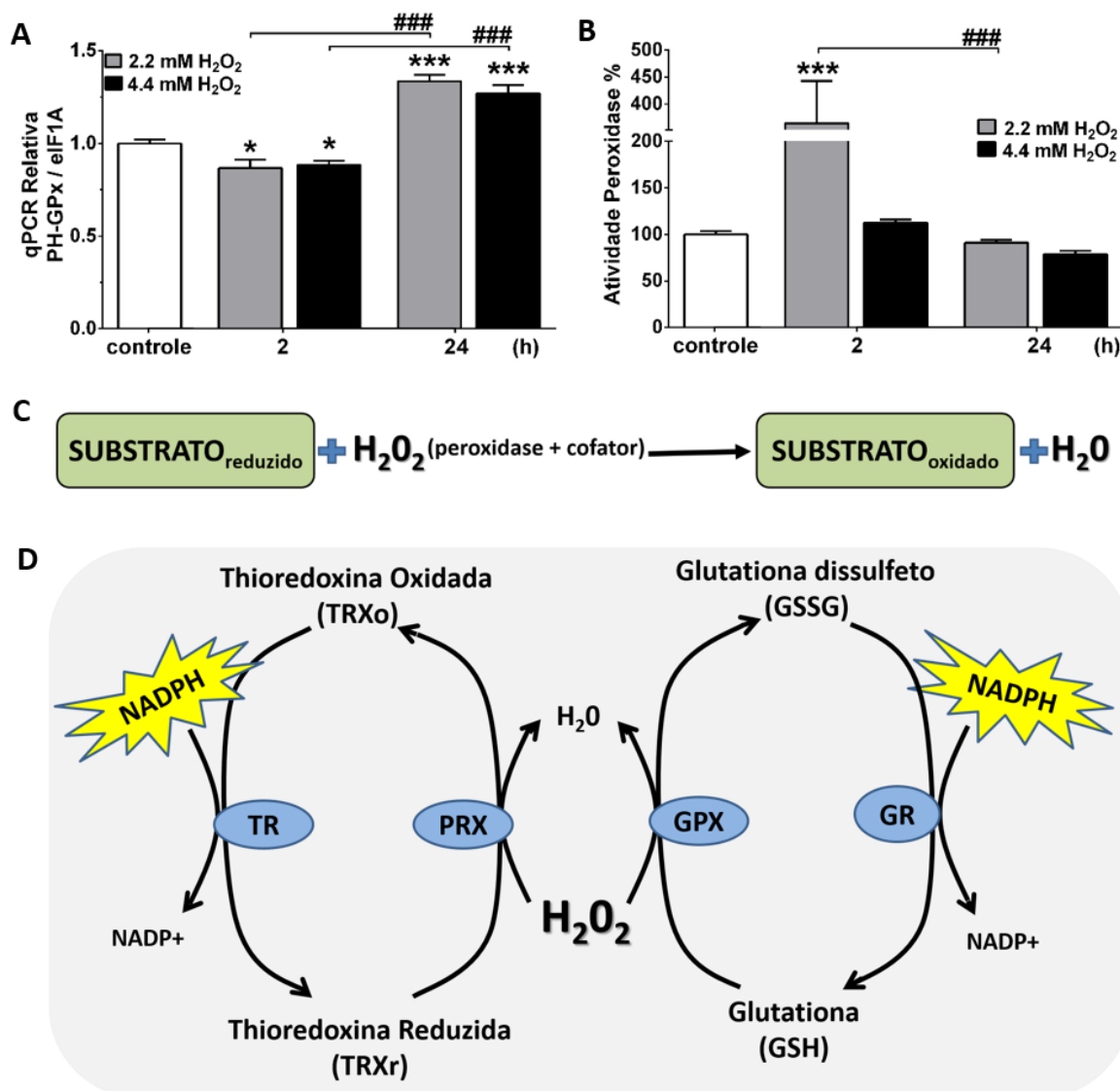
A Catalase atua como primeira linha de defesa na decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células que se encontram em estado de desafio oxidativo, catalisando a dismutação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigênio estável (conforme o esquema da figura 16C). A transcrição relativa da catalase mostrou aumento significativo no tratamento com ambas as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após 24h (Fig. 16A), que não foi acompanhado de uma maior atividade específica de catalase células BME26 após incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 16B).



**Fig. 16: Participação da catalase, transcrição e atividade após adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células BME26 tolerantes ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** (A) Análise da transcrição e (B) da atividade de catalase (CAT) após 2h e 24h da adição de 2,2mM e 4,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para a quantificação relativa por PCR (qPCR relativa) foi utilizado como gene de referência *R. microplus* elongation factor-1alpha (Elf1A) (Nijhof et al., 2009). Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,0001, comparado ao controle; e # p <0,05; ## p <0,01; ### p <0,0001 comparando mesmo tratamento ao longo do tempo, no teste de comparações múltiplas de Tukey. (C) Esquema da atividade de Catalase.

As peroxidases são um grupo de enzimas que participam de processos de oxirredução, e são fundamentais para o controle do metabolismo redox, ou seja, controle de oxidação e redução entre determinados substratos metabólicos. Resumidamente, conforme representado na figura 17C, essa enzima oxida substratos orgânicos, tendo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (agente oxidante) como a molécula que recebe elétrons, proveniente de diversos substratos, por exemplo, proteínas como o citocromo c, peptídeos como a glutatona e tioredoxina, ou ácidos graxos.

A enzima Glutaciona Peroxidase de Hidroperóxido de fosfolípido (PHGPx) foi descrita como importante na resistência a acaricidas no carrapato *R. microplus* (COSSÍO-BAYÚGAR et al., 2005). Na figura 17A, observa-se um aumento na transcrição de PHGPx no tempo de 24h após os tratamentos com 2,2 mM e 4,4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta enzima é conhecida pelo seu papel na proteção celular associada à redução de hidroperóxidos, impedindo a lipoperoxidação em situações causadas pelo estresse oxidativo.



**Fig. 17: Mecanismos de controle oxidativo de peroxidases envolvidas em células BME26 tolerantes a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** (A) Transcrição da Glutaciona Peroxidase de Hidroperóxido de fosfolípido (PHGPx), após 2h e 24h da adição de 2,2mM e 4,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi utilizada como gene de referência para *R. microplus* o eIF1A (NIJHOF et al., 2009). (B) Atividade de peroxidases após 2h e 24h da adição de 2,2mM e 4,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, usando o kit de análise de peroxidases AmplexRed, Invitrogen. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,0001, comparado ao controle; e # p <0,05; ## p <0,01; ### p <0,0001 comparando mesmo tratamento ao longo do tempo, no teste de comparações múltiplas de Tukey. (C) Esquema da atividade de peroxidases. (D) Esquema do controle redox envolvendo peroxidases e redutases, através do potencial oxidativo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizando o potencial redutor de NADPH.

Adicionalmente, a contribuição da atividade de peroxidases para a manutenção da homeostase redox celular foi avaliada utilizando AmplexRed. Observou-se que a atividade aumentou significativamente após 2 horas de tratamento com 2,2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, embora na maior concentração (4,4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

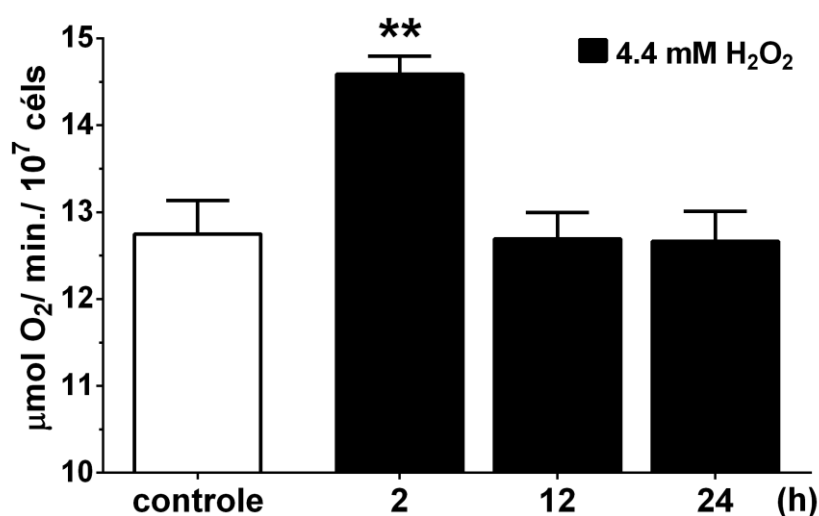
a atividade de peroxidase não seja significativamente diferente da condição controle (Fig. 17B).

Em conjunto, esses dados revelam que, como se esperava, existe uma importante participação das peroxidases e por tratarmos de uma célula embrionária de artrópode, pouco estudada, visualizamos uma complexidade maior devido o resultado da participação da atividade catalase não ser tão evidente como geralmente parece ser em mamíferos (SCHRINER et al., 2005), o que sugere que outras enzimas poderiam estar participando deste processo de adaptação celular das BME26. Outra hipótese é que as atividades enzimáticas de peroxidases e catalases presentes nas células BME26 são suficientes para uma resposta rápida ao desafio com  $H_2O_2$  exógeno. Para responder a esta situação, é necessário desenvolver um estudo detalhado da cinética enzimática de catalases e peroxidases em células BME26. E ainda existe uma terceira hipótese que justifica estes resultados, que seria a possibilidade observar um aumento na atividade dessas enzimas em tempos inferiores a 2 horas. Como abordamos o contexto metabólico nesta tese, as peroxidases atuam no potencial de oxidação-redução conforme no esquema proposto na figura 17D, mostra o exemplo de duas peroxidases PRx e GPx que para manter o equilíbrio redox precisam de um substrato (como os exemplos citados acima) que possa ser oxidado pelo agente oxidante, o  $H_2O_2$ ; porém a manutenção deste sistema exige a necessidade de que enzimas redutases (como TR e GR) reduzam o substrato-oxidado para servir de substrato-reduzido na atividade de peroxidases. Esta reação só é possível com a participação do agente redutor, o NADPH, que é mantido pelas vias metabólicas. Por isto, como próximos resultados abordaremos questões do metabolismo da célula BME26 após o tratamento com  $H_2O_2$ , visando colher as primeiras evidências sobre adaptações metabólicas que podem estar associadas a esta tolerância ao  $H_2O_2$ .

### **5.3- $H_2O_2$ exógeno em células BME26 leva a um aumento do consumo de $O_2$ e redução do superóxido mitocondrial transitórios.**

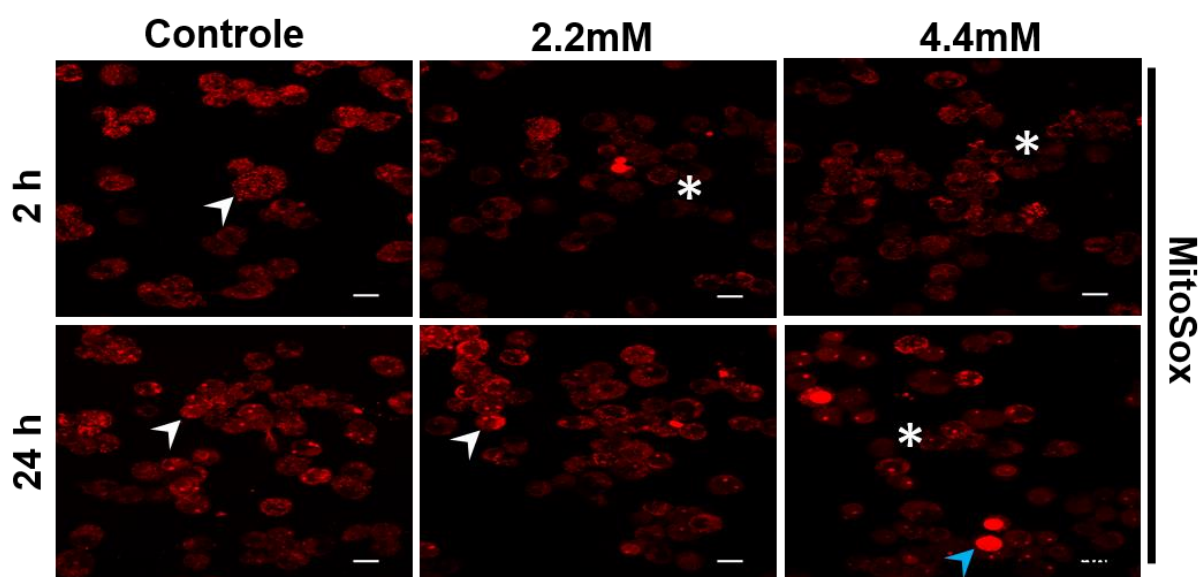
O oxigênio é o receptor final de elétrons na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial durante o metabolismo aeróbio (INDO et al., 2007; LIU et al., 2002). A

figura 18, demonstra na condição controle as células BME26 apresentaram uma taxa de consumo de  $O_2$  de aproximadamente  $12,5 \mu\text{mol}/\text{min}$ , que aumentou transitoriamente para cerca de  $14,5 \mu\text{mol}/\text{min}$  após 2h de tratamento com  $4,4 \text{ mM}$  de  $H_2O_2$ . Essa observação permite relacionar a respiração celular metabólica ao aumento da produção de ROS (Figura 18). A exposição ao peróxido por tempos maiores (12 e 24 horas) não alterou consumo de oxigênio.



**Fig. 18: Aumento transitório do consumo de oxigênio em células BME26 tolerantes ao  $H_2O_2$ .** Taxa de consumo de oxigênio em células BME26 após o tratamento com  $4,4 \text{ mM}$  de  $H_2O_2$  durante 2, 12 e 24h. Quantidade de oxigênio consumida em  $\mu\text{mol}/\text{minuto}$  em  $10^7$  células BME26. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \*\*  $p < 0,01$ , comparado ao controle; no teste de comparações múltiplas de Tukey.

Deste modo, a exposição por duas horas ao  $H_2O_2$  promoveu alterações na produção de superóxido mitocondrial. Houve uma forte redução da produção de superóxido mitocondrial (asterisco branco), observado através do marcador Mitosox. Após 24h de tratamento com  $H_2O_2$  a marcação de superóxido mitocondrial voltou aos mesmos níveis observados na condição controle (ponta de seta branca), porém na concentração de  $4,4 \text{ mM}$  de  $H_2O_2$  observou-se em poucas células um aumento no sinal (ponta de seta azul) da marcação de MitoSox (Fig. 19).



**Fig. 19: Células BME26 após 2h de tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminui o superóxido mitocondrial.** Detecção de superóxido mitocondrial após 2h e 24h da adição de 2,2mM e 4,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram observadas usando MitoSOX™. As imagens foram observadas e capturadas usando o microscópio confocal de varredura a laser, LSM 710, Zeiss, e a análise das imagens foi feita com base em três amostras biológicas independentes em triplicata. Barra de escala: 10 µm. Sendo que *ponta de seta branca* indica a intensidade de marcação dos controles e semelhantes aos controles; *asteriscos brancos* indicam uma intensidade mais fraca em relação ao controle; e *ponta de seta azul* uma intensidade mais forte em relação ao controle.

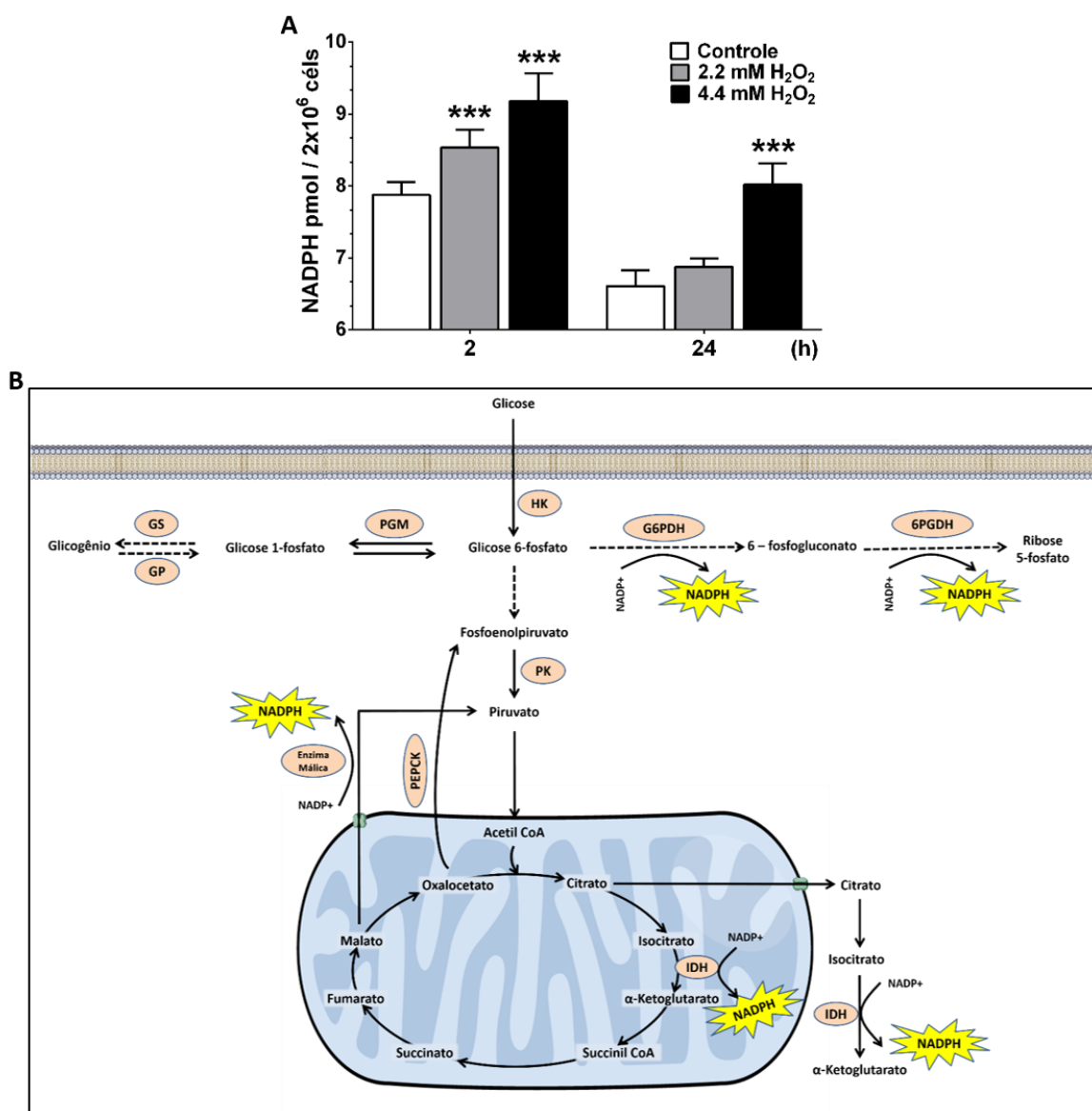
Estes resultados indicam que após 2h, um mecanismo conservado combina a homeostase de ROS com a respiração celular metabólica. A associação entre o aumento do consumo de O<sub>2</sub>, que provavelmente leva a um maior fluxo na cadeia transportadora de elétrons, fazendo com que este elétron encontre rapidamente seu receptor final (O<sub>2</sub>) no complexo IV, evitando escape de elétrons e formação de superóxido mitocondrial, numa situação de ambiente extracelular oxidativo causado pela adição exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é uma hipótese de adaptação (DA-SILVA et al., 2004).

#### **5.4- O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno aumenta a produção de NADPH e Regula enzimas produtoras de NADPH em células BME26 tolerantes ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Como descrito previamente sabemos que existe uma relação entre regulação do estresse oxidativo e metabolismo energético (QUIJANO et al., 2016) e

que componentes da via glicolítica podem ser modulados por  $H_2O_2$  (LIEMBURG-APERS et al., 2015). O potencial redutor, principalmente a produção de NADPH nas vias metabólicas, exibe um papel importante na sobrevivência celular em condições de desafio oxidativo (NG et al., 2008).

Na figura 20, as células BME26 aumentaram a quantidade de NADPH em resposta ao tratamento de 2 h com  $H_2O_2$ , e mesmo após 24 hs, as células com 4,4 mM ainda mantém um conteúdo de NADPH maior do que o controle. É possível que esta resposta adaptativa seja regulada por mudanças na expressão gênica e, por essa razão, a transcrição de genes que codificam para enzimas que reduzem o  $NADP^+$  também foi analisada após o tratamento com  $H_2O_2$ . Deste modo decidimos focar na análise de 3 enzimas G6PDH, IDH- $NADP^+$  e Enzima málica (EM- $NADP^+$ ). Tais enzimas atuam em diferentes vias do metabolismo de carboidratos: via das pentoses fosfato, ciclo de Krebs e descarboxilação do malato fornecendo piruvato e NADPH para a célula, respectivamente (esquema, Fig. 20B).

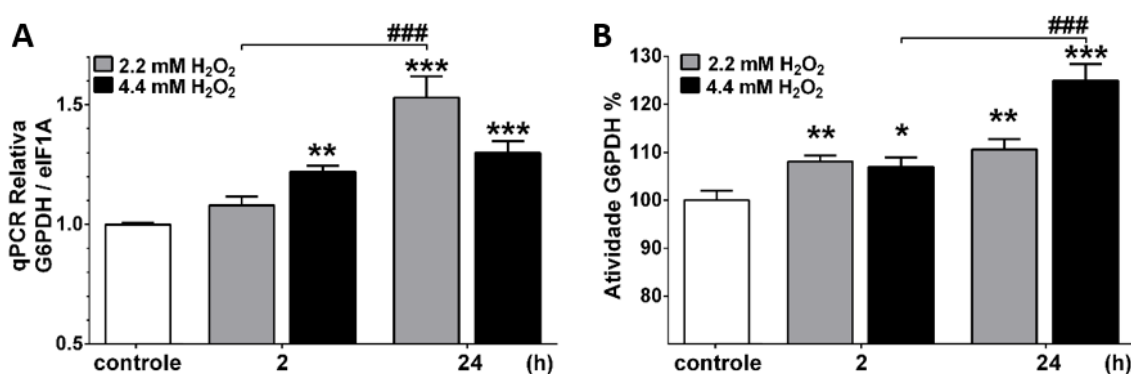


**Fig. 20: Células BME26 tolerantes ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzem a produção de NADPH como uma estratégia adaptativa.** (A) Quantificação de NADPH medida após 2h e 24h da adição de 2,2mM e 4,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelo kit *NADP/NADPH Quantification* (Sigma Aldrich). Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; comparado ao controle; no teste de comparações múltiplas de Tukey. (B) Esquema de adaptação metabólica para manter a produção de NADPH.

A transcrição relativa de G6PDH aumentou em células BME26 2 h após o tratamento com a concentração 4,4mM, e também 24h após o tratamento com 2,2 mM e 4,4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em comparação com o controle (Fig. 21A), Além disso, a atividade de G6PDH apresentou-se maior do que no controle em todos os tratamentos. Na concentração de 2,2 mM de peróxido, e aumento da atividade



permanece entre 2 e 24 horas. Já para a concentração e 4,4 mM, há um pequeno aumento em 2 horas de tratamento, e um incremento ainda maior na atividade de G6PDH com o tratamento mais longo (Fig. 21B). o alinhamento da sequência de aminoácidos do carrapato *R. microplus* com outros organismos mostrou alta conservação entre os artrópodes dos resíduos de aminoácidos críticos de importantes sítios relacionados a ligação do substrato, receptor de prótons e ligação de NADP (Apêndice I).

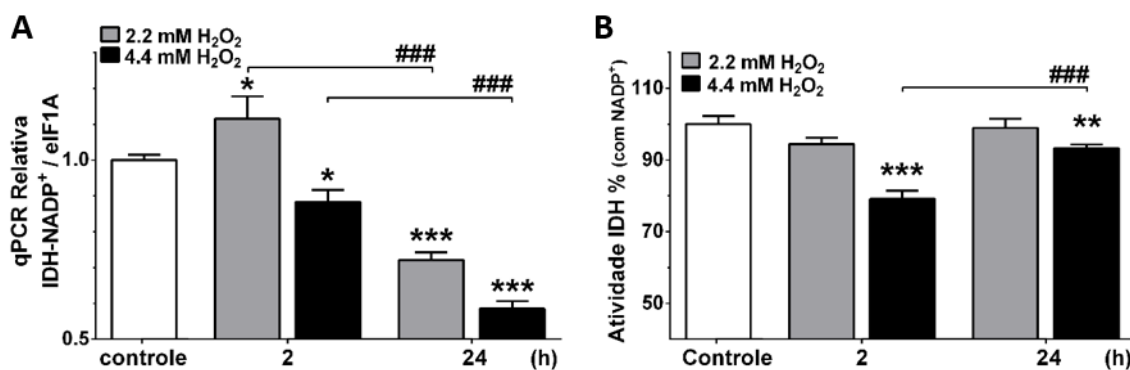


**Fig. 21: Aumento a nível Transcricional e da Atividade da Enzima G6PDH em Células BME26 tolerantes ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Análise da (A) transcrição e (B) atividade de Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) após 2h e 24h da adição de 2,2mM e 4,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,0001, comparado ao controle; e ### p <0,0001 comparando mesmo tratamento ao longo do tempo, no teste de comparações múltiplas de Tukey.

Outra enzima, a isocitrato desidrogenase dependente de NADP<sup>+</sup> (IDH-NADP<sup>+</sup>), foi analisada em células BME26. Ela catalisa a descarboxilação oxidativa do isocitrato, produzindo alfa-cetoglutarato, CO<sub>2</sub> e NADPH. No banco de sequências de nucleotídeos referentes ao transcriptoma de *R. microplus* (ainda não publicado) encontramos somente uma IDH-NADP<sup>+</sup> (alinhamento no apêndice II). De acordo com a análise feita pelo site <http://sunflower.kuicr.kyoto-u.ac.jp/~smatsuda/slplocal.html> (Subcellular Location Predictor based on Local features of amino acid sequence), o domínio de endereçamento desta enzima está em maior probabilidade de ser uma enzima mitocondrial (apêndice II).

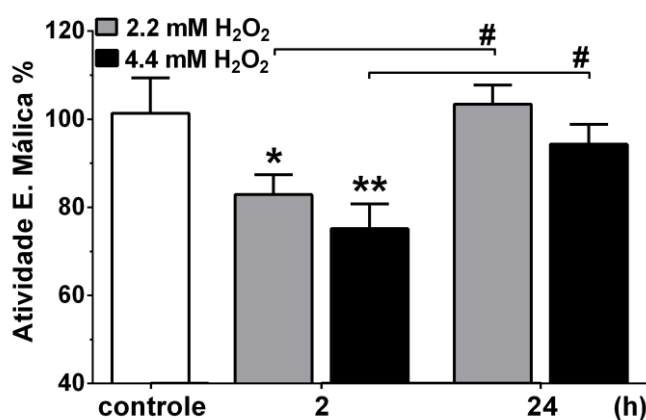
A análise transcricional da IDH-NADP<sup>+</sup> demonstra oscilações frente à exposição ao peróxido. O nível transcricional aumentou em células tratadas após 2 horas com 2,2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e reduziu em aproximadamente 30% 24 horas após o

tratamento (Fig. 22A). Observa-se um perfil transcricional inverso ao apresentado pela G6PDH (Figura 21A). Entretanto, a atividade de IDH-NADP<sup>+</sup> após 2h e 24h de tratamento não apresentou correlação com a análise transcricional, mantendo-se estável nos tempos analisados (Fig. 22B).



**Fig. 22: Participação Transcricional e da Atividade da Enzima IDH-NADP<sup>+</sup> em Células BME26 tolerantes ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Análise da (A) transcrição e (B) atividade de isocitrato desidrogenase dependente de NADP<sup>+</sup> (IDH-NADP<sup>+</sup>) após 2h e 24h da adição de 2,2mM e 4,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,0001, comparado ao controle; e ### p <0,0001 comparando mesmo tratamento ao longo do tempo, no teste de comparações múltiplas de Tukey.

Além disso, a atividade da EM-NADP<sup>+</sup> apesar de apresentar-se reduzida em 2 h de tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi recuperada após 24 h e retornou ao nível do controle (Fig. 23).



**Fig. 23: Atividade de EM-NADP<sup>+</sup> em células tolerantes ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se mantém ao nível do controle ao longo do tempo.** Atividade de EM-NADP<sup>+</sup> foi medida após 2h e 24h da adição de 2,2mM e 4,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas

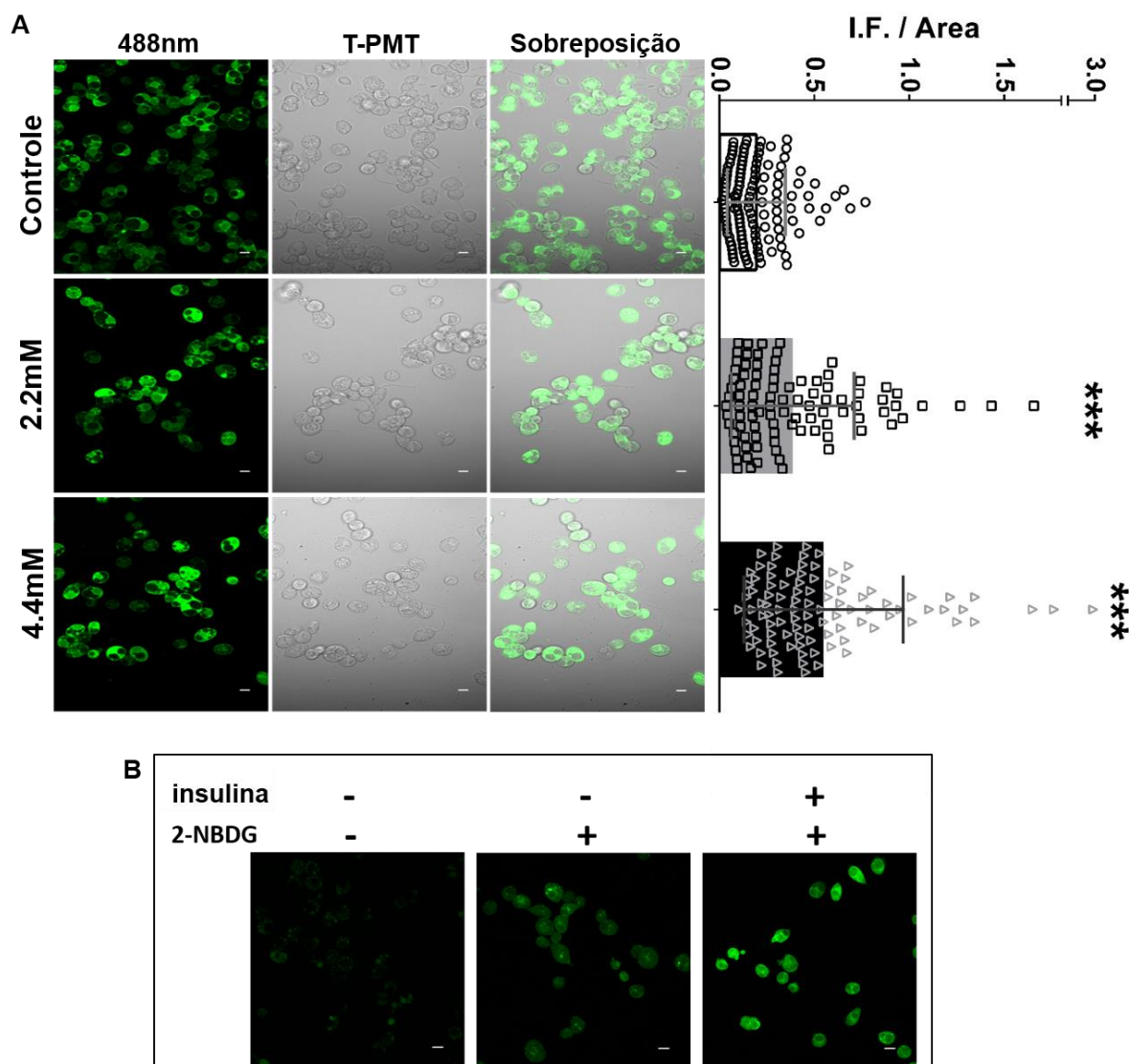
independentes em três repetições experimentais cada, onde \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , comparado ao controle; e #  $p < 0,05$  comparando mesmo tratamento ao longo do tempo, no teste de comparações múltiplas de Tukey.

Pelo aumento da transcrição e atividade da G6PDH é preciso alta carga energética para que sobre glicose-6-fosfato suficiente para via das pentoses fosfato, sem afetar o metabolismo energético celular. Sendo assim é esperado o perfil de atividade de IDH-NADP<sup>+</sup> e EM-NADP<sup>+</sup> estarem ao nível das células controle indicando uma adaptação sem altos custos para a célula. Deste modo, se fez importante a investigação da entrada de glicose na célula e atividade de enzimas da via glicolítica.

#### **5.5- O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno aumenta a entrada de glicose e atividade de Hexoquinase em células BME26 tolerantes ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

A entrada de glicose na célula foi medida pela entrada do seu análogo fluorescente 2-NBDG em células BME26 após 2h da adição de 2,2mM e 4,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O aumento da entrada de glicose foi detectado após 2 horas de tratamento com a concentração de 2,2 mM e 4,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Observa-se uma intensa marcação fluorescente em relação ao controle (Fig. 24A). Esse resultado está representado também em gráfico de Média da Intensidade de Fluorescência (I.F.) por área em mm<sup>2</sup> (calculado pelo software ZEN 2.3 (blue edition) da Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011).

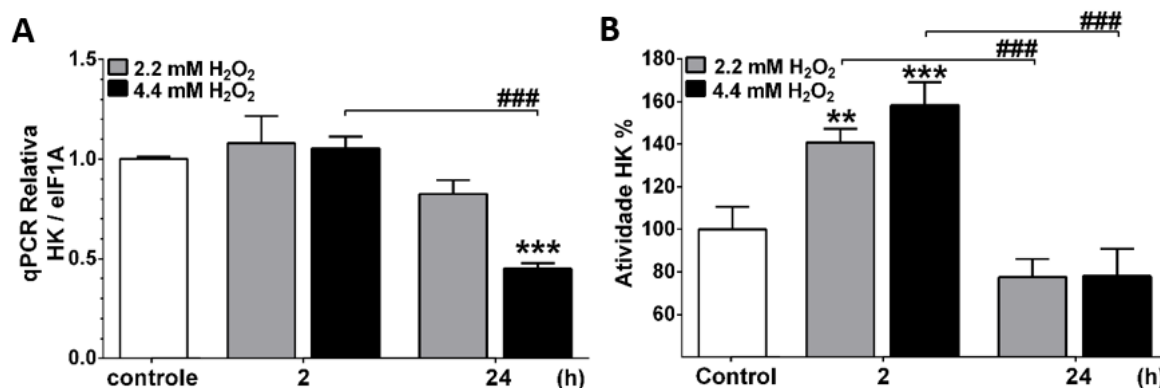
De modo a confirmar se esse aumento da intensidade de fluorescência corresponde, de fato, ao aumento de entrada de glicose na célula, o procedimento foi realizado sem a adição de peróxido, mas na presença ou ausência de insulina exógena. Em acordo com observações anteriores (ABREU et al. 2009 e 2013) da resposta das células BME26 à insulina, aqui foi possível observar a maior intensidade de fluorescência (2-NBDG) na presença do hormônio (Figura 24B).



**Fig. 24: Aumento da entrada de glicose 2h após a adição de 2,2 mM e 4,4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** (A) Análise da entrada de glicose na célula foi medida usando uma sonda fluorescente, análogo de glicose, 2-NBDG, a intensidade de fluorescência foi observada e quantificada pelo microscópio confocal de varredura a laser, LSM 710, Zeiss com o software Zen black 2011. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \*\*\* p < 0,0001; comparado ao controle; no teste de comparações múltiplas de Tukey. (B) Controle do ensaio de entrada do análogo de glicose, 2-NBDG, pelo uso de insulina, e a análise das imagens foi feita com base em três amostras biológicas independentes em triplicata.

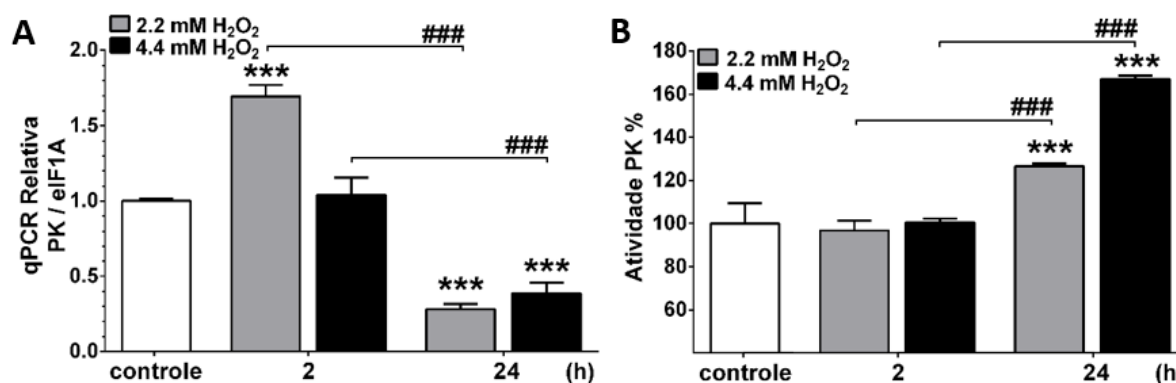
A Hexoquinase e a Piruvato Quinase são enzimas que catalisam a primeira e a última etapas da glicólise, respectivamente. A transcrição relativa de Hexoquinase (HK) não apresentou grandes alterações, exceto após 24h quando diminuiu nas células tratadas com 4,4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (Fig. 25A). Já sua atividade aumentou significativamente 2h após a adição de ambas as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

para que após 24h retornasse à atividade ao nível das células controle (Fig. 25B). Esse resultado corrobora plenamente com o dado de entrada de glicose na célula BME26 após desafio com  $H_2O_2$  (Figura 24A).



**Fig. 25: Participação Transcricional e da Atividade da Enzima HK em Células BME26 tolerantes ao  $H_2O_2$ .** Análise da (A) transcrição e (B) atividade de Enzima Hexoquinase (HK) após 2h e 24h da adição de 2,2mM e 4,4mM de  $H_2O_2$ . Transcrição relativa do gene alvo em relação ao gene de referência ELF1A. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,0001, comparado ao controle; e ### p < 0,0001 comparando mesmo tratamento ao longo do tempo, no teste de comparações múltiplas de Tukey.

Diferentemente, a transcrição de Piruvato quinase (PK) foi aumentada nas células BME26 tratadas com 2,2 mM de  $H_2O_2$  por 2 h, com uma redução no número de transcritos após 24hs de tratamento (Fig. 26A). Porém sua atividade foi somente aumentada 24h após o tratamento com  $H_2O_2$  em ambas as concentrações (Fig. 26B).



**Fig. 26: Participação Transcricional e da Atividade da Enzima PK em Células BME26 tolerantes ao  $H_2O_2$ .** Análise da (A) transcrição e (B) atividade de Enzima Piruvatoquinase

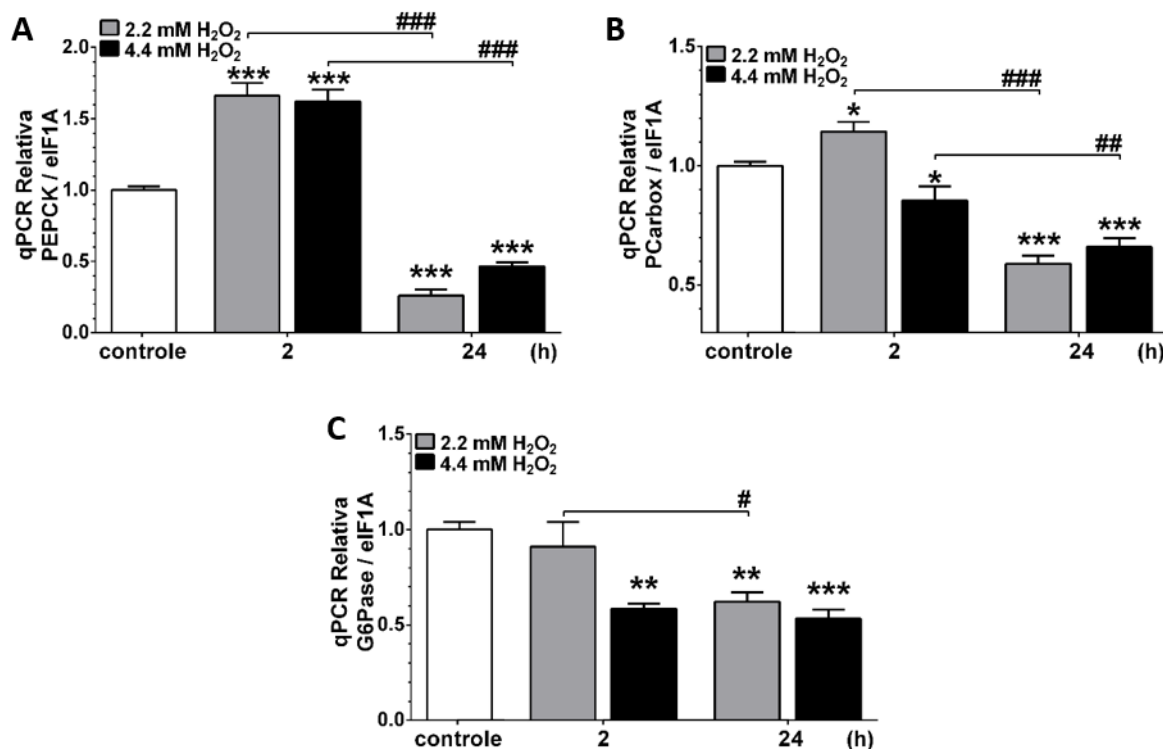
(PK) após 2h e 24h da adição de 2,2mM e 4,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Transcrição relativa do gene alvo em relação ao gene de referência ELF1A. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \*\*\* p <0,0001, comparado ao controle; e ### p <0,0001 comparando mesmo tratamento ao longo do tempo, no teste de comparações múltiplas de Tukey.

Estes resultados em conjunto com o dado de transcrição e atividade da G6PDH sugerem o direcionamento da glicose disponível sendo convertida a glicose-6-fosfato (glicose-6P). Existe também uma correlação da entrada de glicose e aumento de NADPH, correlacionando a atividade da HK com a via das pentoses fosfato. Neste sentido, gostaríamos de compreender se há contribuição da via de gliconeogênese para o conteúdo de glicose-6P.

#### **5.6- Perfil transcricional de enzimas sugere uma participação Gliconeogênese, em resposta a adaptação das células BME26 ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

A gliconeogênese se resume em síntese de glicose a partir de precursores não glicídicos, tendo diversos precursores como lactato, aminoácidos glicogênicos (intermediários do ciclo de Krebs), piruvato, oxalacetato, di-hidroxiacetona fosfato e glicerol. Classicamente, a enzima piruvato carboxilase (PCarbox) catalisa a formação de oxaloacetato a partir de piruvato e CO<sub>2</sub>. Para que, em seguida, a Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) converta oxaloacetato em fosfoenolpiruvato seguindo então na via gliconeogênica até a formação de glicose-6-fosfato. A transcrição gênica de PCarbox em células BME26, 2h após adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou pequenas alterações com um pequeno aumento transcricional na concentração de 2,2 mM e uma pequena diminuição na concentração de 4,4mM. Já após 24 h ambas as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziram os transcritos de PCarbox (Fig. 27B). A PEPCK por sua vez, apresentou um resultado surpreendente, com alta transcrição gênica 2h após a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células BME26, em seguida 24hs após o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uma redução dos transcritos de PEPCK para ambas as concentrações (Fig. 27A).

A enzima glicose-6-fosfatase (G6Pase) realiza a hidrólise do fosfato da glicose-6P formando então glicose livre. Sendo assim, após o desafio com  $H_2O_2$  em células BME26 sua transcrição se manteve ao nível do controle no tempo menor e reduzida no tempo maior (Fig. 27C).



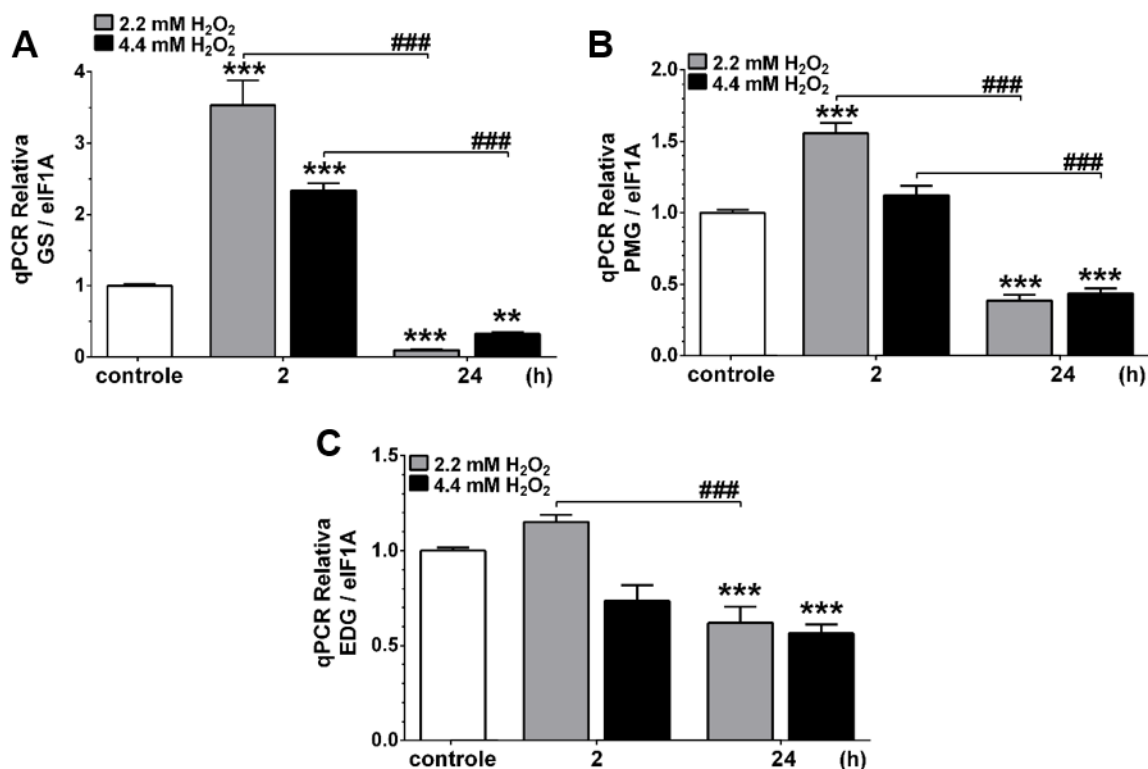
**Fig. 27: Perfil transcricional de enzimas da via gliconeogênica em Células BME26 tolerantes ao  $H_2O_2$ .** Análise da transcrição de (A) PEPCK, (B) PCarbox e (C) G6Pase, após 2h e 24h da adição de 2,2mM e 4,4mM de  $H_2O_2$ . Transcrição relativa do gene alvo em relação ao gene de referência ELF1A. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ , comparado ao controle; e #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,0001$  comparando mesmo tratamento ao longo do tempo, no teste de comparações múltiplas de Tukey.

A enzima PEPCK é uma importante reguladora da via gliconeogênica, classicamente, quando as concentrações de ATP e NADH estão altas, o ciclo de Krebs é inibido, e o oxalacetato vai para a gliconeogênese. A possível contribuição da gliconeogênese parece ser relevante somente em 2 h. Com o aumento da captação de glicose junto com aumento de transcrição da enzima principal da gliconeogênese, surge a pergunta se parte da glicose-6P estaria sendo estocada como glicogênio para futura mobilização.

### **5.7- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno aumenta a transcrição gênica de GS, expressão de GS-P (ser641) e quantificação de glicogênio regulados em diferentes momentos após o tratamento.**

Para analisar o metabolismo de glicogênio nas células BME26 após o desafio com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, inicialmente verificamos a transcrição gênica de alguns alvos do metabolismo de glicogênio. Sendo assim, a figura 28 mostra o perfil transcricional da GS, fosfoglicomutase (PMG) e enzima desramificadora de glicogênio (EDG) após 2 h e 24 h de tratamento com as concentrações de 2,2 mM e 4,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A GS apresentou um grande aumento transcricional 2 h após o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguido de uma redução transcricional em ambas as concentrações testadas 24 h após o tratamento (Fig. 28A). A PMG é uma enzima que atua tanto no sentido da síntese (Glicose-6-fosfato → Glicose-1-fosfato) quanto no sentido da degradação de glicogênio (Glicose-1-fosfato → Glicose-6-fosfato), sua transcrição em células BME26 desafiadas seguiu um perfil semelhante ao da GS, porém com variações menores no tempo de 2h. Já a EDG atua na desramificação do glicogênio, somente após as GP retirar glicose-1-fosfato até sobrar apenas uma cadeia com 4 resíduos antes da ramificação do glicogênio. Sua transcrição em células BME26 desafiadas, 2h após, se manteve equivalente à condição controle, com uma redução transcricional 24 h após o desafio com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

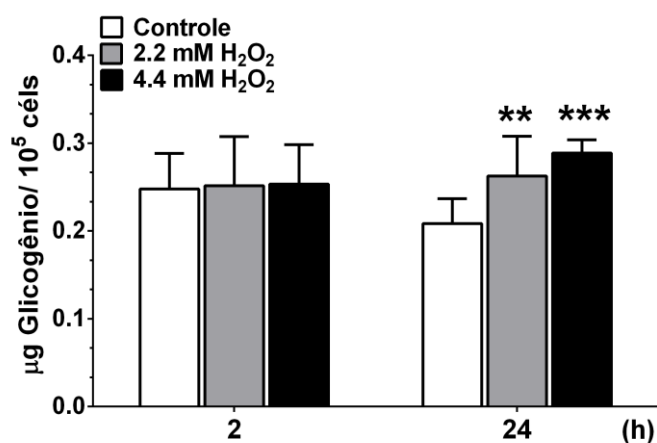




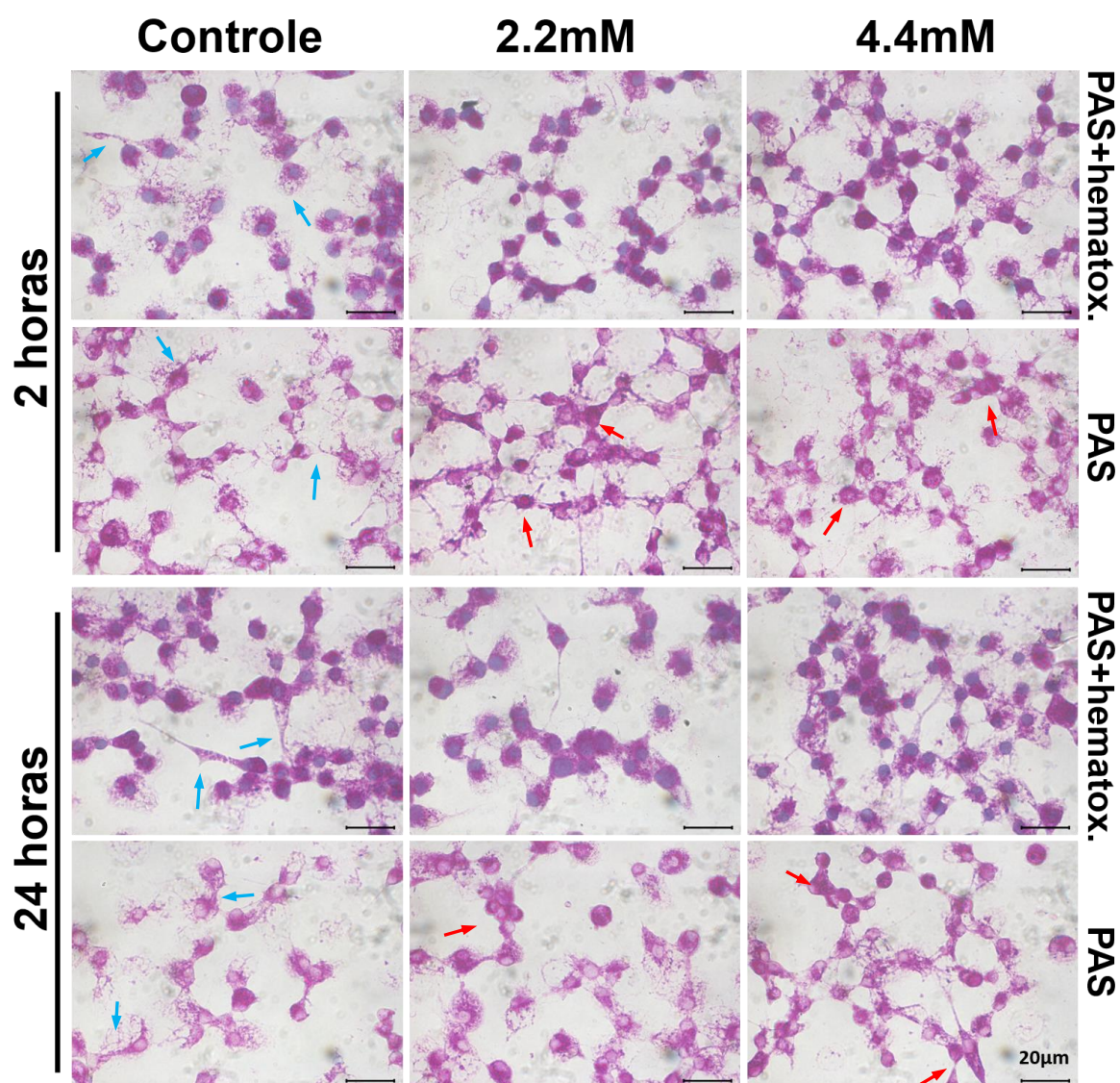
**Fig. 28:** Perfil transcricional de enzimas do metabolismo de glicogênio da via gliconeogênica em Células BME26 tolerantes ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Análise da transcrição de (A) GS, (B) PMG e (C) EDG, após 2h e 24h da adição de 2,2mM e 4,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Transcrição relativa do gene alvo em relação ao gene de referência ELF1A. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,0001, comparado ao controle; e ### p < 0,0001 comparando mesmo tratamento ao longo do tempo, no teste de comparações múltiplas de Tukey.

Os genes do metabolismo de glicogênio mostraram ser regulados por condição oxidativa em células embrionárias BME26. Seguindo estas evidências, foi analisado o teor glicogênio por 10<sup>5</sup> células BME26, com e sem o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, após 2 h e 24 h. A análise demonstrou que 24 h após a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as células BME26 são capazes de acumular glicogênio (Fig. 29).

A marcação de glicogênio por PAS foi realizada para identificar a compartimentalização de glicogênio. Apenas pudemos verificar uma surpreendente marcação perinuclear (setas vermelhas) mais forte após o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em comparação a uma marcação mais difusa do controle sem tratamento (setas azuis) (Fig. 30)



**Fig. 29: Quantificação de glicogênio em células BME26.** Após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 2 h e 24 h nas concentrações 2,2 mM e 4,4 mM. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,0001, comparado ao controle, no teste de comparações múltiplas de Tukey.

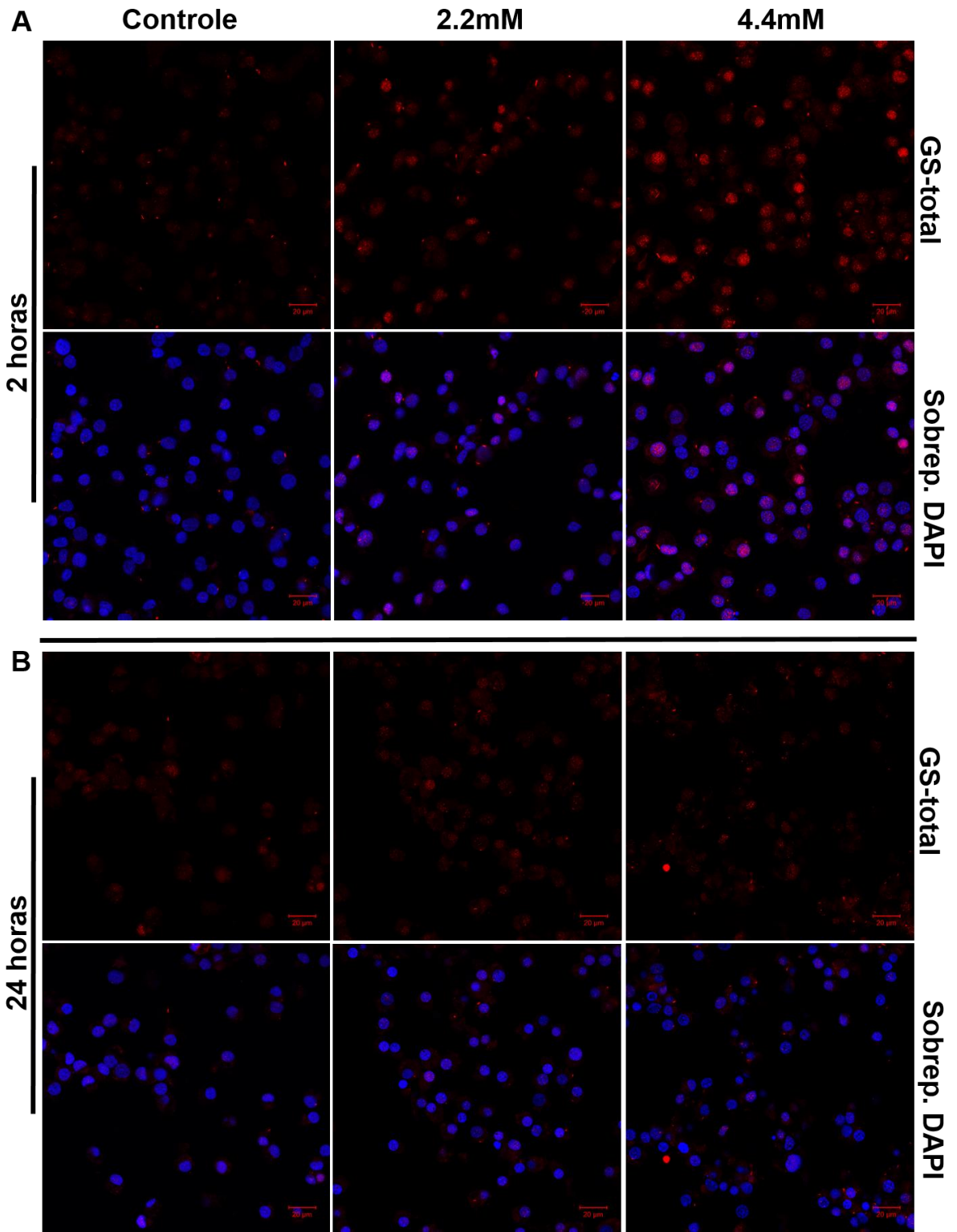


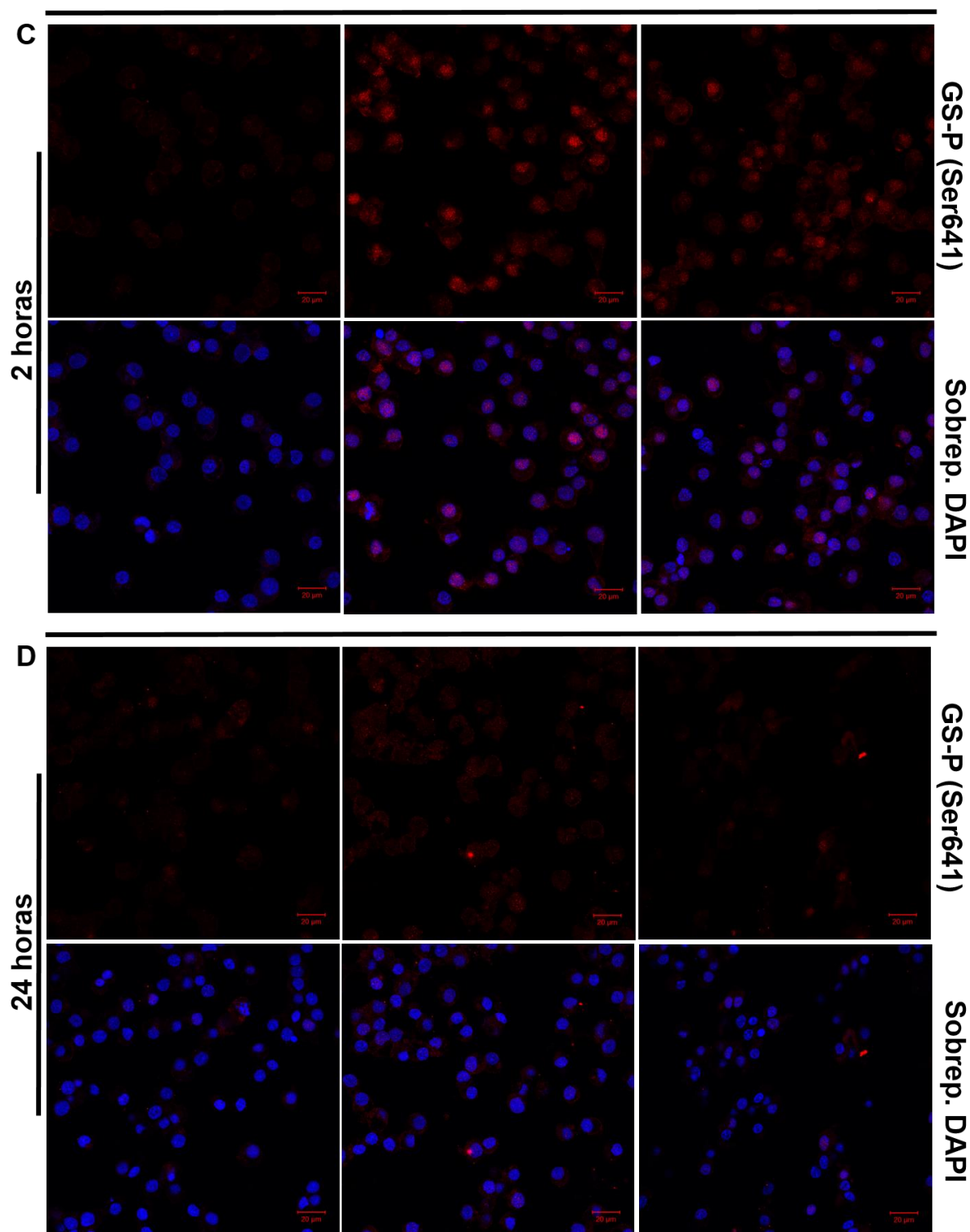
**Fig. 30: Marcação de glicogênio nas células BME26.** Marcação com PAS em células BME26 com e sem Hematoxilina (marcação do núcleo), para visualizar possível localização de glicogênio após 2 h e 24 h tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas concentrações 2,2mM e 4,4 mM. Marcação perinuclear indicado pelas setas vermelhas e marcação difusa pela célula indicado pelas setas azuis. As imagens de microscopia foram capturadas no campo claro usando o microscópio de luz polarizada Axio Scope.A1, Zeiss, através do software Blue Zeiss. A análise qualitativa das imagens foi feita com base em três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais.

De forma a ampliar a compreensão do papel do metabolismo de glicogênio nas células tratadas com peróxido, foi realizada a imunolocalização da GS. A partir dos anticorpos utilizados é possível observar tanto o conteúdo de GS total, como da forma fosforilada no resíduo Ser<sup>641</sup>. Nas imagens da Figura 31, as células tratadas foram coradas também por DAPI, evidenciando os núcleos.

É possível observar que após 2 horas, nas concentrações utilizadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ocorre um aumento de GS tanto total como fosforilada colocalizada com a marcação por DAPI, nos núcleos celulares (Figuras 31A e 31C). Essa forma fosforilada, mesmo com baixa atividade catalítica, ainda é regulada por glicose-6P, seu ativador alostérico. Já após 24 horas a distribuição celular da das duas formas de GS é equivalente entre as células tratadas e a condição controle (Figuras 31B e 31D).

Verificamos que, de acordo com sua transcrição, a quantidade de proteína também aumentou no tempo de 2 h após o desafio com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, porém em sua forma fosforilada. A GS quando fosforilada está na forma menos ativa em comparação a não fosforilada, no entanto, a forma fosforilada passa a ser regulada alostericamente pela quantidade de Glicose-6-fosfato, que ao aumentar seu teor intracelular leva a síntese de glicogênio. Talvez por este motivo que apenas visualizamos um maior teor de glicogênio por número de células somente após 24 h do desafio com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



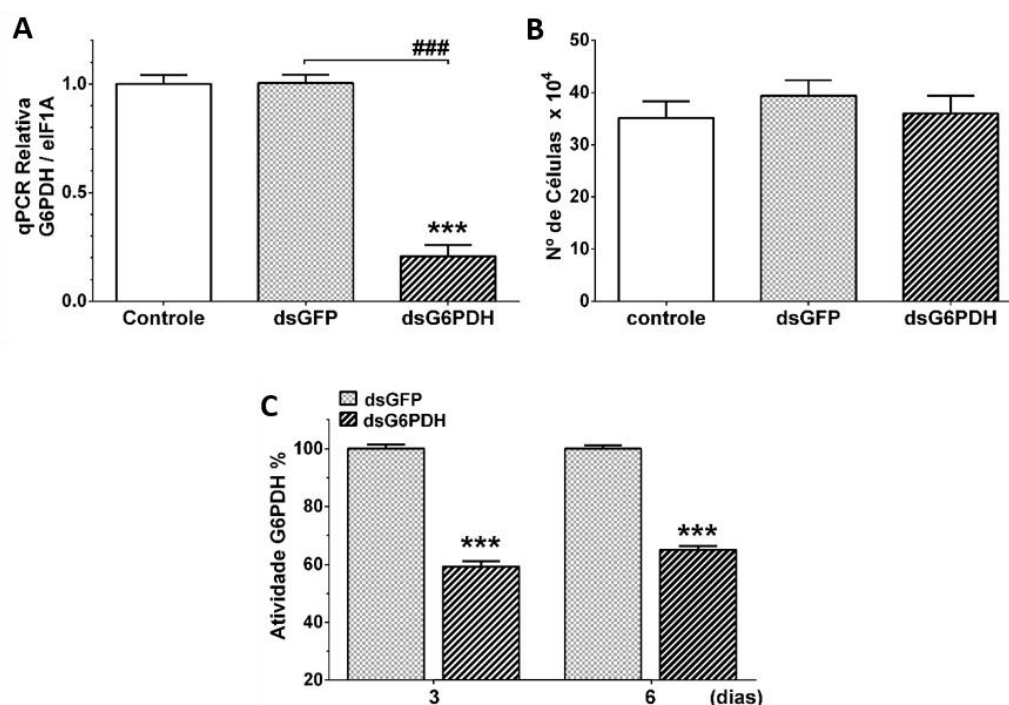


**Fig. 31: Aumento da expressão da proteína Glicogênio Sintase em células BME26 após 2h tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** (A) Imunolocalização de GS total foi realizada usando anticorpo (#3893 cell signaling) nas células BME26 tratadas com 2,2 mM e 4,4 mM após 2h e (B) após 24 h. (C) Imunolocalização de GS-fosforilada (P-ser641) foi realizada usando o anticorpo (#3891 cell signaling) nas células BME26 tratadas com 2,2 mM e 4,4 mM após 2h e (D) após 24 h. Microscopia marcada com anticorpo secundário conjugado ao Alexa Fluor® 555 e DAPI para coloração de núcleos, usando o microscópio confocal de varredura a laser, LSM 710, Zeiss. A análise qualitativa das imagens foi feita com base em três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais. Barra de escala: 20 μm.

Sendo assim, esses resultados sugerem uma participação do metabolismo de glicogênio visando uma reserva para manutenção energética a longo prazo, 24 h, em resposta a adaptação das células BME26 ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

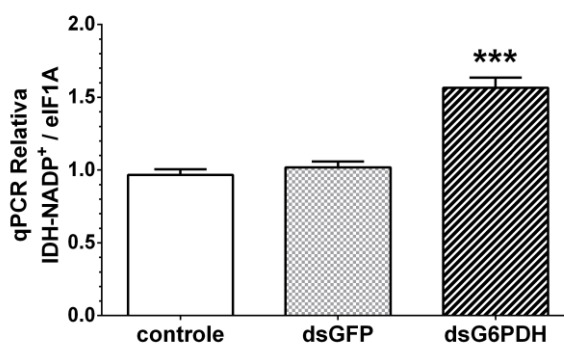
#### **5.8- O silenciamento da G6PDH é compensado pela IDH-NADP<sup>+</sup> em resposta a adaptação das células BME26 ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Juntos os resultados apresentados no tópico 5.5, onde o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno aumenta a produção de NADPH e regula enzimas produtoras de NADPH, demonstraram que G6PDH e IDH-NADP<sup>+</sup> podem estar estrategicamente se compensando em nível transcricional para a manutenção da sobrevivência celular. Para investigar esse fenômeno, a G6PDH foi silenciada nas células BME26 com 4μg de dsRNA 553pb, 3 dias após a adição da dsRNA observou-se redução de 78% na transcrição relativa do gene (Fig 32A). Interessantemente, 3 dias após a adição da dsRNA, o silenciamento de G6PDH não afetou a viabilidade celular (Fig. 32B). Adicionalmente, a atividade enzimática de G6PDH foi examinada nas células BME26 e observou-se a redução em 42% na atividade 3 dias após a adição do dsRNA, que permaneceu baixa 6 dias após o silenciamento (Fig. 32C).



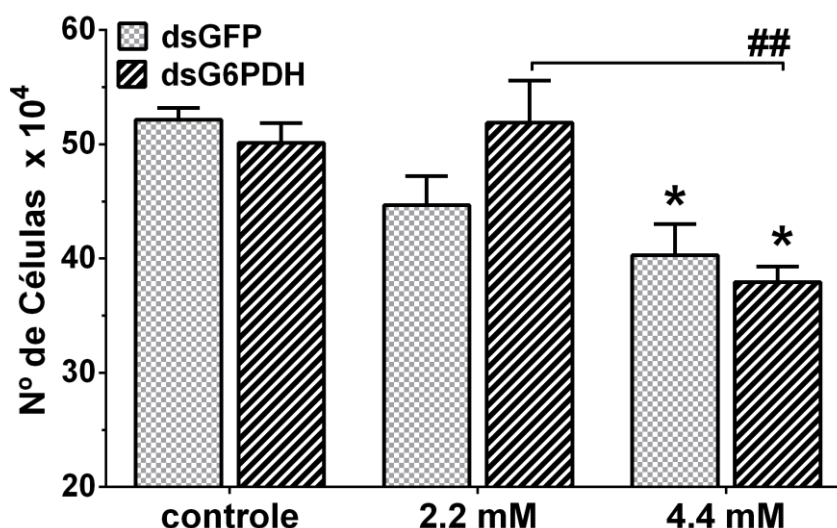
**Fig. 32: Silenciamento de G6PDH em células BME26.** (A) Confirmação do silenciamento de G6PDH com redução de aproximadamente 78% de seu transcrito, e (B) contagem celular foi realizada em células BME26, 3 dias após adição de dsRNA. (C) Atividade de G6PDH foi realizada em células BME26 após o silenciamento de G6PDH. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \*\*\*  $p < 0,0001$ , comparado ao controle; e ###  $p < 0,0001$  comparado ao controle de dsRNA não-relacionada, no teste de comparações múltiplas de Tukey.

Além disso, células BME26 após o silenciamento de G6PDH aumentaram a transcrição relativa de IDH-NADPH<sup>+</sup> (Fig. 33).



**Fig. 33: Silenciamento de G6PDH em células BME26 aumentou a transcrição da IDH-NADP<sup>+</sup>.** Análise da transcrição do gene IDH-NADP<sup>+</sup> após o silenciamento de G6PDH. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \*\*\*  $p < 0,0001$ ; comparado ao controle; no teste de comparações múltiplas de Tukey.

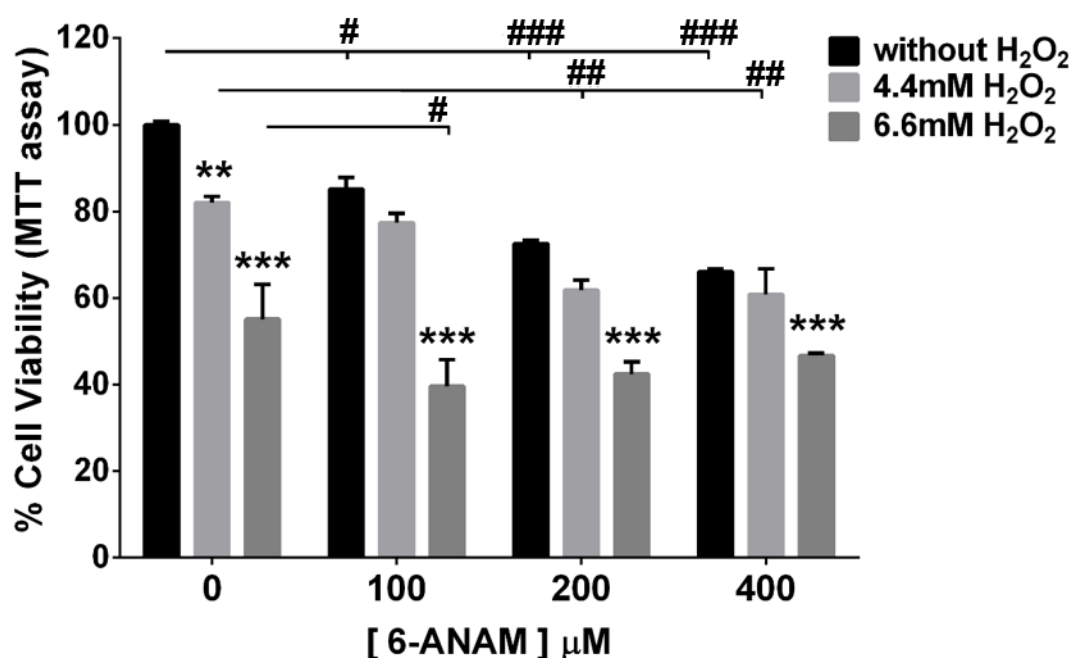
Para confirmar esta evidência, as células silenciadas para G6PDH (3 dias após a incubação com dsRNA) foram desafiadas com 2,2 mM e 4,4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para a análise da viabilidade após 24h. A comparação dos perfis de viabilidade, das células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, silenciadas (incubação com uma dsRNA específica de G6PDH) e não silenciadas (incubação com uma dsRNA de um gene não-relacionado), não evidenciou diferenças significativas entre si (Fig. 34). Entretanto, em ambas as condições, a viabilidade foi igualmente afetada pelo tratamento com 4,4 mM de peróxido, em comparação com o controle.



**Fig. 34: Viabilidade de células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após o silenciamento de G6PDH.** Contagem celular foi verificada nas células BME26 com G6PDH silenciada, 24 h após o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \* p < 0,05, comparado ao controle; e ## p < 0,01 comparando mesmo tratamento ao longo do tempo, no teste de comparações múltiplas de Tukey.

Também foi realizado o mesmo ensaio, porém ao invés de silenciamento da G6PDH foi realizada a inibição química de G6PDH com o 6-ANAM, antes do tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 35). Apesar da redução na viabilidade em aproximadamente 30% na maior concentração de 6-ANAM, esse efeito não implicou numa maior susceptibilidade das células BME26 ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

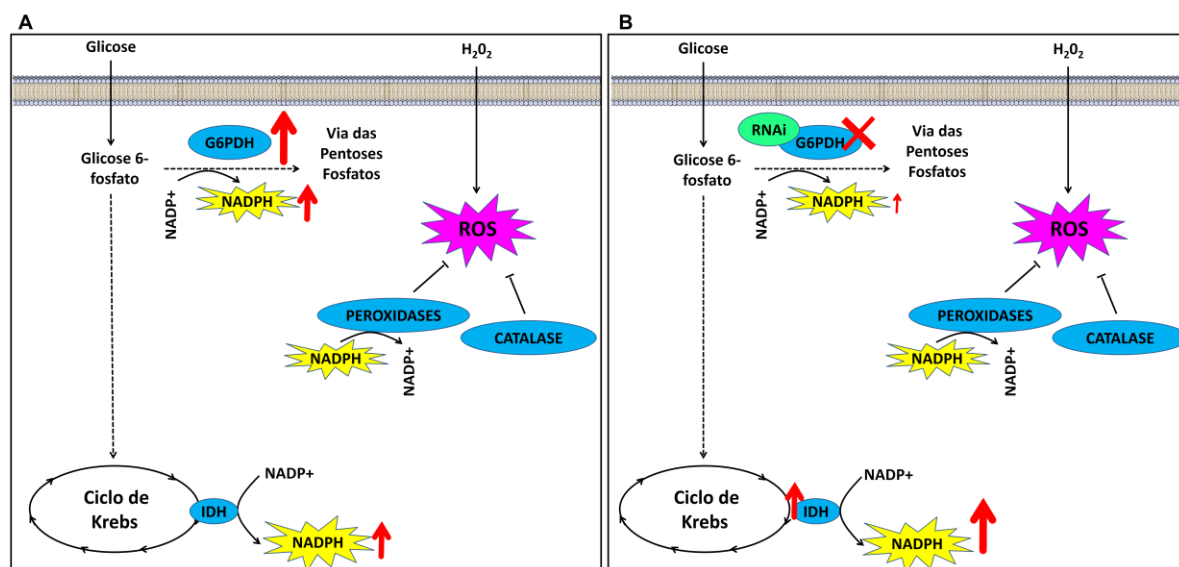




**Fig. 35: Viabilidade de células tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  após a inibição de G6PDH.** Contagem celular foi verificada nas células BME26 incubadas com 6-ANAM, um inibidor conhecido de G6PDH nas concentrações de 100, 200 e 400  $\mu\text{M}$  por 10min antes do tratamento com 4,4 mM e 6,6 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 24 h. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ , comparado ao controle sem  $\text{H}_2\text{O}_2$  (barra branca) dentro de cada grupo de mesma concentração de inibidor; e #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,0001$  comparado ao controle sem inibidor (grupo sem adição de 6-ANAM) dentro de cada grupo de mesma concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , no teste de comparações múltiplas de Tukey.

Esses resultados indicam que mecanismos independentes de G6PDH contribuem para a manutenção da tolerância e controle redox em alta concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Essas observações sugerem um mecanismo compensatório que envolve ambas as enzimas metabólicas produtoras de NADPH, o que também pode contribuir para o equilíbrio redox em células BME26 sob tratamentos com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , como proposto no esquema apresentado na figura 36.



**Fig. 36: Representação da adaptação celular para manter a produção de NADPH e tolerância ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** (A) Adaptação normal das células BME26 após a produção de ROS induzida pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno. (B) Dependência da produção de NADPH pela Via das Pentoses Fosfato transferida para IDH-NADP levando a adaptação após a produção de ROS induzida pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno.

## 6. DISCUSSÃO

Nesta tese, observou-se que as células BME26 toleram altas concentrações de  $H_2O_2$ , pois esta linhagem celular apresentou uma  $DL_{50}$  de 6mM após 24 horas de exposição ao  $H_2O_2$  (Fig. 10B), enquanto que as células AH927 com  $DL_{50}$  de 0,2 mM de  $H_2O_2$  no mesmo tempo de incubação (Fig. 6) (DASH et al., 2008). Desse modo, ao comparar o perfil de viabilidade das células BME26 com o perfil de outras células de mamíferos tratadas com  $H_2O_2$ , observa-se que a linhagem de células *R. microplus* apresenta uma alta tolerância em relação às células de mamífero (Fig. 8). Li e colaboradores (2012) também demonstraram a sensibilidade das células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) à exposição por 18 horas ao  $H_2O_2$  (250-1000  $\mu$ M), que resultou em perda grave de viabilidade celular, avaliada por MTT. As células HUVEC tratadas com 1mM de  $H_2O_2$ , por 18 horas, apresentaram diminuição de 80% na viabilidade celular (LI et al., 2012).

Estudos anteriores demonstraram que os artrópodes hematófagos possuem um ambiente oxidativo interno devido ao seu comportamento alimentar (CITELLI et al., 2007; DIAS et al., 2016; GRAÇA-SOUZA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2011)(Citelli et al., 2007; Dias et al., 2016; Graça-Souza et al., 2006; Oliveira et al., 2011). Muitos trabalhos têm focado na avaliação de algumas estratégias bioquímicas, utilizadas por artrópodes hematófagos como *R. prolixus* (OLIVEIRA, P.L. et al., 1995), *Aedes aegypti* (PEREIRA et al., 2007) e *R. microplus* (MAYA-MONTEIRO et al., 2000), para lidar com o estresse oxidativo causado pela alimentação com alto teor de heme. Dentre elas se destacam a redução do heme livre através da formação de agregados insolúveis, ou formação de complexos entre a molécula de heme e proteínas ligantes, ou pela simples degradação do heme (OLIVEIRA, M.F. et al., 1999; PAIVA-SILVA et al., 2006).

Comparamos as características de tolerância e sobrevivência de algumas células de artrópodes e de mamíferos, após exposição ao aumento das concentrações de  $H_2O_2$  (Fig. 8 e 9). As linhagens de células embrionárias de artrópodes testadas (BME26, Aag2 e S2) apresentaram maior tolerância ao  $H_2O_2$  quando comparadas com células de mamífero. Para as células BME26, a tolerância ao  $H_2O_2$  foi vinte vezes maior do que as duas células de mamífero testadas. Embora

ainda precisemos de estudos adicionais para elucidar essas observações experimentais, curiosamente, a tolerância ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das células S2 é um fenômeno, de acordo com as revisões recentes publicadas. Foram identificados vários genes de resistência ao estresse oxidativo e elevação do teor de NADPH em *Drosophila* desafiadas por diversas condições como: estresse oxidativo, fome, tratamento com Paraquat, hiperóxia, hipóxia e dessecação (RISTOW E ZARSE, 2010; RZEZNICZAK E MERRITT, 2012; ZHAO E HADDAD, 2011).

Observamos que as células BME26 não apenas toleraram como mantiveram sua capacidade proliferativa (Fig.13 e 14), mesmo quando tratadas com 4,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentração que afeta aproximadamente 25% das células BME26 após 24h de tratamento, figuras 10 e 11). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi previamente relatado como indutor da fosforilação de AKT e promotor da sobrevivência em células de mamíferos quando em concentrações entre 20 e 50 micromolar (SADIDI, LENTZ E FELDMAN, 2009). Esses achados sugerem que a tolerância ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser o resultado de mecanismos bem regulados que compõem a geração, remoção e sinalização de ROS (BURDON, 1995; TRACHOOTHAM et al., 2008). Diante de tais evidências, houve um interesse do grupo em aprofundar os estudos relacionados à resistência das células BME26 e suas correlações metabólicas com este fenômeno.

Em organismos aeróbios a produção de ROS ocorre em equilíbrio mantido principalmente por sistemas de defesa antioxidantes (BIRBEN et al., 2012). Os compostos oxidativos, incluindo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, são constantemente formados em células e possuem funções fisiológicas cruciais (Fig. 7) (DEYULIA et al., 2005; MITTLER, 2017; RAY, HUANG E TSUJI, 2012; SIES, 2014). No entanto, quando acontece um desequilíbrio nesta relação, os danos causados por essas espécies reativas são gerados na célula e promovem distúrbios que muitas vezes são irreversíveis. Dentre os vários componentes celulares, muitos danos são ocasionados a proteínas, lipídeos e ao DNA, podendo ser associados com várias condições patológicas como a diabetes, septicemia e doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer (INDO et al., 2015).

Na última década, muitas pesquisas indicam que ROS também são necessárias à sinalização redox fisiológica, o que é essencial para as funções das vias reguladoras (ANDREYEV et al., 2015; MITTLER, 2017). Foi postulado que as respostas adaptativas ao estresse induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em células sensíveis, são relacionadas principalmente à indução de enzimas antioxidantes, com ênfase em

catalases, peroxidases e superóxido dismutases (BIRBEN et al., 2012). A indução destas enzimas é essencial para a remoção de ROS e é também parcialmente responsável por induzir a tolerância ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

No intuito de avaliar a existência de ROS dentro das células BME26 foram feitas as marcações com DHE, e foi avaliado se a adição H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno corresponderia a um aumento intracelular também. O resultado foi maior teor de ROS intracelular de modo dose dependente, 2 h após o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No entanto, 24 horas depois, o ROS diminuiu, o que sugere a participação de um mecanismo de eliminação dessas espécies (Fig. 15). Trabalhos futuros incluem a quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular para comparação com outras células. Normalmente, em células de mamíferos, a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular pode ir até 0,7 µM (CHANCE, SIES E BOVERIS, 1979; STONE E YANG, 2006).

A catalase é a primeira linha de defesa em células submetidas a estresse oxidativo e foi previamente descrita como altamente ativa durante o aumento do consumo de oxigênio em ovos e larvas de *R. microplus* (FREITAS et al., 2007). Apesar disso, 24 h após a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, não houve variação significativa na atividade da catalase, mas a transcrição da catalase mostrou-se elevada no mesmo período (Fig. 16). Este cenário aponta que outros mecanismos podem participar da manutenção do equilíbrio do estado redox celular.

O sistema antioxidante enzimático é representado, em adição à catalase, por enzimas como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase, e glutathione S-transferase. Freitas e colaboradores (2007) avaliaram algumas enzimas de resposta ao estresse oxidativo no carrapato *R. microplus*. Enzimas como, por exemplo, glutathione S-transferase e catalase aumentam bastante suas atividades no 20º dia da embriogênese, próximo à eclosão. Entretanto, no primeiro dia após a eclosão a atividade de ambas diminuiu. Além disso, observou-se correlação positiva entre a atividade da glutathione S-transferase e consumo de O<sub>2</sub> em embriões. Este aumento pode ser explicado pelo aumento do metabolismo durante o desenvolvimento embrionário em *R. microplus*. Porém, em células BME26 após 2 h o desafio com adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno resultou em aumento do consumo de O<sub>2</sub> enquanto a produção de superóxido mitocondrial diminuiu, também vimos aumento apenas na concentração de 2,2 mM da atividade de peroxidases (Fig. 17, 18 e 19). A taxa de produção de ROS mitocondrial é fortemente dependente do potencial de membrana

mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e é inversamente relacionada com a disponibilidade de ADP, utilizado para a síntese de ATP (DA-SILVA et al., 2004; WU et al., 2012).

De um modo geral, considera-se relação estreita entre os processos de desafio oxidativo, homeostase redox, mobilização energética e respostas antioxidantes (FORMAN, MAIORINO E URSINI, 2010; LIEMBURG-APERS et al., 2015). O estado redox em células é primeiramente estimado pelo potencial de redutor de cofatores como o NADH e NADPH, onde a manutenção deste equilíbrio é mantida por enzimas ao custo de energia metabólica (FORMAN, MAIORINO E URSINI, 2010).

Atualmente admite-se que exista uma relação entre a regulação do estresse oxidativo e o metabolismo energético (SANTIAGO et al., 2008; LIEMBURG-APERS et al., 2015). Dentro deste contexto, observou-se que as células BME26 são capazes de ativar genes do metabolismo frente os tratamentos com  $H_2O_2$ . As células BME26 foram investigadas sob 2 períodos após a adição de  $H_2O_2$ : um curto, de 2 horas, e um longo, de 24 horas, após o tratamento. Os perfis transcricional e catalítico das enzimas do metabolismo de carboidratos foram determinados e se mostraram influenciados por alterações em seu ambiente oxidativo. Foram avaliados vários genes envolvidos na gliconeogênese, glicólise e metabolismo do glicogênio, as principais vias de catabolismo e anabolismo de carboidratos, na linhagem celular embrionária BME26 (Fig. 21A, 22A, 26A, 27 e 28).

Em conjunto, no período curto de apenas 2 h, os resultados indicam que um aumento da HK, mas não de PK (Fig. 25B e 26B), pode sugerir que a glicose-6-fosfato seja desviada para via das pentoses e síntese de glicogênio (visto o aumento da atividade de G6PDH (Fig. 21) e aumento da expressão de GS (Fig. 31)). Há ainda evidências de que o conteúdo de glicose-6-fosfato seja proveniente de duas vias ao mesmo tempo: da gliconeogênese, dado o aumento da transcrição de PEPCCK (Figura 27A); e da entrada de glicose nas células BME26, devido ao aumento intracelular do análogo de glicose (Figura 24), que pode seguir diferentes destinos metabólicos além da via glicolítica.

Já em 24 h após o desafio com  $H_2O_2$ , observamos ainda uma necessidade de substrato para a via das pentoses fosfato (pois sua atividade se mantém alta) (Fig. 21B), podendo ser proveniente da quebra do glicogênio, direcionando o restante para obtenção de energia para a manutenção celular pela via glicolítica, por conta do aumento da atividade de PK (Fig. 26B).

A análise pontual do teor de glicogênio 24 h após o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mostrou que os níveis de glicogênio estão altos porém neste momento a expressão de GS total e fosforilada retornou aos níveis do controle, deste modo a ausência de momentos de quantificação de glicogênio entre 2h e 24h impossibilita maiores convicções. Sendo assim, podemos afirmar que os dados de quantificação (Fig. 29), PAS (Fig. 30) e imunolocalização da GS (Fig. 31), sugerem que a síntese de glicogênio não está favorecida em 2 h. Porém, em 24 h apesar do conteúdo celular de glicogênio aumentar, o perfil de atividade/localização da GS é similar entre os ensaios e o controle.

No total, esses resultados contribuem para a nossa compreensão dos mecanismos que controlam o metabolismo da glicose tanto em nível genético quanto, em alguns casos, em nível catalítico na linhagem celular BME26. A caracterização de alterações nas enzimas metabólicas em níveis de transcrição e funcional, em resposta ao ambiente oxidativo, pode levar à identificação de genes importantes para manutenção do equilíbrio redox celular.

Como uma importante estratégia celular adaptativa apresentada em resposta ao meio oxidativo foi demonstrada neste trabalho, a relação entre o consumo de oxigênio (Fig. 18) e a absorção de glicose (Fig. 24), concomitantemente com a diminuição da produção de superóxido mitocondrial (Fig. 19) nas células BME26. Portanto, tanto HK como G6PDH demonstraram serem importantes enzimas nesses processos. Assim, após a entrada da glicose, o primeiro passo para sua utilização é que seja fosforilada pela hexoquinase, formando glicose-6-fosfato. Já a G6PDH parece ser um membro chave para sistemas de resposta antioxidante em células glicolíticas, através da formação de NADPH, substrato importante para a manutenção de defesas antioxidantes, através do direcionamento da glicose-6-fosfato para a via das pentoses. Alguns trabalhos mostraram que o recrutamento de HK para a mitocôndria diminui a produção de ROS, aumentando a eficiência da transferência de elétrons durante a respiração aeróbia (DA-SILVA et al., 2004; LIEMBURG-APERS et al., 2015; MAILLOUX E HARPER, 2010; QUIJANO et al., 2016; RISTOW E ZARSE, 2010; WU et al., 2012). Assim, é possível controlar a formação de ROS mitocondrial em células glicolíticas, a partir do fornecimento de NADPH e manutenção da atividade de HK. Desta forma, a glicose regula as fontes enzimáticas de NADPH intracelulares em BME26. Em mamíferos, a hexoquinase-II se ancora à mitocôndria próxima ao translocador ADP/ATP, utilizando como

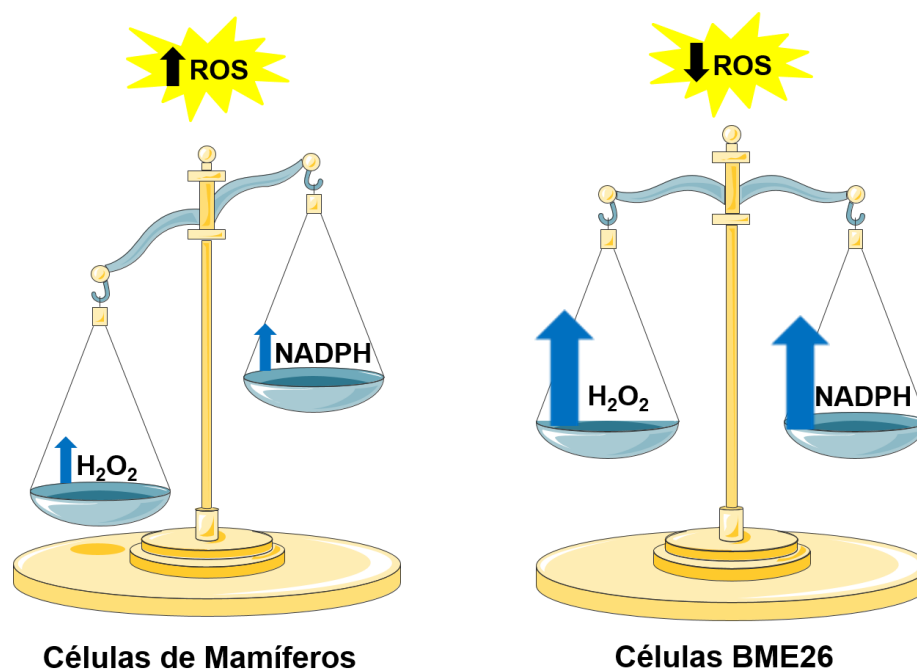
substrato o ATP produzido pela fosforilação oxidativa. O ADP, subproduto da hexoquinase, controla o potencial de membrana mitocondrial, assim como a geração de ROS em cérebro e coração de rato. Dessa forma, a inibição da hexoquinase resulta em um aumento do potencial da membrana mitocondrial e geração de superóxido convertido a  $H_2O_2$  pela catalase. Devido a esse processo, a atividade da ATPsintase é reduzida levando a um menor fluxo através da cadeia transportadora de elétrons. Sendo assim, a hexoquinase ancorada à mitocôndria desempenha um papel fundamental, prevenindo o estresse oxidativo, e reduzindo assim a geração de ROS através da reciclagem de ADP pela atividade da ATPsintase (DA-SILVA et al., 2004; WU et al., 2012).

Outra enzima produtora de NADPH abordada nesta tese é a EM-NADP<sup>+</sup>, sua atividade se dá pela presença de dois substratos como malato e NADP<sup>+</sup>, o malato é oxidado a piruvato liberando  $CO_2$  neste processo, e o NADP<sup>+</sup> é reduzido a NADPH, por isso essa enzima é conhecida como uma oxidoreductase. Em outros trabalhos a expressão de EM-NADP<sup>+</sup> demonstrou ser regulada por fatores de estresse em alguns organismos. As plantas CAM, em condições de seca, para evitar a perda de água, o estoma precisa permanecer por um grande período fechado, o que levaria à inanição de  $CO_2$ . Em compensação, o estoma fechado, ativa a tradução da EM-NADP<sup>+</sup> mantendo a assimilação de  $CO_2$ , permitindo que a fixação de carbono continue. No fungo, *Mucor circinelloides* observou-se a participação da ME-NADP<sup>+</sup> na regulação da síntese de lipídeos. Já em *Drosophila*, foi avaliada a interação de enzimas redutoras de NADP<sup>+</sup> (G6PDH, IDH-NADP<sup>+</sup> e EM-NADP<sup>+</sup>) submetidas a condições de estresse oxidativo, fome (inanição), e dessecação; verificou-se maior contribuição na forma de NADPH das enzimas, sendo a participação de G6PDH e IDH-NADP<sup>+</sup> mais acentuadas pelo estresse oxidativo e EM-NADP<sup>+</sup> mais participativa em situação de estresse por inanição (RZEZNICZAK E MERRITT, 2012). Existem então duas hipóteses para baixa participação da EM-NADP<sup>+</sup> em células BME26, por ela ser mais requerida em situação de baixa carga energética e a outra é dela ser uma enzima pouco participativa no estresse oxidativo comparada à G6PDH por exemplo.

Como propostas futuras há interesse em analisar as células tolerantes ao  $H_2O_2$  frente a outros indutores de estresse oxidativo, e verificar se haveria uma redução da tolerância das células BME26. Apesar de todo o importante papel da G6PDH, ela não responde sozinha às adaptações do tratamento com  $H_2O_2$ . Vimos



que após o tratamento com  $H_2O_2$  frente ao inibidor de G6PDH (6-ANAM) ou ao silenciamento de G6PDH, a tolerância das células BME26 ao agente oxidante  $H_2O_2$  ainda é mantida (Fig. 34 e 35). Isso pode se justificar pelo aumento da transcrição de IDH-NADP<sup>+</sup> (Fig. 33), que pode ser fornecedor de NADPH desta forma mantendo o potencial redutor da célula. Porém, em outros modelos a redução ou ausência da G6PDH é crucial na viabilidade celular. Zhang e colaboradores (2012) mostraram que elevados níveis de glicose em células endoteliais e de rim, com deficiência na atividade da G6PDH, levam à diminuição da sobrevivência celular. Em células  $\beta$  do pâncreas foi visto que a alta concentração de glicose também inibe a atividade e a expressão da G6PDH. De modo que tal inibição levou a um aumento de ROS e de apoptose, e diminuição da proliferação e secreção de insulina em células pancreáticas  $\beta$  (ZHANG et al., 2012). Determinando a importância da atividade de G6PDH, e sua ausência na função celular podendo levar à morte celular, Tian e colaboradores (1999) demonstraram que esta desempenha papel crítico na morte celular por afetar o potencial redox celular. Tais dados mostram que, os inibidores de G6PDH induzem morte celular pelo aumento de  $H_2O_2$  intracelular. Como consequências da inibição de G6PDH incluem-se um aumento significativo na apoptose e perda de proteínas tióis. Já a superexpressão de G6PDH levou a um aumento da resistência ao  $H_2O_2$  (TIAN 1999; TIAN 1998; ZHANG 2010). Com o objetivo de exemplificar de forma mais clara este fenômeno, estabeleceu-se um modelo de uma balança representativo comparado tais situações em células de mamíferos com esta célula embrionária (figura 37).



**Fig. 37: Representação da homeostase oxidativa no estado redox comparativo entre culturas de células de mamífero e BME26.** Balança representativa comparando situação de aumento da concentração de  $H_2O_2$  entre as células de mamíferos estudadas e citadas nesta tese e a célula BME26. Figura representando a eficiência metabólica da célula BME26 para produção de NADPH (potencial redutor) e controle de ROS.

De fato, na BME26 a tolerância ao  $H_2O_2$  depende de G6PDH, porém quando esta é inibida, outros mecanismos são ativados, entre eles a IDH-NADP<sup>+</sup>. Esses resultados sugerem uma adaptação metabólica entre as enzimas citosólicas e mitocondriais e sustentam uma primeira linha de defesa antioxidante em células BME26.

## 7. CONCLUSÕES

As espécies reativas de oxigênio (ROS) foram amplamente descritas como produtos químicos tóxicos, mesmo em concentração micromolar. Aqui, descrevemos que a linhagem embrionária de células BME26 do carrapato *R. microplus* são tolerantes a concentrações na escala de milimolar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. E apesar das poucas alterações morfológicas a capacidade proliferativa se mantem.

O tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promove um aumento de ROS intracelular transitório em 2h, que é amplamente reduzido após 24h, sugerindo uma estratégia de tolerância para lidar com níveis elevados de ROS.

O perfil transcricional de catalase e da peroxidase PHGPx exibiu um aumento significativo em 24h. Entretanto o perfil de atividade mostrou-se elevado apenas para PHGPx em 2h.

Como forma de adaptação celular 2h após o desafio com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o consumo de oxigênio e o transporte de glicose aumentaram, ao mesmo momento em que o superóxido mitocondrial diminuiu.

Os diferentes tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultaram em alterações nos perfis transcricional e de atividade de enzimas do metabolismo de carboidratos.

- O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promoveu aumento da expressão gênica e proteica da glicogênio sintase (GS) com predomínio da forma fosforilada no resíduo ser641, após 2h. Após 24h o conteúdo de glicogênio nas células tratadas foi maior do que na condição controle.

- O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promoveu aumento da expressão transcricional da principal enzima da via gliconeogênica após 2 h (PEPCK). Em 24 h todas as enzimas da via gliconeogênica testadas apresentaram redução da expressão gênica.

- 2h após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultou no aumento da atividade de HK e G6PDH, porém não de PK que se manteve ao nível do controle, indicando um

direcionamento da glicose-6-fosfato maior no sentido via das pentoses fosfato e menor no sentido da via glicolítica.

- 24h após o desafio com  $H_2O_2$  resultou numa alta atividade de G6PDH ainda, concomitante com uma alta atividade de PK, porém não de HK que se manteve ao nível do controle, indicando uma glicose-6-fosfato direcionada tanto para via das pentoses fosfato quanto para a via glicolítica.

Os níveis de NADPH aumentaram após o desafio com  $H_2O_2$  e esse fenômeno é suportado pela transcrição e atividade de G6PDH.

O silenciamento de gene G6PDH não alterou a tolerância ao  $H_2O_2$ , e ainda levou ao aumento da expressão gênica da IDH-NADP<sup>+</sup>.

Esses dados sustentam um mecanismo adaptativo frente à exposição de concentrações milimolares de  $H_2O_2$ , para manter a sobrevivência celular e o equilíbrio redox nas células BME26.

## 8. LITERATURA CITADA

- Abreu, L., Calixto, C., Waltero, C.F., Della Noce, B.P., Naftaly, W., Seixas, A., Parizi, L., Konnai, S., Da-Silva, V.I., Ohashi, K., 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. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1830(3): 2574-2582.
- Abreu, L., Fabres, A., Esteves, E., Masuda, A., Da-Silva, V.I., Daffre, S., Logullo, C. (2009). Exogenous insulin stimulates glycogen accumulation in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo cell line BME26 via PI3K/AKT pathway. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*. 153(2): 185-190.
- Ahmad, S. e Pardini, R.S. (1990). Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radical Biology and Medicine*. 8(4): 401-413.
- Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Murphy, A.N., Starkov, A.A. (2015). Mitochondrial ROS Metabolism: 10 Years Later. *Biochemistry* 80: 517-531.
- Apel, K. e Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55: 373-399.
- Arthur, J.R. (2000). The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 57: 1825-1835.
- Barbouti, A., Doulias, P.T., Nouis, D., Tenopoulou, M., Galaris, D. (2002). DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: Bolus addition versus continuous generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Free Radical Biology and Medicine*. 33: 691-702.
- Batista, L., Kaina, B., Meneghini, R., Menck, C. (2009). How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. 681(2-3): 197-208.
- Bell-Sakyi, L., Zwegarth, E., Blouin, E.F., Gould, E.A. e Jongejan, F. (2007). Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends in Parasitology*, 23: 450-457.
- Bienert, G.P., Møller, A.L.B., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Møller, I.M., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P. (2007). Specific Aquaporins Facilitate the Diffusion of Hydrogen Peroxide across Membranes. *The Journal of Biological Chem.* 282(2): 1183-1192.
- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1758: 994-1003.
- Birben, E., Murat, U., Md, S., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO J*. 5: 9-19.
- Bottino-Rojas, V., Talyuli, O.A.C., Jupatanakul, N., Sim, S., Dimopoulos, G., Venancio, T.M., Bahia, A.C., Sorgine, M.H., Oliveira, P.L., and Paiva-Silva, G.O.

- (2015). Heme signaling impacts global gene expression, immunity and dengue virus infectivity in *Aedes aegypti*. *PLoS One*. 10: 1-19.
- Brown, M.R., Miller Jr., F.J., Li, W.G., Ellingson, A.N., Mozena, J.D., Chatterjee, P., Engelhardt, J.F., Zwacka, R.M., Oberley, L.W., Fang, X., Spector, A.A., Weintraub, N.L. (1999). Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 85(6): 524-533.
- Burdon, R.H. (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic. Biol. Med*. 18: 775-794.
- Cadena-Herrera, D., Esparza-De Lara, J.E., Ramírez-Ibañez, N.D., López-Morales, C.A., Pérez, N.O. Flores-Ortiz, L.F., Medina-Rivero, E. (2015). Validation of three viable-cell counting methods: Manual, semi-automated, and automated. *Biotechnology Reports*. 7: 9-16.
- Campos, E., Moraes, J., Façanha, A.R., Moreira, E., Valle, D., Abreu, L., Manso, P.P.A., Nascimento, A., Pelajo-Machado, M., Lenzi, H., Masuda, A., Vaz-Jr, I., Logullo, C. (2006). Metabolic activity of *Boophilus microplus* during embryonic development. *Veterinary Parasitology* 138: 349–357.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*. 59: 527–605.
- Charles, I., Khalyfa, A., Kumar, D. M., Krishnamoorthy, R.R., Roque, R.S., Cooper, N., Agarwal, N. (2005). Serum deprivation induces apoptotic cell death of transformed rat retinal ganglion cells via mitochondrial signaling pathways. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 46(4): 1330-1338.
- Citelli, M., Lara, F.A., Vaz, I. da S., Oliveira, P.L. (2007). Oxidative stress impairs heme detoxification in the midgut of the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 151: 81-88.
- Corson, M.S., Teel, P.D., Grant, W.E. (2004). Microclimate influence in a physiological model of cattle-fever tick (*Boophilus* spp.) population dynamics. *Ecol. Modell*. 180: 487-514.
- Cossío-Bayúgar, R., Miranda, E., Holman, P.J. (2005). Molecular cloning of a phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol*. 35: 1378-1387.
- D'Autréaux, B. e Toledano, M.B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 8: 813-824.
- da Silva, R.M., Della Noce, B., Waltero, C., Costa, E.P., de Abreu, L., Naftaly, W., Moraes, J., Gomes, H., Konnai, S., da Silva, V.I., Ohashi, K., Logullo, C. (2015). Non-classical gluconeogenesis-dependent glucose metabolism in *Rhipicephalus microplus* embryonic cell line BME26. *International Journal of Molecular Sciences*. 16(1): 1821-1839.
- Dash, R., Acharya, C., Bindu, P.C., Kundu, S.C. (2008). Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts. *BMB reports*. 41(3): 236-241.

- Da-Silva, W.S., Gómez-Puyou, A., De Gómez-Puyou, M.T., Moreno-Sanchez, R., De Felice, F.G., De Meis, L., Oliveira, M.F., and Galina, A. (2004). Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense. Steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 39846–39855.
- Datkhile, K.D., Mukhopadhyaya, R., Dongre, T.K., Nath, B.B. (2009). Increased level of superoxide dismutase (SOD) activity in larvae of *Chironomus ramosus* (Diptera: Chironomidae) subjected to ionizing radiation. *Comp Biochem Physiol C.* 149: 500-506.
- De la Fuente, J., Blouin, E.F., Manzano-Roman, R., Naranjo, V., Almazán, C., Perez de la Lastra, J.M., Zivkovic, Z., Jongejan, F., Kocan, K.M. (2007). Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma marginale*. *Genomics.* 90: 712-722.
- DeYulia, G.J., Cárcamo, J.M., Bórquez-Ojeda, O., Shelton, C.C., Golde, D.W. (2005). Hydrogen peroxide generated extracellularly by receptor-ligand interaction facilitates cell signaling. *PNAS USA.* 102: 5044-5049.
- Dias, F.A., Gandara, A.C.P., Perdomo, H.D., Gonçalves, R.S., Oliveira, C.R., Oliveira, R.L.L., Citelli, M., Polycarpo, C.R., Santesmasses, D., Mariotti, M., Guigó, R., Braz, G.R., Missirlis, F., Oliveira, P.L. (2016). Identification of a selenium-dependent glutathione peroxidase in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 69: 105-114.
- Embrapa (2005). Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/sala/noticias/jornaldoleite.php?id=163>.
- Esteves, E., Bastos, C. V., Zivkovic, Z., de La Fuente, J., Kocan, K., Blouin, E., Ribeiro, M.F.B., Passos, L.M.F., and Daffre, S. (2009). Propagation of a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale* with appendage in a tick cell line (BME26) derived from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.* 161: 150-153.
- Esteves, E., Lara, F.A., Lorenzini, D.M., Costa, G.H.N., Fukuzawa, A.H., Pressinotti, L.N., Silva, J.R.M.C., Ferro, J.A., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., et al. (2008). Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 568-580.
- Ferreira, T. e Rasband, W. (2012). ImageJ User Guide ImageJ User Guide. ImageJ FIJI 1.46r. 185.
- Flechtmann, C.H.W. (1977). Elementos de acarologia. Livraria Nobel, São Paulo.
- Forman, H.J. e Torres, M. (2002). Reactive oxygen species and cell signaling. Respiratory Burst in Macrophage Signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166: S4-S8.
- Forman, H.J., Maiorino, M., Ursini, F. (2010). Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* 49: 835-842.
- Fothergill-Gilmore, L.A., Michels, P.A., (1993). Evolution of glycolysis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 59: 105-235.

- Fraga, A., Moraes, J., Da Silva, J.R., Costa, E.P., Menezes, J., Da Silva Vaz, I., Logullo, C., Da Fonseca, R.N., Campos, E. (2013). Inorganic polyphosphates regulate hexokinase activity and reactive oxygen species generation in mitochondria of *Rhipicephalus (boophilus) microplus* embryo. *Int. J. Biol. Sci.* 9: 842-852.
- Freitas, D.R.J., Rosa, R.M., Moraes, J., Campos, E., Logullo, C., Da Silva Vaz, I., Masuda, A. (2007). Relationship between glutathione S-transferase, catalase, oxygen consumption, lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 146: 688-694.
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., Stein, H. (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer.* 31(1): 13-20.
- Gonzales, J.C. (1995). O controle do carrapato do boi. 2a ed. Porto Alegre. Edição do autor.
- Gonzales, J.C., Silva, N.R., Franco, N. (1974), A vida livre do *Boophilus microplus*. *Arq. Fac. Vet. UFRGS. RG.* 3: 21-28.
- Graça-Souza, A. V., Maya-Monteiro, C., Paiva-Silva, G.O., Braz, G.R.C., Paes, M.C., Sorgine, M.H.F., Oliveira, M.F., Oliveira, P.L. (2006). Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 322-335.
- Hambarde, S., Singh, V., Chandna, S. (2013). Evidence for Involvement of Cytosolic Thioredoxin Peroxidase in the Excessive Resistance of Sf9 Lepidopteran Insect Cells against Radiation-Induced Apoptosis. *PLoS One* 8 (3).
- Holman, P.J., Ronald, N.C. (1980). A new tick cell line derived from *Boophilus microplus*. *Res. Vet. Sci.* 29: 383-387.
- Indo, H.P., Davidson, M., Yen, H.-C., Suenaga, S., Tomita, K., Nishii, T., Higuchi, M., Koga, Y., Ozawa, T., and Majima, H.J. (2007). Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion.* 7: 106-118.
- Indo, H.P., Yen, H.-C., Nakanishi, I., Matsumoto, K.-I., Tamura, M., Nagano, Y., Matsui, H., Gusev, O., Cornette, R., Okuda, T., et al. (2015). A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 56: 1-7.
- Jongejan, F. e Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology.* 129: S3-S14.
- Kang, S.W., Lee, S., Lee, E.K. (2015). ROS and energy metabolism in cancer cells: alliance for fast growth. *Archives of Pharmacal Research.* 38(3): 338-345.
- Keirans, J.E. (1992). Systematics of the Ixodida ( Argasidae, Ixodidae, Nuttalliellidae): An overview and some problems. In *Tick Vector Biology. Medical and Veterinary Aspects.* 1-24.



- Keirans, J.E. e Robbins, R.G. (1999). A word checklist of genera, subgenera, and species of ticks (Acari: Ixodida) published from 1973-1997. *J Vector Ecol.* 24: 115-129.
- Kresge, N., Simoni, R.D., Hill, R.L. (2005). 100 years of biochemistry and molecular biology (JBC Centennial, 1905-2005), Otto Fritz Meyerhof and the elucidation of the glycolytic pathway. *J. Biol.Chem.* 280.
- Kuehne, A., Emmert, H., Soehle, J., Winnefeld, M., Fischer, F., Wenck, H., Gallinat, S., Terstegen, L., Lucius, R., Hildebrand, J., Zamboni, N. (2015). Acute activation of oxidative pentose phosphate pathway as first-line response to oxidative stress in human skin cells. *Molecular Cell.* 59(3): 359-371.
- Kulkarni, G.V. e McCulloch, C. (1994). Serum deprivation induces apoptotic cell death in a subset of Balb/c 3T3 fibroblasts. *Journal of Cell Science*, 107 (5): 1169-1179.
- Kurtti, T. (1988) Tick tissue and cell culture in vector research. *Adv. Dis. Vector Res.* 5: 87-109.
- Leal, A.T., Pohl, P.C., Ferreira, C.A.S., Nascimento-Silva, M.C.L., Sorgine, M., Logullo, C., Oliveira, P.L., Farias, S.E., Vaz, Jr.I.S., Masuda, A. (2006) Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin (BYC) expressed in inclusion bodies. *Protein Expres Purific.* 45: 107-114.
- Li, Z., Liu, J., Hu, J., Li, X., Wang, S., Yia, D., Zhao, M. (2012). Protective effects of hyperoside against human umbilical vein endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide. *Journal of Ethnopharmacology.* 139: 388-394.
- Liemburg-Apers, D.C., Willems, P.H.G.M., Koopman, W.J.H., Grefte, S. (2015). Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism. *Arch. Toxicol.* 89: 1209-1226.
- Liu, Y., Fiskum, G., Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.* 80: 780-787.
- Logullo, C., Vaz, I.S., Sorgine, M.H., Paiva-Silva, G.O., Faria, F.S., Zingali, R.B., De Lima, M.F., Abreu, L., Oliveira, E.F., Alves, E.W., Masuda, H., Gonzales, J.C., Masuda. A., Oliveira, P.L. (1998). Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology.* 116: 525-32.
- Luz, H., Wanderley, L., Faustino, L. (2011). Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. *Acta Scientiae Veterinariae.* 39(2): 956.
- Mailloux, R.J. e Harper, M.E. (2010). Glucose regulates enzymatic sources of mitochondrial NADPH in skeletal muscle cells; a novel role for glucose-6-phosphate dehydrogenase. *FASEB J.* 24: 2495-2506.
- Martins, R., Newton, R., Fonseca, R., Silva, I.V., Logullo, C. (2017). Energy Metabolism Correlations in Tick Embryo Development. *International Journal of Veterinary Science and Research.* 26(32): 26-30.

- Mattila, J.T., Burkhardt, N.Y., Hutcheson, H.J., Munderloh, U.G. Kurtti, T.J. (2007). Isolation of cell lines and a rickettsial endosymbiont from the soft tick *Carios capensis* (Acari: Argasidae: Ornithodorinae). *Journal of Medical Entomology*. 44: 1091.
- Mattos, I.L., Shiraishi, K.A., Braz, A.D., Fernandes, J.R. (2003). Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. *Quim. Nova*. 26: 373-380.
- Maya-Monteiro, C.M., Alves, L.R., Pinhal, N., Abdalla, D.S., Oliveira, P.L. (2000). HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *J Biol Chem*. 275: 36584-9.
- Mehlhorn, H., Al-Rasheid, K.A.S., Al-Quraishy, S., Abdel-Ghaffar, F. (2012). Research and increase of expertise in arachno-entomology are urgently needed. *Parasitol. Res*. 110: 259-265.
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends Plant Sci*. 22: 11-19.
- Moraes, J., Galina, A., Alvarenga, P.H., Rezende, G.L., Masuda, A., Vaz, Jr.I.S., Logullo, C. (2007). Glucose metabolism during embryogenesis of hard tick *B. microplus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 146: 528-533.
- Munderloh, U.G. (1994). Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. *J. Parasitol*. 80: 533-543.
- Munderloh, U.G. e Kurtti, T.J. (1989). Formulation of medium for tick cell culture. *Exp. Appl. Acarol*. 7: 219-229.
- Nari, A. (1995). Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Vet. Parasitol.*, 57: 153-165.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M., Lehninger, A.L. (2015) *Lehninger: Princípios de bioquímica*. Sarvier.
- Ng, C.H., Tan, S.X., Perrone, G.G., Thorpe, G.W., Higgins, V.J., Dawes, I.W. (2008). Adaptation to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*: The role of NADPH-generating systems and the SKN7 transcription factor. *Free Radical Biology and Medicine*. 44(6): 1131-1145.
- Nijhof, A.M., Balk, J.A., Postigo, M., Jongejan, F. (2009). 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 Molecular Biology*. 10:112.
- Oliveira, J.H., Gonçalves, R.L.S., Lara, F.A., Dias, F.A., Gandara, A.C., Menna-Barreto, R., Edwards, M., Laurindo, F., Silva-Neto, M., Sorgine, H.F. Oliveira, P.L. (2011). Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. *PLoS Pathogens*. 7(3): e1001320.
- Oliveira, M.F., Silva, J.R., Dansa-Petretski, M., De Souza, W., Lins, U., Braga, C.M., Masuda, H., Oliveira, P.L. (1999). Haem detoxification by an insect. *Nature*. 400: 517-518.

- Oliveira, P.L., Kawooya, J.K., Ribeiro, J.M., Meyer, T., Poorman, R., Alves, E.W., Walker, F.A., Machado, E.A., Nussenzveig, R.H., Padovan, G.J., Masuda, H.A. (1995). Heme-binding protein from hemolymph and oocytes of the blood sucking insect, *Rhodnius prolixus*. Isolation and characterization. *J Biol Chem.* 270(18): 10897-901.
- Paiva-Silva, G.O., Cruz-Oliveira, C., Nakayasu, E.S., Maya-Monteiro, C.M., Dunkov, B.C., Masuda, H., Almeida, I.C., Oliveira, P.L. (2006). A heme-degradation pathway in a blood-sucking insect. *PNAS.* 103(21): 8030-8035.
- Parker, J.D., Parker, K.M., Keller, L. (2004). Molecular phylogenetic evidence for an extracellular Cu Zn superoxide dismutase gene in insects. *Insect Molecular Biology*, 13: 587-594.
- Pereira, L.O., Oliveira, P.L., Almeida, I.C., Paiva-Silva, G.O. (2007). Biglutaminylbiliverdin IX alpha as a heme degradation product in the dengue fever insect-vector *Aedes aegypti*. *Biochemistry.* 46: 6822-6829.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research.* 29 (9): 45e-45.
- Pohl, P.C., Carvalho, D.D., Daffre, S., Da Silva Vaz, I., Masuda, A. (2014). In vitro establishment of ivermectin-resistant *Rhipicephalus microplus* cell line and the contribution of ABC transporters on the resistance mechanism. *Vet. Parasitol.* 204: 316-322.
- Preston, T.J., Muller, W.J., Singh, G. (2001). Scavenging of Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by Catalase Inhibits the Proliferation of HER-2/Neu-transformed Rat-1 Fibroblasts through the Induction of a Stress Response. *Journal of Biological Chemistry.* 276 (12): 9558-9564.
- Quijano, C., Trujillo, M., Castro, L., Trostchansky, A. (2016). Interplay between oxidant species and energy metabolism. *Redox Biol.* 8: 28-42.
- Ray, P.D., Huang, B.W., Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* 24: 981-990.
- Rello, S., Stockert, J.C., Moreno, V., Gámez, A., Pacheco, M., Juarranz, A., Cañete, M., Villanueva, A. (2005). Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis.* 10: 201-208.
- Rhee, S.G. (2006). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science.* 312:1882.
- Ristow, M. e Zarse, K. (2010). How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp. Gerontol.* 45: 410-418.
- Rombough, P. (2011). The energetics of embryonic growth. *Respir Physiol Neurobiol.* 178: 22-29.
- Rzezniczak, T.Z. e Merritt, T.J.S. (2012). Interactions of NADP-reducing enzymes across varying environmental conditions: a model of biological complexity. *G3 (Bethesda).* 2: 1613-1623.

- Sadidi, M., Lentz, S.I., Feldman, E.L. (2009). Hydrogen peroxide-induced Akt phosphorylation regulates Bax activation. *Biochimie* 91: 577-585.
- Sanches, J.A.G., Nardy, M.B.C., Stella, M.B. (2012). Bases da bioquímica e tópicos de biofísica: um marco inicial. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Santiago, A.P.S.A., Chaves, E.A., Oliveira, M.F., Galina, A. (2008) Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: Correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues. *Biochimie*. 90: 1566-1577.
- Santos, V.T., Ribeiro, L., Fraga, A., de Barros, C.M., Campos, E., Moraes, J., Fontenele, M.R., Araújo, H.M., Feitosa, N.M., Logullo, C., da Fonseca, R.N. (2013). The embryogenesis of the Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: The establishment of a new chelicerate model system. *Genesis*. 51(12): 803-818.
- Sanz, A., Trenzado, C.E., López-Rodríguez, M.J., Furné, M.J., Figueroa, J.M.T. (2010). Study of Antioxidant Defense in Four Species of Perloidea (Insecta, Plecoptera). *Zoological Science*, 27: 952-958.
- Saramago, L., Franceschi, M., Logullo, C., Masuda, A., Vaz, I.S., Farias, S.E., Moraes, J. (2012) Inhibition of enzyme activity of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* triosephosphate isomerase and BME26 cell growth by monoclonal antibodies. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(10): 13118-13133.
- Schriner, S.E., Linford, N.J., Martin, G.M., Treuting, P., Ogburn, C.E., Emond, M., Coskun, P.E., Ladiges, W., Wolf, N., Remmen, H. Van, et al. (2005). Extension of Murine Life Span by Overexpression of Catalase Targeted to Mitochondria. *Science* 308(80): 1909-1911.
- Schwartz, A.G. e Pashko, L.L. (2004). Dehydroepiandrosterone, glucose-6 phosphate dehydrogenase, and longevity. *Ageing Research Reviews*. 3: 171-187.
- Segal, A.W. (2008). The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40: 604-618.
- Seifert, G.W., Springell, P.H., Tatchel, I.R.J. (1968). Radiactive studies on the feeding of larvae, nymphs and adults of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitology*. 58: 415-430.
- Seixas, A., Oliveira, P., Termignoni, C., Logullo, C., Masuda, A., da Silva Vaz, I. (2012) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 148(1-2): 149-156.
- Sies, H. (2014). Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation: Redox signaling and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 289: 8735-8741.
- Smolková, K., e Ježek, P. (2012). The role of mitochondrial NADPH-dependent isocitrate dehydrogenase in cancer cells. *Int. J. Cell Biol. Review Article*. 273947: 1-12
- Sonenshine, D.E., e Roe, M. (2014) *Biology of Ticks Volume 1*, 2ª edição. 557p.

- Stone, J.R. e Yang, S. (2006). Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxidants and Redox Signaling*. 8: 243-270.
- Stone, J.R. e Yang, S. (2006). Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxidants and Redox Signaling*. 8: 243-270.
- Sutherst, R.W., Maywald, G.F., Kerr, J.D., Siegeman, D.A. (1983). The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. *Australian Journal of Agricultural Research*. 34: 317-327.
- Temple, M.D., Perrone, G.G., Dawes, I.W. (2005) Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends in Cell Biology*. 15(6): 319-326.
- Tian, W.N., Braunstein, L.D., Apse, K., Pang, J., Rose, M., Tian, X., Stanton, R.C. (1999). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *The American journal of physiology*. 276(5): C1121-C1131.
- Tian, W.N., Braunstein, L.D., Pang, J., Stuhlmeier, K.M., Xi, Q.C., Tian, X., Stanton, R.C. (1998). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *Journal of Biological Chemistry*. 273(17): 10609-10617.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M.A., Nilsa, R.-D.V., and Huang, P. (2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxid. Redox Signal*. 10: 1343-1374.
- Umemiya, R., Matsuo, T., Hatta, T., Sakakibara, S., Boldbaatar, D., Fujisaki, K. (2008). Autophagy-related genes from a tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Autophagy*. 4: 79-81.
- Varma, M.G.R., Pudney, M., Leaky, C.J. (1975). The establishment of three cell lines from the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) and their infection with some arbovirus. *J. Med. Entomol.*, 11: 698-706.
- Vaz, Jr.I., (1998) Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 66(3-4): 331-341.
- Vital, W., Rezende, G.L., Abreu, L., Moraes, J., Lemos, F.J., Vaz, I.S., Logullo, C. (2010). Germ band retraction as a landmark in glucose metabolism during *Aedes aegypti* embryogenesis. 10: 25.
- WALKER, J.M. (2013). Mammalian Cell Viability, Methods and Protocol. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 53(9): 1689-1699.
- Wang, Y.-P., Zhou, L.-S., Zhao, Y.-Z., Wang, S.-W., Chen, L.-L., Liu, L.-X., Ling, Z.-Q., Hu, F.-J., Sun, Y.-P., Zhang, J.-Y., Yang, C., Yang, Y., Xiong, Y., Guan, K.-L., Ye, D. (2014). Regulation of G6PD acetylation by SIRT2 and KAT9 modulates NADPH homeostasis and cell survival during oxidative stress. *EMBO J*. 33: 1304-1320.
- Wu, R., Wyatt, E., Chawla, K., Tran, M., Ghanefar, M., Laakso, M., Epting, C.L., and Ardehali, H. (2012). Hexokinase II knockdown results in exaggerated cardiac hypertrophy via increased ROS production. *EMBO Mol. Med*. 4: 633-646.

- Ying, W. (2008). NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in Cellular Functions and Cell Death: Regulation and Biological Consequences. *Antioxid. Redox Signal.* 10: 179-206.
- Yoboue, E.D., Mougeolle, A., Kaiser, L., Averet, N., Rigoulet, M., and Devin, A. (2014). The role of mitochondrial biogenesis and ROS in the control of energy supply in proliferating cells. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1837: 1093-1098.
- Zhang, Z., Liew, C.W., Handy, D.E., Zhang, Y., Leopold, J.A. Hu, J., Guo, L., Kulkarni, R.N., Loscalzo, J., Stanton, R.C. (2010). High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and  $\beta$ -cell apoptosis. *The FASEB Journal.* 24(5): 1497-1505.
- Zhang, Z., Yang, Z., Zhu, B., Hu, J., Liew, C.W., Zhang, Y., Leopold, J.A., Handy, D.E., Loscalzo, J., Stanton, R.C. (2012). Increasing glucose 6-phosphate dehydrogenase activity restores redox balance in vascular endothelial cells exposed to high glucose. *PLoS ONE.* 7(11): e49128.
- Zhao, H., Kalivendi, S., Zhang, H., Joseph, J., Nithipatikom, K., Vásquez-Vivar, J., and Kalyanaraman, B. (2003). Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: Potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 1359-1368.
- Zhao, H.W. e Haddad, G.G. (2011). Review: Hypoxic and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster*. In *Placenta.* 25: S104-S108
- Zou, C., Wang, Y., Shen, Z. (2005). 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods.* 64 (3): 207-215.

## APÊNDICE I:

## Sequências e Alinhamentos da G6PDH

## A

	10	20	30	40	50	60
<i>H. sapiens</i>	-----MAEQVALS-----RTQVCGILREEL--					20
<i>R. microplus</i>	-----MPQTS-----FPPSLs-----P.CIAL.K.SIH-					23
<i>R. appendiculatus</i>	MAGRATNEETCSLLDII-----LNSSLCSAEESSYSSEDRICIAL.K.SIH-					45
<i>I. scapularis</i>	-----VEMPQSS-----VVL-----FPPALS-----P.CIAL.K.SIH-					25
<i>T. castaneum</i>	-----MPLLK-----IDDD.D.AN-----SEVCLALY.KS.KS					27
<i>A. aegypti</i>	----MHAATMVELLKGVGSLIYYVNSNGYRTS.SDSSDNTLGTLEGEELA.I.RN.KS					56
	70	80	90	100	110	120
<i>H. sapiens</i>	----FQGDAPHQSDTHIFIMGASGLAKKKIYPTIWWLFRDGLLPENTFLVGYARSRRLT					76
<i>R. microplus</i>	----LFEEPVQEGQQ...VVL.....L.A.....QK.KF....TKM.					79
<i>R. appendiculatus</i>	----LFEEPVQEGQQ...VVL.....L.A.....QK.KF....TKM.					101
<i>I. scapularis</i>	----LFEEPVQEGQQ.V.VL.....L.A.....PK.KF....NM.					81
<i>T. castaneum</i>	KEMDHG.TH.DGHHP.V.TL.....R.....L...Y.N...V.VFF....KTS					87
<i>A. aegypti</i>	SAMDCE.TH.DCNCP.V.VVF.....R.....L.....N...CV.RF....K..					116
	130	140	150	160	170	180
<i>H. sapiens</i>	VADIRKQSEPFKATPEEKLKLEDFFARNsYVAGQYDDAAsYQRLNSHMNALHLGSQANR					136
<i>R. microplus</i>	LEELWAKIV..L.VKD...SRFAE.TRA...LS.K..ESSDFVV..KA.EK.EGN.GG..					139
<i>R. appendiculatus</i>	LEELWGKML..L.VKDD..SRFAE.TRA...LS.K..ESNDFVT.SKE.EK.EGNAGG..					161
<i>I. scapularis</i>	.ESLSEKI..YL.VKE...E.FSN.LKL.T.IS.K..ASEDFDN.DGELRK.EGS.-..					140
<i>T. castaneum</i>	.QE.KEKCK.YM.VRHG.EERF...WKLHY...S...SRTDFE...QELCPFEK.PA...					147
<i>A. aegypti</i>	.NEL.EKCHQYM.VE.DQQE.Y.Q.W.L.F.HP.S...SRRDFEL..QDISKFET.KM...					176
	190	200	210	220	230	240
<i>H. sapiens</i>	LFYLA LPPTVYEA VTKNIHESCMSQIGWNRIIVEKPFGRDLQSSDRLSNHISLRFREDQI					196
<i>R. microplus</i>	M..M.....FQQ.AS..KQH...KQ..T.VVI.....S...AE...LAA..E.S..					199
<i>R. appendiculatus</i>	M..M.....FQQ.AS..KQH...KQ..T.VVI.....H.S...AE..S.LA...E.S..					221
<i>I. scapularis</i>	I..M.....FQ..AT..KRH...KK..T.VVI.....K.SA..AE...LA...D.S.L					200
<i>T. castaneum</i>	V.....S.F.T..VH.RN...APK..T...I.....FD..QK...LG...T.Q..					207
<i>A. aegypti</i>	.....S.F.T..VH.RNT..GLK.....AD..NA..A.LAK..S.E.L					236
	250	260	270	280	290	300
<i>H. sapiens</i>	YRIDHYLGKEMVQNLMLVLRFANRIFGPIWNRDNIA CVILTFK <sup>E</sup> PFGTTEGRGGYDFDFGII					256
<i>R. microplus</i>	.....AI...Q...T...N...SIVIS.....Q.....N...					259
<i>R. appendiculatus</i>	.....AI...Q...T...N...SIVIS.....Q.....N...					281
<i>I. scapularis</i>	.....AI..S.Q...T...NS..S.VIS.....Q.....S...					260
<i>T. castaneum</i>	.....T...G...N.T.....SIQIS.....Q.....Q.....					267
<i>A. aegypti</i>	.....TI..S.Q..S.T...N.V.S.LI.....Q.....D...					296
	310	320	330	340	350	360
<i>H. sapiens</i>	RDV <sup>R</sup> M <sup>G</sup> Q <sup>N</sup> HLLQMLCLVAMEK PASTNSDDVRDEKVKVLKCI SEVQANNVVLGQYVGNPDGEG					316
<i>R. microplus</i>	.....IMS.....R.V...AE.I.N.....VPPITMD.....K.G.T.					319
<i>R. appendiculatus</i>	.....V.IMS.....R.V...AE.I.N.....VPPITMD.....K.G.T.					341
<i>I. scapularis</i>	.....IM.....R.V...AE.I.N.....VPPITM.H.....K.T.					320
<i>T. castaneum</i>	..I.....I.T.A.....VHP..I.N.....R..KVIEK <sup>D</sup> .....D.N..					327
<i>A. aegypti</i>	.....I.S.....TCHP..I.N.....S.KQLTIDD.....TS...LD					356
	370	380	390	400	410	420
<i>H. sapiens</i>	E-ATKGYLDDPTVPRGSTTATFAAVLVYENERWDGVPFILRCG <sup>R</sup> KALNER <sup>R</sup> KAEV <sup>R</sup> LQ <sup>F</sup> HD					375
<i>R. microplus</i>	-E.Q.....K.H...Y.TA.A.IN...E.....I.YKE					378
<i>R. appendiculatus</i>	-E.Q.....KN.R...Y.TA.A.IN...E.....I.YKE					400
<i>I. scapularis</i>	-ERL.....A.R...Y.TA.A.IN...E.....I.YKE					379
<i>T. castaneum</i>	- .KL.....ND.V.P.Y.LAA.HIN.....K.....I..K.					386
<i>A. aegypti</i>	.DSRM.....K.V.P...LA..KIN...E.....V.YR.					416
	430	440	450	460	470	480
<i>H. sapiens</i>	VAGDIFHQCKRNLVIRV <sup>R</sup> Q <sup>N</sup> PEAVYTKMMTKKPGMFFNPEESELDTYGNRYKN--VK					432
<i>R. microplus</i>	...L.AGES.....L...D..I.V.F.....A.DI..T.....S...G---MV					435
<i>R. appendiculatus</i>	...L.AGES.....L...D..I.V.F.....A.DI..T.....S...G---MV					457
<i>I. scapularis</i>	.P...GGNS.....L...G..I.V.L.S...A.DI..T.....S...ARATIR					439
<i>T. castaneum</i>	.P...DGKP.....G..L.V.L.V.T...A.DM..T.....H..A----					443
<i>A. aegypti</i>	.P...DGKP.....G..L.V...S..IT.DM..T.....H..D----					473

```

          490      500      510      520      530      540
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
H. sapiens      LPDAY--ERLILDVFCGSQMHFVRSDELREAWRIFTPLLHQIELEKPKPIPIYIYGSRGPT 490
R. microplus   M....--.....Y...V.....A.....DK.....V..E.....FK 493
R. appendiculatus M....--.....Y...V.....A.....DK.....V..E.....FK 515
I. scapularis  K..FRPER.....Y...V.....A.....DR.R.Q.V..E.....FK 499
T. castaneum   .....--.....S.....S.RV.....V.....K 501
A. aegypti     .....--.....A.....S.....Y..R.R.E..K.VH.....K 531

          550      560
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
H. sapiens      EADELMKRVGFQYEGTYKWNPHKL 515
R. microplus   ...D.W..A..KFY...R.TKA--- 515
R. appendiculatus ...D.W..A..KFY...R.TKA--- 537
I. scapularis  ...D.W.Q...KFY...R.T.TAA- 523
T. castaneum   ...MLLNNN.T.T.S...PA.KM- 525
A. aegypti     ...KRCDENN.K.Y.S...HKQ-- 554

```

**B**

Organism	<i>H. sapiens</i>	<i>R. microplus</i>	<i>R. pulchellus</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>T. castaneum</i>	<i>A. aegypti</i>
<i>H. sapiens</i>	ID	0.621	0.585	0.606	0.633	0.584
<i>R. microplus</i>	0.621	ID	0.908	0.828	0.607	0.579
<i>R. appendiculatus</i>	0.585	0.908	ID	0.772	0.588	0.571
<i>I. scapularis</i>	0.606	0.828	0.772	ID	0.618	0.587
<i>T. castaneum</i>	0.633	0.607	0.588	0.618	ID	0.690
<i>A. aegypti</i>	0.584	0.579	0.571	0.587	0.690	ID

(A) Alinhamento de sequências de Glicose-6-fosfato 1-desidrogenase (G6PD; EC:1.1.1.49). As setas azuis indicam os resíduos críticos relacionados ao sítio de ligação 1 de NADP. As setas vermelhas indicam os resíduos críticos relacionados ao sítio de ligação do substrato. A seta verde indica o resíduo crítico relacionado ao receptor de prótons. As setas laranjas indicam os resíduos críticos relacionados ao sítio 2 de ligação do NADP. (B) Matriz de identidade de seqüência de G6PDH, construída a partir de sequências de proteínas. Números de acesso de Uniprot: *H. sapiens* (P11413), *R. microplus* (ACC62883.1), *R. appendiculatus* (A0A131Z3P3), *I. scapularis* (B7Q331), *T. castaneum* (A0A139WIK4), *A. aegypti* (Q0IEL8).



## APÊNDICE II: Sequências e Alinhamentos da IDH-NADP<sup>+</sup>

### A

	10	20	30	40	50	60	
<i>H. sapiens</i>	MAGYLRVVRSLCRASGSRPAWAPAALTAPTSQEQPRRHADKRIKIVAKPVVEMDGMETR						60
<i>R. microplis</i>	-----MA.A.FKF.RLLQRESVSSSP.AVHVL.S.SYGSE...E.QN...L.....						54
<i>R. appendiculatus</i>	-----MA.A.FKF.RLLQRESGLSSP.AVHVL.S.SYGS...E.QN...L.....						54
<i>I. scapularis</i>	-----MA.AVFKF.RLLQKEGGLSSP.AAFVL.N.SYCT...E.KN...L.....						54
<i>T. castaneum</i>	-----MAGT.TKF.K.L--N.V.TKN---GLL.G.NYGT-Q.VVAKN.....						48
<i>A. aegypti</i>	-----MA...M.FGKYLGNQNT.TAAPSL.VTSV.NRSS.A..Q..N.....						54
	70	80	90	100	110	120	
<i>H. sapiens</i>	I IQWFIKEKLLPHVDIQLKYFDLGLPNRDQDDQVTIDSALATQKYSVAVKCATITPDE						120
<i>R. microplis</i>	...K...E..F.FLKLDC..Y.....S..K.....Y.A.H.IK..N.GI.....						114
<i>R. appendiculatus</i>	...K...E..F.FLKLDC..Y.....S..K.....Y.A.H.IK..N.GI.....						114
<i>I. scapularis</i>	...EK...E..F.F.KLDC..Y.....S..K...F.A.H.IR..N.GI.....						114
<i>T. castaneum</i>	...EK...R..F.Y.KLES..L.....H...N.....A.N.IL.HN.GI.....						108
<i>A. aegypti</i>	.....F.YIKVECL.Y.....Y...N.....A.H.IL.HN.GI.....						114
	130	140	150	160	170	180	
<i>H. sapiens</i>	ARVEEFKLLKMWKSPNGTIQNLGGTVFREP I ICKNIPRLVPGWTKPITIGRHAHGDQYK						180
<i>R. microplis</i>	.....N...YP.....R.....L.....Q..V...F.....						174
<i>R. appendiculatus</i>	.....N...YP.....R.....L.....Q..V...F.....						174
<i>I. scapularis</i>	.....N...YP.....R.....L.....Q..V...F.....						174
<i>T. castaneum</i>	Q..Q..N...L...R.....L.....K.....V.....						168
<i>A. aegypti</i>	.....L...R.....L.S.....R..I.....						174
	190	200	210	220	230	240	
<i>H. sapiens</i>	ATDFVADRAGTFKMFVTPKDGSGVKEWEVYNFPA-GGVGMGYNTDESISGFAHSCFQYA						239
<i>R. microplis</i>	.M.R.VSNM.KVEL...A..GEKQKHV.FD.KKS...T.A...E.....						234
<i>R. appendiculatus</i>	.M.R.VSNM.KVEL...A..GEKQKNI.FD.KNS...T.A...E.....						234
<i>I. scapularis</i>	.M.RTVTKM.KVEL...YE.GEKQRYI.FD.KNS...T.A...Q.....						234
<i>T. castaneum</i>	.K...VTKP..VEL.Y.SD...-K.EKY.LFKYKG-...AL.....R.A...S.V.						226
<i>A. aegypti</i>	.Q...IPKP..V...Y.AD...-TTQ.FQL.KYKD-...A.....AA...S..I.						232
	250	260	270	280	290	300	
<i>H. sapiens</i>	IQKKWPLYMSTKNTILKAYDGRFKDIFQEIFDKHYKTDFFDNKIWEHRLIDDMVAQVLK						299
<i>R. microplis</i>	LM.E...L...Q.....S.YE.E..DK.EAR.M.....						294
<i>R. appendiculatus</i>	LM.E...L...Q.....S.YE.E..DK.EAR.M.....						294
<i>I. scapularis</i>	LM.E...L...Q.....YESE..DK.EAK.M.....						294
<i>T. castaneum</i>	LN.G...L...K.....Y.E.E..SQYEAK.....G..						286
<i>A. aegypti</i>	LG.....L...R.....Y.E.N.QKQ.EDA.....A..						292
	310	320	330	340	350	360	
<i>H. sapiens</i>	SSGGFVWACKNYDGDVQSDILAQGFGLMSTVLVCPDGKTI EAEAAHGTVTRHYREHQ						359
<i>R. microplis</i>	.....I...Y.....V.....						354
<i>R. appendiculatus</i>	.....I...Y.....V.....						354
<i>I. scapularis</i>	.....I...Y.....V.....						354
<i>T. castaneum</i>	.....V...Y...M...M.....S.....						346
<i>A. aegypti</i>	.D.A...S.....V...Y.....I.....S.....						352
	370	380	390	400	410	420	
<i>H. sapiens</i>	KGRPTSTNPIASIFAWTRGLEHRGKLDGNQDLIRFAQMLEKVCVETVESGAMTKDLAGCI						419
<i>R. microplis</i>	..KK.....D.A...N.T..HK.CSA...A.....K.....						414
<i>R. appendiculatus</i>	..KK.....D.A...N.T..HK.CSA...A.....K.....						414
<i>I. scapularis</i>	..KK.....A...N.DE.H..CTA..SA.ID..G.K.....						414
<i>T. castaneum</i>	..N.....A...TP..AK...T...A..DC...K...AS.						406
<i>A. aegypti</i>	.....V.....A...N.P..G...TA...A..DCI...K...I..						412
	430	440	450	460			
<i>H. sapiens</i>	HGLSNVKNLNEHFLNNTDFLDTIKSNLDRALGRQ-----						452
<i>R. microplis</i>	..I--..EGD-Y...ME..EAVTE..KKM.AMGFVLVFLPF						452
<i>R. appendiculatus</i>	..IK...ESD-Y...ME..EAVTE..KKK.NQ-----						445
<i>I. scapularis</i>	..K...EGD-Y...M...EA.TES.KTK.SK-----						445
<i>T. castaneum</i>	...P...PGM-Y...Q...EA.AEE.E.QMK-----						436
<i>A. aegypti</i>	..AK.T.EGM-Y...Q...EA.SEQ.E.SWKK-----						443

**B**

Organism	<i>H. sapiens</i>	<i>R. microplus</i>	<i>R. pulchellus</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>T. castaneum</i>	<i>A. aegypti</i>
<i>H. sapiens</i>	ID	0.668	0.684	0.675	0.674	0.690
<i>R. microplus</i>		ID	0.953	0.874	0.711	0.698
<i>R. appendicula</i>			ID	0.907	0.723	0.716
<i>I. scapularis</i>				ID	0.732	0.716
<i>T. castaneum</i>					ID	0.781
<i>A. aegypti</i>						ID

(A) Alinhamento de sequências de Isocitrato desidrogenase mitocondrial [NADP-dependente] (IDH; EC:1.1.1.42). As setas azuis indicam os resíduos críticos relacionados ao sitio de ligação de NADP. As setas vermelhas indicam os resíduos críticos relacionados ao sitio de ligação do substrato. As setas verdes indicam os resíduos catalíticos críticos. As setas laranjas indicam os resíduos críticos relacionados ao sitio de ligação de metal. (B) Matriz de identidade de sequência de IDH-NADP<sup>+</sup>, construída a partir das sequências de proteínas. Números de acesso de Uniprot: *H. sapiens* (P48735), *R. microplus* (NCBI: KY953209), *R. appendiculatus* (A0A131Z3R7), *I. scapularis* (B7PCD2), *T. castaneum* (D6WMM9), *A. aegypti* (A0A0P6IWM1).

Localização IDH-NADP<sup>+</sup> Rm-26863: mitocôndria.

Pelo site: <http://sunflower.kuicr.kyoto-u.ac.jp/~smatsuda/slplocal.html>

SLP-Local: Subcellular Location Predictor based on Local features of amino acid sequence.

## PREDICTION RESULTS

Selected organism: **non-plant**

Computational time: 0.355783 [s]

No.	Sequence label	First candidate		Second candidate		RI (1-10)
		Predicted location	SVM score	Predicted location	SVM score	
1	KY953209	mitochondria	0.96736006	nucleus_or_cytosol	-1.27857660	3

## ANEXO 1

### Preparo do meio L15

Preparação do Meio L-15 concentrado segundo (Munderloh e Kurtti, 1989).

Dissolver o conteúdo L-15 (Sigma, #L4386) (para volume final de 1 litro) em 900 ml de água estéril e em seguida adicionar:

<b>Ácido L-Aspártico</b>	299mg
<b>Ácido L-Glutamínico</b>	500mg
<b>L-Prolina</b>	300mg
<b>Ácido <math>\alpha</math>-cetoglutâmico</b>	299mg
<b>L-Glutamina</b>	292mg
<b>d-Glicose</b>	14410mg
<b>Solução de Vitaminas *</b>	1 ml
<b>Solução de Minerais **</b>	1 ml

Manter o recipiente envolto em papel alumínio. Dissolver os ingredientes sob leve agitação, por 90 minutos. Ajustar o pH para 6,2. Completar volume para 1 litro e filtrar em membrana de 0,22 $\mu$ m. Estocar por até 2 meses a 4°C (ao abrigo da luz).

\*Obs. Preparo de solução de vitaminas:

<b>Ingredientes</b>	<b>Peso (mg/100ml)</b>
<b>Ácido p-aminobenzóico</b>	100
<b>Cianocobalamina</b>	50
<b>d-biotina</b>	10

\*\*Obs. Preparo de solução de minerais:

<b>Ingredientes</b>	<b>Peso (mg/100ml)</b>
<b>Solução A:</b>	
<b>CoCl 6H<sub>2</sub>O</b>	20
<b>CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O</b>	20
<b>MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O</b>	160
<b>ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	200

---

**Solução B:**

<b>NaMoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O</b>	20
--	----

**Solução C:**

<b>Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub></b>	20
--------------------------------------	----

**Solução D:**

<b>Glutathiona Reduzida</b>	1000
-----------------------------	------

<b>Ácido ascórbico</b>	1000
------------------------	------

<b>FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	50
---	----

<b>Solução A</b>	1 ml
------------------	------

<b>Solução B</b>	1 ml
------------------	------

<b>Solução C</b>	1 ml
------------------	------

---

Os ingredientes das soluções devem ser dissolvidos em água estéril na ordem em que foram listadas e o volume de cada solução deve ser completado para 100 ml.

## ANEXO 2

Lista de primers específicos projetados para os genes de *R. microplus*

Gene alvo	Primers	Amplicon (pb)
<b>Catalase</b>	CAT-Bm-qpcr-for: GAGGAGAGGGACCGCCTTAC CAT-Bm-qpcr-rev: GTGCCTTGGTGAAGTTCTGTG	97
<b>*EDG</b>	Rm-qPCR-GDE-for - ATGCTCAGGATCACGCAGAAGC Rm-qPCR-GDE-rev - GTACGTGCGTTGGGAAGGACAAGG	173
<b>*G6Pase</b>	Rm-qPCR-G6Pase-for - GGCAGCCATTTGGTACATCATCC Rm-qPCR-G6Pase-rev - CGACAGGCTGACAATGCACAGG	133
<b>G6PDH</b>	G6PDH-Bm-qpcr-for: CGCAACGAATTGGTATTGAGG G6PDH-Bm-qpcr-rev: CGACTGCCATAGGTGAGATCC	122
<b>*GS</b>	Rm-qPCR-GS-for - GCTGGTATCGGGCTGATCCTG Rm-qPCR-GS-rev - GATGCCTCTGTCTCCAGCCTCC	165
<b>*Hexoquinase</b>	HK-Bm-qpcr-for: CATGGACAAAGAGCTTCAACTGCTC HK-Bm-qpcr-rev: GGAAAGCTCCCTTGACCAGGGTA	150
<b>IDH-NAPD+</b>	Rm-qPCR-IDHnadph-for: CTTCAAAGCAGGTCTTATGG Rm-qPCR-IDHnadph-rev: AGGAACGGGAATATCAACTC	128
<b>*PCarbox</b>	Rm-qPCR-PCarbox-for- GGATACGCGAAACAGACGTCA Rm-qPCR-PCarbox-rev- TCGTGTGTCAAGAAGGTGCGAC	107
<b>*PEPCK</b>	PEPCK-Bm-qpcr-for: CATTGACTGGATCTGCCGCCG PEPCK-Bm-qpcr-rev: TCGCTGCATTCCTGAAGCCAG	171
<b>PHGPx</b>	Rm-qPCR-PHGPx-for: GCGTCTCCATCTATGACTTC Rm-qPCR-PHGPx-rev: CTTGTTGGTCTTTCCTCACTTG	123
<b>*PK</b>	Pyruki-Bm-qpcr-for: GGGCAAGAGGGCAAGCAACTG Pyruki-Bm-qpcr-rev: CACGTTGAGCACCTTGGTGATG	141
<b>*PMG</b>	Rm-qPCR-PGM-for - CGGATCTGGGCAAGCTGGG Rm-qPCR-PGM-rev - CCGTCGTGACCCTTGATGAGG	151

\*Publicado em (Silva, da *et al.*, 2015).

(pb): pares de base

Gene alvo	Primers
<b>Silenciamento</b>	
<b><i>dsG6PDH</i></b>	5'- <b>TAATACGACTCACTATAGGG</b> GACCCGTGTTGTGATTGAG -3'
<b>(553bp)</b>	5'- <b>TAATACGACTCACTATAGGG</b> CGCTCGTTGTTGATGTAGG -3'
<b><i>dsGFP</i></b>	5'- <b>TAATACGACTCACTATAGGG</b> CCAGTCAAGCACCACCACC -3'
	5'- <b>TAATACGACTCACTATAGGG</b> GCGTAGTTTTCTTATCGCG -3'

## ANEXO 3- Manuscrito do Artigo de primeira autoria:

1

1 *Carbohydrate Metabolic-Compensation Coupled to High Tolerance to Oxidative Stress*  
2 *in Ticks*3  
4  
5 Bárbara Della Noce <sup>a,b</sup>, Marcelle Vianna Carvalho Uhl <sup>a</sup>, Josias Machado <sup>a,b</sup>, Camila  
6 Fernanda Walthero <sup>a</sup>, Leonardo Araujo de Abreu <sup>b</sup>, Renato Martins da Silva <sup>a</sup>, Rodrigo Nunes  
7 da Fonseca <sup>b</sup>, Cintia Monteiro de Barros <sup>b</sup>, Gabriela Sabadin <sup>c</sup>, Satoru Konnai <sup>d</sup>, Itabajara da  
8 Silva Vaz Jr. <sup>e</sup>, Kazuhiko Ohashi <sup>d</sup> and Carlos Logullo <sup>#</sup>9  
0  
1 <sup>a</sup> Laboratório Integrado de Bioquímica Hatisaburo Masuda and Laboratório Integrado de  
2 Morfologia, NUPEM-UFRJ, NUPEM - UFRJ, Campus Macaé, Avenida São José do  
3 Barreto, São José do Barreto, CEP 27965-045, Macaé, RJ, Brazil.4 <sup>b</sup> Unidade de Experimentação Animal, CBB - UENF, Av. Alberto Lamego, 2000, Horto, CEP  
5 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil.6 <sup>c</sup> Centro de Biotecnologia and Faculdade de Veterinária – UFRGS, C.P. 15005, Av. Bento  
7 Gonçalves 9500, Prédio 43421, Campos do Vale, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS,  
8 Brazil.9 <sup>d</sup> Laboratory of Infectious Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido  
0 University, Kita 18, Kita-ku Sapporo 060-0818, Japan.1  
2 <sup>#</sup> Corresponding author, Carlos Logullo: [carloslogullo@yahoo.com.br](mailto:carloslogullo@yahoo.com.br).

3

1  
2           **ABSTRACT**  
3

4    Though reactive oxygen species (ROS) are natural byproducts of metabolism, their toxic  
5    effects are well documented. Here, we describe that *Rhipicephalus microplus* ticks and  
6    embryonic cell line, BME26, are tolerant to high concentrations of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),  
7    at non-physiological concentrations, involving an adaptive metabolic compensation. We  
8    observe that tick and tick embryonic cells are extremely tolerant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure. In a LD<sub>50</sub>  
9    H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration, BME26 cells morphology were mildly alters. However, tolerant BME26  
10   H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cells maintained their proliferative capacity unchanged. In this work we evaluated  
11   several genes involved in gluconeogenesis, glycolysis and pentose phosphate pathway, one  
12   of the major pathways for carbohydrate catabolism and anabolism, in the BME26 cells.  
13   Genetic and catalytic control of the genes and enzymes associated with these pathways are  
14   modulated by glucose uptake and in energy resource availability. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure transiently  
15   increases intracellular ROS at 2 h treatment, which diminishes after 24 h. This suggests a  
16   tolerance strategy developed by BME26 cells to cope with elevated ROS levels. Biochemical  
17   changes associated with such tolerance were investigated and revealed an increase in both  
18   oxygen consumption and glucose uptake, and decreased mitochondrial superoxide levels.  
19   Moreover, NADPH levels increased upon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge, and this phenomenon was  
20   counterbalanced by G6PDH and NADP-ICDH transcription. G6PDH knockdown in BME26  
21   did not alter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance, but increased NADP-ICDH transcription. Altogether, these data  
22   unveil the first metabolic evidence of an adaptive mechanism to cope with high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
23   exposure to maintain redox balance and survival in tick cells.  
24

## 1 INTRODUCTION

2  
3 Among the diverse range of reactive oxygen species (ROS), hydrogen peroxide  
4 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) seems to be the most important signaling compound, as suggested by studies in  
5 mammalian cells, where it is reported to be continuously produced in a steady-state  
6 concentration between  $10^{-7}$  M and  $10^{-9}$  M (Chance et al., 1979; D'Autréaux and Toledano,  
7 2007; Sadidi et al., 2009; Sies, 2014). Energy metabolism mechanisms work chiefly to supply  
8 the organism's energetic demand, but also to maintain physiological homeostasis and to  
9 prevent oxidative damage caused by ROS generated as byproducts (Fraga et al., 2013;  
10 Liemburg-Apers et al., 2015; Yoboue et al., 2014). For instance, glucose metabolism includes  
11 both ROS generation and scavenging processes (Liemburg-Apers et al., 2015). The activity  
12 of the first glycolytic enzyme, hexokinase, depends on ATP generated by mitochondrial ATP-  
13 synthase, thus supplying ADP to sustain the flow of electrons through oxidative  
14 phosphorylation, which in turn prevents free electrons from reacting with oxygen and the  
15 consequent generation of ROS (Da-Silva et al., 2004; Wu et al., 2012).

16 Pentose Phosphate Pathway (PPP) is an alternative oxidative route for glucose that  
17 also provides glycolytic intermediates and nucleotide precursors,  $\text{CO}_2$  and reduced  
18 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) (Kuehne et al., 2015; Mailloux and  
19 Harper, 2010; Wang et al., 2014). Intracellular NADPH provides reducing potential for  
20 biosynthetic reactions and protection against oxidative compounds (Ying, 2008), and may  
21 also be supplied by isocitrate dehydrogenase and malic enzymes (Rzezniczak and Merritt,  
22 2012; Smolková and Ježek, 2012). Recently, arthropod cell lines were established as models  
23 to study several biological processes, including metabolism, signaling, vector-pathogen  
24 interactions, and oxidative stress (de Abreu et al., 2013; Bottino-Rojas et al., 2015; Esteves  
25 et al., 2009; Hambarde et al., 2013; Pohl et al., 2014). Understanding the biochemical basis  
26 of ROS homeostasis in these cell lines might provide new molecular targets for the control of  
27 invertebrate parasites and disease vectors (Mehlhorn et al., 2012). In the interest of  
28 understanding how hematophagous arthropods cope with oxidative stress caused by the high  
29 amounts of heme ingested during blood feeding, several biochemical studies have been  
30 performed in organisms such as *Rhodinus prolixus* (Oliveira et al., 1995), *Aedes aegypti*  
31 (Pereira et al., 2007) and *Rhipicephalus microplus* (Maya-Monteiro et al., 2000). Some of the  
32 mechanisms described include: free heme reduction by formation of insoluble aggregates,  
33 heme complexation with ligand proteins, and plain heme degradation (Oliveira et al., 1999;  
34 Paiva-Silva et al., 2006).



1 In the present work, *R. microplus* cattle tick demonstrated a remarkable resistance to  
2 high, non-physiological H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations. We have used the BME26 tick cell line  
3 challenged with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to investigate a so-far undisclosed adaptive strategy that reduces ROS  
4 levels by regulating both transcription and activity of enzymes associated with aerobic and  
5 anaerobic carbohydrate metabolism and NADPH production. Such metabolic compensation  
6 confers a remarkable oxidative tolerance to tick cells.

## 8 RESULTS

### 9 Tick and tick embryonic cells were shown extremely tolerant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure

10 Overexposure of biological systems to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is related to deleterious effects on cells,  
11 tissues and organisms (Birben et al., 2012; Gülden et al., 2010; Indo et al., 2015; Sies, 2017).  
12 In order to investigate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> susceptibility of ticks *in vivo* we injected 1 µL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in partially  
13 fed females at concentrations ranging from 0.5 to 5 µmol/ µL, and analyzed the immediate  
14 impacts and after effects on tick blood meal and reproductive capacity (Figure 1). We  
15 observed that tick females were able to survive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injection even at 5 µmol  
16 concentration. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure caused immediate strong reaction inside the tick, followed by  
17 an overflow of the internal contents, especially at concentrations greater than 1 µmol  
18 (supplementary video 1). Surprisingly, treated ticks recovered from this injury (Figure 1A) and  
19 were able to feed as well as control ticks (Figure 1B), demonstrating their high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
20 tolerance and ability to counteract H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage. Treated ticks were also able to lay  
21 eggs and these eggs were viable (Figure 1C-D). In all evaluated measure biological  
22 parameters, merely oviposition was very few affected at higher concentrations (Figure 1C).  
23 This is an exceptional survival capacity, unparalleled in other models. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure at  
24 millimolar concentrations induce significant mortality in *Drosophila melanogaster* (Grover et  
25 al., 2009) and *Caenorhabditis elegans* (Jansen et al., 2002).

26 To disclose the metabolic mechanisms related to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance, we used BME26  
27 tick embryonic cells challenged with direct addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Marinho et al., 2013). The effect  
28 of oxidative conditions on cell survival was compared among different cell types. In general,  
29 arthropod embryonic cells (BME26 from *R. microplus* and Aag2 from *A. aegypti*) were more  
30 tolerant to exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at concentrations ranging from 62.5 - 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, than  
31 mouse macrophages (primary culture) and Rhesus monkey kidney epithelial cells (LLCMK2)  
32 (Figure 2A-D). Similarly, MTT assay showed that *Drosophila* Schneider 2 (S2) cell line was  
33 able to tolerate up to 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and exhibited a 20 % decrease in cell viability when  
34 exposed to 2 mM (2000 µM) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Supplementary Figure S1B). In both mammalian cell

1 types, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced cytotoxic effects leading to reduced cellular viability; LD<sub>50</sub> values ranged  
2 between 125 - 250 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after 24 h of treatment, in agreement with previous findings  
3 (Figure 2C and D) (Dash et al., 2008; Li et al., 2012). In contrast, the mosquito embryonic cell  
4 line Aag2 exhibited cell proliferation at concentrations ranging from 125 to 250 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, with  
5 up to 30 % increase in viable cell number. Only at the highest tested concentration (1000 μM)  
6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduced by 20 % the number of viable Aag2 cells (Figure 2B). BME26 cells were  
7 unaffected by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at concentrations from 62.5 to 1000 μM, with number of viable cells  
8 similar to the untreated control, as determined by Trypan blue exclusion (Figure 2A), as well  
9 as by MTT assay (Supplementary Figure S1A).

10 Then, to determine the lethal dose (LD) the BME26 cell viability was evaluated 24 h  
11 after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment at millimolar concentrations (2.2 mM to 13.2 mM). Viability was not  
12 significantly affected at 2.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but a dose-dependent reduction in cell viability was  
13 observed at concentrations between 4.4 mM and 13.2 mM. The highest concentration  
14 caused 90 % reduction in the number of viable cells (Figure 2E), and the LD<sub>50</sub> 24 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
15 challenge was 6 mM (Figure 2E insert).

16

### 17 **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge alters BME26 cell morphology mildly but not proliferative capacity.**

18 Further investigation was performed to understand cell patterns which may be  
19 associated with BME26 cells H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tolerance. For the experimental design were selected  
20 concentrations of 2.2 mM and 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, non-lethal dose and LD<sub>25</sub>, respectively.  
21 Treatment with 2.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> did not significantly alterations in cell viability over time from 2 h  
22 up to 24 h (Figure 2F and Supplementary Figure S1C, gray bars). At 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cell  
23 viability was mildly but significantly affected in a time-dependent manner (Figure 2F and  
24 Supplementary Figure S1C, black bars), an effect accompanied by morphological changes  
25 (Figure 2G and Supplementary Figure S1D).

26 BME26 cells were previously characterized as a morphologically heterogeneous cell  
27 type, similar to other arthropod lines, presenting different sizes of cells and nuclei (Bell-Sakyi  
28 et al., 2007). Two major morphology cell formats are usually shown in a culture of tick cells,  
29 one with a fusiform appearance with several cellular filopodia and another presenting  
30 rounded and larger format with a large number of vesicles scattered in the cytoplasm. And  
31 these two mophologies characterize a tick cell culture under optimum conditions of cultivation  
32 (Bell-Sakyi et al., 2007; Esteves et al., 2008). Using phalloidin stain, was observed at  
33 treatment with 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a reduction in number of cell events with fusiform appearance  
34 and filopodia (white arrows) with a higher proportion of rounded small cells (yellow asterisks,

1 Figure 2G). Being more evident in 24 h after 4.4mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge than when compared to  
2 shorter exposure or lower dose treatment, which was also observed by cytochemical staining  
3 with Quick-Panoptic (Supplementary Figure S1D). These morphological alteration of cellular  
4 retraction can be associated with the reduction in cellular viability (Rello et al., 2005), or  
5 indicates a possible transdifferentiation phenomenon among the different cell formats,  
6 leading to filopodia reduction (Mattila and Lappalainen, 2008).

7 Due to cell retraction may be associated with reduction in cellular viability, we  
8 evaluated the viable cell counts during 5 days after 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (Figure 3A). To  
9 investigate the possibility of decreasing cell viability after 24 h of 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment.  
10 However, an increased number of viable cells were observed comparing the 2nd with the 5th  
11 day after treatment, with approximately 40% more cells at the end of this period (blue line,  
12 Figure 3A). The cell growth under control and treated conditions showed a similar slope at  
13  $4.738 \pm 1.27$  and  $3.545 \pm 0.68$ , respectively. (Figure 3A, dotted red line). To confirm that the  
14 cells retained the same proliferative capacity even after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, proliferation was  
15 analyzed by fluorescence imaging after immunolocalization of Ki67, a cell proliferation  
16 marker. Quantitative image analysis using Cell Counter tool on ImageJ software determined  
17 the ratio of DAPI-stained nuclei (i.e., total nuclei) to anti-Ki67-stained nuclei in two categories  
18 of Ki67 immunofluorescence intensity (Figure 3B). The results show that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> did not alter  
19 the proliferative capacity of BME26 cells (Figure 3B and 3C).

20 For the first time, we have observed that BME26 cells tolerate at millimolar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
21 concentrations. At the millimolar range of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> we chose a non-lethal and a lethal  
22 concentration just on 25% of BME26 cells. Therefore, we got evaluate cell survival and  
23 proliferation, and its adaptability in this extreme extracellular oxidative environment. In this  
24 sense, the next results show the intracellular ROS profile, gene transcription and activity of  
25 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenger enzymes.

26

## 27 **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge promoted a transient ROS increase and upregulated ROS-scavenger** 28 **enzymes.**

29 Reactive oxygen species (ROS) were quantified in BME26 cells H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-challenged in  
30 the set conditions above, using dihydroethidium (DHE) fluorescent probe (Zhao et al., 2003)  
31 (Figure 4A). This result is also plotted as mean fluorescence intensity (F.I.) per cell area in  
32 mm<sup>2</sup>, calculated by the software ZEN 2.3 (Figure 4B). At the concentration of 2.2 mM in 2 h  
33 after addition, the ROS labeling was subtly greater than control but did not show statistical  
34 difference in the fluorescence quantitative analysis. Then, 24 h after treatment with 2.2 mM

1 ROS levels was equal to the control. However, a significantly increased ROS production was  
2 detected following the 2-h treatment with 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which was not observed after 24 h of  
3 exposure. The asterisks represent the intensity of ROS marking equal to the control, and the  
4 white arrows point to a higher fluorescence intensity (Figure 4A). These findings suggest that  
5 the transient increase in ROS levels observed during the 2 h treatment was caused by the  
6 oxidative potential induced by exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bolus addition. The elevated ROS levels were  
7 not sustained 24 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition, and since BME26 cells remain viable under these  
8 conditions. Its indicates that such ROS scavenging is associated with protective  
9 mechanisms, and suggest that one or more ROS defense system could be involved (Figure  
10 4). Thus, as an enzyme defense system, the relative transcription of tick catalase showed a  
11 significant increase 24 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge, with 2.2 mM or 4.4 mM (Supplementary Figure  
12 S2A), but catalase activity was not significantly increased under any of the treatment  
13 conditions (Figure 4C). According to AmplexRed detection kit, peroxidase activity was  
14 significantly increased after 2 h treatment with 2.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but not with LD<sub>25</sub> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
15 concentration (4.4 mM) (Figure 4D). Despite of catalase activity results, to verify the  
16 importance of the catalase by otherwise we decided to challenge the cells with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after  
17 catalase inhibition using classical inhibitor Aminotriazole (AT) (Supplementary Figure S2B).  
18 BME26 cells were challenged for 24 h with 2.2 mM and 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, after 4 h incubation  
19 with catalase inhibitor. We observed that cell viability was unaffected, unless in the 4.4 mM  
20 treatment, where there was 90% lethality (Supplementary Figure S2B). Therefore, we  
21 observed that there is an ROS increased 2 h after addition H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and for the non-lethal  
22 concentration (2.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a great contribution of the peroxidases. On the otherwise, in the  
23 LD<sub>25</sub> concentration (4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) the results demonstrate that the catalase is extremely  
24 important in the cell survival.

25 Another possible enzyme of response to stress in ticks previously described as an  
26 important factor of acaricide resistance in *R. microplus* is the phospholipid-hydroperoxide  
27 glutathione peroxidase (PHGPx) (Cossío-Bayúgar et al., 2005). This enzyme is known for its  
28 role in cellular protection associated with reduction of hydroperoxides, thus preventing lipid  
29 peroxidation in conditions of oxidative stress. Then, increased PHGPx transcription was  
30 observed in response after 24 h treatment with 2.2 mM and 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Supplementary  
31 Figure S2C). Indicating a putative involvement of ROS control mechanisms by PHGPx in  
32 BME26 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance.

33 The role of peroxidase activities in oxiredution reactions during the process of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
34 tolerance is proposed in Supplementary Figure S3A, showing PRx and GPx as examples.

1 Maintaining the redox balance in this context requires a reduced substrate that can be  
2 oxidized by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as well as reductase enzymes (such as TR and GR) to reduce the oxidized  
3 substrate. This reaction is only possible with the participation of a reducing agent, *e.g.*  
4 NADPH, supplied by metabolic pathways. Thus, the experiments described in the following  
5 sections were designed to approach the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tolerance phenomenon from a metabolic  
6 standpoint. As an earlier and fundamental step for cellular adaptation.

7

### 8 **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge leads to transient increase in O<sub>2</sub> consumption and decreased** 9 **mitochondrial superoxide in BME26 cells.**

10 Oxygen is the final electron acceptor in the mitochondrial electron transport chain  
11 during aerobic metabolism (Liu et al., 2002). In BME26 cells, oxygen consumption  
12 significantly increased after treatment with 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 4E), indicating a mechanism  
13 associated with metabolic cellular respiration. At a given density (10<sup>7</sup> cells/mL), BME26 cells  
14 consumed oxygen at a rate of 12.5 μmol/min under control conditions; two hours after  
15 addition of 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, oxygen consumption increased to 14.5 μmol/min. Interestingly, at  
16 12 h and 24 h post-treatment, oxygen consumption returned to the same levels observed in  
17 control culture. The 2 h H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment also promoted changes in mitochondrial superoxide  
18 production, using the mitochondrial superoxide marker (MitoSox), there was a strong  
19 reduction of signal in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposed cells (Figure 4F, white asterisks) when compared with  
20 the control condition (white arrowhead). Interestingly, after 24 h of exposure to 2.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  
21 increased mitochondrial superoxide levels to the basal control condition, and at LD<sub>25</sub> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
22 concentration (4.4 mM) a intense increase in MitoSox signal was observed in a few cells  
23 (Figure 4F, blue arrowhead). These results indicate that after 2 h of challenge, a tolerance  
24 mechanism combines ROS homeostasis with metabolic cellular respiration.

25 Fluorescent imaging with Mitotracker marker was used to observe changes in number  
26 and morphology of mitochondria after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. We could observe that the treatment  
27 affected mitochondrial morphology mainly 2 h post-treatment in both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations  
28 tested, with a reduction of long mitochondria and greater number of dotted mitochondria.  
29 After 24 h of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition, the number and morphology of mitochondria in the cells was  
30 unaltered by the treatment (Supplementary Figure S2D-E).

31 In an oxidative extracellular environment situation caused by addition of exogenous  
32 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the increase in O<sub>2</sub> consumption, with reduced mitochondrial superoxide levels, indicate  
33 that adaptation mechanisms lead to a greater flow in the electron transport chain, avoiding  
34 the escape of electrons and consequently the formation of mitochondrial superoxide.

1

## 2 **The correlation of enhance NADPH production with glucose metabolism in BME26** 3 **cells challenged with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

4 The metabolic profiling of BME26 cells after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge indicates interesting  
5 alterations in carbohydrates metabolism aiming at adaptation to sustain redox balance. The  
6 relationship between oxidative stress regulation and energy metabolism has been already  
7 suggested (Quijano et al., 2016). Also, components of the glycolytic pathway were previously  
8 shown to be modulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Particularly, redox balance via NADPH production in  
9 metabolic pathways plays an important role in cell survival under oxidative conditions  
10 (Liemburg-Apers et al., 2015). In the present work, glucose uptake was measure using its  
11 fluorescent analog 2-NBDG, 2 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition at 2.2 or 4.4 mM. Increased glucose  
12 uptake was detected as an intense fluorescent labeling observed when compared with the  
13 control cells (Figure 5A). Quantitative result was expressed in Fluorescence Intensity Mean  
14 (F.I.) by area in mm<sup>2</sup> (Figure 5B). BME26 cells have been previously shown to be responsive  
15 to insulin signaling (Abreu et al., 2009; de Abreu et al., 2013), and we successfully used  
16 insulin as a positive control in 2-NBDG internalization experiment (Supplementary Figure S4).  
17 Previous work using the BME26 cell line identified an expressive increase in the transcription  
18 of genes involved in glycolysis and gluconeogenesis after challenge using high concentration  
19 of glucose (da Silva et al., 2015). Interestingly, hexokinase (HK) exhibited a higher activity 2  
20 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge with both concentrations, 2.2 mM and 4.4 mM (Figure 5C). In contrast,  
21 pyruvate kinase (PK) activity remained unaltered during the same treatment (Figure 5D).

22 Some tissues under aerobic conditions or low oxygen (muscle hypoxia, for example)  
23 pyruvate is reduced to lactate by lactic fermentation (Maciel et al., 2008), by the way, in  
24 BME26 cells 2 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-challenged, the O<sub>2</sub> total consumption increased. So as expected,  
25 lactate dehydrogenase activity decreased in both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations (Figure 5E),  
26 suggesting others destination to pyruvate of the remained PK activity. The set of results so  
27 far indicates an aerobic oxidation fate of pyruvate. Phosphoenolpyruvate carboxykinase  
28 (PEPCK) was previously described as stimulated by increased transcription/translation of the  
29 gene. Interestingly, it was observed an increased PEPCK transcription in both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
30 conditions (Figure 5F). Indicating a reloading of G6P through gluconeogenesis to maintain  
31 the activity of G6PDH. We also observed minor changes at the transcriptional level. In HK  
32 relative transcription remained unaltered in 2 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge (Supplementary Figure  
33 S5A). PK relative transcription was increased in BME26 cells after 2 h treatment with 2.2 mM  
34 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Supplementary Figure S5C). But, 24 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge HK and PK relative

1 transcription reduced (Supplementary Figure S5B and S5D). These data suggest that a  
2 differential relationship between transcriptional and enzymatic regulation is taking place  
3 under the tested conditions for HK and PK (da Silva et al., 2015)

4 One of the cellular routes for glucose 6-phosphate oxidation is pentose phosphate  
5 pathway, a set of reactions that produce ribose 5-phosphate and reducing potential in the  
6 form of NADPH as major products (Supplementary Figure S3B). G6PDH relative transcription  
7 increased in BME26 cells 2 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment with 4.4 mM, as well as 24 h after treated  
8 with 2.2 mM or 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in comparison with control conditions (Figure 5G and 5J).  
9 Additionally, G6PDH activity was higher than control in all treatments, particularly at 24 h in  
10 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (Figure 5H and 5K). *R. microplus* G6PDH amino acid sequence  
11 showed more than 80% identity to other ticks and had high conservation among the critical  
12 residues of important sites related to substrate binding, proton receptor and NADP<sup>+</sup> binding  
13 (data not shown). Increased NADPH content was observed in BME26 cells in response to 2 h  
14 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, and even after 24 h of treatment, the cells challenged with 4.4 mM still  
15 maintain a higher NADPH content than the control (Figure 5I and 5L). It is possible that such  
16 an adaptive response is regulated by changes in gene expression of NADP<sup>+</sup> reducing  
17 enzymes. Altogether, these results strongly suggest that glucose is taken up after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
18 challenge, converted to glucose-6-phosphate and led mainly through the PPP. There is also  
19 a correlation between glucose uptake and increased NADPH content, which corroborates HK  
20 activity within PPP.

21

## 22 **G6PDH knockdown was compensated by NADP-ICDH transcription in BME26 cells** 23 **under oxidative environment.**

24 To investigate the importance of G6PDH for tolerance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in BME26 cells, we  
25 generated a G6PDH knockdown in this cells. A reduction of 78% in relative gene transcription  
26 was observed (Figure 6A). G6PDH activity was reduced in 42% 3 days after dsRNA addition,  
27 and such reduction was still seen 6 days after dsRNA-treatment (Supplementary Figure  
28 S6A). G6PDH silencing did not affect BME26 cell viability in the absence of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
29 (Supplementary Figure S6B), nevertheless, caused an enhance of NADP-dependent  
30 isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH) relative transcription (Figure 6B), which indicated a  
31 possible compensation mechanism of G6PDH knockdown. NADP-ICDH is another NADPH-  
32 producing enzyme, which catalyzes the oxidative decarboxylation of isocitrate, producing  
33 alpha-ketoglutarate, CO<sub>2</sub> and NADPH. Its nucleotide sequence (accession number  
34 KY953209) was found in a *R. microplus* transcriptome database (RmINCT-EM) created by

1 our research group using Illumina sequencing (BioProject ID PRJNA232001 at  
2 Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) database - GenBank). The deduced amino acid  
3 sequence alignment showed a high conservation in critical residues (data not shown) and  
4 more than 88% identity to other ticks. Additional NADP-ICDH transcription and activity was  
5 performed on BME26 cells challenged with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Supplementary Figure S7). NADP-ICDH  
6 relative transcription increased in BME26 cells 2 h after treatment with 2.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  
7 whereas a reduction of approximately 30% was observed after 24 h (Supplementary Figure  
8 S7A). However, NADP-ICDH enzyme activity in response to short or long exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
9 did not correlate to the changes in transcriptional levels. At 2.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the enzyme activity  
10 remained similar to the control, whereas at 4.4 mM a reduction of ~15% in NADP-ICDH  
11 activity was observed (Supplementary Figure S7B). Cells treated with G6PDH dsRNA for  
12 three days and submitted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment at 2.2 mM (non-lethal concentration) and 4.4 mM  
13 (LD<sub>25</sub> concentration) showed viability profiles similar to controls treated with unrelated-dsRNA  
14 (Figure 6C). In addition, G6PDH chemical inhibition by 6-ANAM did not affect the viability of  
15 the cells following H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge (Supplementary Figure S6C), indicating that BME26 cells  
16 can use G6PDH-independent pathways for redox control in the presence of high  
17 concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. These observations suggest a compensatory mechanism involving  
18 NADPH-producing metabolic enzymes, which might contribute for the redox balance in  
19 BME26 cells under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment.

## 21 DISCUSSION

22 It is well described that in aerobic organisms, ROS production is maintained under  
23 balance by antioxidant systems (Birben et al., 2012; DeYulia et al., 2005; Ray et al., 2012;  
24 Sies, 2014). ROS are involved in processes as diverse as signal transduction, pathogen  
25 killing, and gene regulation (Forman et al., 2010; Marinho et al., 2014; Mittler, 2002; Segal,  
26 2008). During oxidative stress, ROS cause tissue and cellular damage by reacting with  
27 biomolecules, which may trigger the development of diseases such as diabetes, sepsis, and  
28 neurodegenerative diseases (Indo et al., 2015; Di Meo et al., 2016; Sies, 2015). However,  
29 oxidative compounds, including H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, are naturally formed in cells and many researchers  
30 have suggested that ROS are also required for physiological redox signaling, which is  
31 essential to regulate pathways functions (Andreyev et al., 2015; Mittler, 2017). Recent data  
32 suggests that sustained ROS generation is required for successful tadpole regeneration in  
33 *Xenopus*, and that ROS regulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling (Love et al., 2013). It has been  
34 postulated that adaptive responses to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced stress in sensitive cells are primarily



1 related to the induction of antioxidants enzymes, with emphasis on catalases, peroxidases  
2 and superoxide dismutases (Birben et al., 2012). Induction of these enzymes is essential for  
3 ROS scavenging and is partly responsible for promoting tolerance towards H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

4 Previous studies demonstrated that hematophagous arthropods harbor an internal  
5 oxidative environment due to their feeding behavior (Citelli et al., 2007; Dias et al., 2016;  
6 Graça-Souza et al., 2006; Kumar et al., 2016). In fact, here we demonstrated that ticks are  
7 extremely tolerant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure *in vivo* (Figure 1). When hydrogen peroxide was fed to  
8 *D. melanogaster* at 0.1% (29.4 mM), significant mortality was observed (Grover et al., 2009).  
9 For instance, ticks were able to survive after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injection at 5 µmol/ µL. In the same way,  
10 when arthropod and mammalian cells were exposed to increasing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations  
11 (Figure 2), the arthropod embryonic cell lines (BME26, Aag2 and S2) displayed higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
12 tolerance compared to mammalian cells (Figures 2A-D and S1 A-B). Interestingly, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
13 tolerance by S2 *Drosophila* cells (Figure S1B) is in agreement with previous publications  
14 showing an increase in the expression of oxidative stress resistance genes and NADPH  
15 levels in *Drosophila* under diverse stress conditions, such as starvation, paraquat treatment,  
16 hyperoxia, hypoxia, and desiccation (Ristow and Zarse, 2010; Rzezniczak and Merritt, 2012;  
17 Zhao and Haddad, 2011). BME26 cells had an LD<sub>50</sub> of 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after 24 h of exposure,  
18 whereas AH927 cells, as well as other mammalian cells investigated in this study, have LD<sub>50</sub>  
19 of 0.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was previously reported to stimulate Akt phosphorylation and promote  
20 mammalian cell survival at 20 to 50 micromolar concentrations (Sadidi et al., 2009). We  
21 observed that BME26 cells tolerated and retained their proliferative capacity even after  
22 treatment with 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 3). These findings indicate a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance by ticks,  
23 which could be a result of tightly regulated mechanisms comprising ROS generation,  
24 scavenging, and signaling (Burdon, 1995; Trachootham et al., 2008).

25 Intracellular ROS content in BME26 after 2 h of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment was shown to be  
26 increased in a dose-dependent manner. However, 24 h later, ROS were no longer detected,  
27 suggesting a possible scavenging mechanism (Figures 4 A-B). Catalase is in the first line of  
28 defense in cells undergoing oxidative stress (decomposes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into H<sub>2</sub>O and oxygen), and it  
29 was previously described as a highly active component during increased oxygen  
30 consumption in both *R. microplus* eggs and larvae (Freitas et al., 2007). According to the  
31 results presented here, although catalase transcription increased following H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge,  
32 catalase activity was unchanged 24 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bolus addition (Figures 4C, S2A). However,  
33 when BME26 cells had catalase inhibited by AT, was very sensitive at the 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
34 concentration (Figure S2B). BME26 catalase inhibited cells were not sensitive to 2.2 mM

1 concentration which corroborates with increased peroxidase activity (Figure 4D), maintaining  
2 such tolerance. Taken together, these data reveal that catalase activity participation as a  
3 response to oxidative conditions is not as evident in tick cells as it is observed in mammals  
4 (Schriner et al., 2005), which suggests that other enzymes could be taking part in this  
5 adaptive process. Another hypothesis is that basal peroxidase and catalase enzymatic  
6 activities present in BME26 cells are sufficient for a rapid response to exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In  
7 order to investigate this hypothesis, a detailed study of enzyme kinetics for catalases and  
8 peroxidases in BME26 cells is needed, as well as the assessment of these activities in  
9 periods shorter than 2 h.

10 After 2 h of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition we observed an increase in O<sub>2</sub> consumption (Figure 4E),  
11 whereas the mitochondrial superoxide content diminished (Figure 4F). In addition, a  
12 conserved mechanism coupling ROS homeostasis to metabolic cellular respiration seems to  
13 take place, and the morphological alteration of mitochondria after 2 h incubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
14 (Figure S2E) supports this hypothesis. Probably this oxidative response is associated with  
15 mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) for ROS production, and inversely related to ATP  
16 synthesis and ADP depletion (Da-Silva et al., 2004; Wu et al., 2012). In this work the  
17 relationship between oxygen consumption (Figure 4E) and glucose uptake (Figure 5A-B),  
18 with simultaneous decrease in mitochondrial superoxide activity (Figure 4F), is presented as  
19 an important adaptive cellular strategy in response to oxidative environment. In this context,  
20 hexokinase and G6PDH were shown to be the main enzymes participating in the first two  
21 hours of this cellular adaptation (Figures 5C, 5G-L). Our data show that NADPH formation  
22 (Figure 5I, 5L) might represent an antioxidative defense, shifting glucose to PPP for oxidant  
23 detoxification, mainly by the action of G6PDH, which does not exclude the participation of  
24 other enzymes in the antioxidative response in glycolytic cells. As previously shown, the  
25 recruitment of HK to the mitochondria diminishes ROS production by increasing the efficiency  
26 of electron transfer during aerobic respiration (Da-Silva et al., 2004; Wu et al., 2012). In  
27 addition, HK is known to be released from the surface of mitochondria by its enzymatic  
28 product, G6P (Da-Silva et al., 2004; Liemburg-Apers et al., 2015; Mailloux and Harper, 2010;  
29 Quijano et al., 2016; Ristow and Zarse, 2010; Wu et al., 2012). This system can control  
30 mitochondrial ROS emission in glycolytic cells by providing NADPH and maintaining HK  
31 activity (Figure 5). In this way, glucose regulates enzymatic sources of intracellular NADPH in  
32 BME26. Results described by da Silva et al. (2004) indicated for the first time that  
33 mitochondrial HK activity performed a key preventive role against oxidative stress, reducing  
34 mitochondrial ROS generation through an ADP-recycling mechanism.

1 Another investigated enzyme is the Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)  
2 that occupies an important position in energy homeostasis because it is involved in the  
3 regulation of fatty acid re-esterification, glucose synthesis, transamination and the  
4 cataplerosis of citric acid cycle anions (Yang et al., 2009). It is well established that  
5 alterations in PEPCK gene transcription regulate the total activity of this enzyme (Hanson  
6 and Reshef, 2003; Yang et al., 2009). The transcription of PEPCK increases 24 h after  
7 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-challenged (Figure 5F), suggesting an increased activity at this moment. The pyruvate  
8 produced by glycolysis can be used to generate G6P through gluconeogenesis, a process  
9 regulated by PEPCK (Chakravarty et al., 2005; Croniger et al., 2002). The increased G6PDH  
10 activity 2 and 24 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-challenged demands higher concentration of G6P to ensure the  
11 NADPH production necessary to support the oxidative stress. Therefore, in this condition  
12 both glycolysis and part of gluconeogenesis are activated at same time, similar to observed  
13 in colorectal cancer (Montal et al., 2015).

14 In G6PDH knockdown BME26 cells, a cellular environment was induced by oxidative  
15 stress in which NADP-ICDH seems to be a compensator NADPH provider (Figure 6). Since  
16 G6PDH transcription and activity increased after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenged (Figure 5G-H, 5J-K), a high  
17 energy load is necessary to supply sufficient glucose-6-phosphate for pentose phosphate  
18 pathway, without affecting cellular energy metabolism. Thus, the activity of NADP-ICDH  
19 (Figure S6C-D) and NADP-ME (Data not shown) are expected to be at the level of the control  
20 cells, indicating a less costly adaptation mechanism. In other studies, the expression of  
21 NADP-ME has been shown to be regulated by stress factors in some organisms. For  
22 example, in *Drosophila*, the interaction of NADPH-producing enzymes (G6PDH, NADP-ICDH  
23 and NADP-ME) under different stress conditions, such as oxidative stress, starvation and  
24 desiccation were evaluated. The study showed that NADPH production was mostly afforded  
25 by G6PDH and NADP-ICDH, which were more accentuated in oxidative stress, and by  
26 NADP-ME under starvation stress (Rzezniczak and Merritt, 2012). Thus, we formulate two  
27 hypotheses for a smaller participation of NADP-ME in BME26 cells (Figure S4): I) the  
28 enzyme is mainly required in a situation of low energy load, and II) there is a modest  
29 contribution of this enzyme to the oxidative balance when compared to G6PDH, for example.

30 Mitochondrial ROS homeostasis is supported by different pathways that have been  
31 suggested as potential targets to eliminate cancer cells through increased ROS formation  
32 under NADPH deficient conditions (Ciccarese and Ciminale, 2017). Either NADH or NADPH  
33 are required as co-factors for anti-oxidative enzymatic activities (Ying, 2008). An additional  
34 adaptive mechanism displayed by BME26 in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was the upregulation of

1 NADP<sup>+</sup> reducing enzymes, which increases intracellular NADPH (Figure 5). According to  
2 these results, BME26 cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce NADPH production as an adaptive  
3 strategy of compensation between NADP-ICDH and G6PDH enzymes (Smolková and Ježek,  
4 2012; Stanton, 2012).

5 A great progress has been achieved with arthropod model systems to study various  
6 human disorders including diabetes, multiple sclerosis, and epilepsy (King et al., 2011;  
7 Monge-Fuentes et al., 2015; Pakpour et al., 2013). Thus, arthropod cell lines act as excellent  
8 experimental models to study physiology, gene regulatory networks, metabolic fluxes, and  
9 the regulation of energy homeostasis (Abreu et al., 2009; Bottino-Rojas et al., 2015; Esteves  
10 et al., 2008, 2009; Hambarde et al., 2013; Kumar et al., 2012; Pohl et al., 2014). The present  
11 work demonstrate the ticks are able to support high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations *in vivo* and  
12 represents the first analysis of an adaptive response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, where tolerance is linked to  
13 metabolic control in eukaryotic cells. Moreover, this study helps elucidate an adaptive  
14 mechanism developed by BME26 cells under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure to maintain cellular  
15 performance and redox balance. Taken together, the results contribute to a better  
16 understanding of tick physiology and metabolism. Finally, it is important to determine if the  
17 adaptive mechanism described here is a species-specific phenomenon or could also be  
18 extended to the physiology of other hematophagous arthropods.

19  
20

## 21 MATERIALS AND METHODS

22

### 23 *Ticks and tick H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment*

24 *Rhipicephalus microplus* (Porto Alegre strain), were reared on Hereford calves (*Bos*  
25 *taurus taurus*) obtained from a naturally tick-free area (Santa Vitória do Palmar, RS, Brazil;  
26 33°32'2" S, 53°20'59" W) maintained in individual sheds at the Faculdade de Veterinária of  
27 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). During the off-host period of the life  
28 cycle, ticks were kept at 27°C and 85% relative humidity. The experiments were approved  
29 and conducted following the guidelines of the Ethics Committee on Animal Experimentation  
30 of the same university.

31 To access tick susceptibility to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, partially engorged adult female were manually  
32 removed from experimentally infested cattle. Ticks weighing between 25 mg and 65 mg were  
33 immobilized on a tray covered with double-sided adhesive tape and injected with 1 µL of  
34 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 0.5, 1, 2, 3, 4 or 5 M concentrations (equivalent to the quantities of 0.5, 1, 2, 3, 4 and

1 5  $\mu\text{mol}$ ), using syringe (Hamilton). Were selected to compose groups of 33 females in each  
2 condition of 0, 0.5, 1 and 2  $\mu\text{mol}$ ; and 17 females for each condition of 3, 4 and 5  $\mu\text{mol}$ .  
3 These ticks were artificially fed using microhematocrit capillary tubes filled with blood from  
4 non-infested bovines, collected in the presence of sodium citrate. Females were allowed to  
5 feed for approximately 24 h, and then kept at 27 - 28 °C and 80 - 90% relative humidity  
6 (Gonsioroski et al., 2012).

### 8 **BME26 cell line and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment**

9 BME26 tick embryo cells were maintained as previously described (Esteves et al.,  
10 2008), in Leibovitz L-15 medium (Sigma-Aldrich®), supplemented with amino acids, glucose,  
11 mineral salts, and vitamins, according to (Munderloh and Kurtti, 1989). The medium was  
12 diluted in sterile water (3:1), followed by addition of 10% tryptose phosphate broth (Sigma-  
13 Aldrich, #T8782), 10% fetal calf serum (Nutricell®, inactivated by heating), and 100 U/mL  
14 Penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Streptomycin (Gibco, #15140122). To perform the experiments, cell  
15 culture density was standardized at an initial aliquot of  $10^7$  cells per bottle ( $25\text{ cm}^2$ ) in 5 ml  
16 medium ( $2 \times 10^6$  cells / ml), to be used 14 days later at an expected concentration of  
17 approximately  $2 \times 10^7$  cells per bottle ( $4 \times 10^6$  cells / ml) (de Abreu et al., 2013). Then,  
18 resuspended cells were counted and typically plated at  $5 \times 10^5$  cells in 500  $\mu\text{L}$  of medium per  
19 well in a 24-well plate. Small modifications for indicated experiments were as follows: <sup>(1)</sup> for  
20 microscopy with fixed cells,  $2.5 \times 10^5$  cells in 500  $\mu\text{L}$  of medium per well were seeded on round  
21 coverslips in a 24-well plate; <sup>(2)</sup> for microscopy with *in vivo* staining of intact cells (MitoSox  
22 and 2- NBDG),  $2.5 \times 10^5$  cells in 2 mL of medium were seeded in cell culture dish for confocal  
23 microscopy (SPL life sciences, Model: 20035); <sup>(3)</sup> for oxygen consumption test, the treatment  
24 was made in standardized bottle with approximately  $2 \times 10^7$  cells; <sup>(4)</sup> for assessing long-term  
25 viability (5 days), cells were seeded at  $2.5 \times 10^5$  cells in 500  $\mu\text{L}$  of medium per well in a 24-well  
26 plate.

27 Treatment was performed with a single H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bolus addition. To access the cell  
28 susceptibility, cells were incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at concentrations ranging from 62  $\mu\text{M}$  to 1000  
29  $\mu\text{M}$ , and cell viability was checked 24 h after treatment. To determine LD<sub>50</sub>, cells were  
30 incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at concentrations ranging from 2.2 mM to 13 mM, and cell viability was  
31 checked 24 h after treatment. The concentrations of 2.2 mM and 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were chosen  
32 for further experiments, with incubations in indicated periods (usually 2 h and 24 h). BME26  
33 cells were used between passages 40 - 60.

### 1 **Cell lines used for comparative tests for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> susceptibility**

2 Aag2 cell line (continuous culture of *Aedes aegypti* embryo cells) and Schneider-2  
3 (S2) cells (continuous culture of *Drosophila melanogaster* embryonic cell) were maintained in  
4 Schneider 2 medium with L-glutamine (Gibco, #21720024) supplemented with 10% fetal  
5 bovine serum (Nutricell®, inactivated by heating) and Penicillin/Streptomycin at 100 U/mL  
6 and 100 µg/mL, respectively (Gibco, #15140122). Cells were maintained at 28 °C, with  
7 culture medium replaced 2-3 times a week. For the experiment, cells were seeded in 5x10<sup>5</sup>  
8 cells in 500 µL of medium per well in a 24-well plate.

9 Mammalian cells were provided by the cell culture division of the Carlos Chagas Filho  
10 Institute of Biophysics – UFRJ, only for performing a comparative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> susceptibility test.  
11 Rhesus monkey kidney epithelial cells (LLC-MK2 continuous lineage) were maintained in  
12 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum.  
13 For the experiment, the trypsinized and resuspended cells were counted and seeded at  
14 4x10<sup>5</sup> cells in 500 µL of medium per well in a 24-well plate. Peritoneal macrophages were  
15 obtained by intraperitoneal lavage of the C57Black/6 mouse. For the experiment, the  
16 resuspended cells were counted and seeded at 8x10<sup>4</sup> cells in 500 µL of medium per well in a  
17 24-well plate.

18 To assess cell susceptibility, the treatment was performed with a single H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bolus  
19 addition, at indicated concentrations of 62 µM to 1000 µM and cell viability was verified 24 h  
20 after treatment.

21

### 22 **Cell Viability Assays**

23 Cell viability was determined using a Neubauer hemocytometer with trypan blue  
24 exclusion technique and visual detection (Cadena-Herrera et al., 2015). After H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment,  
25 cells in each well were thoroughly rinsed with PBS and detached with 1 mL of a solution  
26 containing trypsin and trypan blue, in a proportion of 3.5:1:0.5 (v:v:v) of PBS, trypsin (2.5%,  
27 no phenol red, #15090046), and trypan blue 0.4% (Sigma-Aldrich). Ten microliters of the cell  
28 suspension were loaded into each chamber of the hemocytometer. The experimental  
29 procedure and calculation were done according to standard methodology (John M. Walker,  
30 2013), focus on the grid corner regions of 1×1 mm dimension using a 10x objective to take  
31 images using camera AxioCam 503 color coupled to microscope Axio Imager 2 (Zeiss). Cells  
32 were counted using cell counter Manual Counting plugin on ImageJ software (Ferreira and  
33 Rasband, 2012).

34 Alternatively, cell viability was measured using the MTT assay. Briefly, after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

1 treatment, medium was replaced by 0.5 mL of fresh medium, and 50  $\mu$ L of MTT (5 mg/mL in  
2 PBS) were added to each well. After 2 h of incubation at 34 °C, the medium was completely  
3 removed, and 1 mL of acid-isopropyl alcohol (0.15% HCl in isopropyl alcohol) was added to  
4 dissolve formazan crystals. The mixture was transferred to 1.5-mL tubes and centrifuged at  
5 6000 $\times$  g for 15 min. The clear supernatant was collected for absorbance measurement at 570  
6 nm in a UVmini-1240 UV-Vis spectrophotometer Shimadzu (Kyoto, Japan). Unless otherwise  
7 stated, the absorbance values of the control treatment were used for normalization (100%  
8 viability) (de Abreu et al., 2013).

### 9 10 ***RNA Extraction and Relative Quantification of Gene Transcription by Real-Time PCR***

11 Total RNA was extracted from BME26 cells harvested from 24-well plates using Trizol  
12 reagent (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) according to the manufacturer's instructions.  
13 One microgram of total RNA was reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse  
14 Transcription-M-MLV kit (Takara Biotechnology, Shiga, Japan). Relative transcription was  
15 analyzed with cDNA template in a quantitative PCR using the LightCycler 480 II platform  
16 (Roche, Mannheim, Germany) and the primers described in Table 1. Serial dilutions of the  
17 cDNA were used to construct a calibration curve. Reaction efficiencies between 85% and  
18 100% were determined from calibration curves for each set of primers in 10  $\mu$ L reactions. The  
19 *R. microplus* elongation factor-alpha gene (Elf1A) was used as reference (Nijhof et al., 2009)  
20 to normalize the reactions. cDNA from control, untreated BME26 cells was used as a  
21 calibrator for the assays. The relative expression of the calibrators was assigned a value of 1  
22 unit. Statistical analyses (mean and standard deviation) were performed on data from three  
23 independent experiments. Relative expression was determined using the Cp values from  
24 each run in Relative Expression Software Tool (Pfaffl, 2001).

25 For confirmation of G6PDH gene silencing by RT-qPCR, 1  $\mu$ g total RNA was reverse  
26 transcribed with the High Capacity cDNA Reverse transcription kit (Invitrogen, USA). Relative  
27 transcription was analyzed using cDNA as a template for quantitative PCR in the StepOne  
28 Plus platform (Applied Biosciences).

29 Gene sequences for isocitrate dehydrogenase-NADP<sup>+</sup> (NADP-ICDH) and catalase  
30 (CAT) from different species were retrieved from the GenBank database and used to conduct  
31 a BLAST search of an *R. microplus* transcriptome database generated using the Illumina  
32 Solexa sequencing platform (BioProject ID PRJNA232001 at Transcriptome Shotgun  
33 Assembly (TSA) database, GenBank). The *R. microplus* gene sequences for hexokinase  
34 (HK), pyruvate kinase (PK), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and

1 phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase (PH-GPx) were obtained from GenBank.  
2 Specific primers for the genes were designed based on these *R. microplus* sequences (see  
3 Table 1).  
4

### 5 ***Double-Stranded RNA (dsRNA) Synthesis and Delivery into BME26 Cells***

6 Oligonucleotide primers containing T7 promoter sequence were synthesized for the *in*  
7 *vitro* transcription and synthesis of dsRNA using RiboMAX™ Express RNAi System Kit  
8 (Promega, Madison, WI, USA). cDNA from BME26 cells was used for dsRNA synthesis,  
9 using the primers listed in Table1. The dsRNA was purified according to the manufacturer's  
10 instructions, and its concentration was measured at 260 nm. An aliquot of dsRNA was  
11 analyzed by agarose gel electrophoresis to check for degradation. An unrelated dsRNA for  
12 GFP was used as negative control for the RNAi-induced gene silencing experiment. The size  
13 of the synthesized G6PDH dsRNA complex was 553 bp . Double-stranded RNA was applied  
14 as described previously (de Abreu et al., 2013).

15 BME26 cells were seeded in 24-well plates, and 4 µg of dsRNA were added in 200 µL  
16 of medium per well gentle mixing. After 24-h incubation, 300 µL of complete medium were  
17 added to each well, and plates were further incubated at 34 °C for 48 h. At this point (3 days  
18 after dsRNA addition) the cells were collected for assays. G6PDH gene silencing was  
19 confirmed by RT-qPCR, as well as by enzyme activity assay. To verify the persistence of  
20 G6PDH gene silencing after the initial 3 days, culture medium was fully replaced by 500 µL of  
21 complete medium and incubated for additional 72 h. Cells were then collected to analyze  
22 G6PDH enzymatic activity (prolonged exposure assay, 6 days after dsRNA addition) (de  
23 Abreu et al., 2013). For H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge, BME26 cells (3 days after dsRNA addition) had their  
24 medium replaced (500 µL) and were treated with a single H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bolus addition of 2.2 mM or  
25 4.4 mM. Cell viability was measured after 24 h of incubation.  
26

### 27 ***Enzymatic Activities***

#### 28 *Catalase (CAT) activity*

29 After H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, cells in each 24-well of plate were washed twice with 500 µl of  
30 PBS pH 7.0 and detached in PBS. Each well resuspended was transferred to an identified  
31 eppendorf tube and centrifuged (hettich-universal centrifuge 320) at 6000rpm for 15 minutes  
32 at 15 °C. Three eppendorf tubes with the same treatment were pooled and lysed in 200 µl of  
33 the lysis buffer: prepared with 980 µL of the Reaction Buffer used in the specific activity of  
34 each enzyme; 10 µl of Triton-X100 (at the final concentration of 0.1%); 10 µL of protease



1 inhibitor cocktail (Sigma aldrich #P8340).The homogenate was mixed by vortexing for 10  
2 seconds, followed by mechanical lysis passing 20 times by the 1-ml syringe with 26G  
3 needle. The cell lysate was centrifuged (hettich-universal centrifuge 320) to remove debris  
4 and unlysed cell debris at 6000 rpm for 10 minutes at 4 °C, and the supernatant was  
5 collected only in a new eppendorf tube, always kept on ice before activities assays. Then, 50  
6 µl cell lysate was assayed for catalase (CAT) activity in 420 µl of 100 mM Tris-HCl Buffer, pH  
7 8.0 and 230 µl of 60 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. CAT activity was determined spectrophotometrically (UVmini-  
8 1240 UV-Vis Shimadzu - Kyoto, Japan) by monitoring the absorbance at 240 nm, at 25 °C.  
9 The reaction rate was determined by the consumption of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per minute, where one unit of  
10 enzyme is the amount needed to convert 1 mol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O+ O<sub>2</sub>. Enzymatic activity was  
11 normalized based on the total protein quantification, U / mg total protein. After normalization  
12 by protein, activity was calculated by setting each control condition activity as 100%.  
13 Enzymatic activity was expressed as percentage.  
14

#### 15 *Glucose-6-phosphate Dehydrogenase (G6PDH) Activity*

16 Samples were prepared as for CAT activity as described above. G6PDH activity was  
17 measured in 55 mM Tris-HCl Buffer containing 3,3 mM MgCl<sub>2</sub> pH 7.8; 3.5 mM glucose 6-  
18 phosphate and 2 mM β-NADP<sup>+</sup>, in 700 µl final volume. The reaction was started with 30 µl of  
19 homogenate cell lysate addition. The formation of β-NADPH was monitored  
20 spectrophotometrically at 340 nm, 30 °C (UVmini-1240 UV-Vis Shimadzu - Kyoto, Japan)  
21 during 7 minutes, using a molar extinction coefficient of 6.22 M<sup>-1</sup>. Enzymatic activity was  
22 normalized based on the total protein quantification, U / mg total protein. After normalization  
23 by protein, activity was calculated by setting each control condition activity as 100%.  
24 Enzymatic activity was expressed as percentage.  
25

#### 26 *Isocitrate Dehydrogenase-NADP<sup>+</sup> (ICDH-nadp) Activity*

27 Samples were prepared as for CAT activity as described above. ICDH-NADP<sup>+</sup> activity  
28 was measured in 50 mM MOPS, containing 4 mM MgCl<sub>2</sub> pH 8.0; 3.5 mM isocitrate and 2 mM  
29 β-NADP<sup>+</sup>, in 700 µl final volume. The reaction was started with 30 µl of homogenate cell  
30 lysate addition. The formation of β-NADPH was monitored spectrophotometrically at 340 nm,  
31 30 °C (UVmini-1240 UV-Vis Shimadzu - Kyoto, Japan) during 7 minutes, using a molar  
32 extinction coefficient of 6.22 M<sup>-1</sup>. Enzymatic activity was normalized based on the total protein  
33 quantification, U / mg total protein. After normalization by protein, activity was calculated by

1 setting each control condition activity as 100%. Enzymatic activity was expressed as  
2 percentage.

3

#### 4 *Hexokinase (HK) Activity*

5 Samples were prepared as for CAT activity as described above. Cell lysates, 30  $\mu$ l of  
6 homogenate, were assayed for HK activity in 20 mM Tris-HCl pH 7.5 containing 6 mM  
7  $MgCl_2$ , 1 mM ATP, 0.5 mM  $NAD^+$  and 10 mM NaF. The enzymatic reaction was started with  
8 2 mM glucose. The glucose 6-phosphate produced was measured indirectly by adding an  
9 equal volume of 1 unit /mL glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc*  
10 *mesenteroides*, and 0.3 mM  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, in 700  $\mu$ l final volume. The production of  $\beta$ -NADH was  
11 determined at 340 nm, 30 °C (UVmini-1240 UV-Vis Shimadzu - Kyoto, Japan) using a molar  
12 extinction coefficient of 6.22  $M^{-1}$ , as previously described (da Silva et al., 2015). Enzymatic  
13 activity was normalized based on the total protein quantification, U / mg total protein. After  
14 normalization by protein, activity was calculated by setting each control condition activity as  
15 100%. Enzymatic activity was expressed as percentage.

16

#### 17 *Pyruvate Kinase (PK) Activity*

18 Samples were prepared as for CAT activity as described above. PK activity using 30  $\mu$ l  
19 of homogenate was measured in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM ADP, 0.4 mM  
20 NADH and 1 unit /mL lactate dehydrogenase, and the reaction was started with 1 mM  
21 phosphoenolpyruvate, in 700  $\mu$ l final volume. The  $\beta$ -NADH consumption was evaluated  
22 spectrophotometrically (UVmini-1240 UV-Vis Shimadzu - Kyoto, Japan) at 340 nm, 25 °C.  
23 Using a molar extinction coefficient of 6.22  $M^{-1}$ , as previously described (da Silva et al.,  
24 2015). Enzymatic activity was normalized based on the total protein quantification, U / mg  
25 total protein. After normalization by protein, activity was calculated by setting each control  
26 condition activity as 100%. Enzymatic activity was expressed as percentage.

27

#### 28 *Peroxidases Activity (Amplex-Red)*

29 After treatment,  $2 \times 10^6$  cells were washed and suspended in 500  $\mu$ L of PBS. Cell  
30 suspension was centrifuged at 6000 rpm for 10 minutes (hettich-universal centrifuge 320).  
31 After the supernatant was discarded and the pelleted cells were suspended in 250  $\mu$ L of lysis  
32 buffer (100  $\mu$ L of 20 mM aminotriazole (Sigma-aldrich #A8056), 10  $\mu$ L of protease inhibitor  
33 cocktail (Sigma-aldrich #P8340) in reaction buffer of Amplex Red kit (Invitrogen #A22188)).  
34 Lysis was mechanically induced by 20 cycles of aspiration and dispensing using a 1-ml

1 syringe with 26G needle. After centrifuging at 6000 rpm for 5 minutes at 4 °C, the supernatant  
2 was collected for assay, the followed procedure was performed according to the  
3 manufacturer to Peroxidase Assay. A standard curve was prepared with horseradish  
4 peroxidase (HRP) concentrations of 0 to 6 mU /mL, in 50 µL. Samples from each treatment  
5 were prepared in triplicate, with 50 µL of each homogenate being diluted in the provided kit's  
6 reaction buffer. Reactions containing 50 µM Amplex Red reagent, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and HRP or  
7 the samples in reaction buffer were incubated for 30 minutes at room temperature.  
8 Absorbance at 560 nm was then measured using Thermo Scientific Multiskan GO UV/Vis  
9 microplate reader. Background, determined from a control reaction in the absence of  
10 enzyme, was subtracted from each value. The normalization of the results was done based  
11 on the total protein quantification. After normalization by protein, activity was calculated by  
12 setting each control activity as 100%.

13

#### 14 *Protein Determination*

15 For calculation of specific enzymatic activities, total protein in samples was determined  
16 using Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma Aldrich, #BCA1), with Bovine Serum  
17 Albumin as standard.

18

#### 19 ***Phalloidin-Texas Red and Hoechst 33342 staining***

20 After treatment, BME26 cells under round coverslips in a 24-well plate were washed  
21 twice with PBS pH 7.0 and fixed in 4% paraformaldehyde solution for 20 minutes at room  
22 temperature. After 2 washes, cells were incubated with absolute ice-cold acetone (stored at  
23  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ) for 5 min, and then washed five times with PBS pH 7.0. Cells were incubated with a  
24 freshly prepared solution of 165 nM Texas Red Phalloidin (Molecular Probes) in the dark at  
25 34 °C for 20 minutes, followed by a 5-min incubation with 25 µg/mL Hoestch 33342 (Aldrich  
26 Chem) at room temperature. After being washed twice with PBS pH 7.0, the coverslips were  
27 prepared on slides with glycerol to be observed. The images were made using the Zeiss  
28 LSM710 confocal laser scanning microscope, using objective 40x magnification (Water Plan-  
29 Apochromat 40x / 1.0 DIC), through the program ZEN 2.3 (black edition).

30

#### 31 ***Cell Proliferation Marker Ki67***

32 After treatment, BME26 cells on round coverslips in a 24-well plate were washed twice  
33 with PBS pH 7.0 and fixed in 4% paraformaldehyde solution for 20 minutes at room  
34 temperature, permeabilized with absolute ice-cold acetone (stored at  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ) for 5 min, and

1 washed five times with PBS pH 7.0. Cells were incubated for 1 hour with 1% BSA in PBS pH  
2 7.0 (blocking solution), followed by an overnight incubation with Ki67 antibody (Abcam, anti-  
3 Ki67 antibody, #ab15580) diluted 1:200 in blocking solution. After that, cells were washed 3  
4 times, incubated for 2 h with Anti-rabbit IgG secondary antibody conjugate-Alexa Fluor 555  
5 (Cell Signaling, # 4413) diluted 1:1000 in blocking solution, followed by a 15-min incubation  
6 with DAPI (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Cover slips were mounted in glycerol after 2 washes, and observed by  
7 microscopy. Image acquisition was performed using the Zeiss LSM710 confocal laser  
8 scanning microscope, using objective 40x magnification (Water Plan-Apochromat 40x / 1.0  
9 DIC), through the program ZEN 2.3 (black edition). Cells were counted using cell counter  
10 Manual Counting plugin on ImageJ software (Ferreira and Rasband, 2012). Among the nuclei  
11 labeled with anti-Ki67, different degrees of intensity were identified corresponding to variation  
12 in Ki67 protein levels. Two categories (dim and bright) of red nuclei were separately  
13 normalized to total nuclei (DAPI stained) as 100%.

14

#### 15 ***Measurement of Cellular ROS Level***

16 After treatment, BME26 cells under round coverslips in a 24-well plate were washed  
17 twice with PBS pH 7.0 and incubated for 15 minutes with 300  $\mu\text{L}$  of 50  $\mu\text{M}$  DHE  
18 (Dihydroethidine; Sigma-Aldrich, #D7008) solution in PBS in the dark under gentle shaking.  
19 Then, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min. After washed twice with PBS  
20 pH 7.0, coverslips were prepared on slides with glycerol to be immediately observed by  
21 microscopy. Image acquisition was performed using the Zeiss LSM710 confocal laser  
22 scanning microscope, using objective 40x magnification (Water Plan-Apochromat 40x / 1.0  
23 DIC), through the program ZEN 2.3 (black edition). The quantification of Fluorescence  
24 Intensity mean (F.I.) per cell area in  $\text{mm}^2$  was calculated by ZEN 2.3 (Blue edition) software,  
25 from Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011.

26

#### 27 ***Mitochondrial superoxide indicator for live cell images MitoSOX-Red***

28 The Mitosox fluorescence probe (Molecular probes, invitrogen, # M36008) was used to  
29 verify the generation of mitochondrial superoxide in living cells, the entire procedure was  
30 performed according to the manufacturer. After treatment, adherent cells on the plate cover  
31 (Petri dishes for confocal microscopy) were washed twice with 500  $\mu\text{L}$  of HBSS solution  
32 (prepared as recommended by the manufacturer), and then incubated with 500  $\mu\text{L}$  of 5  $\mu\text{M}$   
33 Mitosox, diluted in HBSS solution, for 10 minutes at 34 ° C in the dark. After three washes  
34 with HBSS solution, the cells were observed by confocal microscopy. Image acquisition was

1 performed using the Zeiss LSM710 confocal laser scanning microscope, using objective 63x  
2 magnification (LD plan-neofluar 63x / 1.0 DIC), through the program ZEN 2.3 (black edition).

### 4 **Glucose Uptake Assay**

5 D-glucose fluorescent analog, 2-NBDG (2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-  
6 yl)amino]-2-deoxy-d-glucose) (Molecular probes, #N13195) was used as an indicator for  
7 direct measurement of glucose uptake by the BME26 cells after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (Zou et al.,  
8 2005). After 2 h incubation with 2.2 mM or 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, adherent cells on the plate cover  
9 (Petri dishes for confocal microscopy) were washed twice with 500 µL of L15 medium  
10 prepared without glucose supplementation (Munderloh and Kurtti, 1989). 2-NBDG glucose  
11 analog (100 µM final concentration) was added to 500 µL medium and incubated for 15  
12 minutes at 34 °C in the dark. After two washes with L15 medium without-glucose  
13 supplementation, the cells were observed in confocal microscopy. An additional positive  
14 control of glucose uptake 2-NBDG assay was made by the use of insulin, by previous studies  
15 demonstrated that it stimulates the entry of glucose (Abreu et al., 2009; de Abreu et al.,  
16 2013). For 1 h BME26 cells were incubated in the presence or absence of 1 mM insulin in  
17 L15 medium (without glucose) with 100 µM 2-NBDG. Image acquisition was performed using  
18 the Zeiss LSM710 confocal laser scanning microscope, using objective 40x magnification  
19 (Water Plan-Apochromat 40x / 1.0 DIC), through the program ZEN 2.3 (black edition). The  
20 quantification of Fluorescence Intensity mean (F.I.) per cell area in mm<sup>2</sup> was calculated by  
21 ZEN 2.3 (Blue edition) software, from Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011.

### 23 **Oxygen Consumption**

24 Treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was done directly on the cell culture bottle and incubated for  
25 different times at 34 °C. After treatment, the medium was discarded, the cells were washed  
26 twice with 2 mL PBS pH 7.0, and resuspended in 2 ml PBS pH 7.0. Cells were counted in  
27 hemocytometer chamber (Cadena-Herrera et al., 2015) and 10<sup>7</sup> cells in 1 mL of PBS were  
28 added into Oxygraph cuvette. Total oxygen consumed by BME26 cells after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment,  
29 measured for 10 minutes, was determined using a Clark-type electrode (by Oxytherm liquid  
30 phase electrode, Hansatech Instruments Ltd). The calibration process was executed using  
31 complete air-saturated buffer at 28 °C as 100%. Measurements were carried out in 1.5 mL of  
32 PBS pH 7.0 and the rate of oxygen consumption was calculated in µmol O<sub>2</sub> / min / 10<sup>7</sup> cells.  
33 A solution containing 1 mM KCN to inhibit cytochrome oxidase was used as negative control  
34 to confirm cellular respiration. Three assays were performed using 1×10<sup>7</sup> cells /mL for three

1 independent experiments in triplicate.

2

### 3 ***NADPH Determination***

4 Samples were prepared as described above for CAT activity. The cell lysate was  
5 assayed for NADPH determination using the NADP/NADPH Quantification Kit (Sigma  
6 Aldrich). Determination NADPH in samples was determined spectrophotometrically by  
7 monitoring absorbance at 450 nm according to the manufacturer's protocol.

8

### 9 ***Statistical Analyses***

10 Experiments were performed with three independent biological samples in three  
11 experimental replicates each, to obtain the mean. All values are expressed as mean  $\pm$  S.D.  
12 Data were verified for normal distribution, using Shapiro–Wilk test. When normality was  
13 confirmed, statistical significance was assessed by one-way and two-way ANOVA to  
14 determine significant differences between groups. The Tukey test was used to compare data  
15 between three groups. Significance was set at \*p <0.05, \*\*p <0.01, \*\*\*p <0.0001. n.s., not  
16 significant (Compared to control); and # p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.0001 (Compared  
17 within the same concentration between the different times 2 and 24 hours).

18 The analysis of the images was made based on three independent biological samples  
19 in three experimental replicates (coverslips) each. Three or more images from each replicate  
20 were recorded by laser scanning confocal microscope LSM 710, Zeiss. For further image  
21 analyses, the Fluorescence Intensity Mean (F.I.) by cellular area in mm<sup>2</sup> was calculated using  
22 the software ZEN 2.3 (blue edition) from Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011, or cell and  
23 nuclei counting was performed using Cell Counter plugin on ImageJ software.

24 Percentage calculations, as well as statistical and graphical analyses were performed  
25 using GraphPad Prism 6 Software.

26

27

### 28 **Supplemental Methods**

#### 29 ***Panotic staining***

30 Panotic staining was done according to manufacturer's instructions (Laborclin Brazil,  
31 #620529), a kit for rapid staining of cells. Cells were incubated for 1 minute in solution-1  
32 (0.1% triarylmethane) and 1 minute in solution-2 (0.1% xanthenes). After 2 washes with  
33 distilled water the cells were incubated for 3 minutes in the solution-3 (0.1% thiazines) and  
34 washed 3 times in distilled water. Cover slides were prepared in glycerol and observed in

1 microscope. Microscopy images were captured in the bright field using the Axio Scope.A1  
2 polarized light microscope, Zeiss, through the Blue Zeiss software.

### 3 4 ***Mitochondrial Mass Investigation using MitoTracker-Green<sup>FM</sup>***

5 The MitoTracker-Green<sup>FM</sup> is green-fluorescent mitochondrial stain (Molecular probes,  
6 invitrogen, #M7514) was used to verify the mitochondrial location, the entire procedure was  
7 performed according to the manufacturer. After treatment, adherent cells on the plate cover  
8 (Petri dishes for confocal microscopy) were washed once with 500  $\mu$ L of pre-warmed L15  
9 complete medium. And then incubated with 500  $\mu$ L of 200  $\mu$ M mitotracker green, diluted in  
10 L15 complete medium, for 20 minutes at 34 ° C in the dark. After three washes with L15  
11 complete medium, the cells were observed by confocal microscopy. Image acquisition was  
12 performed using the Zeiss LSM710 confocal laser scanning microscope, using objective 63x  
13 magnification (LD plan-neofluar 63x / 1.0 DIC), through the program ZEN 2.3 (black edition).

### 14 15 ***G6PDH chemical inhibition***

16 BME26 cells were treated with 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M or 400  $\mu$ M of 6-ANAM (6-  
17 aminonicotinamide, Sigma-Aldrich, #A68203) for 24 h. Then, we performed a single H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
18 bolus addition (4.4 mM or 6.6 mM) and the samples were incubated for additional 24 h, after  
19 which cell viability was checked.

### 20 21 22 **ACKNOWLEDGMENTS**

23 This work was supported by grants from CNPq-Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia,  
24 CAPES, UENF, INCT- Entomologia Molecular and FAPERJ (Brazil). The authors would like  
25 to thank Jorgete Logullo de Oliveira for providing the different type cells for the experiments.

### 26 27 28 **COMPETING INTERESTS**

29 The authors have declared that no competing interests exist.

30  
31  
32  
33

1 **REFERENCES**

- 2 Abreu, L.A. de, Fabres, A., Esteves, E., Masuda, A., da Silva Vaz, I., Daffre, S., and Logullo,  
3 C. (2009). Exogenous insulin stimulates glycogen accumulation in *Rhipicephalus* (*Boophilus*)  
4 microplus embryo cell line BME26 via PI3K/AKT pathway. *Comp. Biochem. Physiol. - B*  
5 *Biochem. Mol. Biol.* 153, 185–190.
- 6 de Abreu, L.A., Calixto, C., Waltero, C.F., Della Noce, B.P., Githaka, N.W., Seixas, A., Parizi,  
7 L.F., Konnai, S., da Silva Vaz, I., Ohashi, K., et al. (2013). The conserved role of the  
8 AKT/GSK3 axis in cell survival and glycogen metabolism in *Rhipicephalus* (*Boophilus*)  
9 microplus embryo tick cell line BME26. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830, 2574–  
10 2582.
- 11 Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Murphy, A.N., and Starkov, A.A. (2015). Mitochondrial  
12 ROS Metabolism: 10 Years Later. *Biochemistry* 80, 517–531.
- 13 Bell-Sakyi, L., Zwegarth, E., Blouin, E.F., Gould, E.A., and Jongejan, F. (2007). Tick cell  
14 lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends Parasitol.* 23, 450–457.
- 15 Birben, E., Murat, U., Md, S., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). Oxidative  
16 Stress and Antioxidant Defense. *WAO J.* 5, 9–19.
- 17 Bottino-Rojas, V., Talyuli, O.A.C., Jupatanakul, N., Sim, S., Dimopoulos, G., Venancio, T.M.,  
18 Bahia, A.C., Sorgine, M.H., Oliveira, P.L., and Paiva-Silva, G.O. (2015). Heme signaling  
19 impacts global gene expression, immunity and dengue virus infectivity in *Aedes aegypti*.  
20 *PLoS One* 10, 1–19.
- 21 Burdon, R.H. (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell  
22 proliferation. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 775–794.
- 23 Cadena-Herrera, D., Esparza-De Lara, J.E., Ramírez-Ibañez, N.D., López-Morales, C.A.,  
24 Pérez, N.O., Flores-Ortiz, L.F., and Medina-Rivero, E. (2015). Validation of three viable-cell  
25 counting methods: Manual, semi-automated, and automated. *Biotechnol. Reports* 7, 9–16.
- 26 Chakravarty, K., Cassuto, H., Reshef, L., and Hanson, R.W. (2005). Factors That Control the  
27 Tissue-Specific Transcription of the Gene for Phosphoenolpyruvate Carboxykinase-C. *Crit.*  
28 *Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40, 129–154.
- 29 Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian  
30 organs. *Physiol. Rev.* 59, 527–605.
- 31 Ciccarese, F., and Ciminale, V. (2017). Escaping Death: Mitochondrial Redox Homeostasis  
32 in Cancer Cells. *Front. Oncol.* 7.
- 33 Citelli, M., Lara, F.A., Vaz, I. da S., and Oliveira, P.L. (2007). Oxidative stress impairs heme  
34 detoxification in the midgut of the cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Mol.*



- 1 Biochem. Parasitol. 151, 81–88.
- 2 Cossío-Bayúgar, R., Miranda, E., and Holman, P.J. (2005). Molecular cloning of a  
3 phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene from the tick, *Boophilus microplus*  
4 (*Acari: Ixodidae*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 1378–1387.
- 5 Croniger, C.M., Chakravarty, K., Olswang, Y., Cassuto, H., Reshef, L., and Hanson, R.W.  
6 (2002). Phosphoenolpyruvate carboxykinase revisited: II. Control of PEPCK-C gene  
7 expression. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*
- 8 D'Autréaux, B., and Toledano, M.B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that  
9 generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 813–824.
- 10 Da-Silva, W.S., Gómez-Puyou, A., De Gómez-Puyou, M.T., Moreno-Sanchez, R., De Felice,  
11 F.G., De Meis, L., Oliveira, M.F., and Galina, A. (2004). Mitochondrial bound hexokinase  
12 activity as a preventive antioxidant defense. Steady-state ADP formation as a regulatory  
13 mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria.  
14 *J. Biol. Chem.* 279, 39846–39855.
- 15 Dash, R., Acharya, C., Bindu, P., and Kundu, S. (2008). Antioxidant potential of silk protein  
16 sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts. *BMB Rep.* 41,  
17 236–241.
- 18 DeYulia, G.J., Cárcamo, J.M., Bórquez-Ojeda, O., Shelton, C.C., and Golde, D.W. (2005).  
19 Hydrogen peroxide generated extracellularly by receptor-ligand interaction facilitates cell  
20 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5044–5049.
- 21 Dias, F.A., Gandara, A.C.P., Perdomo, H.D., Gonçalves, R.S., Oliveira, C.R., Oliveira, R.L.L.,  
22 Citelli, M., Polycarpo, C.R., Santesmasses, D., Mariotti, M., et al. (2016). Identification of a  
23 selenium-dependent glutathione peroxidase in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*.  
24 *Insect Biochem. Mol. Biol.* 69, 105–114.
- 25 Esteves, E., Lara, F.A., Lorenzini, D.M., Costa, G.H.N., Fukuzawa, A.H., Pressinotti, L.N.,  
26 Silva, J.R.M.C., Ferro, J.A., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., et al. (2008). Cellular and molecular  
27 characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*)  
28 *microplus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 568–580.
- 29 Esteves, E., Bastos, C. V., Zivkovic, Z., de La Fuente, J., Kocan, K., Blouin, E., Ribeiro,  
30 M.F.B., Passos, L.M.F., and Daffre, S. (2009). Propagation of a Brazilian isolate of  
31 *Anaplasma marginale* with appendage in a tick cell line (BME26) derived from *Rhipicephalus*  
32 (*Boophilus*) *microplus*. *Vet. Parasitol.* 161, 150–153.
- 33 Ferreira, T., and Rasband, W. (2012). ImageJ User Guide ImageJ User Guide IJ 1.46r.
- 34 Forman, H.J., Maiorino, M., and Ursini, F. (2010). Signaling functions of reactive oxygen

- 1 species. *Biochemistry* 49, 835–842.
- 2 Fraga, A., Ribeiro, L., Lobato, M., Santos, V., Silva, J.R., Gomes, H., da Cunha Moraes, J.L.,  
3 de Souza Menezes, J., de Oliveira, C.J.L., Campos, E., et al. (2013). Glycogen and Glucose  
4 Metabolism Are Essential for Early Embryonic Development of the Red Flour Beetle  
5 *Tribolium castaneum*. *PLoS One* 8.
- 6 Freitas, D.R.J., Rosa, R.M., Moraes, J., Campos, E., Logullo, C., Da Silva Vaz, I., and  
7 Masuda, A. (2007). Relationship between glutathione S-transferase, catalase, oxygen  
8 consumption, lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larvae of *Boophilus*  
9 *microplus* (Acarina: Ixodidae). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 146, 688–  
10 694.
- 11 Gonsioroski, A.V., Bezerra, I.A., Utiumi, K.U., Driemeier, D., Farias, S.E., da Silva Vaz, I.,  
12 and Masuda, A. (2012). Anti-tick monoclonal antibody applied by artificial capillary feeding in  
13 *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* females. *Exp. Parasitol.* 130, 359–363.
- 14 Graça-Souza, A. V., Maya-Monteiro, C., Paiva-Silva, G.O., Braz, G.R.C., Paes, M.C.,  
15 Sorgine, M.H.F., Oliveira, M.F., and Oliveira, P.L. (2006). Adaptations against heme toxicity  
16 in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 322–335.
- 17 Grover, D., Ford, D., Brown, C., Hoe, N., Erdem, A., Tavaré, S., and Tower, J. (2009).  
18 Hydrogen peroxide stimulates activity and alters behavior in *Drosophila melanogaster*. *PLoS*  
19 *One* 4.
- 20 Gülden, M., Jess, A., Kammann, J., Maser, E., and Seibert, H. (2010). Cytotoxic potency of  
21 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cell cultures: Impact of cell concentration and exposure time. *Free Radic. Biol. Med.*  
22 49, 1298–1305.
- 23 Hambarde, S., Singh, V., and Chandna, S. (2013). Evidence for Involvement of Cytosolic  
24 Thioredoxin Peroxidase in the Excessive Resistance of Sf9 Lepidopteran Insect Cells against  
25 Radiation-Induced Apoptosis. *PLoS One* 8.
- 26 Hanson, R.W., and Reshef, L. (2003). Glyceroneogenesis revisited. In *Biochimie*, p.  
27 Indo, H.P., Yen, H.-C., Nakanishi, I., Matsumoto, K.-I., Tamura, M., Nagano, Y., Matsui, H.,  
28 Gusev, O., Cornette, R., Okuda, T., et al. (2015). A mitochondrial superoxide theory for  
29 oxidative stress diseases and aging. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 56, 1–7.
- 30 Jansen, W.T.M., Bolm, M., Balling, R., Chhatwal, G.S., and Schnabel, R. (2002). Hydrogen  
31 peroxide-mediated killing of *Caenorhabditis elegans* by *Streptococcus pyogenes*. *Infect.*  
32 *Immun.* 70, 5202–5207.
- 33 John M. Walker (2013). *Mammalian Cell Viability, Methods and Protocol*.
- 34 King, I., Tsai, L.T.-Y., Pflanz, R., Voigt, A., Lee, S., Jäckle, H., Lu, B., and Heberlein, U.

- 1 (2011). *Drosophila tao* controls mushroom body development and ethanol-stimulated  
2 behavior through par-1. *J. Neurosci.* *31*, 1139–1148.
- 3 Kuehne, A., Emmert, H., Soehle, J., Winnefeld, M., Fischer, F., Wenck, H., Gallinat, S.,  
4 Terstegen, L., Lucius, R., Hildebrand, J., et al. (2015). Acute Activation of Oxidative Pentose  
5 Phosphate Pathway as First-Line Response to Oxidative Stress in Human Skin Cells. *Mol.*  
6 *Cell.*
- 7 Kumar, D., Budachetri, K., Meyers, V.C., and Karim, S. (2016). Assessment of tick  
8 antioxidant responses to exogenous oxidative stressors and insight into the role of catalase  
9 in the reproductive fitness of the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum*. *Insect Mol. Biol.*  
10 *25*, 283–294.
- 11 Kumar, J.S., Suman, S., Singh, V., and Chandna, S. (2012). Radioresistant Sf9 insect cells  
12 display moderate resistance against cumene hydroperoxide. *Mol. Cell. Biochem.* *367*, 141–  
13 151.
- 14 Li, Z., Liu, J., Hu, J., Li, X., Wang, S., Yi, D., and Zhao, M. (2012). Protective effects of  
15 hyperoside against human umbilical vein endothelial cell damage induced by hydrogen  
16 peroxide. *J. Ethnopharmacol.* *139*, 388–394.
- 17 Liemburg-Apers, D.C., Willems, P.H.G.M., Koopman, W.J.H., and Grefte, S. (2015).  
18 Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism.  
19 *Arch. Toxicol.* *89*, 1209–1226.
- 20 Liu, Y., Fiskum, G., and Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the  
21 mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* *80*, 780–787.
- 22 Love, N.R., Chen, Y., Ishibashi, S., Kritsiligkou, P., Lea, R., Koh, Y., Gallop, J.L., Dorey, K.,  
23 and Amaya, E. (2013). Amputation-induced reactive oxygen species are required for  
24 successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nat. Cell Biol.* *15*, 222–228.
- 25 Maciel, J.E.S., Souza, F., Valle, S., Kucharski, L.C., and da Silva, R.S.M. (2008). Lactate  
26 metabolism in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* during hypoxia and post-  
27 hypoxia recovery. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* *151*, 61–65.
- 28 Mailloux, R.J., and Harper, M.-E. (2010). Glucose regulates enzymatic sources of  
29 mitochondrial NADPH in skeletal muscle cells; a novel role for glucose-6-phosphate  
30 dehydrogenase. *FASEB J.* *24*, 2495–2506.
- 31 Marinho, H.S., Cyrne, L., Cadenas, E., and Antunes, F. (2013). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> delivery to cells:  
32 Steady-state versus bolus addition. In *Methods in Enzymology*, (Academic Press), pp. 159–  
33 173.
- 34 Marinho, H.S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H., and Antunes, F. (2014). Hydrogen peroxide

- 1 sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol.*
- 2 Mattila, P.K., and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: Molecular architecture and cellular  
3 functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 446–454.
- 4 Maya-Monteiro, C.M., Daffre, S., Logullo, C., Lara, F.A., Alves, E.W., Capurro, M.L., Zingali,  
5 R., Almeida, I.C., and Oliveira, P.L. (2000). HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of  
6 the cattle tick, *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* 275, 36584–36589.
- 7 Mehlhorn, H., Al-Rasheid, K.A.S., Al-Quraishy, S., and Abdel-Ghaffar, F. (2012). Research  
8 and increase of expertise in arachno-entomology are urgently needed. *Parasitol. Res.* 110,  
9 259–265.
- 10 Di Meo, S., Reed, T.T., Venditti, P., and Victor, V.M. (2016). Role of ROS and RNS Sources  
11 in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016.
- 12 Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7,  
13 405–410.
- 14 Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends Plant Sci.* 22, 11–19.
- 15 Monge-Fuentes, V., Gomes, F.M.M., Campos, G.A.A., Silva, J. de C., Biolchi, A.M., dos  
16 Anjos, L.C., Gonçalves, J.C., Lopes, K.S., and Mortari, M.R. (2015). Neuroactive compounds  
17 obtained from arthropod venoms as new therapeutic platforms for the treatment of  
18 neurological disorders. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 21, 31.
- 19 Montal, E.D., Dewi, R., Bhalla, K., Ou, L., Hwang, B.J., Ropell, A.E., Gordon, C., Liu, W.J.,  
20 DeBerardinis, R.J., Sudderth, J., et al. (2015). PEPCK Coordinates the Regulation of Central  
21 Carbon Metabolism to Promote Cancer Cell Growth. *Mol. Cell.*
- 22 Munderloh, U.G., and Kurtti, T.J. (1989). Formulation of medium for tick cell culture. *Exp.*  
23 *Appl. Acarol.* 7, 219–229.
- 24 Nijhof, A.M., Balk, J.A., Postigo, M., and Jongejan, F. (2009). Selection of reference genes  
25 for quantitative RT-PCR studies in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus*  
26 *appendiculatus* ticks and determination of the expression profile of Bm86. *BMC Mol. Biol.*
- 27 Oliveira, M.F., Silva, J.R., Dansa-Petretski, M., De Souza, W., Lins, U., Braga, C.M.S.,  
28 Masuda, H., and Oliveira, P.L. (1999). Haem detoxification by an insect. *Nature* 400, 517–  
29 518.
- 30 Oliveira, P.L., Kawooya, J.K., Ribeiro, J.M.C., Meyer, T., Poorman, R., Alves, E.W., Walker,  
31 F.A., Machado, E.A., Nussenzveig, R.H., Padovan, G.J., et al. (1995). A heme-binding  
32 protein from hemolymph and oocytes of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*.  
33 Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 270, 10897–10901.
- 34 Paiva-Silva, G.O., Cruz-Oliveira, C., Nakayasu, E.S., Maya-Monteiro, C.M., Dunkov, B.C.,

- 1 Masuda, H., Almeida, I.C., and Oliveira, P.L. (2006). A heme-degradation pathway in a  
2 blood-sucking insect. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 8030–8035.
- 3 Pakpour, N., Camp, L., Smithers, H.M., Wang, B., Tu, Z., Nadler, S.A., and Luckhart, S.  
4 (2013). Protein Kinase C-Dependent Signaling Controls the Midgut Epithelial Barrier to  
5 Malaria Parasite Infection in Anopheline Mosquitoes. *PLoS One* 8.
- 6 Pereira, L.O.R., Oliveira, P.L., Almeida, I.C., and Paiva-Silva, G.O. (2007). Biglutaminyl-  
7 biliverdin IX alpha as a heme degradation product in the dengue fever insect-vector *Aedes*  
8 *aegypti*. *Biochemistry* 46, 6822–6829.
- 9 Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-  
10 PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 45e–45.
- 11 Pohl, P.C., Carvalho, D.D., Daffre, S., Da Silva Vaz, I., and Masuda, A. (2014). In vitro  
12 establishment of ivermectin-resistant *Rhipicephalus microplus* cell line and the contribution of  
13 ABC transporters on the resistance mechanism. *Vet. Parasitol.* 204, 316–322.
- 14 Quijano, C., Trujillo, M., Castro, L., and Trostchansky, A. (2016). Interplay between oxidant  
15 species and energy metabolism. *Redox Biol.* 8, 28–42.
- 16 Ray, P.D., Huang, B.W., and Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis  
17 and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* 24, 981–990.
- 18 Rello, S., Stockert, J.C., Moreno, V., Gámez, A., Pacheco, M., Juarranz, A., Cañete, M., and  
19 Villanueva, A. (2005). Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic  
20 and necrotic treatments. *Apoptosis* 10, 201–208.
- 21 Ristow, M., and Zarse, K. (2010). How increased oxidative stress promotes longevity and  
22 metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp. Gerontol.* 45,  
23 410–418.
- 24 Rzezniczak, T.Z., and Merritt, T.J.S. (2012). Interactions of NADP-reducing enzymes across  
25 varying environmental conditions: a model of biological complexity. *G3 (Bethesda)*. 2, 1613–  
26 1623.
- 27 Sadidi, M., Lentz, S.I., and Feldman, E.L. (2009). Hydrogen peroxide-induced Akt  
28 phosphorylation regulates Bax activation. *Biochimie* 91, 577–585.
- 29 Schriener, S.E., Linford, N.J., Martin, G.M., Treuting, P., Ogburn, C.E., Emond, M., Coskun,  
30 P.E., Ladiges, W., Wolf, N., Remmen, H. Van, et al. (2005). Extension of Murine Life Span by  
31 Overexpression of Catalase Targeted to Mitochondria. *Science (80-. )*. 308, 1909–1911.
- 32 Segal, A.W. (2008). The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to  
33 other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 604–618.
- 34 Sies, H. (2014). Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation: Redox signaling and oxidative stress. *J.*

- 1 Biol. Chem. 289, 8735–8741.
- 2 Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 4,  
3 180–183.
- 4 Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological  
5 oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 11, 613–619.
- 6 da Silva, R.M., Della Noce, B., Fernanda Waltero, C., Costa, E.P., de Abreu, L.A., Githaka,  
7 N.W., Moraes, J., Gomes, H.F., Konnai, S., da Silva Vaz, I., et al. (2015). Non-classical  
8 gluconeogenesis-dependent glucose metabolism in *Rhipicephalus microplus* embryonic cell  
9 line BME26. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 1821–1839.
- 10 Smolková, K., and Ježek, P. (2012). The role of mitochondrial NADPH-dependent isocitrate  
11 dehydrogenase in cancer cells. *Int. J. Cell Biol.*
- 12 Stanton, R.C. (2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival.  
13 *IUBMB Life* 64, 362–369.
- 14 Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M.A., Nilsa, R.-D.V., and Huang, P. (2008). Redox  
15 regulation of cell survival. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1343–1374.
- 16 Wang, Y.-P., Zhou, L.-S., Zhao, Y.-Z., Wang, S.-W., Chen, L.-L., Liu, L.-X., Ling, Z.-Q., Hu,  
17 F.-J., Sun, Y.-P., Zhang, J.-Y., et al. (2014). Regulation of G6PD acetylation by SIRT2 and  
18 KAT9 modulates NADPH homeostasis and cell survival during oxidative stress. *EMBO J.* 33,  
19 1304–1320.
- 20 Wu, R., Wyatt, E., Chawla, K., Tran, M., Ghanefar, M., Laakso, M., Epting, C.L., and  
21 Ardehali, H. (2012). Hexokinase II knockdown results in exaggerated cardiac hypertrophy via  
22 increased ROS production. *EMBO Mol. Med.* 4, 633–646.
- 23 Yang, J., Reshef, L., Cassuto, H., Aleman, G., and Hanson, R.W. (2009). Aspects of the  
24 control of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J. Biol. Chem.*
- 25 Ying, W. (2008). NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in Cellular Functions and Cell Death:  
26 Regulation and Biological Consequences. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 179–206.
- 27 Yoboue, E.D., Mougeolle, A., Kaiser, L., Averet, N., Rigoulet, M., and Devin, A. (2014). The  
28 role of mitochondrial biogenesis and ROS in the control of energy supply in proliferating cells.  
29 *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1837, 1093–1098.
- 30 Zhao, H.W., and Haddad, G.G. (2011). Review: Hypoxic and oxidative stress resistance in  
31 *Drosophila melanogaster*. In *Placenta*, p.
- 32 Zhao, H., Kalivendi, S., Zhang, H., Joseph, J., Nithipatikom, K., Vásquez-Vivar, J., and  
33 Kalyanaraman, B. (2003). Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent  
34 product that is distinctly different from ethidium: Potential implications in intracellular

- 1 fluorescence detection of superoxide. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 1359–1368.
- 2 Zou, C., Wang, Y., and Shen, Z. (2005). 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose
- 3 uptake measurement. *J. Biochem. Biophys. Methods* 64, 207–215.
- 4

1 **FIGURE LEGENDS:**

2

3 **Figure 1: *R. microplus* tick endures H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> overexposure.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance in ticks was  
 4 evaluated measuring biological parameters after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injection in partially fed females. (A)  
 5 Representative images of ticks after completed oviposition. Ticks were collected from groups  
 6 injected with increasing amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 – 5 µmol). (B) Tick weight gain to determine  
 7 blood feeding capacity; (C) Tick reproductive efficiency index to determine the oviposition  
 8 capacity; and (D) Eclosion rate, after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injection followed to completed engorgement by  
 9 capillary tube blood feeding. Was used 33 females in each condition of 0, 0.5, 1 and 2 µmol;  
 10 and 17 females for each condition of 3, 4 and 5 µmol. Data were verified for normal  
 11 distribution, using D'Agostino & Pearson normality test, statistical significance was assessed  
 12 by Ordinary one-way ANOVA, being \**p* 0,0482, \*\**p* 0,0022.

13

14 **Figure 2: BME26 tick cells tolerate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> overexposure compared to other mammalian**  
 15 **cell lines.** (A-D) Comparison of cell viability in four different cell types 24 h after challenge  
 16 with increasing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations (from 62.5 µM to 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). (A) Embryonic  
 17 *Rhipicephalus microplus* BME26 cell line. (B) Embryonic *Aedes aegypti* Aag2 cell line. (C)  
 18 BLACK6 mouse macrophage cells; (D) Rhesus monkey kidney epithelial LLCMK2 cells. The  
 19 dotted line (100%) represents untreated control (absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). (E) BME26 cells viability  
 20 by MTT assay was performed 24 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition in increasing concentrations of 2.2  
 21 mM to 13.2 mM. Insert shows LD<sub>50</sub> at approximately 6.02 mM. (F) BME26 cells viability by  
 22 MTT assay was check in 2, 12 and 24 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition in 2.2 mM (non-lethal) and 4.4  
 23 mM (~LD<sub>25</sub>) concentrations. (G) BME26 cells morphology was observed by confocal laser  
 24 scanning microscope, Zeiss LSM 710. Cytoskeletal architecture and nuclei were observed  
 25 using Phalloidin-Texas Red and Hoechst 33342 staining, respectively. White arrows show  
 26 the filopodia and yellow asterisks show cells with a rounded shape. Scale Bar: 20 µm. The  
 27 experiments were performed with three independent biological samples in three experimental  
 28 replicates each, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001, compared to control; ##*p* < 0.01  
 29 comparison over time, in Tukey's multiple comparisons test.

30

31 **Figure 3: Proliferative capacity was unchanged in BME26 cells after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge.**  
 32 (A) Cell viability was assessed by cell counting with trypan blue dye exclusion, in prolonged  
 33 times, 2, 3, 4 and 5 days after 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition. Dotted red line represents slope of the  
 34 cell growth line shown in control (4.738 ± 1.27) and treated (3.545 ± 0.68) conditions. \* *p*  
 35 <0,05, \*\* *p* <0,01, \*\*\* *p* <0,0001, comparing 4.4 mM treatment to the controls conditions; e #  
 36 *p* <0,05; ## *p* <0,01; ### *p* <0,0001, comparing the same treatment over time, in Tukey's  
 37 multiple comparisons test. (B) Count of nuclei labeled with Ki67 relative to total nuclei. (C)  
 38 Ki67 immunolocalization and DAPI nuclear staining in BME26 cells were visualized under  
 39 laser scanning confocal microscope LSM 710, Zeiss. Yellow arrows indicate Ki67 soft  
 40 labeling and white asterisks indicates Ki67 bright labeling Scale Bar: 10 µm. The experiments  
 41 were performed with three independent biological samples in three experimental replicates  
 42 each.

43



1 **Figure 4: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tolerant BME26 cells have an adaptive response in ROS scavenger**  
 2 **inducing ROS reduction over time with a transitional increase in total O<sub>2</sub> consumption.**  
 3 (A) ROS generation in short (2 h) and prolonged (24 h) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge at 2.2 mM and 4.4  
 4 mM was observed using DHE fluorescent probe in laser scanning confocal microscope LSM  
 5 710, scale bar: 10 μm; and (B) DHE fluorescence intensity measured using Zen2011 Zeiss  
 6 software. (C) Transcriptional and (D) activity levels of catalase (CAT); (E) total peroxidase  
 7 activity using Amplexred peroxidase assay kit (Invitrogen); and (F) mitochondrial superoxide  
 8 levels using MitoSox were measured 2 h and 24 h after 2.2 mM or 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition. (G)  
 9 Rate of total oxygen consumption was measured in 10<sup>7</sup> BME26 cells μmol/min using liquid-  
 10 phase Oxytherm electrode (Hansatech) after 2, 12 and 24 h at 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The  
 11 experiments were performed with three independent biological samples in three experimental  
 12 replicates each, where \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001, compared to control; and ##*p* <  
 13 0.01, ###*p* < 0.001 comparison over time, in Tukey's multiple comparisons test.

14

15 **Figure 5: Evidence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance derived from glucose metabolic pathway in**  
 16 **BME26 cells 2 hours after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge induces NADPH production.** (A) 2-NBDG  
 17 glucose analog uptake after treatment with 2.2 mM or 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 2 h observed using  
 18 laser scanning confocal microscope LSM 710, scale bar: 10 μm and (B) fluorescence  
 19 intensity measured of 2-NBDG glucose analog uptake using Zen2011 Zeiss software. (C)  
 20 Hexokinase (HK) activity; (D) pyruvate kinase (PK) activity; (E) Lactate dehydrogenase (LDH)  
 21 activity; (F) Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) transcription; (G) Transcriptional  
 22 and (H) activity levels of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH); and (I) NADPH  
 23 levels were measured 2 h after 2.2 mM or 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition. And 24 h after 2.2 mM or  
 24 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition were measured (J) transcriptional and (K) activity levels of glucose 6-  
 25 phosphate dehydrogenase (G6PDH); and (L) NADPH levels. The experiments were  
 26 performed with three independent biological samples in three experimental replicates each,  
 27 where \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001, compared to control; using Tukey's multiple  
 28 comparisons test.

29

30 **Figure 6: G6PDH-knockdown was compensated by NADP-ICDH transcription increase**  
 31 **in BME26 and maintained its tolerance to high concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** (A) Confirmation  
 32 of G6PDH knockdown 78%, 3 days after incubation with 4μg of the gene coding for *R.*  
 33 *microplus* G6PDH. (B) Transcriptional analysis of NADP-ICDH gene after G6PDH  
 34 knockdown. (C) BME26 cells viability was assessed after G6PDH knockdown by 3 days  
 35 incubated with dsRNA, and then challenged with 2.2 and 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. By cell  
 36 counting method with trypan blue dye exclusion. (D) Representation of proposed BME26 cell  
 37 adaptation to maintain NADPH production and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance by NADP-ICDH  
 38 compensation. The experiments were performed with three independent biological samples  
 39 in three experimental replicates each, where \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001, compared  
 40 to control; and ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001 compared between the groups, in Tukey's multiple  
 41 comparisons test.

42

43

1 **SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS**

2 **Supplementary Figure S1. Additional evidence of the tolerance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge of**  
 3 **BME26 cells and *Drosophila* Schneider 2 (S2) cells.** (A) BME26 and (B) *Drosophila*  
 4 Schneider 2 (S2) cell viability measured by MTT assay after hydrogen peroxide treatment  
 5 (Related to Fig. 2A-D). (C) BME26 cell viability measured by cell counting in hemocytometer  
 6 with Trypan blue exclusion (Related to Fig. 2F). (D) BME26 morphology assessed by  
 7 cytological analysis using Panoptic staining. Microscopy images were captured in bright field  
 8 using Axio Scope.A1 Polarized Light Microscope, Zeiss and Zeiss software Blue edition.  
 9 Scale bar: 10  $\mu$ m. The yellow arrows show the reduced-size cytosol 24 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 10 treatment (Related to Fig. 2G). The experiments were performed with three independent  
 11 biological samples in three experimental replicates each, \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001,  
 12 compared to control in Tukey's multiple comparisons test.

13

14 **Supplementary Figure S2: Additional contributions in adaptive response in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-**  
 15 **scavenger enzymes and mitochondrial mass.** (A) Transcriptional levels of catalase (CAT)  
 16 after 2.2 mM and 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment during 2 h and 24 h. (B) Catalase was inhibited by  
 17 3-amino-1,2,4-triazole (Sigma No. A8056) at  $2 \times 10^{-2}$  M in BME26 cells and after 4 h,  
 18 challenged with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and incubated for 24 h. (C) Phospholipid-hydroperoxide Glutathione  
 19 Peroxidase transcription 2 h and 24 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. (D-E) Mitochondrial staining  
 20 using MitoTracker-Green<sup>FM</sup> after 2 h and 24 h treatment with 2.2 mM and 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. All  
 21 fluorescence microscopy images were captured using laser scanning confocal microscope  
 22 LSM 710, Zeiss at Zen2011 Zeiss software. Scale bar: 10  $\mu$ m.

23

24 **Supplementary Figure S3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tolerant BME26 cells induce the production of NADPH**  
 25 **as an adaptive strategy.** (A) Proposed scheme of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging, using NADPH reducing  
 26 potential. (B) Metabolic adaptation scheme to maintain the production of NADPH. Metabolic  
 27 pathways involving enzymes related to NADPH production analyzed in BME26 cells after  
 28 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge.

29

30 **Supplementary Figure S4. Uptake assay control using insulin to stimulate glucose**  
 31 **uptake.** Glucose uptake by cells in response to 1 mM insulin for 1 hour with glucose analog  
 32 2-NBDG.

33

34 **Supplementary Figure S5. Hexokinase and pyruvate kinase relative transcription in**  
 35 **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated BME26 cells.** Analysis of HK, 2 h (A) and 24 h (B) and PK 2 h (C) and 24 h (D)  
 36 transcription after addition of 2.2 mM or 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *R. microplus* elongation factor-alpha  
 37 gene (Elf1A) (Nijhof et al., 2009) was used as reference for relative quantification (RQ). The  
 38 experiments were performed with three independent biological samples in three experimental  
 39 replicates each, \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001, compared to control; and ## $p$  < 0.01,  
 40 ### $p$  < 0.001 comparison over time, in Tukey's multiple comparisons test.

1

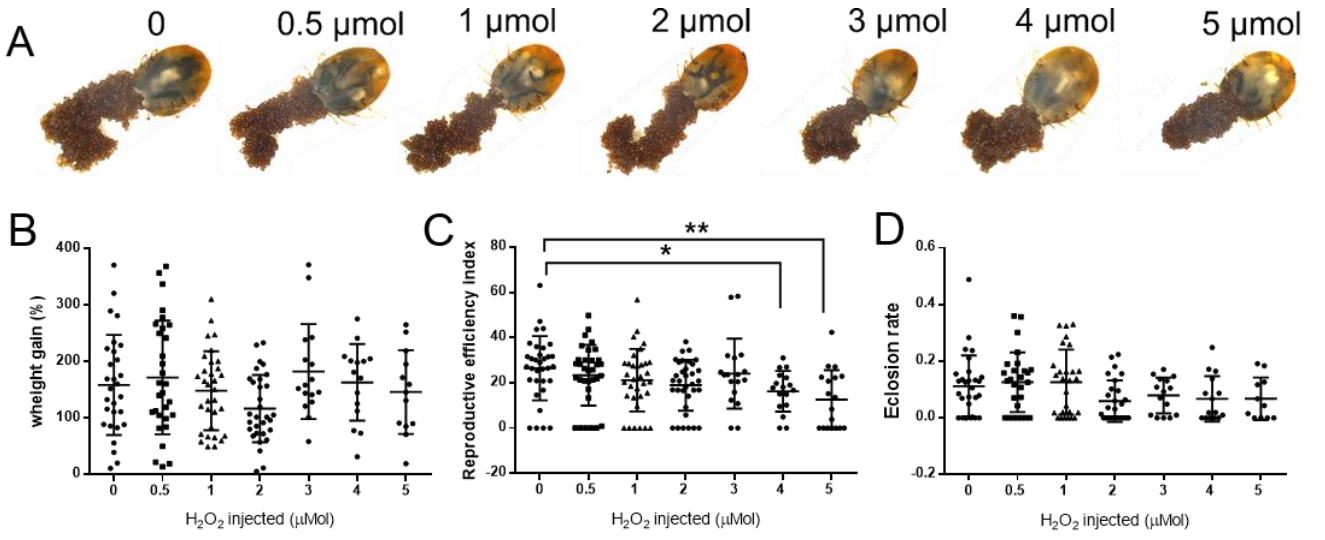
2 **Supplementary Figure S6. G6PDH chemical inhibition or knockdown did not alter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-**  
3 **tolerance.** (A) G6PDH activity was measured in BME26 cells 3 and 6 days after G6PDH  
4 knockdown. (B) G6PDH silencing did not affect BME26 cell viability in the absence of  
5 exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (C) BME26 cells were incubated with 6-ANAM, a known G6PDH inhibitor,  
6 at concentrations of 100, 200 and 400 μM. After 10 min, cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 4.4  
7 mM and 6.6 mM. The experiment was performed with three independent biological samples  
8 in three experimental replicates each, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ , compared to the control  
9 without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (black bar) within each group of the same concentration of inhibitor; and #  $p$   
10  $< 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.0001$  compared to the control without inhibitor (group without  
11 addition of 6-ANAM) within each group of the same H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration, in the Tukey multiple  
12 comparisons test.

13

14 **Supplementary Figure S7: Transcription and activity profile of NADP-ICDH in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**  
15 **challenged cells in BME26 cells.** (A) Transcriptional and (B) activity levels of NADP<sup>+</sup>-  
16 dependent isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH) after treatment with 2.2 mM or 4.4 mM  
17 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 2 h and 24 h. The experiment was performed with three independent biological  
18 samples in three experimental replicates each, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$  in Tukey's  
19 multiple comparisons test.

20

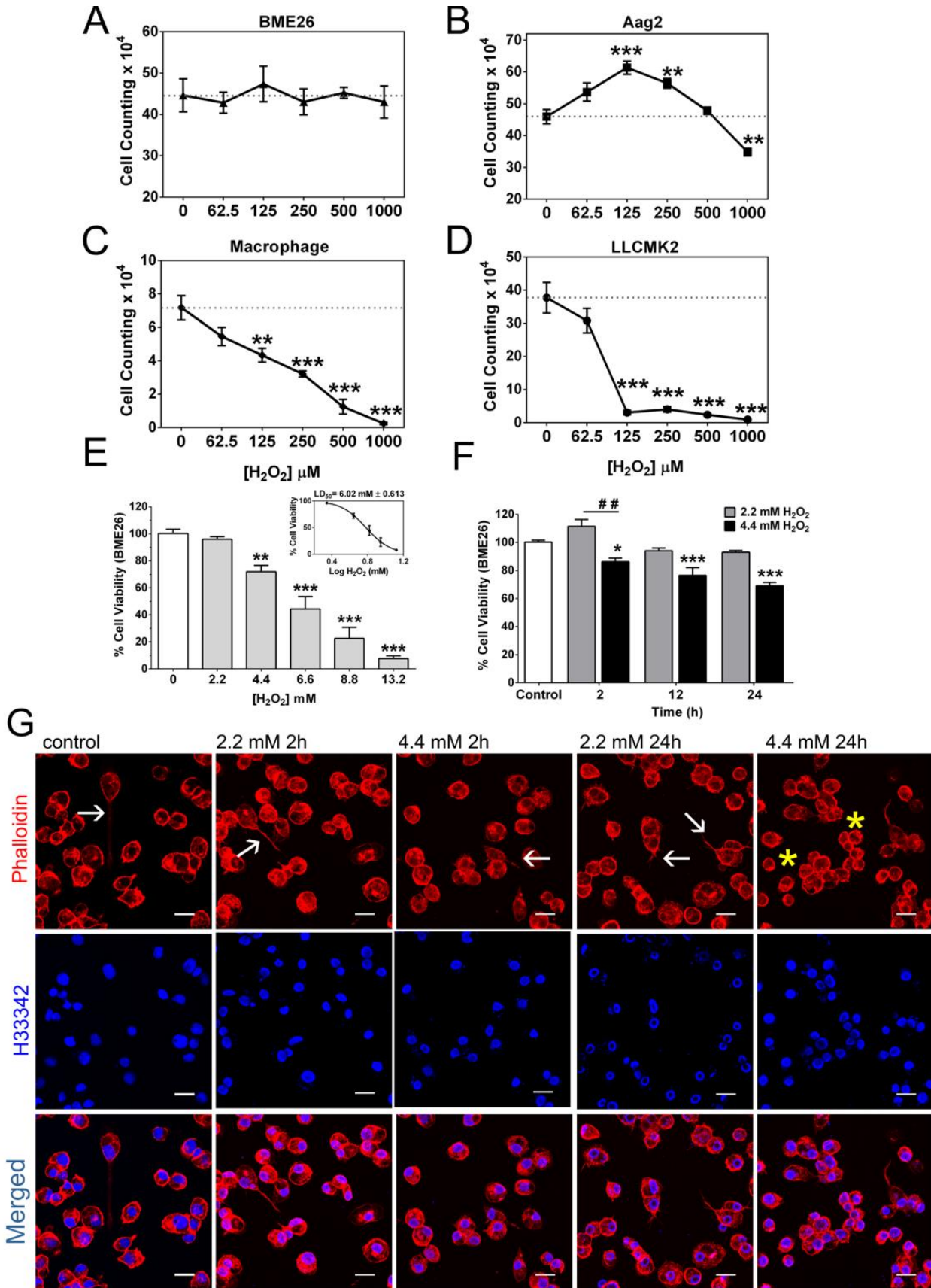
1 **Figure 1**



2  
3  
4

1

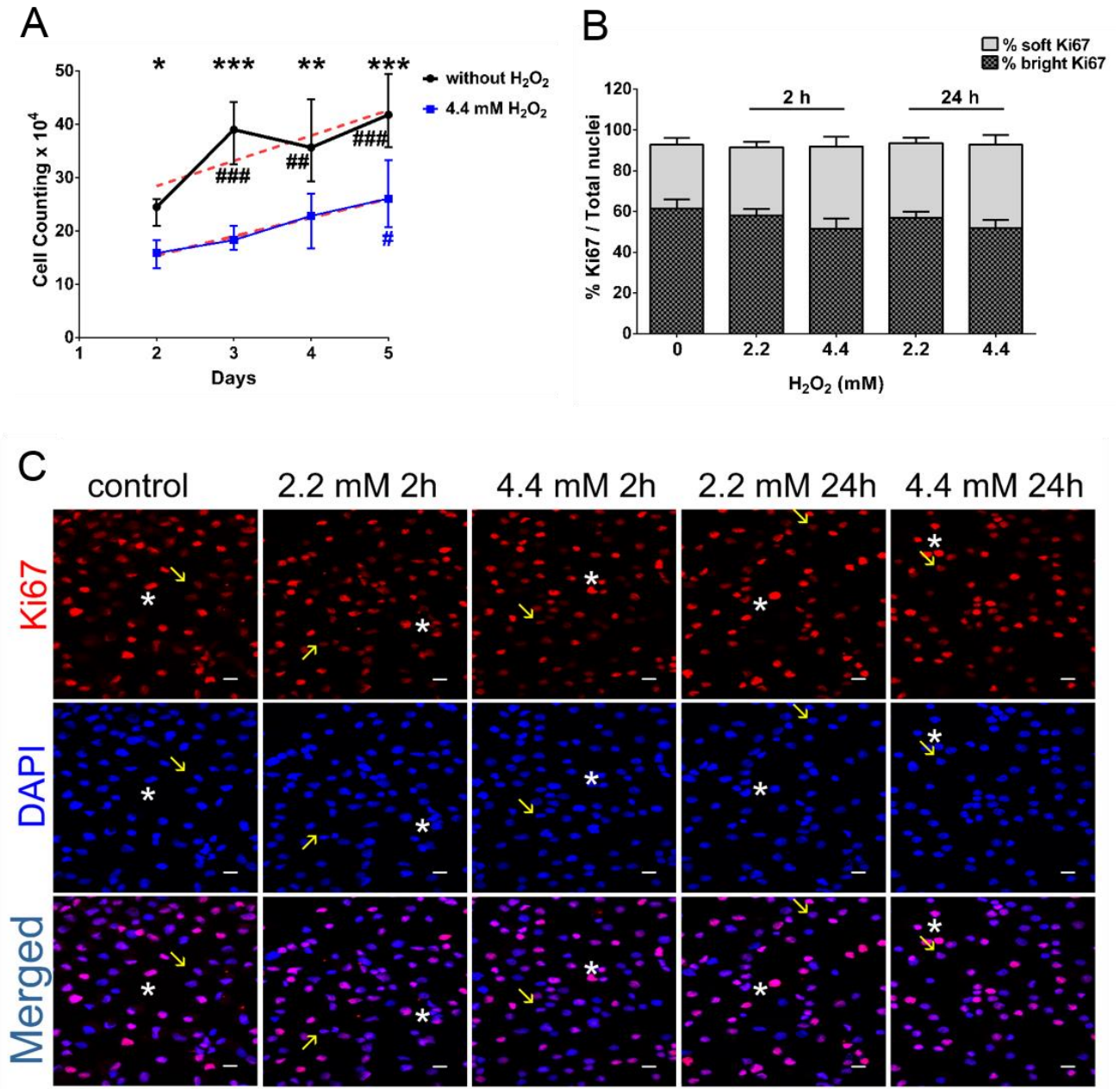
Figure 2



2

3

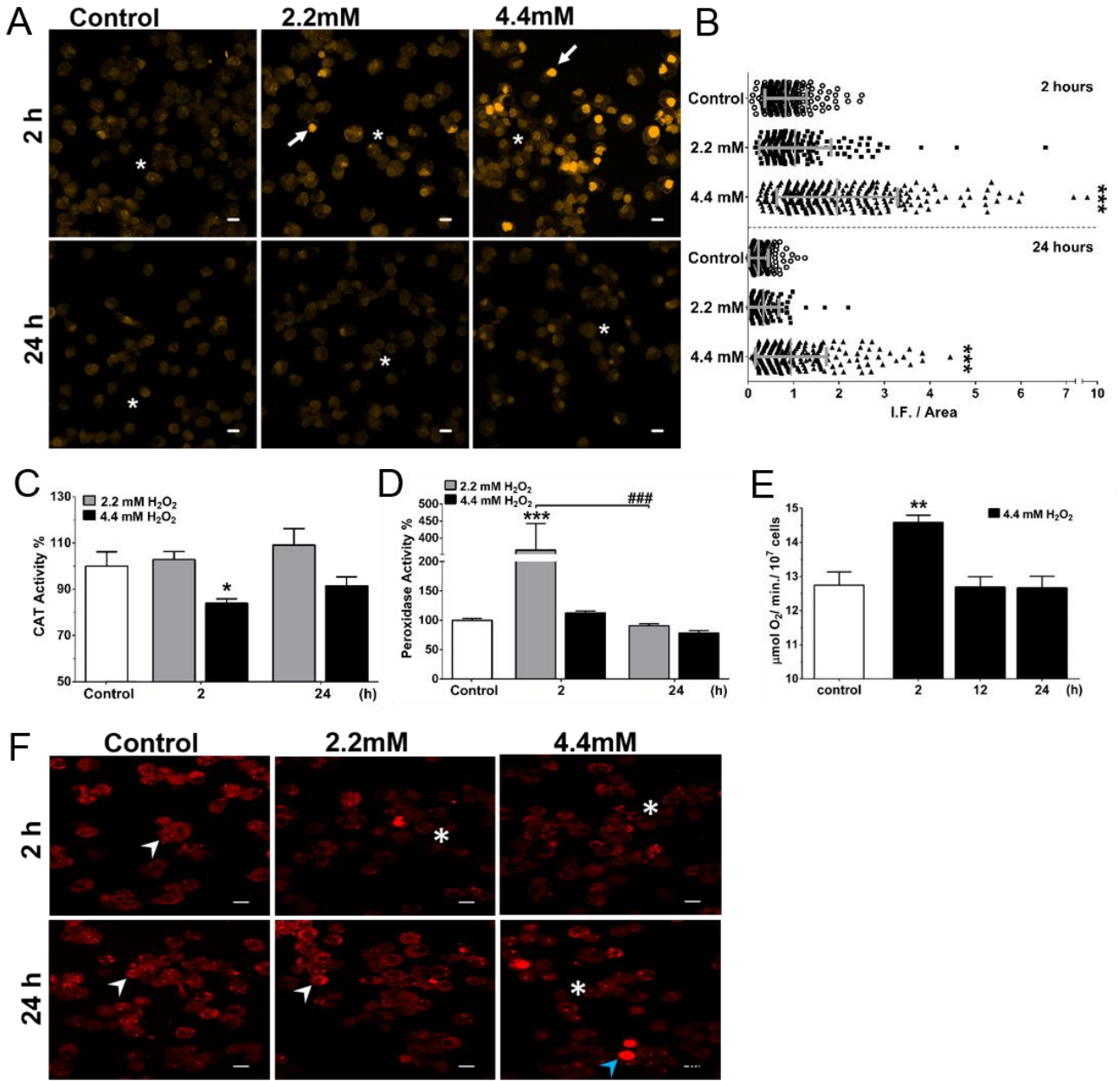
1 **Figure 3**



2  
3

1

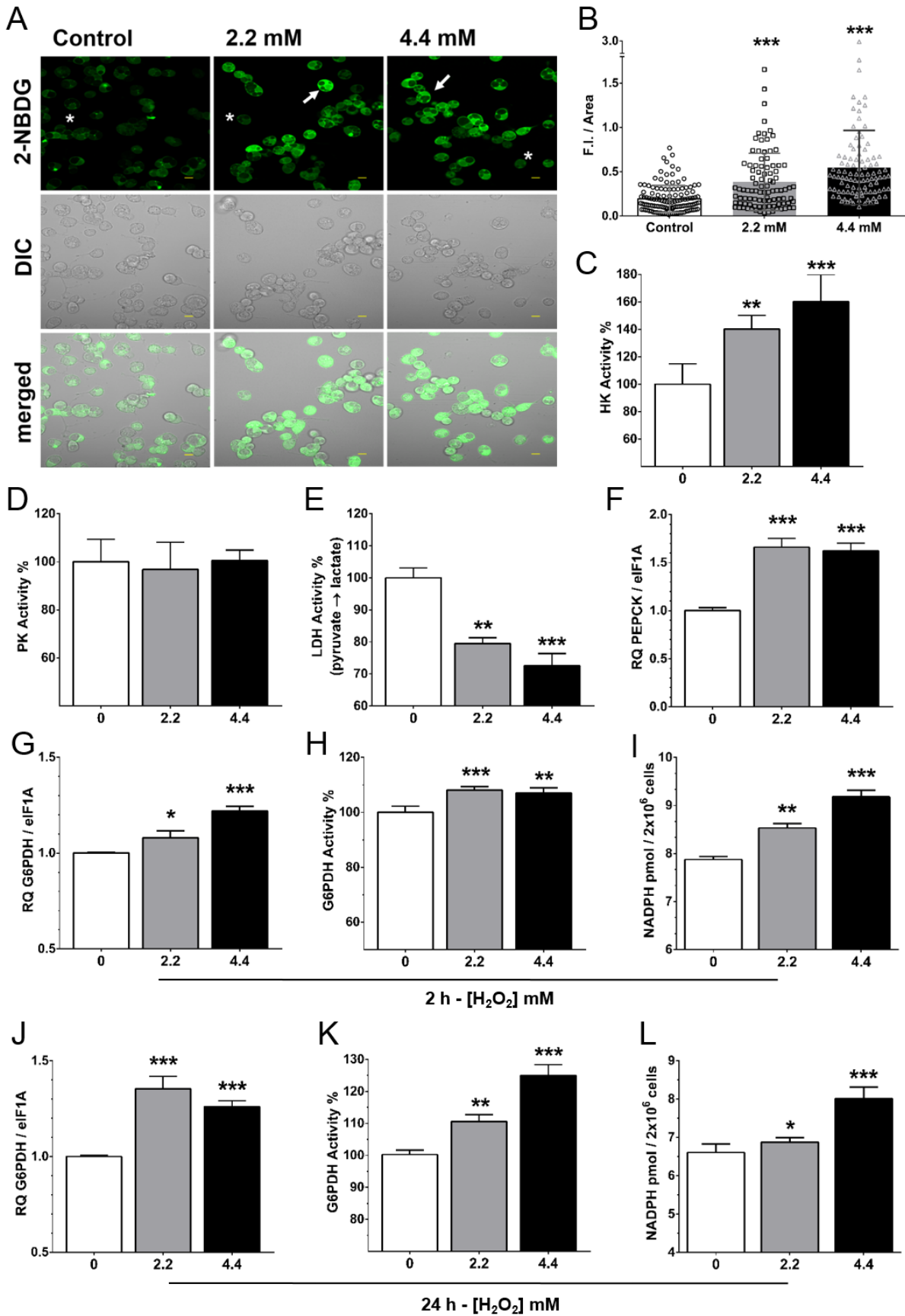
Figure 4



2

3

1 Figure 5



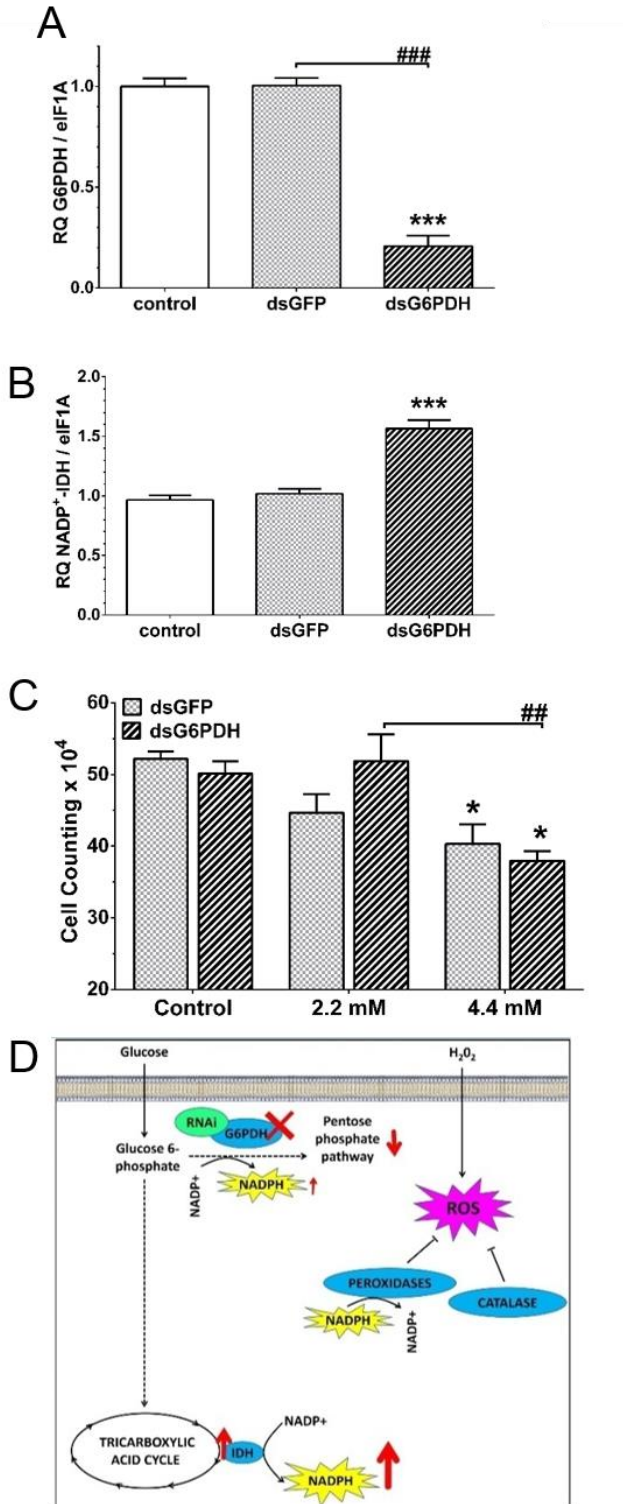
2

3



1

Figure 6

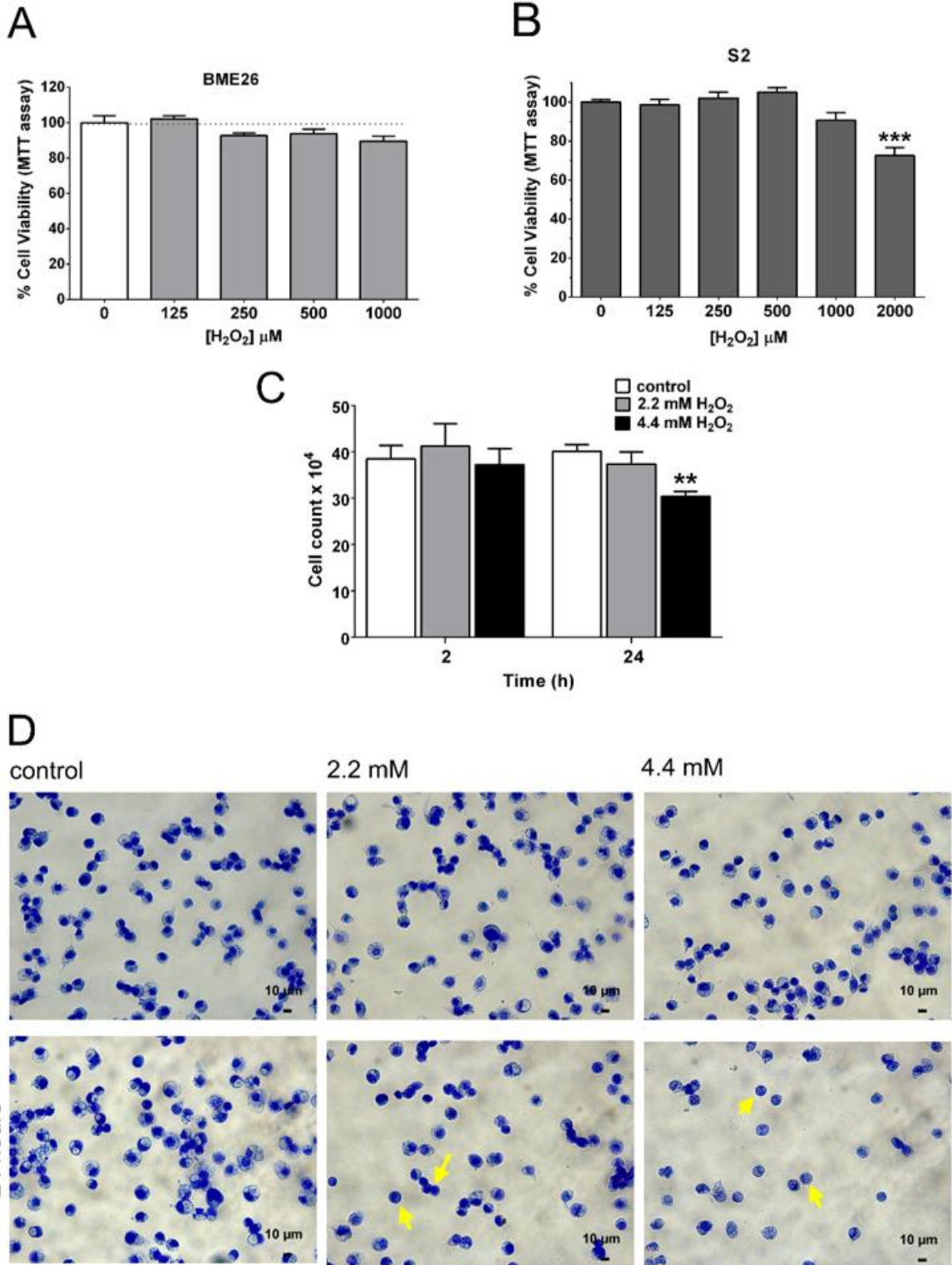


2

3

1

Figure S1

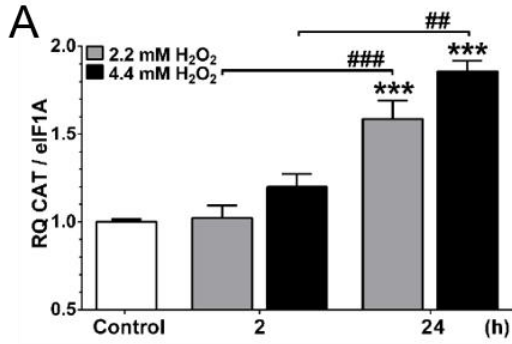


2

3

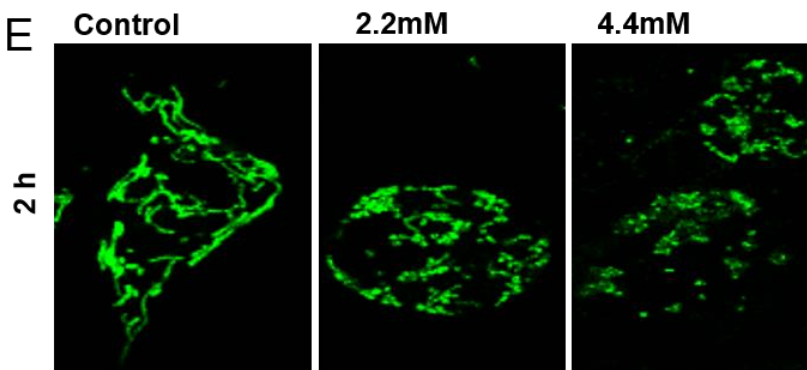
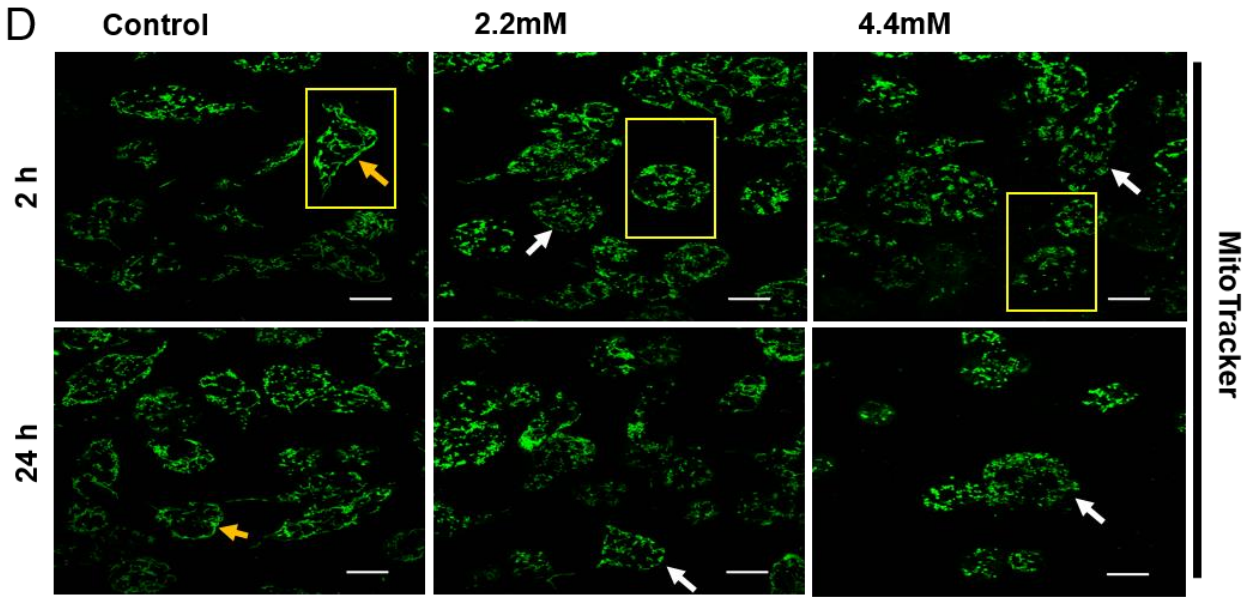
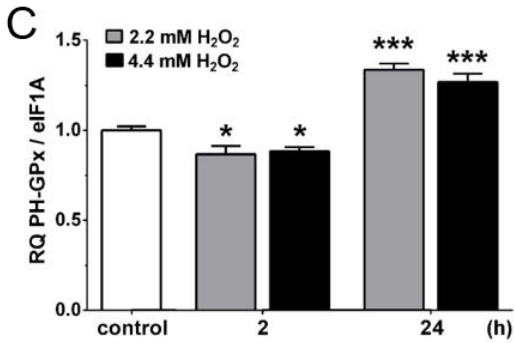
1

Figure S2



**B**

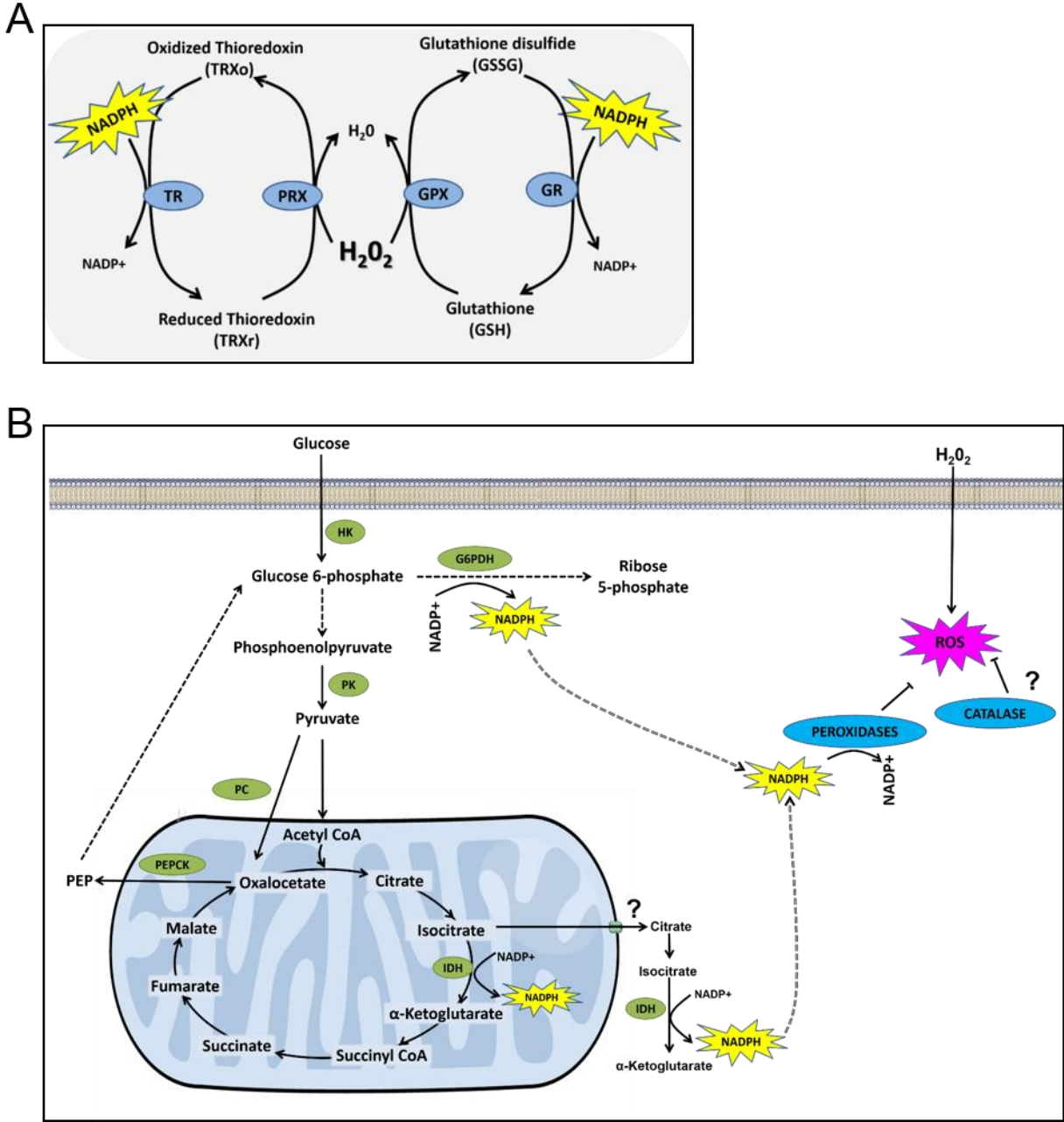
Aminotriazole  
 Inhibits at  $2 \times 10^{-2}$  M.  
 3-AMINO-1,2,4-TRIAZOLE  
 Sigma Prod. No. A8056  
 Desafiei as células com  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24h após 4h de  
 inibição de catalase.



2

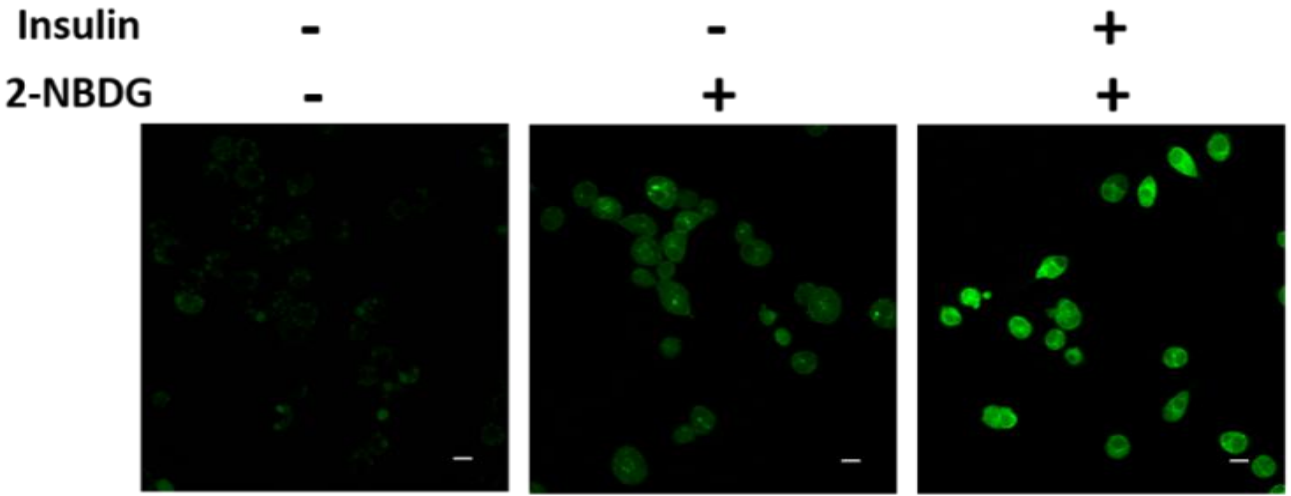
3

1 Figure S3



2  
3  
4

1 Figure S4

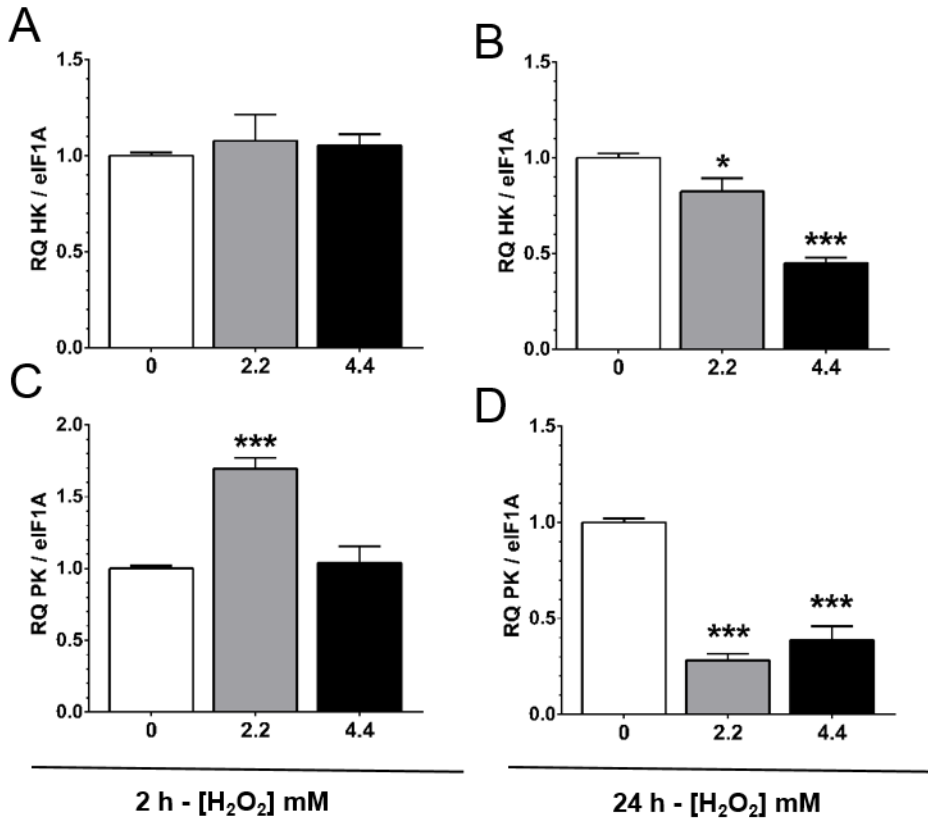


2

3

1

Figure S5



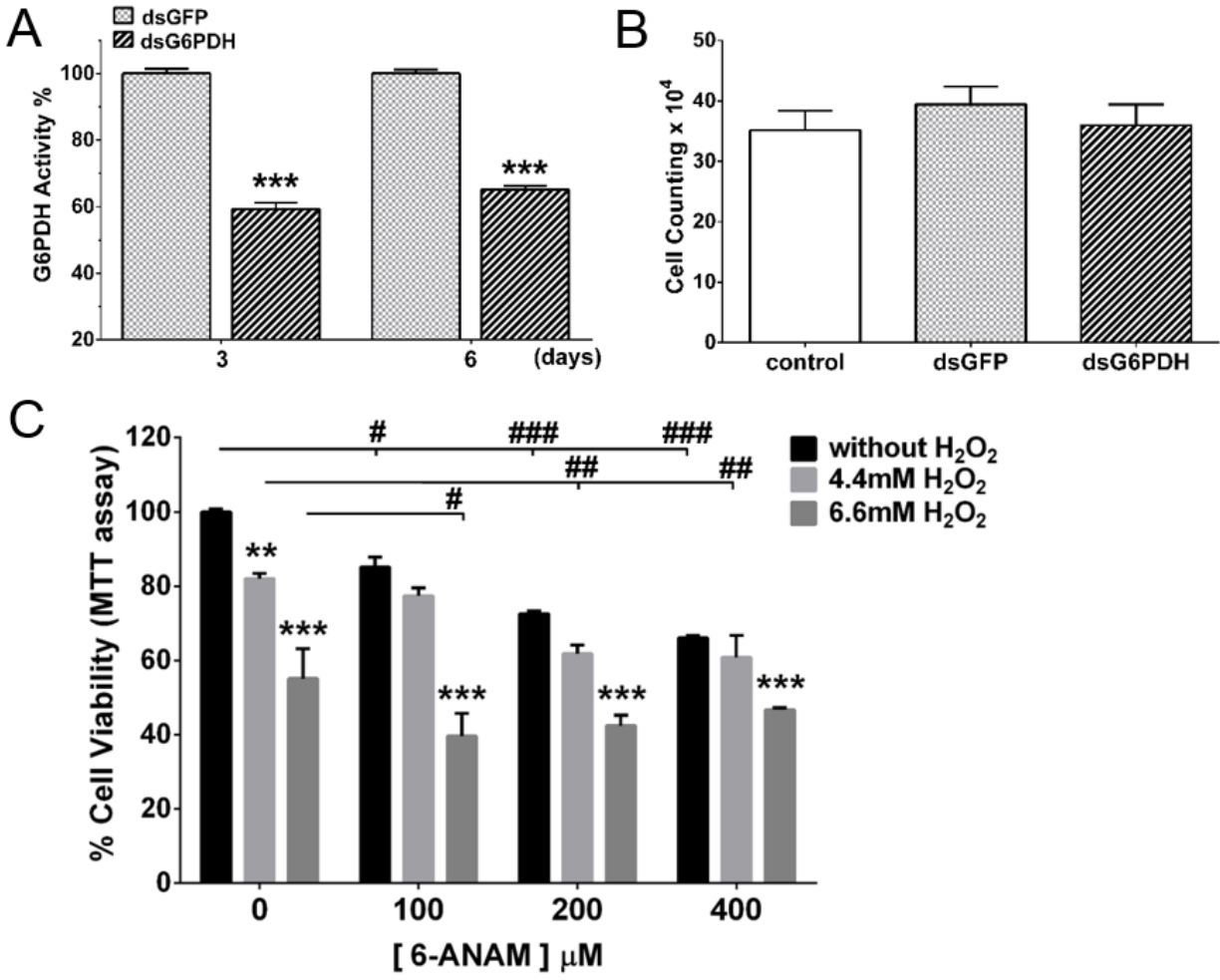
2

3

4

1

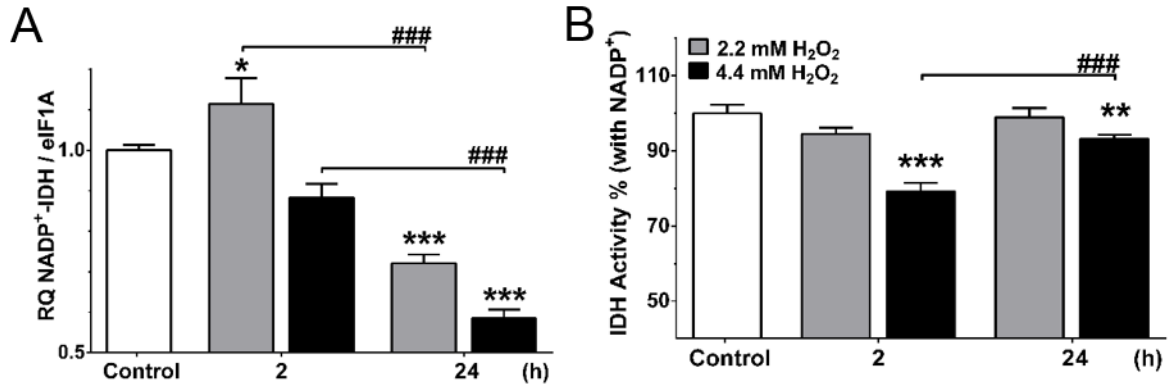
Figure S6



2

3

Figure S7





**Table 1.** GenBank accession numbers and oligonucleotide sequences used for RQ-PCR and dsRNA synthesis.

Gene	GenBank Access Number	Primers	Amplicon Size (bp)
<i>Glucose-6-phosphate Dehydrogenase</i> (G6PDH)	EU595878.1	5'-CGC AAC GAA TTG GTA TTG AGG-3' 5'-CGA CTG CCA TAG GTG AGA TCC-3'	122
<i>Isocitrate Dehydrogenase-nadp+</i> (NADP- ICDH)	KY953209	5'-CTT CAA AGC AGG TCT TAT GG-3' 5'-AGG AAC GGG AAT ATC AAC TC-3'	128
<i>Catalase</i> (CAT)	KY953208	5'-GAG GAG AGG GAC CGC CTT AC-3' 5'-GTG CCT TGG TGA AGT TCG TG-3'	97
<i>Hexokinase</i> (HK)	KF951259	5'-CAT GGA CAA AGA GCT TCA ACT GCT C-3' 5'-GGA AAG CTC CCT TGA CCA GGG TA-3'	150
<i>Pyruvate kinase</i> (PK)	KF951260	5'-GGG CAA GAG GGC AAG ACA ACT G-3' 5'-CAC GTT GAG CAC CTT GGT GAT G-3'	141
<i>Phospholipid-hydroperoxide Glutathione</i> <i>Peroxidase</i> (PH-GPx)	DQ180067	5'-GCG TCC TCC ATC TAT GAC TTC-3' 5'-CTT GTT GGT CTT TCC TCA CTT G-3'	123
<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i> (PEPCK)	KF951261	5'-CAAGCAATGAGTGCCTGCCAC-3' 5'-ACAGTCTTCCGTTTTTCATCTTG-3'	147
<i>Elongation factor 1-alpha</i> (ELF1A, Nijhof et al, 2009)	EW679365	5'-CGT CTA CAA GAT TGG TGG CAT T-3' 5'-CTC AGT GGT CAG GTT GGC AG-3'	108
	<b>Target gene</b>	<b>Primers</b>	
	<i>dsG6PDH</i> (553bp)	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGG</u> ACCCGTTGTGATTGAG -3' 5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGC</u> GCTCGTTGTTGATGTAGG -3'	
	<i>dsGFP</i>	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGCC</u> ACGTC AAGCACCACCACC -3' 5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGG</u> CGTAGTTTTTCCTTATCGCG -3'	

\*T7 promoter sequence (Highlighted in underlined)

\*\*All primers are designed for *Rhipicephalus microplus* sequences unless otherwise specified.