

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO**

CAMILA FERNANDA WALTERO ORJUELA

**CORRELAÇÕES ENTRE VIAS DE SINALIZAÇÃO INSULINATOR E O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO NO CARRAPATO BOVINO
*Rhipicephalus microplus***

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2019

CAMILA FERNANDA WALTERO ORJUELA

**CORRELAÇÕES ENTRE VIAS DE SINALIZAÇÃO INSULINATOR E O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO NO CARRAPATO BOVINO**

Rhipicephalus microplus

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Logullo

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2019

CAMILA FERNANDA WALTERO ORJUELA

**CORRELAÇÕES ENTRE VIAS DE SINALIZAÇÃO INSULINATOR E O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO NO CARRAPATO BOVINO**

Rhipicephalus microplus

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Aprovada em 10 de maio de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca– Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr. Cíntia Monteiro de Barros - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr. Carlos Logullo – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
(ORIENTADOR)

Dedico este trabalho a minha mãe Policarpa.
Exemplo de mulher guerreira, forte, inteligente, maravilhosa, cheia de luz.
Dou graças a Deus porque você é o melhor presente que a vida me deu.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me acompanhar em toda a jornada.

Ao professor Carlos Logullo, por ter me recebido no seu laboratório, por ter acreditado em mim, por ser fonte de conhecimento e apoio.

Ao professor Leonardo Araújo de Abreu, pelos ensinamentos e pela constante formação.

Aos meus colegas de laboratório e futuros colaboradores, Bárbara, Adriann, Renato, Christiano, Josias, Newton, Evenilton, Marcelle, Criscila, Drica, Jhenifer, Beijiane, Mickaela, Luan, Cintia, Joyce, Leonardo e Thayná, pelo apoio na hora de desenvolver os experimentos, discussão e troca de ideias.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pelo processo formativo.

Aos professores Rodrigo Nunes da Fonseca e Itabajara da Silva Vaz Jr., pela proposição de experimentos e discussão de resultados. Por permitir-me desenvolver experimentos fundamentais para esta tese em cada um dos seus laboratórios e por todas as outras inúmeras contribuições para minha formação.

À professora Flávia Borges Mury por aceitar ser a revisora desta tese.

Aos professores Pedro Lagerblad de Oliveira, Cíntia Monteiro de Barros e Rodrigo Nunes da Fonseca por participar na Banca Examinadora desta tese. Por propor importantes correções e sugestões para a apresentação deste trabalho final.

À equipe de trabalho do NUPEM-UFRJ, pela boa disposição.

Ao governo brasileiro e seus órgãos de fomento CAPES, CNPq, FAPERJ e INCT-EM, por fornecer o suporte financeiro durante meu doutorado.

A minha família Policarpa, Fernando, Paola e Marcelo, por dar-me amor, compreensão, por compartilhar seu tempo e ideias. Principalmente, pela confiança e paciência.

A meu primo Mauricio, por me dar a oportunidade de abrir caminhos para desenvolver este sonho.

A todas as pessoas que de uma e outra forma ajudaram a que chegara a este momento da minha vida.

Muito obrigada!

“Somos o que fazemos, mas somos, principalmente, o que fazemos para mudar o
que somos”.

Eduardo Galeano

RESUMO

Neste trabalho se estudaram as correlações existentes entre a via de sinalização pela insulina/TOR com o desenvolvimento embrionário do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Através de sequenciamentos foi demonstrada a conservação dos alvos RmTOR, RmS6K e Rm4E-BP1, ainda não descritos na literatura. Posteriormente, foi analisado que a insulina exógena pode estimular a transcrição de RmAKT e RmTOR em células embrionárias BME26, o que ressalta o papel conservado da via de sinalização insulina/AKT/TOR neste carrapato. Além disso, foi demonstrado que o tratamento com o inibidor químico da TOR, a rapamicina, causa a diminuição da viabilidade das células e a perda da integridade da membrana, resultados semelhantes ao efeito da inibição química da AKT nesta mesma linhagem celular. O tratamento com rapamicina promoveu a regulação negativa da transcrição de RmS6K e Rm4E-BP1, alvos a jusante da via de sinalização TOR. Em contraste, o tratamento de células BME26 com inibidores químicos de AKT ou GSK-3 não afetou a transcrição de RmS6K e Rm4E-BP1, indicando que a TOR é especificamente necessária para ativar seus alvos. Com o objetivo de estudar o papel desta via na reprodução de carrapatos, estudos *in vivo* foram realizados. A análise da transcrição relativa durante diferentes estágios do desenvolvimento embrionário de carrapatos mostrou diferentes níveis de transcrição para RmTOR, similares a RmGSK-3 β , que sugerem que os alvos são de origem materna e transcritos também pelo embrião em desenvolvimento. Observou-se também uma possível deposição materna de transcritos para os alvos RmS6K e Rm4E-BP1, em um perfil similar a RmAKT descrito anteriormente pelo grupo de pesquisa. A injeção de RNA de interferência para TOR em fêmeas parcialmente alimentadas levou a um leve atraso no desenvolvimento ovariano, morfologia externa do ovo atípica, diminuição do conteúdo de vitelina e proteína total nos ovos e à diminuição da eclosão. Os resultados demonstram que a via de sinalização insulina/AKT/TOR é importante para a reprodução de carrapatos, e que os alvos funcionam como um sistema regulador na embriogênese do *R. microplus*.

Palavras chave: Insulina, TOR, embriogênese, *Rhipicephalus microplus*.

ABSTRACT

In this work, the correlations between the insulin/TOR signaling pathway and the embryonic development of the tick *Rhipicephalus microplus* were studied. Sequencing has demonstrated the conservation of RmTOR, RmS6K and Rm4E-BP1 targets, not yet described in the literature. Subsequently, it was analyzed that the exogenous insulin can stimulate the transcription of RmAKT and RmTOR in BME26 embryonic cells, which highlights the conserved role of the insulin/AKT/TOR signaling pathway in this tick. In addition, treatment with the chemical inhibitor of TOR, rapamycin, has been shown to cause decreased cell viability and loss of membrane integrity, results similar to the effect of chemical inhibition of AKT in this same cell line. Treatment with rapamycin promoted the downregulation of RmS6K and Rm4E-BP1 transcripts, targets downstream of the TOR signaling pathway. In contrast, treatment of BME26 cells with chemical inhibitors of AKT or GSK-3 did not affect the transcription of RmS6K and Rm4E-BP1, indicating that TOR is specifically required to activate their targets. In order to study the role of this pathway in tick reproduction, *in vivo* studies were performed. Analysis of relative transcription during different stages of embryonic development of ticks showed different levels of transcription for RmTOR, similar to RmGSK-3 β , which suggest that the targets are of maternal origin and transcribed by the developing embryo. A possible maternal deposition of transcripts for RmS6K and Rm4E-BP1 targets was also observed in a profile similar to RmAKT previously described by the research group. Injection of RNA of interference to TOR in partially fed females led to a slight delay in ovarian development, external morphology of the atypical egg, decreased egg yolk and total protein content in eggs, and decreased hatchability. The results demonstrate that the insulin/AKT/TOR signaling pathway is important for tick reproduction, and that the targets function as a regulatory system for *R. microplus* embryogenesis.

Keywords: Insulin, TOR, embryogenesis, *Rhipicephalus microplus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da via de sinalização por insulina em mamíferos.	22
Figura 2. Modelo esquemático do papel conservado da via de sinalização por insulina no carrapato <i>R. microplus</i>	24
Figura 3. Modelo esquemático da via de sinalização da insulina/TOR.	25
Figura 4. O ciclo de vida do carrapato <i>R. microplus</i>	32
Figura 5. Fêmeas teleóginas da espécie <i>R. microplus</i>	34
Figura 6. Esquema da dinâmica populacional do <i>R. microplus</i>	34
Figura 7. Caracterização das células embrionárias BME26.	38
Figura 8. Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos para RmTOR.	59
Figura 9. Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos para RmS6K.	61
Figura 10. Múltiplo alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos para Rm4E-BP1 com sequências ortólogas de outros organismos.	62
Figura 11. Efeitos da insulina exógena sobre a transcrição relativa de RmAKT (A) e RmTOR (B) nas células embrionárias BME26.	63
Figura 12. Viabilidade das células BME26 tratadas com rapamicina, analisada através do ensaio de MTT.	65
Figura 13. Contagem celular das células BME26 tratadas com rapamicina.	66
Figura 14. Análises da integridade de membrana de células BME26 tratadas com rapamicina.	67
Figura 15. Projeção da <i>dsRNA</i> para RmTOR.	69
Figura 16. Expressão relativa dos genes A) RmAKT; B) RmGSK3- β e C) RmTOR em células BME26 para confirmação do silenciamento gênico por RT-qPCR.	70
Figura 17. Expressão relativa dos alvos moleculares a jusante A) RmTOR; B) RmGSK-3; C) RmS6K; e D) Rm4E-BP1 em células BME26 tratadas com dsAKT. ..	71
Figura 18. Expressão relativa dos alvos moleculares a jusante A) RmTOR; B) RmS6K; e C) Rm4E-BP1 em células BME26 tratadas com dsGSK-3.	72
Figura 19. Expressão relativa dos alvos moleculares a jusante A) RmS6K; e B) Rm4E-BP1 em células BME26 tratadas com dsTOR.	73
Figura 20. Expressão relativa dos alvos moleculares a jusante A) RmS6K e B) Rm4E-BP1 após inibição química da AKT em células embrionárias BME26.	74

Figura 21. Expressão relativa dos alvos moleculares a jusante A) RmS6K e B) Rm4E-BP1 após inibição química da GSK-3 em células embrionárias BME26.....	74
Figura 22. Expressão relativa dos alvos moleculares a jusante A) RmS6K e B) Rm4E-BP1 após inibição química da TOR em células embrionárias BME26.	75
Figura 23. Representação esquemática dos estágios de desenvolvimento seguindo os dias após a oviposição e análise da expressão relativa dos alvos moleculares durante a embriogênese do carrapato <i>R. microplus</i>	77
Figura 24. Expressão relativa do alvo RmTOR em fêmeas do carrapato <i>R. microplus</i> parcialmente ingurgitadas.	78
Figura 25. Desenvolvimento ovariano de fêmeas tratadas com RNAi para RmTOR.	79
Figura 26. Observação morfológica de ovos de fêmeas tratadas com RNAi para RmTOR.	80
Figura 27. Índice de eficiência nutricional, peso dos ovos e índice de produção de ovos de fêmeas tratadas com RNAi.	81
Figura 28. Efeitos do silenciamento com RNAi sobre a eclosão de larvas.....	81
Figura 29. SDS-PAGE e dot blot anti-VT de amostras de ovos colocados por fêmeas tratados com <i>dsRNA</i>	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos específicos utilizados na clonagem e sequenciamento dos alvos TOR, S6K e 4E-BP1 do carrapato <i>R. microplus</i>	44
Tabela 2. Oligonucleotídeos específicos utilizados para a síntese de <i>dsRNA</i> para silenciamento gênico.....	47
Tabela 3. Oligonucleotídeos específicos utilizados para análise da transcrição relativa de diferentes alvos deste estudo.	54
Tabela 4. Análise comparativa entre a sequência deduzida de RmTOR com sequências ortólogas de diferentes espécies usando o algoritmo Blastp.	60
Tabela 5. Análise comparativa entre a sequência deduzida de RmS6K com sequências ortólogas de diferentes espécies usando o algoritmo Blastp.	61
Tabela 6. Análise comparativa entre a sequência deduzida de Rm4E-BP1 com sequências ortólogas de diferentes espécies usando o algoritmo Blastp.	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais fases do desenvolvimento embrionário do carrapato <i>R. microplus</i>	36
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4E-BP1	Proteínas de ligação do fator 4E iniciador da tradução em eucariotos
AKT	Proteína quinase B
BCIP	5-bromo4-cloro-3-indolil fosfato
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Cp	Pontos de cruzamentos
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	Dupla fita de RNA
eIF4E	Fator de iniciação eucariótica 4E
ELF-1A	Fator de alongamento-1A
FAT	Domínios alvo de adesão focal
FATC	Domínio terminal do Alvo da Rapamicina
FKBP12	Domínio de ligação a rapamicina
FRB	Domínio de ligação a rapamicina
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GS	Glicogênio Sintase
GSK-3	Glicogênio sintase quinase 3
GSK-3 β	Glicogênio sintase quinase 3 beta
GTP	Guanosina Trifosfato
HPTT	Hormônio protoracicotrópico
IC ₅₀	Concentração necessária do fármaco que elimina 50% das células
IGFs	Fatores de crescimento similares à insulina
ILPs	Peptídeos similares à insulina
IR	Receptor de insulina
IRS	Substratos do receptor de insulina
MAPK	Proteínas-quinases ativadas por mitógenos
mTORC1	Complexo Alvo da Rapamicina 1 de mamíferos
mTORC2	Complexo Alvo da Rapamicina 2 de mamíferos
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio brometo
MZT	Controle do desenvolvimento de materno para o zigoto

NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidase
NBT	Nitro azul de tetrazólio
OGP	Fase de Crescimento Ovariano
ORF	Fases de Leitura Aberta
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Iodeto de propídeo
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKB	Proteína quinase B
PKC- α	Proteínas quinases C α ,
Raptor	Regulatory-associated protein of mTOR
RHEB	Ras homolog enriched in brain
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
Rm	<i>Rhipicephalus microplus</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
S6K	Proteínas quinases da proteína ribossomal S6
SFB	Soro Fetal Bovino
SGK1	Serum glucocorticoid-induced protein kinase 1
shRNA	RNAs de <i>hairpins</i> curtos
TOR	Alvo da Rapamicina
TSC	Complexos da esclerose tuberosa 1 e 2
Vt	Vitelina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 A via de sinalização por insulina	20
2.1.1 A via de sinalização pela insulina no carrapato <i>R. microplus</i>	23
2.2 A via de sinalização insulina/TOR.....	24
2.2.1 A via de sinalização insulina/TOR em artrópodes.....	27
2.3 O modelo de estudo: O carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	29
2.3.1 Classificação taxonômica, distribuição geográfica e métodos de controle....	29
2.3.2 O ciclo de vida.....	31
2.3.3 Aspectos morfológicos e metabólicos da embriogênese do carrapato <i>R. microplus</i>	35
2.3.4 A linhagem de células embrionárias BME26.....	37
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Geral	40
3.2 Objetivos Específicos.....	40
4. JUSTIFICATIVA.....	41
5. MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.1 Manutenção da cultura de células embrionárias BME26 do carrapato bovino <i>R. microplus</i>	42
5.2 Manutenção de fêmeas e de ovos do carrapato <i>R. microplus</i>	42
5.3 Extração de RNA e síntese de cDNA de células embrionárias BME26	43
5.4 Clonagem e sequenciamento das Fases de Leitura Aberta que codificam as proteínas TOR, S6K e 4E-BP1 do carrapato bovino <i>R. microplus</i>	43
5.5 Síntese de RNA de interferência.....	46
5.6 Análise da viabilidade celular através do ensaio de redução por MTT das células BME26 tratadas com inibição química para TOR	48
5.7 Análise da contagem de células BME26 tratadas com inibição química para TOR	49
5.8 Análises de integridade de membrana das células BME26 tratadas com inibição química para TOR.....	49
5.9 Inibição química da TOR, AKT e GSK-3 nas células embrionárias BME26	50

5.10 Silenciamento gênico da TOR, AKT e GSK-3 β nas células embrionárias BME26	51
5.11 Tratamento das células embrionárias BME26 com insulina exógena	51
5.12 Silenciamento gênico da TOR em fêmeas parcialmente ingurgitadas	52
5.13 Extração de RNA e síntese de cDNA de ovários e ovos.....	53
5.14 Análise da transcrição relativa dos alvos por RT-qPCR.....	53
5.15 Determinação do desenvolvimento ovariano de fêmeas tratadas com silenciamento gênico para TOR.....	55
5.16 Determinação do conteúdo de vitelina por SDS-PAGE e dot blot em ovos de fêmeas tratadas com <i>dsRNA</i> para TOR.....	55
5.17 Parâmetros biológicos analisados após tratamento com <i>dsRNA</i> para TOR nas fêmeas de <i>R. microplus</i>	56
5.18 Análises estatísticas.....	56
6. RESULTADOS	58
7. DISCUSSÃO.....	83
CONCLUSÕES	91
ANEXOS	112
ANEXO 1.....	112
ANEXO 2.....	115

1. INTRODUÇÃO

Várias estratégias têm sido criadas para o controle do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, bem como das doenças transmitidas por ele ao redor do mundo. No entanto, estas estratégias variam por causa da legislação local, das condições ambientais, da geografia e do custo (TABOR et al., 2017). A aplicação de acaricidas é o componente mais comum das estratégias de controle, porém o uso destes pesticidas sintéticos impõe numerosas limitações, que incluem a pressão seletiva para o desenvolvimento de carrapatos mais resistentes, a contaminação ambiental e a presença de resíduos em produtos alimentícios, entre outras problemáticas (WILLADSEN, 2004; ABBAS et al., 2014; TABOR et al., 2017). Por outro lado, as vacinas contra o carrapato têm sido uma alternativa muito promissora em comparação ao uso de acaricidas. No entanto, são insuficientes para conferir proteção contra as várias espécies de carrapatos que existem em diferentes regiões geográficas (DE LA FUENTE; CONTRERAS, 2015; DE LA FUENTE et al., 2016; SCHETTERS et al., 2016; TABOR et al., 2017).

Especificamente nosso grupo de pesquisa tem centrado seus esforços para obter conhecimento da biologia deste importante artrópode vetor, com a proposta de reduzir a densidade vetorial a partir do estudo de aspectos relacionados com o metabolismo energético na fase de embriogênese. Desta forma, acredita-se que o estudo das moléculas envolvidas nas vias metabólicas, especificamente dos alvos envolvidos no metabolismo de carboidratos, pode revelar redes regulatórias fundamentais nesta fase de desenvolvimento e que sua inibição, ou silenciamento, podem chegar a ser importantes estratégias para o controle deste organismo (FABRES et al., 2010; MARTINS et al., 2015, 2018). De posse dos resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, e de grupos colaboradores, atualmente existe um conhecimento mais amplo sobre o processo de embriogênese deste carrapato (CAMPOS et al., 2006; MORAES et al., 2007; LOGULLO et al., 2009; VITAL et al., 2010; SEIXAS et al., 2012, 2018; DE ABREU et al., 2013; SANTOS et al., 2013; MARTINS et al., 2018).

No caso, a via de sinalização pela insulina desempenha um papel importante no controle metabólico na embriogênese do carrapato *R. microplus* (DE ABREU et al., 2009, 2013; LOGULLO et al., 2009; FABRES et al., 2010). De Abreu e

colaboradores (2009) demonstraram que a linhagem de células embrionárias BME26 do carrapato *R. microplus* possui um mecanismo responsivo à insulina. Assim mesmo neste trabalho e em De Abreu e colaboradores (2013) foram verificadas as funções das proteínas fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), a proteína quinase B (PKB ou AKT) e a glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3), que em conjunto integram o metabolismo do glicogênio e a sobrevivência celular. Também estudos desenvolvidos *in vivo* demonstraram que a GSK-3 participa dos processos de viabilidade celular, oviposição e taxa de eclosão do carrapato bovino (FABRES et al., 2010; DE ABREU et al., 2013). No entanto, as funções de outros alvos biológicos e moleculares relacionados a esta via ainda permanecem desconhecidas. Por exemplo, a via de sinalização TOR (do nome em inglês *Target of rapamycin*) pode ser regulada pela via de sinalização da insulina (HAY; SONENBERG, 2004; WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006; HASSAN et al., 2013; HATEM et al., 2015; YOON, 2017). A via TOR atua controlando o metabolismo energético a partir do monitoramento do estado nutricional das células eucarióticas e desempenha um papel fundamental na síntese de proteínas, transcrição, crescimento celular, proliferação, envelhecimento e autofagia, desde leveduras até mamíferos (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006; GUERTIN; SABATINI, 2007; JUNG et al., 2010; KATEWA; KAPAHI, 2011; KIM; GUAN, 2011; BEAUCHAMP; PLATANIAS, 2013). No entanto, seu papel na embriogênese do carrapato ainda é desconhecido.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A via de sinalização por insulina

O principal papel da insulina em vertebrados é regular a homeostase de glicose (HATTING et al., 2018). Não obstante, a via de sinalização por insulina tem sido descrita por ser extremamente conservada em organismos tão distantes filogeneticamente como *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* (LEEVERS, 2001; PORTE; BASKIN; SCHWARTZ, 2005; DAS; ARUR, 2017). A via de sinalização por insulina participa na regulação de diversos processos celulares como o crescimento e a proliferação, e em diferentes processos fisiológicos, como reprodução e envelhecimento (EBBERINK; SMIT; MINNEN, 1989; DICKSON, 2003; PAN; FINKEL, 2017).

No caso, a insulina é um hormônio peptídico pertencente à superfamília de peptídeos similares à insulina (com o nome inglês *insulin-like peptides* ou ILPs), que compreende também às relaxinas e os fatores de crescimento similares à insulina (com o nome inglês *insulin-like growth factors* ou IGFs) (WU; BROWN, 2006; NÄSSEL; BROECK, 2016; ALTINDIS et al., 2018). Os ILPs, de modo geral, são expressos a partir de moléculas precursoras, denominadas pré-propeptídeos, que por sucessivos processamentos proteolíticos perdem um peptídeo sinal e um fragmento conector (peptídeo C), exceto pelos IGFs que após das clivagens ainda conservam este peptídeo (RIEHLE et al., 2006). Os peptídeos A e B (cada um com 20 a 30 aminoácidos) se unem por 3 ligações de dissulfeto, uma ligação intramolecular na cadeia A e duas intermoleculares entre as cadeias A e B, que configuram a forma bioativa da insulina e dos peptídeos relacionados (WU; BROWN, 2006; MIYAZAKI et al., 2017). Estes peptídeos podem ser armazenados ou libertados de grânulos de secreção na superfície celular em resposta a estímulos celulares ou moleculares. Uma vez liberados, os peptídeos podem se difundir para células-alvo locais ou ser transportados para células distantes, onde atuam através de diferentes receptores e vias de sinalização para regular uma grande variedade de processos (WU; BROWN, 2006).

A sinalização intracelular da insulina (Figura 1) é estimulada pela ligação deste hormônio a um receptor específico de membrana, denominado receptor de

insulina (ou IR pelo nome em inglês *insulin receptor*). O IR é uma proteína heterotetramérica com atividade quinase composta por duas subunidades α e duas subunidades β . A ligação da insulina ao receptor ocorre nas subunidades α , que permitem que as subunidades β adquiram atividade quinase levando a alteração conformacional e autofosforilação, promovendo um aumento da atividade quinase do receptor (PATTI; KAHN, 1998). Uma vez ativado o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em tirosina, alguns deles pertencentes à família dos substratos do receptor de insulina, chamados proteínas IRS pela abreviação do inglês *Insulin Receptor Substrate* (WHITE; YENUSH, 1998; CARVALHEIRA, J.B., ZECCHIN, H.G., SAAD et al., 2002). A fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia Src2 (SH₂), resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI3K, a cascata de sinalização das proteínas-quinases ativadas por mitógenos (nome proveniente do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases* - MAPK) e a ativação de TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário (CARVALHEIRA, J.B., ZECCHIN, H.G., SAAD et al., 2002).

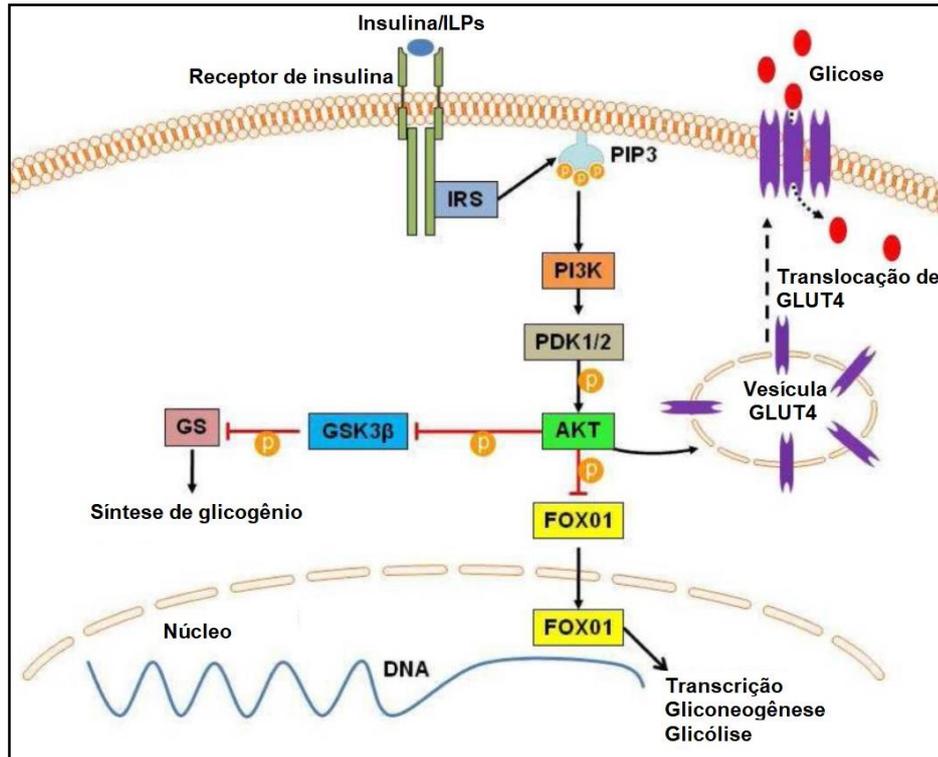


Figura 1. Representação esquemática da via de sinalização por insulina em mamíferos.

Modificada de Elmadhun et al. (2013).

Dentre as proteínas que se destacam da via de sinalização, encontra-se a PI3K, composta de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85), importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e transporte de glicose (FOLLI et al., 1992; SAAD et al., 1992, 1993; SHEPHERD; NAVÉ; SIDDLE, 1995). A proteína PI3K catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol produzindo fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (LIETZKE et al., 2000), e assim as suas principais proteínas alvo são a proteína quinase B (PKB, também conhecida como AKT) e as isoformas atípicas da aPKC (ζ e λ) (KOHN et al., 1996; BANDYOPADHYAY et al., 1997; KITAMURA et al., 1998; KOTANI et al., 1998).

Por sua parte, a proteína quinase B é a principal molécula efetora da via de sinalização por insulina. Em humanos, têm sido descritas três isoformas, ativadas mediante a sinalização por insulina, mas com papéis fisiológicos não redundantes. A AKT1 é necessária no desenvolvimento e crescimento normais, e indispensável na manutenção da glicemia (CHO et al., 2001a). A isoforma AKT2 demonstrou-se essencial para uma glicemia normal, a partir de experimentos feitos em

camundongos com *knockout* para este gene (CHO et al., 2001b). Estudos com a isoforma AKT3 demonstram que ela é pouco necessária na manutenção da glicemia, mas possui um papel fundamental para o desenvolvimento pós-natal do cérebro de camundongos (EASTON et al., 2005; TSCHOPP et al., 2005). Um substrato da AKT é a proteína glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3) (CROSS et al., 1995). Esta proteína é uma serina/treonina quinase que, a partir da fosforilação de resíduos específicos de sua estrutura, deixa de inibir a ação da enzima glicogênio sintase (GS) e outros substratos. Quando a GSK-3 está ativa um número de vias de sinalização intracelular centrais ativam-se também, por exemplo, em mamíferos a GSK-3 está envolvida nos processos de proliferação celular, migração, inflamação e resposta imunológica, regulação da glicose e apoptose (WOODGETT, 1994; ALI; HOEFLICH; WOODGETT, 2001; FRAME; COHEN, 2001).

2.1.1 A via de sinalização pela insulina no carrapato *R. microplus*

Estudos anteriores realizados pelo grupo têm demonstrado que a via de sinalização pela insulina e seus componentes, PI3K, AKT e GSK-3 β , foram capazes de desempenhar papéis importantes no controle metabólico do carrapato *R. microplus* (Figura 2). Em primeiro lugar, foi demonstrado que a linhagem de células embrionárias BME26 de *R. microplus* tem um mecanismo responsivo à insulina exógena e que o eixo PI3K/AKT/GSK-3 está diretamente relacionado ao metabolismo de glicogênio (DE ABREU et al., 2009, 2013). Além disso, Abreu e colaboradores (2013) demonstraram que os alvos AKT e GSK-3 β também estão envolvidos na sobrevivência celular (DE ABREU et al., 2013).

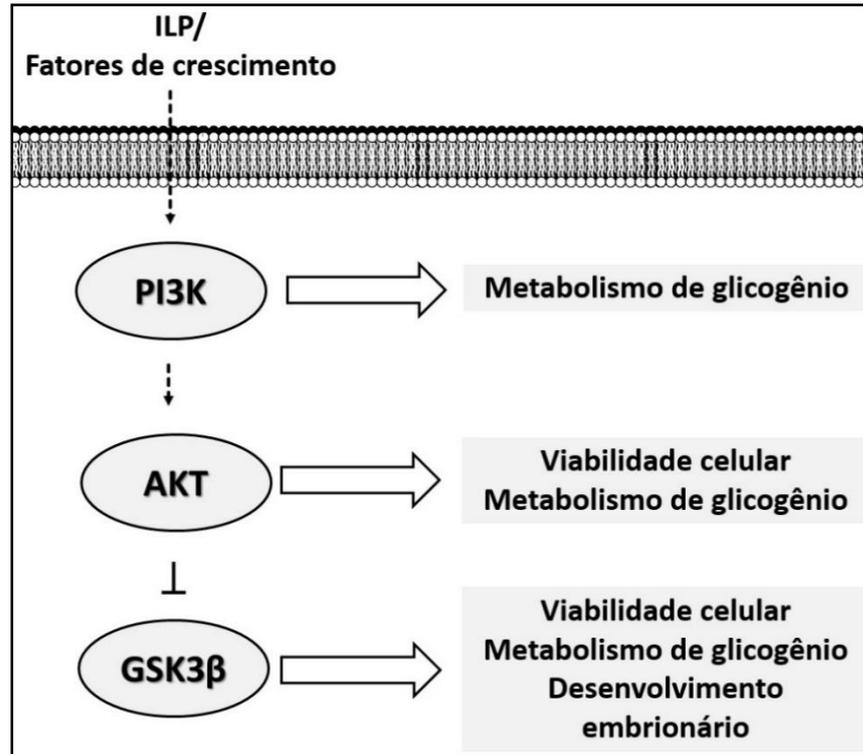


Figura 2. Modelo esquemático do papel conservado da via de sinalização por insulina no carrapato *R. microplus*.

Adaptada de De Abreu et al (2009, 2013).

Quando estudadas as funções da GSK-3 β na embriogênese do carrapato, foi observado que tanto a inibição como o silenciamento deste alvo diminui significativamente a oviposição e a eclosão de larvas (FABRES et al., 2010). Desta forma, as evidências sugerem que a via de sinalização pela insulina e os componentes reconhecidos até agora cumprem funções fundamentais na fisiologia e desenvolvimento do carrapato *R. microplus*.

2.2A via de sinalização insulina/TOR

A via de sinalização TOR, chamada assim pelas abreviaturas em inglês *Target of Rapamycin* e em português Alvo da Rapamicina, é regulada pela via de sinalização pela insulina em várias espécies animais (Figura 3) (HAY; SONENBERG, 2004; JIA; CHEN; RIDDLE, 2004; WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006; HASSAN et al., 2013; HATEM et al., 2015; YOON, 2017). Em conjunto, esta via atua controlando o metabolismo energético e monitorando o estado

nutricional das células eucarióticas, desempenhando um papel fundamental na síntese de proteínas, transcrição, crescimento celular, proliferação, metabolismo, envelhecimento e autofagia, de leveduras a mamíferos (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006; GUERTIN; SABATINI, 2007; JUNG et al., 2010; KATEWA; KAPAHI, 2011; KIM; GUAN, 2011; BEAUCHAMP; PLATANIAS, 2013; DOBRENEL et al., 2016).

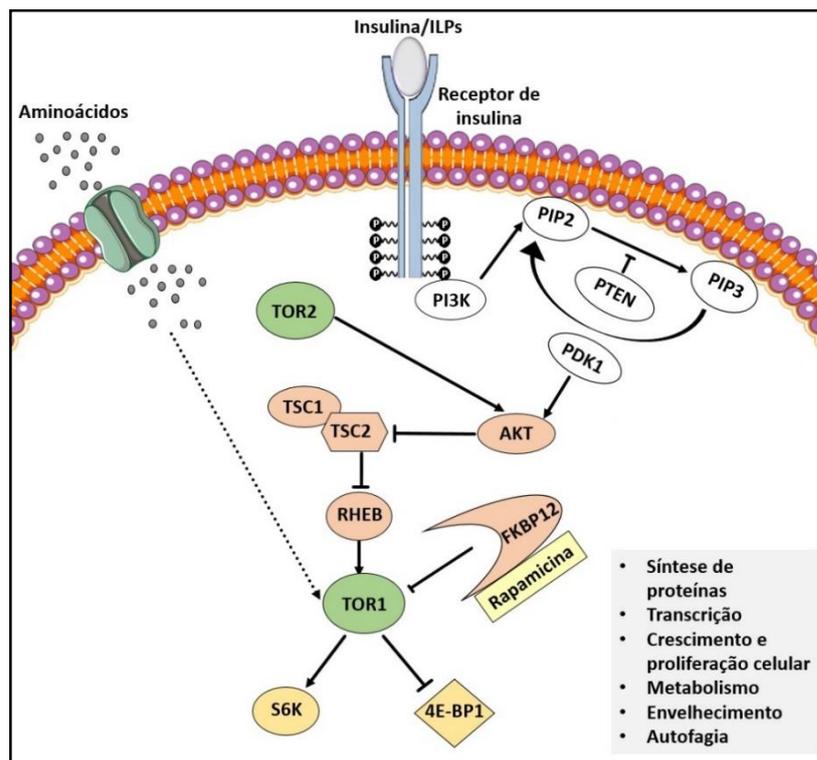


Figura 3. Modelo esquemático da via de sinalização da insulina/TOR.

Adaptada de Cell Signaling (2019).

A principal proteína desta via, a TOR, é uma serina/treonina quinase que compõe a subunidade catalítica de dois complexos descritos em mamíferos denominados mTORC1 e mTORC2 (HAY; SONENBERG, 2004). Um domínio associado ao complexo regulatório de mTOR conhecido como Raptor (pelas abreviaturas em inglês *Regulatory-associated protein of mTOR*), e um domínio insensível à rapamicina chamado Rictor (pelas abreviaturas em inglês *Rapamycin-insensitive companion of mTOR*) definem a mTORC1 e mTORC2, respectivamente. Esses domínios funcionam como suportes para a montagem dos complexos e para ligar os substratos e os reguladores, configurando funções diferentes para cada um

(MARTIN; HALL, 2005; WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006; SOULARD; COHEN; HALL, 2009; ZONCU; EFEYAN; SABATINI, 2011). O complexo mTORC2 fosforila as proteínas AKT, SGK1 (abreviação do nome em inglês *Serum glucocorticoid-induced protein kinase 1*) e as proteínas quinases C α (PKC- α), que controlam, principalmente, a sobrevivência celular e a organização do citoesqueleto, além de outras funções. Por outro lado, mTORC1 estimula o crescimento e a proliferação celulares, aumentando a iniciação da tradução *cap*-dependente através de seus dois maiores alvos: as proteínas de ligação do fator 4E iniciador da tradução em eucariotos (4E-BP1) e as quinases da proteína ribossomal S6 (S6K) (Figura 3) (DOWLING et al., 2010; LAPLANTE; SABATINI, 2012; YOON, 2017).

Avanços no reconhecimento das funções da via tem sido desenvolvidos através do mecanismo de ação da rapamicina, um inibidor específico da TOR, isolado do fungo *Streptomyces hygroscopicus*, que apresenta diversas aplicações clínicas como droga anti-fúngica, imunossupressora e anticâncer (SHOR et al., 2009; THOREEN et al., 2009; WU; HU, 2010; ZAYTSEVA et al., 2012). A rapamicina atua através de um mecanismo alostérico incomum que requer o seu receptor intracelular, FKBP12, para a inibição do seu alvo (Figura 3) (SABERS et al., 1995). A rapamicina pode inibir seletivamente mTORC1, que é muitas vezes referido como o complexo sensível ao inibidor (SABERS et al., 1995; THOMSON; TURNQUIST; RAIMONDI, 2009). Por outro lado, mTORC2 é considerada uma proteína insensível a rapamicina, embora em tratamentos prolongados com o fármaco a proteína mTORC2 também possa ser afetada (SHOR et al., 2009; THOREEN et al., 2009; WU; HU, 2010; ZAYTSEVA et al., 2012).

A literatura descreve que a estimulação pela insulina leva à ativação da via PI3K/AKT e a fosforilação da AKT inibe a atividade dos complexos da esclerose tuberosa 1 e 2, denominados TSC1 (também conhecido como hamartina) e TSC2 (também conhecido como tuberina). Estas duas proteínas agem juntas em um complexo molecular citosólico e quando inibidas causam o aumento de moléculas de guanosina trifosfato (GTP). O aumento de GTP acarreta um aumento na atividade da proteína GTPase RHEB (nome abreviado do inglês *Ras homolog enriched in brain*). Quando ativa, a RHEB se liga diretamente à proteína mTORC1, o que aumenta sua atividade quinase. Assim mesmo, a proteína RHEB atua como um suporte e media a ligação do mTORC1 aos seus substratos (Figura 3) (HAY;

SONENBERG, 2004; MARTIN; HALL, 2005; WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006; TAKAHARA; MAEDA, 2013).

2.2.1 A via de sinalização insulina/TOR em artrópodes

Em artrópodes, a via de sinalização insulina/TOR é descrita em organismos como *Drosophila melanogaster*, *Tribolium castaneum*, *Bombyx mori*, *Aedes aegypti* e *Haemaphysalis longicornis*. Estes dois últimos organismos considerados como artrópodes vetores de doenças de importância médica e veterinária.

A mosca da fruta *D. melanogaster* foi o primeiro organismo em que os componentes e os efeitos dependentes da via de sinalização por insulina/TOR foram descobertos. Estas vias sinalizadoras constituem os principais sistemas de detecção de nutrientes que associam o crescimento às condições nutricionais neste organismo (OLDHAM; HAFEN, 2003; SAUCEDO et al., 2003; GREWAL, 2009; IBAR et al., 2013). No caso, os componentes extracelulares da via consistem de oito ILPs que se ligam ao seu receptor específico de membrana (TOIVONEN; PARTRIDGE, 2009; KANNAN; FRIDELL, 2013; GRAZE et al., 2018). Este estímulo ativa a via de sinalização que cumprem importantes funções conservadas relacionadas ao metabolismo, regulação hormonal, reprodução, desenvolvimento e envelhecimento (BATEMAN; MCNEILL, 2004; BENMIMOUN et al., 2012; PRITCHETT; MCCALL, 2012; GANCZ; GILBOA, 2013; GLATTER et al., 2014; MIRTH; SHINGLETON, 2014; KIM; CHOI, 2019). Dessa forma, novas funções da via têm sido relatadas como, por exemplo, seu papel na diferenciação neuronal (LÉOPOLD, 2004) e na montagem eficiente de filamentos de actomiosina, uma importante característica para o estudo da cicatrização de feridas diabéticas (KAKANJ et al., 2016).

Adicionalmente, a via também tem sido estudada no besouro da farinha, *T. castaneum*, e foi demonstrado seu papel na vitelogênese e ovogênese deste organismo (PARTHASARATHY; PALLI, 2011). Estudos de genômica funcional utilizando RNA de interferência (RNAi) para genes envolvidos nas vias de sinalização pela insulina/TOR mostraram que a cascata desempenha papéis fundamentais na síntese de vitelogenina, que afeta diretamente a maturação do ovócito. Já no bicho-da-seda, o *B. mori*, foi demonstrado que o estímulo por insulina ativa a via de sinalização PI3K/AKT/TOR promovendo a síntese de DNA em células

endomitóticas da glândula da seda (KENNEDY et al., 2016). Assim mesmo, têm sido avaliadas as funções das proteínas S6K e 4E-BP1 com relação à atividade do hormônio protoracicotrópico (HPTT) (GU et al., 2012). Os resultados deste estudo demonstraram que a fosforilação da S6K e da 4E-BP1 é estimulada pela ação do hormônio, sugerindo que tanto a insulina como o HPTT estimulam o eixo PI3K/TOR/S6K/4E-BP1 neste organismo.

No caso dos organismos vetores de doenças, estudos têm sido desenvolvidos no mosquito *A. aegypti*, transmissor da febre amarela, dengue, zika e chikungunya (GULIA-NUSS et al., 2011; ROY; RAIKHEL, 2012; PÉREZ-HEDO; RIVERA-PEREZ; NORIEGA, 2013; SMYKAL; RAIKHEL, 2015) e no carrapato *H. longicornis*, vetor da doença de Lyme e da meningite cerebrospinal (UMEMIYA-SHIRAFUJI et al., 2012a, 2012b).

Em mosquitos, sabe-se que a via de sinalização insulina/TOR é conservada e que regula processos que envolvem metabolismo, ação hormonal e reprodução. Em fêmeas estes alvos servem como pontos de controle regulatórios que garantem a suficiência de nutrientes para o desenvolvimento dos ovos (SMYKAL; RAIKHEL, 2015). Outros estudos reportam a relação entre insulina/TOR e a ação hormonal no mosquito, pois a cascata de sinalização desempenha um importante papel na transdução da informação nutricional que regula a síntese de hormônio juvenil (PÉREZ-HEDO; RIVERA-PEREZ; NORIEGA, 2013). Também Roy e Raikhel (2012) demonstraram que o repressor translacional 4E-BP1 é crítico na modulação de eventos translacionais que são dependentes das condições nutricionais, de desenvolvimento e de estresse no mosquito *A. aegypti*.

Os estudos referentes ao carrapato *H. longicornis* indicam que tanto a proteína AKT como a proteína TOR são essenciais para o metabolismo e a reprodução. Sendo assim, a ativação da AKT é fundamental para completar o processo de alimentação sanguínea, necessário para o crescimento de órgãos internos em carrapatos adultos (UMEMIYA-SHIRAFUJI et al., 2012a) e que a proteína TOR controla a vitelogênese via ativação de S6K no corpo gorduroso (UMEMIYA-SHIRAFUJI et al., 2012b).

Atualmente, para o carrapato *Rhipicephalus microplus* não existem estudos que tenham identificado componentes da via de sinalização TOR, o que acredita-se reforça a proposta deste trabalho.

2.3 O modelo de estudo: O carrapato *Rhipicephalus microplus*

O carrapato *R. microplus* é um artrópode hematófago obrigatório de vertebrados que representa uma séria ameaça para os produtores de gado leiteiro e bovino. Seu impacto negativo deve-se aos efeitos diretos da alimentação que causam a perda de peso e danos ao couro, e de efeitos indiretos como a transmissão de patógenos (TABOR et al., 2017). As doenças resultantes podem causar grandes perdas de produção na pecuária, o que reduz os rendimentos agrícolas, aumenta os custos para os consumidores e ameaça o comércio entre regiões e/ou mercados mundiais (TABOR et al., 2017). Estima-se que aproximadamente 80% da população de bovinos do mundo está em risco pela infestação deste carrapato e pelas doenças transmitidas por ele e calcula-se que as perdas econômicas por causa da prevenção e do tratamento atingem um valor aproximado de 22 a 30 bilhões de dólares por ano (LEW-TABOR; RODRIGUEZ VALLE, 2016; TABOR et al., 2017).

2.3.1 Classificação taxonômica, distribuição geográfica e métodos de controle

Os carrapatos são organismos classificados taxonomicamente no filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida, ordem Acarina, e encontram-se distribuídos nas famílias Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae (KEIRANS, 1992; HORAK, I. G., CAMICAS, J., KEIRANS, 2002). No caso, o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* pertence à família dos Ixodídeos, caracterizada por apresentar uma carapaça ou escudo protetor endurecido. Murrell e Barker (2003), utilizando estudos de filogenética molecular, descreveram uma reclassificação desta espécie e, dessa forma, fazem parte do gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus*.

A espécie *Rhipicephalus microplus* é considerada como um complexo, no qual são reconhecidas diferenças geográficas entre 3 tipos de carrapatos (A, B e C) distribuídos em clados que também incluem *Rhipicephalus australis* e *Rhipicephalus annulatus* (BURGER; SHAO; BARKER, 2014; LOW et al., 2015; TABOR et al., 2017). Low e colaboradores (2015) concluíram que o complexo *R. microplus* consiste de pelo menos cinco táxons: *R. australis*, *R. annulatus*, *R. microplus* clado

A, clado B e clado C, respectivamente. Cada taxa transmite os patógenos responsáveis da anaplasmose e da babesiose e cada uma tem um ciclo de vida parasita em bovinos de aproximadamente 21 dias (TABOR et al., 2017).

Sobre sua distribuição geográfica, sabe-se que este carrapato co-evoluiu originalmente com bovinos asiáticos, especificamente de raças zebuínas. No entanto, durante os séculos XVIII e XIX devido à migração global das raças europeias *Bos taurus* para produção leiteira, este carrapato espalhou-se por diversas regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo (TABOR et al., 2017). Encontra-se distribuído por todo o Brasil, considerando que sua maior ou menor incidência variam de acordo com as condições climáticas e os tipos raciais de bovinos explorados (GONZÁLES, 2003).

Entre os métodos atuais de controle para este carrapato e para as doenças transmitidas por ele encontra-se o uso de acaricidas e vacinas. O uso de acaricidas químicos ainda é a estratégia mais utilizada. No entanto, seu uso intensificado tem levado ao desenvolvimento de resistência de várias espécies de carrapatos, principalmente, em países tropicais e subtropicais (BANUMATHI et al., 2017; RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018). Além disso, tem ocasionado contaminação ambiental, contaminação pela presença de resíduos em produtos para consumo humano e gerado altos custos de desenvolvimento e registro (DE LA FUENTE et al., 2008; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2011; PARIZI et al., 2012; BANUMATHI et al., 2017; TABOR et al., 2017). Em conjunto, estas situações têm promovido o desenvolvimento de outras abordagens químicas e não químicas para o controle do carrapato bovino.

Assim, consideráveis recursos e esforços de pesquisadores foram investidos, nas últimas décadas, com a intenção de desenvolver uma vacina eficaz contra este carrapato que fosse de amplo espectro, levando em consideração os complexos mecanismos envolvidos na resposta imunológica. Vacinas como a TickGard e a Gavac têm sido disponibilizadas há mais de 20 anos e comercializadas no mundo inteiro, registrando alta eficácia contra os carrapatos *Rhipicephalus annulatus*, níveis de eficácia que variam entre carrapatos *R. microplus* que vivem em diversos locais e posições geográficas, e eficácia nula para carrapatos *Amblyomma* spp (RODRÍGUEZ et al., 1994; WILLADSEN et al., 1995; DE LA FUENTE et al., 2007; ALMAZAN et al., 2018). Vale a pena destacar que estas duas vacinas foram

desenvolvidas através do descobrimento da proteína Bm86, uma proteína de membrana do intestino do carrapato bovino. A versão recombinante da molécula foi desenvolvida como antígeno comercial para as vacinas TickGard e Gavac (WILLADSEN et al., 1995; ALMAZAN et al., 2018).

Embora as vacinas sejam uma alternativa muito promissora em comparação ao uso de acaricidas, ainda são insuficientes para conferir proteção contra todas as espécies de carrapatos que infestam os bovinos e, especificamente, contra todos os tipos de carrapatos *R. microplus* que existem em diversas regiões geográficas (DE LA FUENTE; CONTRERAS, 2015; DE LA FUENTE et al., 2016; RODRÍGUEZ-MALLON, 2016; SCHETTERS et al., 2016; TABOR et al., 2017). Esta condição tem estimulado a pesquisa de outros antígenos protetores contra o carrapato bovino e de outras alternativas de controle (PARIZI et al., 2012; RODRÍGUEZ-MALLON, 2016; BANUMATHI et al., 2017).

Acredita-se que uma melhor compreensão da biologia deste carrapato pode contribuir na busca de novos alvos moleculares para o desenvolvimento de novas estratégias de controle para este importante artrópode vetor.

2.3.2 O ciclo de vida

O carrapato *R. microplus* é um parasita monoxênico, isto é, para se alimentar depende de apenas um hospedeiro em seu ciclo de vida e esse hospedeiro é, preferencialmente, o boi (GONZALES, J., SILVA, N., FRANCO, 1974). No entanto, outras espécies podem comportar-se como hospedeiras, entre as quais se encontram búfalos, jumentos, ovinos, caprinos, cães, gatos, porcos, veados, onças, preguiças, cangurus e coelhos (ARTHUR, 1960).

O ciclo de vida deste carrapato apresenta duas etapas: uma fase de vida livre que ocorre no solo e que pode durar de dois a três meses (dependendo principalmente das condições climáticas existentes), e uma fase de vida parasitária que acontece sobre um único hospedeiro, em um período médio de 21 dias (Figura 4) (GONZALES, J., SILVA, N., FRANCO, 1974; NICARETTA, 2018).

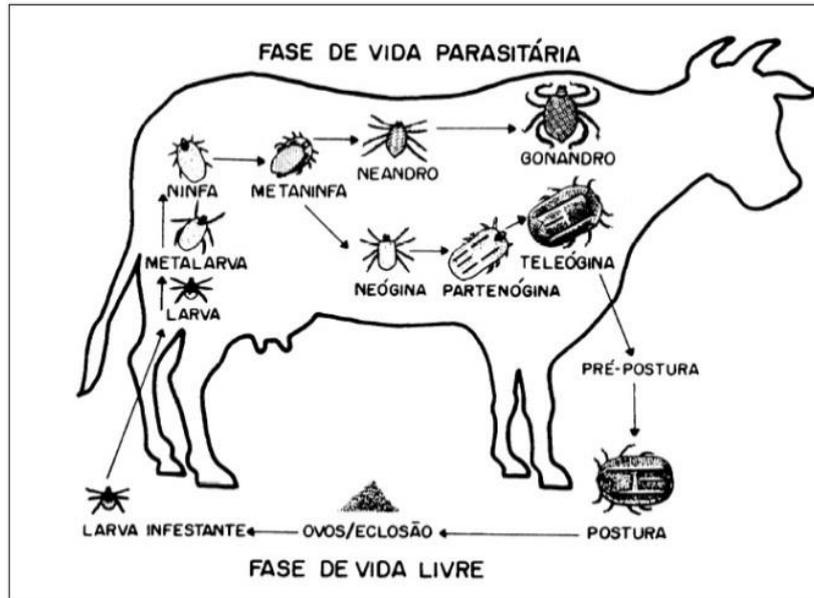


Figura 4. O ciclo de vida do carrapato *R. microplus*.

Modificada de Gonzales, Silva e Franco (1974).

A fase de vida livre compreende os estágios de fêmea adulta, chamada de fêmea teleóquina por encontrar-se totalmente alimentada, ovo e larva infestante. Neste período o carrapato não se alimenta e sobrevive exclusivamente das suas reservas energéticas (FARIAS, 1995). A fêmea adulta desprende-se do bovino com o objetivo de procurar um local no solo para efetuar a postura dos ovos. Em condições adequadas de temperatura (entre 26 a 28°C) e umidade (aproximadamente de 80%) a postura se inicia no terceiro dia após a queda, e acontece por um período de 15 dias (NICARETTA, 2018).

Após a oviposição a fêmea morre, sendo que o peso total dos ovos pode equivaler a 52% do peso vivo da teleóquina. Cada fêmea pode colocar de 2000 a 3000 ovos. No entanto, deste total somente 2% desta população de carrapato alcançam a fase adulta devido ao controle ambiental de predadores e patógenos como fungos, bactérias, aves e insetos. Além disso, alguns indivíduos morrem por não encontrarem o hospedeiro ou por não serem capazes de estabelecer a relação de parasitismo, devido à remoção mecânica ou resposta imunológica eficiente do hospedeiro (NICARETTA, 2018).

Os ovos começam a eclodir 21 dias após a postura. Eles se desenvolvem na ausência de nutrientes exógenos e são os nutrientes maternos, principalmente, grânulos de vitelo, que mantêm toda esta fase (CAMPOS et al., 2008). As larvas

emergentes podem sobreviver várias semanas antes de encontrar um hospedeiro, usando o vitelo restante como única fonte de energia (CAMPOS et al., 2008). As larvas passam por um período de maturação de, aproximadamente, uma semana para estarem aptas a fixarem-se no hospedeiro e continuarem seu desenvolvimento (GONZALES, J., SILVA, N., FRANCO, 1974). A larva está pronta para subir nas pastagens por geotropismo negativo, localizando o hospedeiro pelo odor, vibrações, sombreamento, estímulo visual e gradiente de concentração de CO₂ (SONENSHINE, 1991).

Na fase parasitária, o carrapato apresenta três estágios morfológicos distintos: larva, ninfa e adulto. A larva alimenta-se e inicia o processo de desenvolvimento e crescimento tegumentário (GONZALES, J., SILVA, N., FRANCO, 1974). A larva infectante, ao entrar em contato com o bovino, fixa-se em regiões do corpo do hospedeiro que favorecem seu desenvolvimento, tais como úbere, mamas, regiões perineal, perianal, vulvar e entrepernas. Essas regiões preferenciais de fixação são determinadas em função da espessura, vascularização e temperatura da pele (aproximadamente 31° a 38°C), bem como pela dificuldade de acesso às lambidas do hospedeiro (WAGLAND, 1978; DOUBE; KEMP, 1979; NICARETTA, 2018).

Em torno do sexto dia, a larva muda para ninfa adquirindo uma nova estrutura com mais um par de patas. Esta fase dura em média dois a quatro dias, até que ao final do processo surge o indivíduo adulto, sexualmente diferenciado (GONZALES, J., SILVA, N., FRANCO, 1974). Em torno do décimo sétimo dia os machos já estão aptos à cópula podendo fecundar as fêmeas (LONDT, J., ARTHUR, 1975). Após a fecundação ocorre um rápido ingurgitamento das fêmeas, em um período médio de três dias, onde passam de ser partenóginas (fêmeas parcialmente ingurgitadas) a teleóginas (fêmeas com ingurgitamento máximo) (Figura 5).



Figura 5. Fêmeas teleóginas da espécie *R. microplus*.

Fonte: Entomological Society Of America (2019).

Aos 22 dias, a maioria das fêmeas cai no solo e os machos podem permanecer no bovino por mais de 38 dias fecundando inúmeras fêmeas (GONZALES, J., SILVA, N., FRANCO, 1974). No final do processo parasitário, as fêmeas apresentam um tamanho cerca de 10 vezes superior ao dos machos, e podem aumentar o seu peso em até 200 vezes. Desta forma tornam-se prontas para a oviposição (KEMP, D., STONE, B., 1982).

Sobre a dinâmica populacional (Figura 6), sabe-se que 5% dos carrapatos *R. microplus* encontram-se na fase parasitária, ou seja, nos bovinos no estado de larvas, ninfas e adultos. No entanto, 95% dos carrapatos encontram-se em vida livre na forma de fêmeas ingurgitadas, ovos em incubação e larvas esperando um hospedeiro.

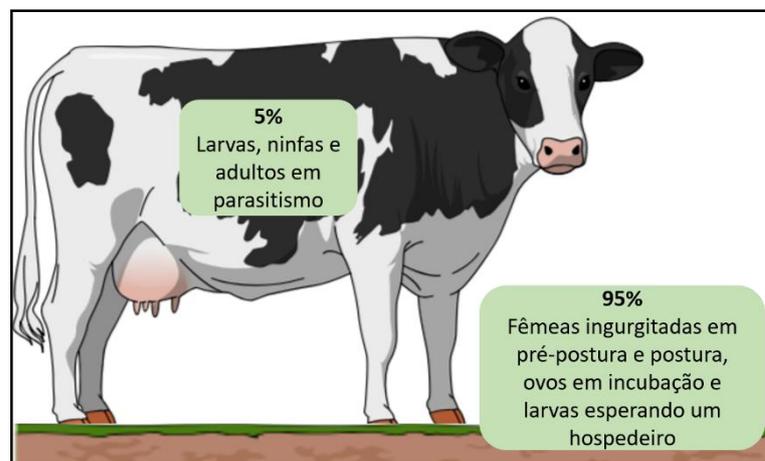


Figura 6. Esquema da dinâmica populacional do *R. microplus*.

Baseada nas referências Murrell e Barker (2003) e Nicaretta (2018)

Desta forma, estudar aspectos relacionados à fase de vida livre podem ser uma estratégia importante para o controle deste organismo.

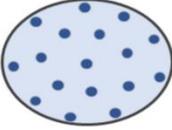
2.3.3 Aspectos morfológicos e metabólicos da embriogênese do carrapato *R. microplus*

Estudar a embriogênese de artrópodes vetores é um dos aspectos fisiológicos mais importantes para conseguir controlar a sua população, devido a ser uma fase em que os ovos não conseguem se dispersar (FONSECA, R; GOMES, H; ARAÚJO, 2012). No caso do carrapato *R. microplus*, diversos estudos têm ajudado a compreender o processo da embriogênese ao nível morfológico e metabólico (CAMPOS et al., 2006; MORAES et al., 2007; SANTOS et al., 2013). Desta forma, Santos e colaboradores (2013) classificaram em estágios o desenvolvimento embrionário deste organismo, enquanto Campos e colaboradores (2006) e Moraes e colaboradores (2007) descreveram perfis metabólicos durante este mesmo processo.

Assim, em um primeiro momento, durante o período em que acontece o desenvolvimento dos ovócitos nos ovários, os nutrientes maternos, tais como, carboidratos, lipídios e proteínas, principalmente na forma de grânulos de vitelo, e RNAs são empacotados dentro dos ovócitos para satisfazer as futuras necessidades regulatórias e metabólicas do embrião (CHERRY, 1973; CHIPPENDALE, 1978; CAMPOS et al., 2006). Após esta fase, quando a fêmea teleógina cai ao solo, começa a fase da oviposição e embriogênese que, em condições ambientais controladas, acontece em aproximadamente 21 dias (GONZALES, J., SILVA, N., FRANCO, 1974; NICARETTA, 2018).

O Quadro 1 resume as fases do desenvolvimento embrionário do *R. microplus* em três momentos principais: uma fase inicial, uma fase intermediária e uma fase final, caracterizadas pelos eventos morfológicos e metabólicos que acontecem em cada uma.

Quadro 1. Principais fases do desenvolvimento embrionário do carrapato *R. microplus*.

	Fase inicial	Fase intermediária	Fase final
Tempo de desenvolvimento	1° ao 3° dia após da oviposição	6° e 7° dia após da oviposição	15° ao 18° dia após da oviposição
Estágio do desenvolvimento correspondente (Santos et al., 2013)	1° e 2° estágio	8° estágio	13° estágio
Eventos morfológicos importantes	<ul style="list-style-type: none"> • Começam as primeiras clivagens e as primeiras divisões celulares. • Se dá início à migração celular para a periferia do ovo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Início da extensão da banda germinal. • Geração de segmentos abdominais. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fechamento dorsal quase completo. • O prosoma está localizado em sua posição final.
Acontecimentos metabólicos relevantes	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição acentuada no conteúdo de lipídeos totais. • Consumo de conteúdos de glicose e glicogênio. 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento abrupto no consumo de oxigênio e redução no peso seco. • Redução do conteúdo de carboidratos. • Começo de processos gliconeogênicos. • Aumento do RNA total. 	<ul style="list-style-type: none"> • A degradação de proteínas sugere que em fases prévias acontece a intensificação da gliconeogênese para o fornecimento de glicose e glicogênio.
Representação gráfica			

Baseado nas referências Campos et al. (2006), Moraes et al. (2007) e Santos et al. (2013).

A fase inicial, correspondente aos primeiros três dias da embriogênese, é caracterizada pelo aumento do número de células e migração de um grupo delas para a periferia do ovo (SANTOS et al., 2013). Entre a fase inicial e a fase intermediária, importantes mudanças metabólicas acontecem, entre elas a diminuição acentuada no conteúdo de lipídeos totais (CAMPOS et al., 2006) e consumo de conteúdos de glicose e glicogênio (MORAES et al., 2007). Essas reservas de glicogênio são, preferencialmente, mobilizadas para apoiar o processo de consumo intensivo de energia, pois durante o quinto e sexto dia da embriogênese ocorre a formação de núcleos, onde é necessário o fornecimento da ribose-5-fosfato para síntese de nucleotídeos, e a disponibilidade da coenzima fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidase (NADPH) para a biossíntese de fosfolípidios necessários para a celularização (MORAES et al., 2007).

Na fase intermediária, entre o 6° e o 7° dia após a oviposição, observa-se o início da extensão da banda germinal, a geração de segmentos abdominais e a formação precoce dos quatro pares de patas (SANTOS et al., 2013). Nesta fase foi observado um aumento abrupto no consumo de oxigênio e redução no peso seco, que sugerem que o processo de respiração é ativado (CAMPOS et al., 2006). Assim

mesmo, foi observada uma grande redução no conteúdo de carboidratos, que sugerem que processos gliconeogênicos são necessários para manter o equilíbrio energético nesta fase e na fase final do desenvolvimento embrionário do carrapato (MORAES et al., 2007; LOGULLO et al., 2009; MARTINS et al., 2018). Por outro lado, o aumento de RNA total foi observado após a celularização, corroborando a substituição de processos materno-dirigidos por expressão zigótica no embrião (CAMPOS et al., 2006; MARTINS et al., 2018).

Durante a fase final, correspondente aos 15 e 18 dias após da oviposição, observa-se o fechamento dorsal do embrião com o posicionamento de quelíceras na cabeça (SANTOS et al., 2013). Adicionalmente, a degradação de proteínas sugere que em fases prévias acontece a intensificação da gliconeogênese para o fornecimento de glicose e glicogênio, moléculas necessárias para suprir esta fase do desenvolvimento (MORAES et al., 2007).

Diante deste panorama, pode-se dizer que a embriogênese do carrapato *R. microplus* acontece através de uma regulação dinâmica entre eventos morfológicos programados e o metabolismo energético. No entanto, a compreensão da participação de outros componentes e vias metabólicas neste processo ainda não estão completamente compreendidos.

2.3.4 A linhagem de células embrionárias BME26

O cultivo de células de carrapatos alcançou o estabelecimento da sua primeira linhagem há mais de três décadas (VARMA; PUDNEY; LEAKE, 1975) e nos últimos 30 anos aproximadamente 50 linhagens tem sido estabelecidas a partir de 13 espécies de carrapatos Ixodídeos, além de outras linhagens estabelecidas para carrapatos Argasídeos (MATTILA et al., 2007).

No caso, a linhagem de células BME26 foi derivada de embriões de diferentes dias de desenvolvimento de uma única fêmea ingurgitada, coletada direto de um boi na Ciudad Victoria (México) em 1981 (KURTTI et al., 1988; ESTEVES et al., 2008). Esteves e colaboradores (2008) confirmaram a origem da linhagem celular por meio de sequenciamento parcial do gene mitocondrial 16S. A sequência é 100% idêntica à sequência do gene de *R. microplus*, mostrando que essa linhagem realmente foi derivada dessa espécie. No entanto, como essa linhagem teve origem em

fragmentos de tecidos embrionários, a origem tecidual e o nível de diferenciação ainda são desconhecidos.

Como características gerais, pode-se destacar que esta linhagem se adere ao substrato e é morfológicamente heterogênea. Cresce formando monocamadas e apresenta na sua cultura inicial (cultura pouco confluenta) algumas células com aparência fusiforme (formas alongadas) (Figura 7A, células apontadas com setas brancas) e outras células com aparência mais arredondada (Figura 7A, células apontadas com setas vermelhas). A medida que aumenta a confluência, as células vão se tornando cada vez mais arredondadas. Bell-Sakyi e colaboradores (2007) confirmaram que, de forma geral, as linhagens celulares de carrapatos compreendem dois ou mais tipos de células, e que estas podem estar presentes em proporções variáveis tanto em diferentes momentos dentro de uma única cultura como em diferentes níveis de passagens.

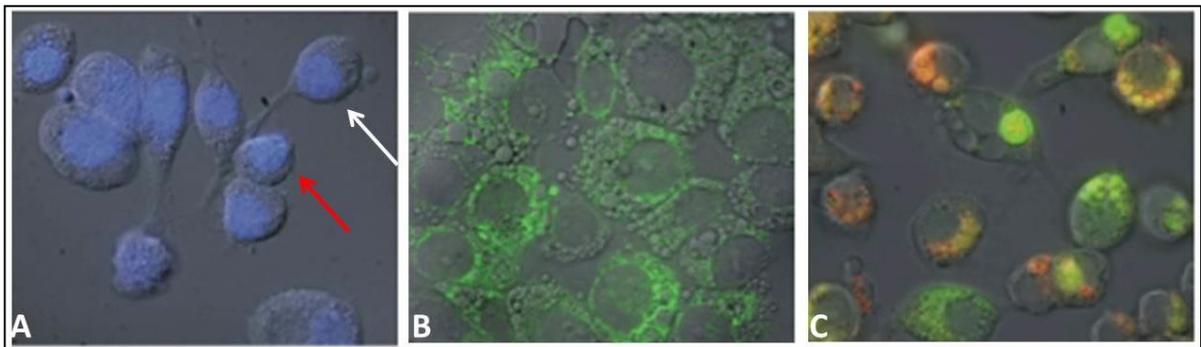


Figura 7. Caracterização das células embrionárias BME26.

Fonte: Adaptada de Esteves, et. al (2008).

Nas células BME26 pode ser observada a presença de grandes núcleos celulares que ocupam mais da metade do citoplasma (Figura 7A, núcleos marcados em azul pelo fluoróforo 4',6'-diamino-2-fenil-indol - DAPI), a presença de uma grande quantidade de mitocôndrias (Figura 7B, mitocôndrias marcadas em verde pelo fluoróforo rodamina-123) e grande quantidade de vesículas que ficam dispersas e que apresentam diferentes graus de acidificação (Figura 7C, vesículas marcadas em diferentes cores pelo fluoróforo laranja de acridina) (ESTEVES et al., 2008).

Entre outras informações, cabe destacar que as células embrionárias BME26 possuem um crescimento relativamente lento, com um tempo de duplicação de 5 a 10 dias, fator que pode ser altamente influenciado pela temperatura de incubação,

suplementação do meio e histórico de passagens (MUNDERLOH; KURTTI, 1989). Este fenômeno acontece também em outras linhagens de células de carrapatos (BELL-SAKYI et al., 2007).

A linhagem celular BME26 pode ser mantida em altas densidades celulares (aproximadamente 10^6 ou 10^7 células/mL) e resiste naturalmente a um período de um pouco mais que uma semana sem troca de meio, refletindo a capacidade dos carrapatos Ixodídeos para suportar períodos extremamente longos entre as refeições de sangue na natureza (BELL-SAKYI et al. 2007).

Desde o estabelecimento desta linhagem, diversos estudos têm sido desenvolvidos e têm ajudado a elucidar entre outros fenômenos as interações vetor-patógeno (KURTTI et al., 1993; ESTEVES et al., 2009; ZIVKOVIC et al., 2010; BIFANO et al., 2014; KALIL et al., 2017), mecanismos de resistência a pesticidas (POHL et al., 2014) e novos compostos com atividade anti-acaricida (SARAMAGO et al., 2018; BRAZ et al., 2019). Também outros estudos têm contribuído na compreensão da função de diversos alvos em processos celulares como viabilidade e crescimento (SARAMAGO et al., 2012), ciclo celular (GOMES et al., 2013), metabolismo energético (DE ABREU et al., 2009, 2013; MARTINS et al., 2015), autofagia (MOURA-MARTINIANO et al., 2017), resposta imunológica (ROSA et al., 2016) e estresse oxidativo (DELLA NOCE et al., 2019). Em conjunto, estes resultados têm permitido a descoberta de novas vias para o controle anti-carrapato.

Vale a pena destacar que as células BME26 são altamente tolerantes a inúmeros tratamentos quando comparadas com outras linhagens celulares de mamíferos, um deles é a incubação com peróxido de hidrogênio (DELLA NOCE et al., 2019). Dados produzidos no grupo de pesquisa e ainda não publicados revelam que tratamentos como a exposição à radiação ultravioleta e ausência de soro fetal bovino não causaram morte celular expressiva na linhagem celular.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Evidenciar as correlações entre a via de sinalização insulina/TOR e o desenvolvimento embrionário no carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*.

3.2 Objetivos Específicos

1. Reconhecer a conservação da via de sinalização insulina/TOR no carrapato bovino.
2. Analisar os efeitos da inibição química da proteína TOR sobre a viabilidade de células embrionárias do carrapato bovino BME26.
3. Estudar as possíveis regulações da via de sinalização insulina/TOR nas células embrionárias BME26.
4. Analisar os perfis transcricionais dos alvos RmTOR, RmS6K e Rm4E-BP1 durante a embriogênese.
5. Estudar os efeitos do silenciamento gênico de TOR no desenvolvimento ovariano, depósito de vitelina, oviposição, desenvolvimento embrionário e eclosão.

4. JUSTIFICATIVA

O carrapato bovino *R. microplus* é um artrópode hematófago obrigatório de vertebrados que representa uma séria ameaça para os produtores de gado leiteiro e bovino. Estudos descrevem que, aproximadamente, 80% da população de bovinos do mundo está em risco pela infestação deste carrapato. Seu impacto negativo deve-se aos efeitos diretos da alimentação que causam a perda de peso dos bois e danos ao couro e, de efeitos indiretos, como a transmissão de patógenos. Desta forma, calcula-se que as perdas econômicas por causa da prevenção e do tratamento contra este carrapato atingem um valor aproximado de dois bilhões de dólares por ano somente no Brasil.

Entre os atuais métodos de controle para este carrapato e para as doenças transmitidas por ele encontra-se o uso de acaricidas e vacinas. O uso de acaricidas químicos é a estratégia mais utilizada. No entanto, seu uso intensificado tem levado ao desenvolvimento de resistência de várias espécies de carrapatos, além do elevado custo para desenvolvê-los e registrá-los e da crescente preocupação na saúde pública pelos resíduos químicos achados em produtos de origem animal e da poluição do ambiente. Além disso, algumas vacinas têm sido disponibilizadas há mais de 20 anos e comercializadas no mundo inteiro, Apesar de serem uma alternativa muito promissora em comparação ao uso de acaricidas, ainda são insuficientes para conferir proteção contra todos os tipos de carrapatos *R. microplus* que existem em diversas regiões geográficas no mundo. Diante deste panorama, novas estratégias para o controle deste carrapato centradas no maior entendimento sobre sua biologia são necessárias.

Nosso grupo de pesquisa tem focado em estratégias para a seleção de moléculas-alvo a partir da caracterização bioquímica, molecular e funcional de proteínas envolvidas, direta ou indiretamente, na embriogênese do carrapato *R. microplus* como possíveis alvos para interferir na sua proliferação nesta fase de vida. O presente estudo busca caracterizar a via de sinalização Insulina/TOR neste processo. Acredita-se que os resultados deste estudo permitirão sugerir novas abordagens para o desenvolvimento de estratégias de controle e aumentar o conhecimento da fisiologia deste importante organismo.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Manutenção da cultura de células embrionárias BME26 do carrapato bovino *R. microplus*

O cultivo de células embrionárias BME26 foi mantido como descreve Esteves e colaboradores (2008). Meio de cultura Leibovitz L15 (Sigma-Aldrich, USA) foi diluído em água ultra pura esterilizada (3:1) e suplementado com soro fetal bovino inativado (20%, Nutricell, Brasil), caldo de triptose fosfato (10%, Sigma-Aldrich, USA), 100 unidades ml⁻¹ de penicilina (Gibco, USA) e 100 µg ml⁻¹ de estreptomicina (Gibco, USA). Este meio completo fresco foi usado na manutenção da cultura celular.

Células aderidas a garrafas de 25 cm² foram ressuspensas em 5 mL do meio descrito acima usando uma agulha de calibre 22 (0,7 x 25 mm) com a ponta dobrada montada em uma seringa de 5 mL de plástico. A quantidade de células da cultura foi determinada usando câmara de Neubauer (hemocitômetro) e a viabilidade celular foi determinada usando o método de exclusão de células mortas marcadas com azul de tripan (0,4%, Sigma-Aldrich, USA). Alíquotas de 1x10⁷ células foram transferidas a novas garrafas e o volume de 5 mL foi completado com meio completo fresco. As garrafas foram incubadas a 34°C durante duas semanas e o meio substituído semanalmente para promover a proliferação celular.

Células mantidas nessas garrafas, com aproximadamente 4x10⁶ células/mL, entre as passagens 35 e 55, foram usadas em experimentos posteriores deste estudo com o propósito de manter características homogêneas entre as células usadas. Cada uma destas garrafas é considerada como uma amostra biológica independente (*n*).

5.2 Manutenção de fêmeas e de ovos do carrapato *R. microplus*

Os carrapatos *R. microplus* (colônia Porto Alegre) foram coletados de bovinos alojados em baias individuais no estábulo localizado na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os carrapatos são livres de patógenos como *Babesia spp.* e *Anaplasma spp.* (RECK et al., 2009). Por uma

parte, fêmeas adultas totalmente ingurgitadas foram coletadas e incubadas a 28°C e 80% de umidade relativa até a finalização da oviposição em placas de Petri. Os ovos foram coletados em dias diferentes após a oviposição para extração de RNA. Adicionalmente, fêmeas, parcialmente ingurgitadas, com peso entre 20 e 60 mg foram removidas manualmente dos bovinos e usadas para experimentos de RNA de interferência. Os ovos destas fêmeas foram coletados para determinação do conteúdo de vitelina ou observados até a eclosão das larvas.

Vale a pena destacar que todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações éticas e metodológicas descritas nas Normas Nacionais e Internacionais do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFRGS (processo número 14403).

5.3 Extração de RNA e síntese de cDNA de células embrionárias BME26

RNA total de células BME26 (5×10^5 células para cada tratamento) foi usado para extração de RNA usando Reagente TRIzol® (Invitrogen, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria (Picodrop Ltd, USA) medida a 260 e 280 nm. Dois microgramas de RNA total foram ressuspensos em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e foi realizado o tratamento com DNase I (Invitrogen, CA, EUA). A reação de transcrição reversa foi realizada com o kit de transcrição reversa para cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, CA., EUA) seguindo o protocolo do fabricante. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C.

5.4 Clonagem e sequenciamento das Fases de Leitura Aberta que codificam as proteínas TOR, S6K e 4E-BP1 do carrapato bovino *R. microplus*

Oligonucleotídeos específicos para clonar parcial ou completamente as Fases de Leitura Aberta (nome traduzido do inglês *Open Reading Frames* também conhecidas como *ORF*) que codificam as proteínas TOR, S6K e 4E-BP1 do carrapato *R. microplus* foram projetados tendo como base os resultados do banco

de dados do transcriptoma do *R. microplus* criado pelo grupo de pesquisa RmINCT-EM, ainda não publicado.

Os oligonucleotídeos específicos para a clonagem da RmTOR e da RmS6K foram projetados para se anelar dentro e fora do *ORF* destes alvos (o oligonucleotídeo *Forward* se anela dentro do *ORF* enquanto o oligonucleotídeo *Reverse* se anela fora do *ORF*), pois as sequências não estão completas no transcriptoma. Já os oligonucleotídeos específicos para a clonagem da Rm4E-BP1 foram projetados para se anelar fora do *ORF*, isto porque a sequência está completa no transcriptoma (Tabela 1). Neste ponto, vale a pena destacar que os sequenciamentos foram importantes para confirmar se as informações depositadas no transcriptoma estavam corretas.

Tabela 1. Oligonucleotídeos específicos utilizados na clonagem e sequenciamento dos alvos TOR, S6K e 4E-BP1 do carrapato *R. microplus*.

ALVO	SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS (5'- 3')	TAMANHO DO FRAGMENTO (PARES DE BASES)
RmTOR	GTACCAGCGTTCCTTGAATGTCAAAG CCCTTTCTAGCACCTCTCAACAGGAC	1456
RmS6K	AGGACCTCTGTCCTCATGACGTCC CTCGAAGTCTTGCTCATGATTTCCAC	462
Rm4E-BP1	TGGGCGCTCGTGGAGAACG CTGGTGGCACTCCGTACTIONGGAGC	597
Oligonucleotídeo universal T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
Oligonucleotídeo universal SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	

Fonte: O próprio autor.

Reações em cadeia da polimerase (nome traduzido do inglês *Polymerase Chain Reaction* também conhecidas como PCR) foram preparadas com aproximadamente 0,6 µg de DNA complementar (cDNA) de células embrionárias BME26, usando a enzima Taq DNA Polimerase (Sinapse Inc., Brasil) e seguindo as instruções do fabricante. Os programas executados no termociclador (modelo Veriti, Applied Biosystems, Hitachi, USA) para cada alvo foram os seguintes:

- Para amplificação do número de cópias do alvo RmTOR foi programado um ciclo de 94°C de 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos e 72°C por um minuto e 30 segundos, seguidos de um ciclo de 72°C de 10 minutos.
- Para amplificação do número de cópias do alvo RmS6K foi programado um ciclo de 94°C de 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por um minuto, seguidos de um ciclo de 72°C de 10 minutos.
- Para amplificação do número de cópias do alvo Rm4E-BP1 foi programado um ciclo de 94°C de 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos e 72°C por um minuto, seguidos de um ciclo de 72°C de 10 minutos.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo (5 µg/mL) e cada fragmento foi cortado e purificado usando o kit de purificação *PCR GFX™ Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, IL, USA). Os fragmentos purificados foram ligados ao vector *pGEM-T easy* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante e os plasmídeos foram transformados em células *Escherichia coli* TOP10 por choque térmico seguindo o protocolo de Sambrook e Russell (2001). O DNA plasmidial foi extraído utilizando *Plasmid Prep Mini Spin Kit* (GE Healthcare, IL, USA) e o sequenciamento foi realizado utilizando oligonucleotídeos específicos do vector T7 e SP6, descritos na Tabela 1. Um total de 4 sequenciamentos foi desenvolvido para cada alvo, usando o equipamento *3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Hitachi, USA).

As sequências de cada alvo geradas a partir do sequenciamento foram analisadas e registradas no banco de dados GenBank com os seguintes códigos de acesso MK598842 para RmTOR, MK598841 para RmS6K e MK598840 para Rm4E-BP1. Estas sequências também encontram-se no Anexo 1.

Para as análises das sequências de nucleotídeos obtidas do sequenciamento foi utilizado o programa SeqMan 7.0.0 (DNASTAR, Madison, USA) e para a determinação das sequências deduzidas de aminoácidos foram usadas as ferramentas de tradução para proteína do programa BioEdit versão 7.2.6 (HALL, 1999) e Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>). Para analisar os domínios

conservados e a identidade das sequências deduzidas de aminoácidos de *R. microplus* com proteínas ortólogas foram usadas as ferramentas “Domínios Conservados” e “Blastp” do servidor da *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> e http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). No caso da Rm4E-BP1 o peso da proteína foi calculado por médio do servidor ExpASy (http://web.expasy.org/compute_pi/).

5.5 Síntese de RNA de interferência

RNA de interferência ou RNAi (também conhecido como *Doubled Stranded RNA* ou *dsRNA*) baseado no *ORF* sequenciado para RmTOR foi desenvolvido neste trabalho. Oligonucleotídeos específicos, com e sem sequências promotoras T7, foram projetados para a síntese da *dsRNA* (Tabela 2). Para isto, apropriadas regiões do *ORF* e da sequência de RNA foram rastreadas utilizando *Blast* para determinar a especificidade da sequência. Assim mesmo, esta especificidade e possíveis alvos potenciais não específicos foram estimados a partir do *software* dsCheck (NAITO et al., 2005). Este é um software online (<http://dsCheck.RNAi.jp/>) baseado em dados depositados na web que estima os efeitos da *dsRNA* da seguinte forma: no processo bioquímico a *dsRNA* longo é clivada pela enzima Dicer em RNAs curtos, o software simula esse processo e investiga subconjuntos de 19 nucleotídeos enumerando uma lista de potenciais candidatos genéticos que podem ser afetados pela estratégia do silenciamento gênico. Desta forma, o algoritmo estima a eficiência e a sensibilidade da estratégia pela busca por homologia.

Tabela 2. Oligonucleotídeos específicos utilizados para a síntese de *dsRNA* para silenciamento gênico.

ALVO	SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS (5'- 3') ¹	TAMANHO DO FRAGMENTO (PARES DE BASES)	REFERENCIA
TOR	GAGGTGACTGGCATTGAG GCTTGTGGACGCATCTTC	521	
AKT	TCAGCCTGGACAACCTTTGAGTTCCT ATTTTCATACATGACCACGCCAGC	595	De Abreu et al. (2013)
GSK3-β	TTATGCGACGGCTAGAACACT GCTCTTGCTCTGTGAAGTTGAA	798	Fabres et al. (2010)
GFP	TCACGAACTCCAGCAGGACCATGTGATC ACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTC	600	Mulenga; Khumthong (2010)

¹ Para todos os oligonucleotídeos específicos descritos foram incluídas a sequência do promotor T7 (taatacgactcactataggg)

Fonte: O próprio autor.

Reações de PCR foram preparadas com DNA plasmidial contendo o vetor com o inserto da TOR, usando os oligonucleotídeos específicos sem a sequência T7 e a enzima Taq DNA Polimerase (Sinapse Inc., Brasil) seguindo as instruções do fabricante. O programa executado no termociclador (modelo Veriti, Applied Biosystems, Hitachi, USA) foi um ciclo de 94°C de 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, seguidos de um ciclo de 72°C de 10 minutos. O produto de PCR foi usado para uma nova reação, usando os oligonucleotídeos específicos com a sequência T7 e a enzima Taq DNA Polimerase. O programa executado no termociclador foi um ciclo de 94°C de 3 minutos, 10 ciclos de 94°C por 30 segundos, 47°C por 30 segundos e 72°C por um minuto, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por um minuto, seguidos de um ciclo final de 72°C de 10 minutos. O produto de PCR foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm e 280 nm (Picodrop Ltd, USA).

O *dsRNA* foi transcrito *in vitro* a partir de 1 µg deste molde, utilizando o sistema de síntese de RNAi *T7 RiboMAX™ Express* (Promega) e produzido de acordo com as instruções do fabricante. O produto da síntese foi quantificado pela medição da absorbância a 260 nm e 280 nm (Picodrop Ltd, USA) e a qualidade confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo (5 µg/mL). O tamanho final do *dsRNA* foi de 521 pb (Tabela 2).

A síntese de *dsRNA* para AKT e GSK-3 β foi realizada como descrito anteriormente por Abreu et. al (2013) e Fabres et. al (2010). Os oligonucleotídeos específicos para a síntese destes *dsRNAs* estão apresentados na Tabela 2. Cada RNA de interferência têm um tamanho de 595 e 798 pares de bases respectivamente. Também um *dsRNA* não relacionado de 600 pares de bases que codifica para uma proteína verde fluorescente (dsGFP) foi sintetizado para usar como controle (Tabela 2) (MULENGA; KHUMTHONG, 2010). O molde foi gentilmente cedido pelo Dr. Albert Mulenga (Universidade Texas A&M, EUA).

5.6 Análise da viabilidade celular através do ensaio de redução por MTT das células BME26 tratadas com inibição química para TOR

Após 48 horas de inibição química da TOR com rapamicina, as células BME26 foram preparadas para o ensaio de redução por MTT (ensaio de viabilidade celular) seguindo o protocolo definido por Abreu e colaboradores (2013). Em cada poço 50 μ L de MTT (5 mg/mL preparado em meio L15 sem soro fetal bovino) foi adicionado. A placa com células foi incubada a 34°C e protegida da luz durante 2 horas. Posteriormente, todos os meios foram completamente descartados e 1 mL de álcool isopropílico (0,15% HCl em álcool isopropílico) foi adicionado em cada poço para dissolver os cristais de formazan. A mistura foi transferida para tubos de 1,5 mL, centrifugados a 6000 \times g por 15 min e o sobrenadante foi coletado em novos tubos para medir a absorbância a 570 nm, utilizando cubetas de quartzo em um espectrofotômetro UVmini-1240 UV-VIS (Shimadzu, Japão). Os valores de absorbância do tratamento controle foram usados para normalização (100% de viabilidade). Todas as amostras foram analisadas em três experimentos independentes realizados em triplicatas técnicas.

Neste ponto, vale a pena destacar que as análises de viabilidade celular, contagem celular e integridade de membrana com células tratadas com 10-DEBC e Alsterpaullone não foram feitas por já ter sido apresentadas em trabalhos anteriores (DE ABREU, 2009; DE ABREU et al., 2009, 2013).

5.7 Análise da contagem de células BME26 tratadas com inibição química para TOR

A viabilidade das células BME26 foi determinada usando câmara de Neubauer (hemocitômetro) e o método de exclusão de células mortas marcadas com azul de tripan (0,4%, Sigma-Aldrich, USA) da seguinte forma: após 48 horas de inibição química da TOR com rapamicina, poços com células foram cuidadosamente lavados com 0,5 mL de PBS pH 7,0 por poço e descoladas em 1 mL de solução de tripsina com azul de tripan. Esta solução foi preparada da seguinte forma: 3,5 mL de PBS pH 7,0, 1 mL de tripsina (2,5%, sem fenol red, Thermo Fisher Scientific, USA) e 0,5 mL de azul de tripan 0,4% (Sigma-Aldrich, USA). Tendo descolado e marcado as células, 10 µL da mistura foram adicionados em cada câmara do hemocitômetro.

O procedimento experimental e o cálculo foram realizados de acordo com a metodologia padrão (LOUIS; SIEGEL, 2011) contando as células vivas das regiões de grade de 1×1mm de dimensão e usando a objetiva de 10x. Foram feitas imagens usando a câmera Axiocam 503 color acoplada no microscópio Axio Imager 2 (Zeiss, Alemanha). As células foram contadas com o software ImageJ, ferramenta plugin cell counter para a contagem manual (FERREIRA; RASBAND, 2012). Todas as amostras foram analisadas em três experimentos independentes desenvolvidos em triplicatas técnicas.

5.8 Análises de integridade de membrana das células BME26 tratadas com inibição química para TOR

Um total de 2×10^5 células foram plaqueadas em cada poço (diâmetro de 16,25 mm e área de crescimento de $1,93 \text{ cm}^2$) sobre lamínulas de vidro colocadas no fundo da placa de 24 poços, e o volume final de 500 µL foi completado com meio completo fresco. As placas com células foram incubadas a 34°C por um período de 24 horas para permitir a adesão celular. Para a inibição química da TOR, diferentes concentrações de rapamicina (Sigma-Aldrich, USA) foram adicionadas nos poços, em concentrações finais que variam entre 0,2 µM a 2 µM. Posteriormente, as placas com células foram incubadas por 48 horas. Após esse tempo, as células BME26 foram preparadas para analisar a integridade da membrana seguindo o protocolo de

Abreu e colaboradores (2013). Primeiramente, o meio de cultura foi removido lentamente e substituído por PBS 1x. Para marcação, 25 μL de Hoechst 33342 (1 mg/mL) foram adicionados durante 5 min, seguido por um tratamento de 5 min com 6 μL de iodeto de propídio (1 mg/mL). As incubações foram realizadas à temperatura ambiente e protegidas da luz. Posterior à incubação o conteúdo foi descartado, lamínulas foram lavadas com PBS 1x e montadas sobre lâminas de vidro contendo 5 μL de glicerol. Células BME26 foram observadas em microscópio confocal (LSM 780-NLO Zeiss Axio Observer Z.1, Carl Zeiss, Alemanha) e as imagens foram obtidas com uma ampliação de 400x.

5.9 Inibição química da TOR, AKT e GSK-3 nas células embrionárias BME26

Um total de 5×10^5 células foram plaqueadas em poços (diâmetro de 16,25 mm e área de crescimento de $1,93 \text{ cm}^2$) de placas com 24 poços, e o volume final de 500 μL foi completado com meio completo fresco. As placas com células foram incubadas a 34°C por um período de 24 horas para permitir a adesão celular. Após desse tempo, o meio de cultura dos poços foi substituído por meio completo fresco e foram adicionados os inibidores químicos para as proteínas TOR, AKT e a GSK-3 conforme descrito abaixo:

Para a inibição química da TOR, diferentes concentrações de rapamicina (Sigma-Aldrich, USA) foram adicionadas nos poços, em concentrações finais que variam entre 0,12 μM e 8 μM . Posteriormente, as placas com células foram incubadas por períodos de 24 e 48 horas para diferentes experimentos. As células incubadas por 24 horas foram usadas para extração de RNA total e as incubadas por 48 horas foram usadas para os experimentos de viabilidade celular.

Para a inibição química da AKT e da GSK-3, tomou-se como referência o desenho experimental proposto por Abreu e colaboradores (2013). Especificamente, o 10-DEBC é um inibidor da AKT e o Alsterpaullone é um inibidor da GSK-3 β . Células BME26 foram tratadas com uma concentração de 12 μM de 10-DEBC (Tocris Bioscience, USA) e de 40, 400 e 4000 nM de Alsterpaullone (Sigma-Aldrich, USA). Posteriormente, as células foram incubadas por 24 horas a 34°C e usadas para extração de RNA total. Para monitorar a ação do diluente do fármaco, células

BME26 foram tratadas com DMSO e este tratamento foi usado como controle. O experimento foi desenvolvido usando três amostras biológicas independentes e três replicatas técnicas.

Cabe destacar que para esses experimentos, maiores concentrações de 10-DEBC não foram testadas por afetar diretamente a viabilidade celular (DE ABREU et al., 2013). Além disso, as análises de viabilidade celular, integridade de membrana e morfologia celular com células tratadas com 10-DEBC e Alsterpaullone não foram feitas por já ter sido apresentadas em trabalhos anteriores (DE ABREU, 2009; DE ABREU et al., 2009, 2013).

5.10 Silenciamento gênico da TOR, AKT e GSK-3 β nas células embrionárias BME26

Um total de 5×10^5 células foram plaqueadas em poços (diâmetro de 16,25 mm e área de crescimento de $1,93 \text{ cm}^2$) de placas com 24 poços, e o volume final de 500 μL foi completado com meio completo fresco. As placas com células foram incubadas a 34°C por um período de 24 horas para permitir a adesão celular. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por 200 μL de meio fresco contendo 4 μg de *dsRNA* e a placa foi gentilmente misturada. Após 24 horas adicionais de incubação a 34°C , as células foram coletadas e processadas para extração de RNA. O RNA de células tratadas com dsGFP foi usado como controle. O experimento foi desenvolvido usando três amostras biológicas independentes e três replicatas técnicas.

5.11 Tratamento das células embrionárias BME26 com insulina exógena

Células embrionárias BME26 foram tratadas com insulina exógena, como descrito anteriormente por Abreu e colaboradores (2009). As células BME26 foram ressuspendidas de garrafas em que a proliferação celular foi promovida. Em seguida, a quantidade de células foi determinada usando câmara de Neubauer (hemocitômetro) e a viabilidade celular foi determinada usando o método de

exclusão de células mortas marcadas com azul de tripan (0,4%, Sigma-Aldrich, USA).

Um total de 5×10^5 células foram plaqueadas em poços (diâmetro de 16,25 mm e área de crescimento de $1,93 \text{ cm}^2$) de placas com 24 poços e o volume final de 500 μL foi completado com meio completo fresco. As placas com células foram incubadas a 34°C por um período de 24 horas para permitir a adesão celular. Após esse tempo, o meio completo foi substituído por meio sem soro fetal bovino ou com meio completo fresco durante 24 horas. Posteriormente, algumas células foram expostas a insulina bovina (concentração final de $1 \mu\text{M}$, Sigma-Aldrich, USA). Novamente a placa foi incubada a 34°C durante 30 minutos. Finalmente, todas as células foram lisadas para extração de RNA. Todas as análises estão baseadas em três amostras biológicas independentes e em três replicatas técnicas.

5.12 Silenciamento gênico da TOR em fêmeas parcialmente ingurgitadas

A injeção de fêmeas parcialmente ingurgitadas com *dsRNA* foi realizada de acordo com Fabres et. al. (2010). Fêmeas, com peso entre 20 e 60 mg, foram removidas manualmente dos bovinos e injetadas com aproximadamente 4 μg de *dsRNA* para TOR em um volume máximo de 2 μL , no quadrante inferior da superfície ventral usando uma seringa Hamilton. Dois grupos controle foram injetados: um com *dsRNA* não relacionado (4 μg de dsGFP em um volume máximo de 2 μL) e o outro com tampão (2 μL de 10 mM PBS, pH 7.4). As fêmeas foram fixadas em placas de poliestireno expandido com fita adesiva dupla face para alimentação artificial por meio de capilar. Os capilares foram preenchidos com sangue de bovinos não infestados que foi coletada em tubos heparinizados. Os capilares foram substituídos a cada três horas. As fêmeas foram mantidas com esta alimentação por 28 horas.

Para confirmação do silenciamento, ovários de três fêmeas para cada experimento independente foram coletados e processados para extração de RNA após 48 horas da injeção de *dsRNA* ou o PBS. Dois experimentos independentes foram realizados, com aproximadamente 20 indivíduos por tratamento, para cada um dos experimentos independentes.

5.13 Extração de RNA e síntese de cDNA de ovários e ovos

Ovários de fêmeas tratadas com RNAi para TOR ou *dsRNA* não relacionado (*dsGFP*) ou PBS (3 ovários para cada tratamento para cada experimento independente) e ovos de diferentes dias durante a embriogênese (50 mg para cada dia do desenvolvimento embrionário coletado em três momentos diferentes) foram usados para extração de RNA usando Reagente TRIzol® (Invitrogen, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria (Picodrop Ltd, USA) mesurada a 260 e 280 nm. Dois microgramas de RNA total foram ressuspensos em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e o tratamento com DNase I foi realizado (Invitrogen, CA, EUA). A reação de transcrição reversa foi realizada com o kit de transcrição reversa para cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, CA., EUA) seguindo o protocolo do fabricante. O cDNA gerado foi armazenado a -20°C e utilizado em posteriores análises de RT-qPCR.

5.14 Análise da transcrição relativa dos alvos por RT-qPCR

A análise da transcrição relativa por PCR quantitativa ou RT-qPCR (também conhecida como PCR em tempo real) foi usada em cinco experimentos diferentes durante o desenvolvimento deste trabalho: (i) para avaliar a transcrição relativa de RmTOR e RmAKT usando cDNA de células embrionárias BME26 tratadas com insulina exógena; (ii) para confirmar o silenciamento gênico em células BME26 e ovários de fêmeas tratadas com *dsRNA*; (iii) para avaliar a transcrição relativa de alvos deste estudo após silenciamento gênico com *dsRNA* em células embrionárias BME26; (iv) para avaliar a transcrição relativa de RmS6K e Rm4E-BP1 após tratamento com inibidores químicos em células embrionárias BME26 e (v) para avaliar a transcrição relativa de RmTOR, RmS6K e Rm4E-BP1 em diferentes estágios da embriogênese, utilizando cDNA de ovos diferentes dias de desenvolvimento.

Oligonucleotídeos específicos para cada alvo foram projetados para esta função (Tabela 3). No caso, os oligonucleotídeos projetados para a análise da

transcrição relativa da RmTOR, RmAKT e da RmGSK3- β se anelam em regiões diferentes do ORF que foram usada na síntese de RNA de interferência.

Tabela 3. Oligonucleotídeos específicos utilizados para análise da transcrição relativa de diferentes alvos deste estudo.

ALVO	SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS (5'- 3')	TAMANHO DO FRAGMENTO (PARES DE BASES)	REFERENCIA
TOR	AGGCTCTGAACAAAAAGGC GAACATCCAAAGTCTCATCTG	93	
S6K	TGTGATTGGTGGAGTTTTGG GCGAGTGCTTGGTGTAAC	96	
4E-BP1	CCAGATGTCTCCAAGGCCAG GTTTCGTCACCCGATCCTTCA	103	
AKT	GAAGTTGGCGAGTGAGGAGGA CGCGTCGAGATGCTGAACTTGT	86	De Abreu et al. (2013)
GSK3-β	CCCACACCCGCTATTTATTG TGTGCAGGAGAGCCAGTTTA	113	Martins et al. (2015)
ELF-1^a	CGTCTACAAGATTGGTGGCATT CTCAGTGGTCAGGTTGGCAG	108	Nijhof et al. (2009)

Fonte: O próprio autor.

Diluições em série do cDNA foram utilizadas para o estabelecimento das eficiências de cada oligonucleotídeo específico. Reações contendo cDNA de tratamentos controle, oligonucleotídeos específicos para cada alvo e reagente *Power Sybr Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, USA) foram preparadas seguindo as instruções do fabricante e usadas na plataforma *Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR SystemTM* (USA).

O programa executado no termociclador para analisar os alvos RmTOR, RmS6K e Rm4E-BP1 foi: um ciclo de 95°C de 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C de 15 segundos e de 60°C durante um minuto. Para a curva de *melting*, os parâmetros de ciclagem foram: 95°C por 15 segundos, 60°C por um minuto, seguido de 35 ciclos com aumento de temperatura de 0,3°C em cada ciclo para atingir a temperatura final de 95°C. Outros parâmetros de ciclagem para a análise da transcrição relativa de RmAKT e RmGSK-3 β foram selecionados de acordo com

Abreu et. al. (2013) e Martins et. al. (2015). O fator de alongamento-1A (ELF-1A) foi usado como um gene de referência (NIJHOF et al., 2009).

Somente oligonucleotídeos específicos com eficiências entre 85% e 100% foram usados neste estudo e a transcrição relativa das amostras foi determinada usando os valores de pontos de cruzamentos (do inglês *Crossing point* ou Cp) através da Ferramenta REST (PFAFFL, 2001). Todas as amostras foram analisadas em triplicatas técnicas, em três experimentos independentes (três replicatas biológicas), exceto a confirmação do silenciamento em fêmeas ingurgitadas, que foi feito em dois experimentos independentes.

5.15 Determinação do desenvolvimento ovariano de fêmeas tratadas com silenciamento gênico para TOR

Após 48 horas de injeção de *dsRNA* para TOR, fêmeas foram dissecadas e os ovários foram coletados para determinação do desenvolvimento ovariano, utilizando o sistema proposto por Seixas e colaboradores (2008). A proporção de ovócitos maduros foi analisada medindo a área ocupada por ovócitos maduros e imaturos em cada imagem, usando o software ImageJ (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004; FERREIRA; RASBAND, 2012). Além disso, as fêmeas tratadas com *dsRNA* ou PBS e seus ovos foram coletados e analisados com lupa EZ4 (Leica, Alemanha). Desta forma, registros fotográficos foram feitos com a câmara acoplada ao equipamento.

5.16 Determinação do conteúdo de vitelina por SDS-PAGE e dot blot em ovos de fêmeas tratadas com *dsRNA* para TOR

Ovos de fêmeas tratadas com *dsRNA* para TOR e com os dois tratamentos controle (dsGFP e PBS) foram coletados 9 dias após a oviposição (vinte ovos de cada grupo) e homogeneizados em 20 µL de tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, contendo um coquetel inibidor de protease (4EBSF, aprotinina, cloridrato de bestatina, E-64, EDTA e hemissulfato de leupeptina, Sigma-Aldrich, USA), pepstatina A (1 mM, Sigma-Aldrich, USA) e Triton X-100 10% (Thermo Fisher Scientific, USA).

As amostras foram mantidas em gelo e imediatamente utilizadas para determinação do teor de vitelina por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e dot blot.

A SDS-PAGE foi realizada sob condições desnaturantes seguindo o protocolo de Laemmli (1970), seguido de coloração com prata. Para o dot blot, cada amostra foi colocada em membrana de nitrocelulose (5 µL por ponto) e deixada a secar. As membranas foram processadas, posteriormente, da seguinte forma: 1 h à temperatura ambiente com solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado diluído em PBS); incubação *overnight* com 4 mL de anti-Vt (CANAL et al., 1995) (diluído 1:1000 em solução de bloqueio) ou solução de bloqueio apenas como controle. Posteriormente, foram feitas 3 lavagens de 5 minutos com PBS; incubação durante 1 h a temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-IgG conjugado a fosfatase alcalina (diluído 1:5000 em solução de bloqueio, Sigma-Aldrich, USA). Finalmente, a detecção da fosfatase alcalina foi realizada com nitro azul de tetrazólio (NBT) e 5-bromo4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) (Promega).

5.17 Parâmetros biológicos analisados após tratamento com *dsRNA* para TOR nas fêmeas de *R. microplus*

Os parâmetros biológicos analisados no experimento com fêmeas tratadas com RNAi ou PBS foram: índice de eficiência nutricional (peso final do carrapato ingurgitado/peso inicial), índice de produção de ovos (peso dos ovos/peso final do carrapato ingurgitado) × 100), peso dos ovos após 10 dias de oviposição, peso das larvas após 40 dias após a oviposição e taxa de eclosão (%) (BENNETT, 1974; FABRES et al., 2010; GONSIOROSKI et al., 2012).

5.18 Análises estatísticas

Testes t de Student não pareados foram usados para análises de transcrição relativa, nos experimentos de estimulação de insulina, inibição química e silenciamento gênico. O Teste ANOVA one-way, seguido do pós teste de Dunnett, foi usado em experimentos de viabilidade celular, contagem de células, para análise da transcrição relativa durante a embriogênese e para avaliação de parâmetros

biológicos. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism versão 6.01 (Graph Pad Software, Inc.).

6. RESULTADOS

A via de sinalização pela insulina/TOR em carrapatos não está totalmente definida. Em *R. microplus* foi demonstrado que componentes da cascata de insulina atuam no controle celular e no metabolismo de glicogênio em células embrionárias BME26 (DE ABREU et al., 2009, 2013). Por ser um artigo científico de co-autoria que respalda ideias do presente trabalho, o trabalho de De Abreu et al. (2013) é anexado nesta tese (Anexo 2). No sentido de aprofundar esta linha de pesquisa, neste trabalho alvos, ainda não descritos na literatura, foram identificados a partir da projeção de estratégias para clonar e sequenciar três ORFs que codificam as proteínas RmTOR, RmS6K e Rm4E-BP1.

Primeiramente, um fragmento de 1.378 nucleotídeos que codificam parcialmente a proteína RmTOR foi obtido. A correspondente tradução contém 459 aminoácidos que compõem três importantes domínios desta proteína: o domínio de ligação a rapamicina (FKBP12 ou FRB), o domínio quinase e o domínio terminal FATC (Figura 8A). O múltiplo alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos com sequências ortólogas (Figura 8B) e as porcentagens de identidade (Tabela 4) demonstram um grau de conservação entre 58 e 98% de identidade com outras sequências.

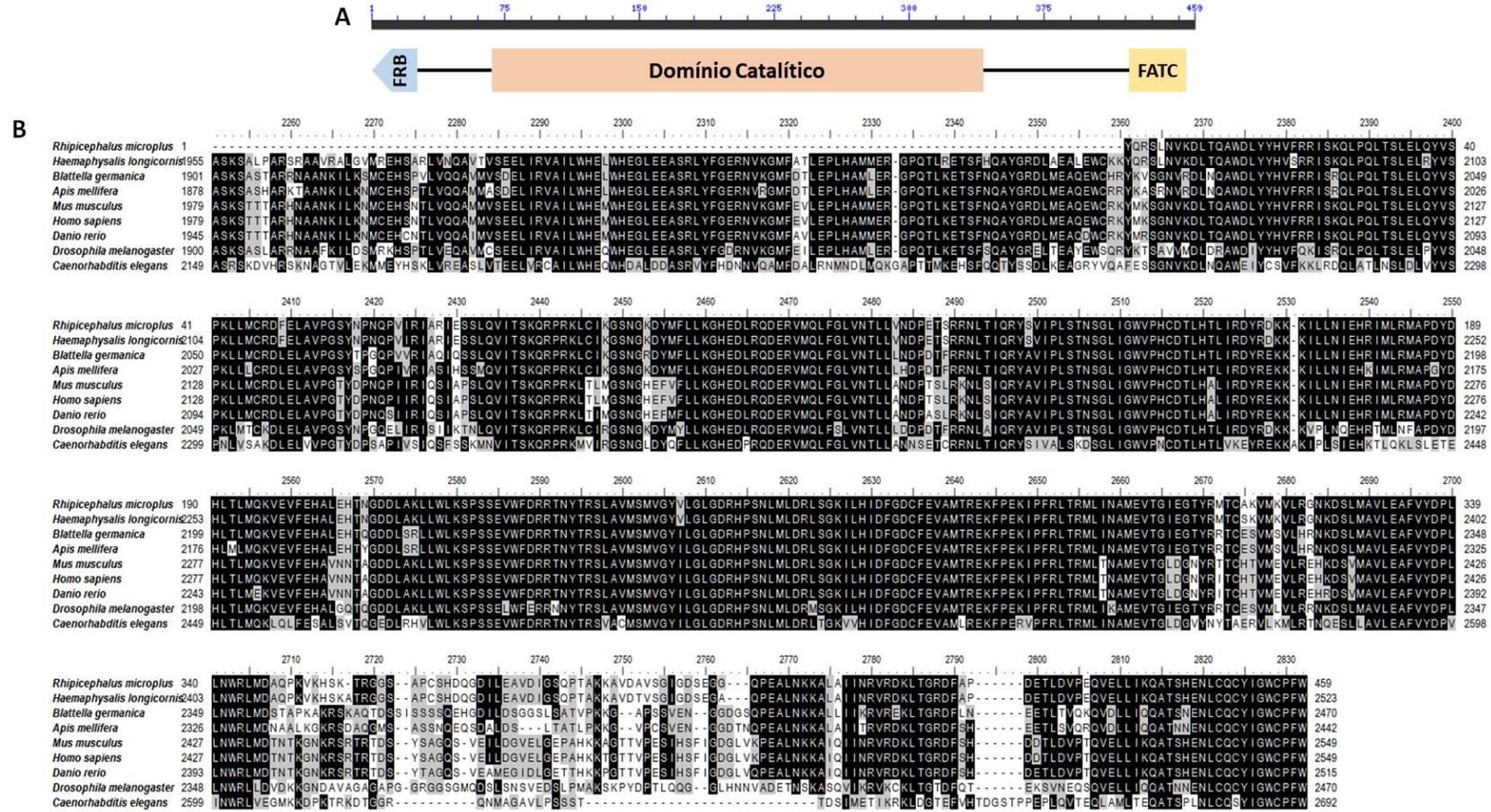


Figura 8. Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos para RmTOR.
A) Estrutura dos domínios da proteína RmTOR: o domínio de ligação a rapamicina (FKBP12 ou FRB), o domínio quinase e o domínio terminal FATC.
B) Múltiplo alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos para RmTOR com sequências ortólogas de outros organismos (*H. longicornis*, *B. germanica*, *A. melífera*, *M. musculus*, *H. sapiens*, *D. rerio*, *D. melanogaster* e *C. elegans*). Resíduos de aminoácidos idênticos ou similares em todas as sequências são marcados em preto, e resíduos idênticos ou similares na maioria das sequências destacam-se em cinza. Hífens indicam espaços introduzidos para aperfeiçoar o alinhamento.

Tabela 4. Análise comparativa entre a sequência deduzida de RmTOR com sequências ortólogas de diferentes espécies usando o algoritmo Blastp.

Organismo	ID da Sequência	% de identidade com a RmTOR
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	BAM65820.1	98%
<i>Blattella germanica</i>	ACH47049.1	83%
<i>Apis mellifera</i>	XP_006566705.2	82%
<i>Mus musculus</i>	NP_064393.2	80%
<i>Homo sapiens</i>	NP_004949.1	80%
<i>Danio rerio</i>	NP_001070679.2	80%
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_524891.1	73%
<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_491552.2	58%

Fonte: O próprio autor.

Com o objetivo de analisar as proteínas controladas pela TOR, um segundo fragmento de 425 nucleotídeos que codifica parcialmente a proteína RmS6K também foi sequenciado e analisado. A correspondente tradução contém 140 aminoácidos que compõem parte do domínio catalítico da proteína (Figura 9A). A partir do múltiplo alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos com sequências ortólogas (Figura 9B) e das porcentagens de identidade (Tabela 5) foi possível observar um grau de conservação de 44 a 78% de identidade com outras sequências.

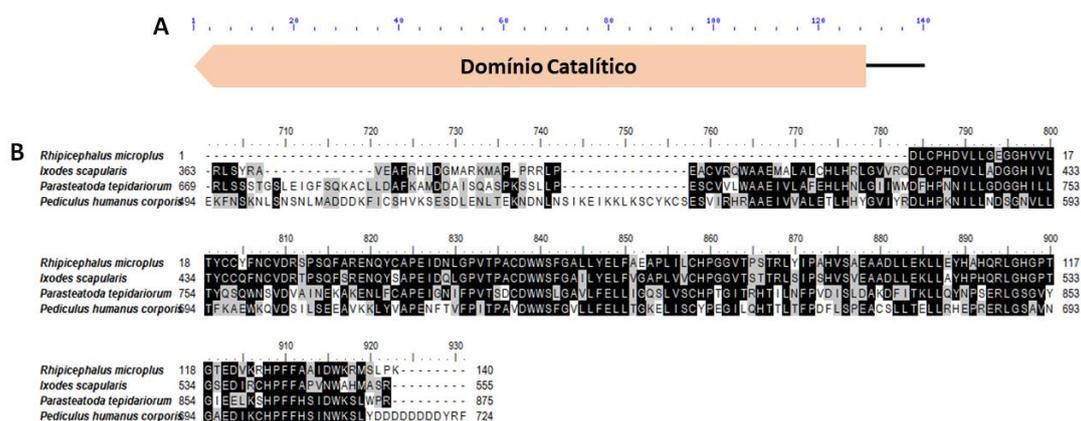


Figura 9. Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos para RmS6K.
A) Estrutura do domínio catalítico da proteína RmS6K. **B) Múltiplo alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos para RmS6K com sequências ortólogas de outros organismos (*Ixodes scapularis*, *Parasteatoda tepidariorum*, *Pediculus humanus corporis*).** Resíduos de aminoácidos idênticos ou similares em todas as sequências são marcados em preto, e resíduos idênticos ou similares na maioria das sequências destacam-se em cinza. Hífens indicam espaços introduzidos para aperfeiçoar o alinhamento.

Tabela 5. Análise comparativa entre a sequência deduzida de RmS6K com sequências ortólogas de diferentes espécies usando o algoritmo Blastp.

Organismo	ID da Sequência	% de identidade com a RmS6K
<i>Ixodes scapularis</i>	XP_002414920.1	78%
<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	XP_015918501.1	49%
<i>Pediculus humanus corporis</i>	XP_0024261134.1	44%

Fonte: O próprio autor.

Seguindo o mesmo raciocínio utilizado para análise feita para a RmS6K, o ORF completo para Rm4E-BP1 foi sequenciado. Este ORF é composto de 381 nucleotídeos e a sua correspondente sequência traduzida contém 126 aminoácidos, possuindo um peso molecular calculado de 13,3 kDa. A análise do múltiplo alinhamento com sequências ortólogas (Figura 10) e as porcentagens de identidade (Tabela 6) demonstram um grau de conservação de 40 a 74% de identidade com outras sequências.

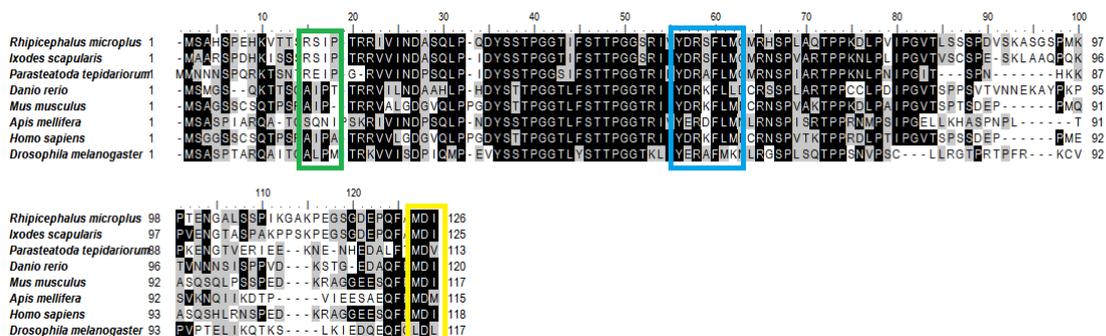


Figura 10. Múltiplo alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos para Rm4E-BP1 com sequências ortólogas de outros organismos.

As sequências ortólogas são dos organismos *Ixodes scapularis*, *Parasteatoda tepidariorum*, *D. rerio*, *M. musculus*, *A. melífera*, *H. sapiens* e *D. melanogaster*. Resíduos de aminoácidos idênticos ou similares em todas as sequências são marcados em preto, e resíduos idênticos ou similares na maioria das sequências destacam-se em cinza. Hífens indicam espaços introduzidos para aperfeiçoar o alinhamento. As caixas sinalizam conservação de três *motifs*: a verde o *motif* RAIP; a azul o *motif* YXXXXLφ; e a amarela o *motif* TOS.

Tabela 6. Análise comparativa entre a sequência deduzida de Rm4E-BP1 com sequências ortólogas de diferentes espécies usando o algoritmo Blastp.

Organismo	ID da Sequência	% de identidade com a RmTOR
<i>Ixodes scapularis</i>	XP_002404524.1	74%
<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	XP_015908828.1	52%
<i>Danio rerio</i>	NP_955939.1	52%
<i>Mus musculus</i>	NP_031944.3	54%
<i>Apis melífera</i>	XP_006569762.1	48%
<i>Homo sapiens</i>	NP_004086.1	53%
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_477295.1	40%

Fonte: O próprio autor.

Os ORFs foram depositados no banco de dados do GenBank com os códigos de identificação MK598842, MK598841 e MK598840, para RmTOR, RmS6K e Rm4E-BP1 respectivamente. Assim mesmo podem ser encontrados no Anexo 1 do presente documento. A clonagem destes alvos confirma a preservação destes componentes no carrapato *R. microplus*.

Em conjunto aos dados já publicados por Abreu e colaboradores (2009 e 2013) (Anexo 2, Figuras 1, 6, 7 e 8) com relação ao papel dos alvos RmAKT e RmGSK-3β e sua função nas células embrionárias BME26, considerou-se reconhecer outras informações fisiológicas e de controle

molecular no desenvolvimento embrionário deste artrópode para os novos alvos analisados.

Com o objetivo de avaliar se no carrapato *R. microplus* a via de sinalização insulina/TOR é estimulada e regulada por este hormônio, células embrionárias BME26 foram cultivadas na ausência ou na presença de soro fetal bovino (SFB) e então incubadas com ou sem insulina exógena. Após esta exposição, foram avaliadas as transcrições relativas para os alvos RmAKT e RmTOR, os principais alvos reguladores analisados neste estudo (Figura 11). Sobre estas condições, foi observada uma maior transcrição relativa de RmAKT e RmTOR quando as células BME26 foram incubadas na ausência de soro fetal bovino e na presença de insulina exógena, em comparação com os outros tratamentos controle. Os resultados sugerem que a insulina exógena pode estimular e regular a via de sinalização AKT/TOR no carrapato *R. microplus*.

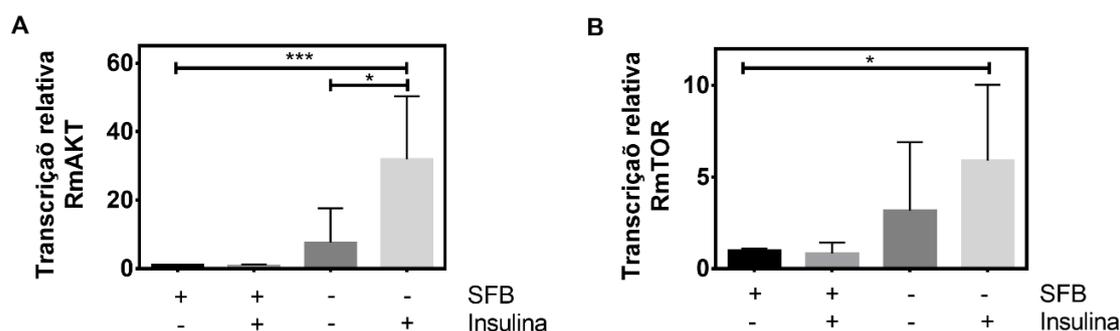


Figura 11. Efeitos da insulina exógena sobre a transcrição relativa de RmAKT (A) e RmTOR (B) nas células embrionárias BME26.

Células embrionárias BME26 foram cultivadas na ausência ou na presença de soro bovino fetal (SFB) e, posteriormente, incubadas na presença ou ausência de insulina exógena (insulina bovina 1 μ M) de acordo com o descrito em Materiais e Métodos Item 5.11. A transcrição relativa de (A) RmAKT e (B) RmTOR foi avaliada usando o método de Pfaffl (2001). O ELF-1A foi utilizado como gene de referência (NIJHOF et al., 2009). Para as análises estatísticas Teste t de Student com organização não pareada foi usado. As barras representam média \pm DP de três experimentos independentes (* = p < 0,05; *** = p < 0,0001).

De Abreu e colaboradores (2013) verificaram um importante eixo de transdução de sinal que integra o conhecimento prévio sobre a via de sinalização PI3K/AKT nas células BME26. Pode-se observar previamente que vários destes componentes estão associados com a viabilidade celular (DE ABREU et al., 2009, 2013) (Anexo 2, Figura 1 e 7).no entanto as funções

da TOR sobre este quesito não tinham sido evidenciadas. Este alvo controla vários processos para ajustar a atividade metabólica de acordo com os suprimentos disponíveis de nutrientes, incluindo tradução de proteínas, importação de glicose e autofagia em diversos organismos (BULLER et al., 2008). De posse destas informações, se buscou evidenciar funções da proteína TOR nas células BME26 (Figura 2).

Assim, células embrionárias BME26 foram tratadas durante 48 horas com rapamicina, um inibidor específico da proteína TOR, e foram desenvolvidos os seguintes experimentos: análise da viabilidade celular pelo ensaio do MTT, análise da contagem celular e marcação das células com os fluoróforos Hoechst 33342 (marcador de núcleos celulares) e iodeto de propídeo (marcador de células com a membrana celular danificada).

A análise pelo ensaio do MTT demonstrou que concentrações de rapamicina acima de 0,12 μM causaram uma redução significativa na viabilidade celular atingindo, aproximadamente, 34% de redução na concentração de 2 μM (Figura 12A). Analisando estas condições, novos ensaios com rapamicina foram feitos com o propósito de identificar a concentração necessária do fármaco que elimina 50% das células (IC_{50}). Foi observada uma redução na viabilidade celular de 46% e 49% nas concentrações de 4 e 8 μM de rapamicina, respectivamente. No entanto, nenhuma concentração atingiu ou superou o IC_{50} (Figura 12B), provavelmente por atingir a eficácia máxima do inibidor neste tipo celular. Estes resultados sugerem que mesmo que a proteína TOR esteja envolvida no processo de viabilidade celular na linhagem de células BME26, é provável que seu papel fundamental não esteja somente relacionado com este processo.

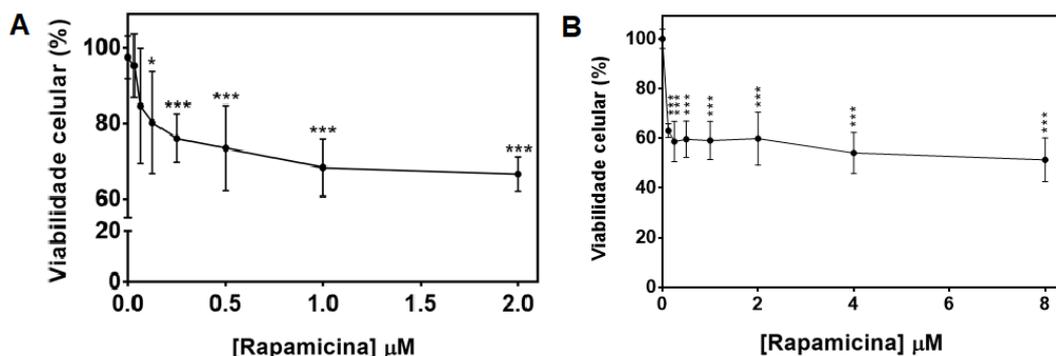


Figura 12. Viabilidade das células BME26 tratadas com rapamicina, analisada através do ensaio de MTT.

Células embrionárias BME26 foram tratadas com diferentes concentrações de rapamicina de 0,03 a 2 μM (A) e de 0,12 a 8 μM (B) durante 48 horas. A viabilidade celular foi analisada por ensaio de MTT. Os resultados foram normalizados com células controle tratadas com DMSO, que representara o 100% de viabilidade. ANOVA seguida do teste de Dunnett foram usados como métodos estadísticos. Os gráficos apresentam tendência, média \pm DP de três experimentos independentes (* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,0001$).

Adicionalmente, análises sobre o número de células foram feitas através da contagem celular. Para isto, células embrionárias BME26 foram tratadas com quatro concentrações de rapamicina que demonstraram ter algum efeito sobre a viabilidade celular no ensaio por MTT. Essas concentrações foram 0.25, 0.5, 1 e 2 μM de rapamicina. Uma redução do número de células foi observado em todos os tratamentos em que as células foram tratadas com rapamicina (Figura 13), o que mais uma vez demonstra o envolvimento da TOR no processo de viabilidade celular na linhagem BME26.

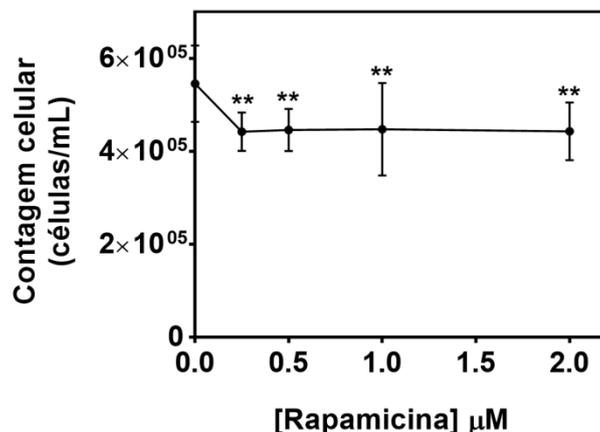


Figura 13. Contagem celular das células BME26 tratadas com rapamicina.

Células embrionárias BME26 foram tratadas com diferentes concentrações de rapamicina de 0,25 a 2 μM durante 48 horas. A quantidade de células foi analisada por contagem celular sendo que os resultados foram comparados com células tratadas com DMSO (0,073%) unicamente. ANOVA seguida do teste de Dunnett foram usados como métodos estatísticos. Os gráficos apresentam tendência, média \pm DP de três experimentos independentes (** = $p < 0,005$).

Tendo como referência os resultados obtidos da viabilidade e da contagem celular nos tratamentos com rapamicina, analisou-se a integridade membranar com o objetivo de obter uma perspectiva mais próxima dos eventos que podem estar acontecendo nas células BME26 (Figura 14). Para isso, estas células foram tratadas com quatro concentrações de rapamicina que demonstraram ter algum efeito sobre a viabilidade e a contagem celular. Essas concentrações foram 0,25, 0,5, 1 e 2 μM de rapamicina. Após 48 horas de incubação, foram usados os marcadores Hoechst 33342, para marcar ácidos nucleicos e, portanto, os núcleos de todas as células (primeira coluna da Figura 14) e iodeto de propídeo, um intercalante de DNA, para marcar os núcleos das células com a membrana parcial ou totalmente danificada (segunda coluna da Figura 14). Dessa forma, observou-se uma maior marcação com iodeto de propídeo nas células tratadas com rapamicina com relação à marcação das células controle (asteriscos da Figura 14).

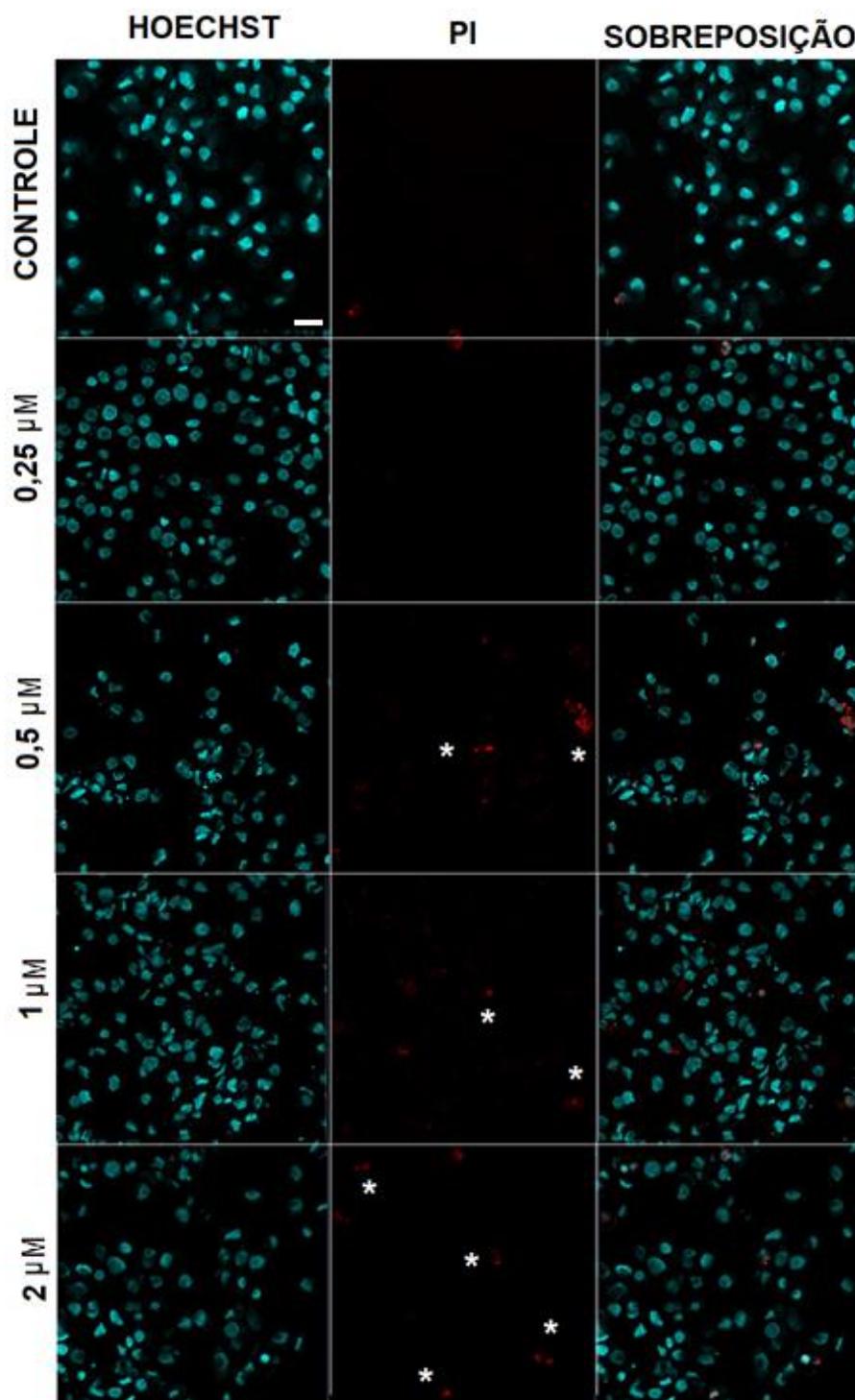
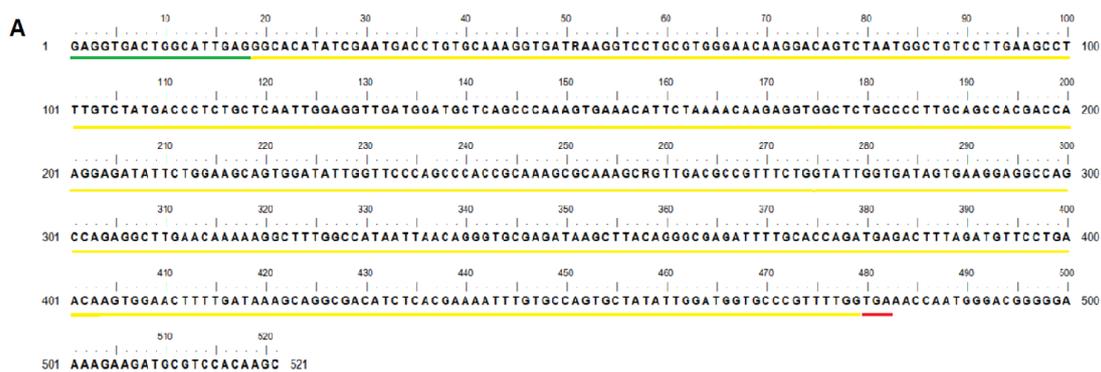


Figura 14. Análises da integridade de membrana de células BME26 tratadas com rapamicina.

As imagens foram obtidas através de microscopia confocal. A primeira coluna apresenta as marcações com Hoechst 33342, a segunda coluna apresenta as marcações com iodeto de propídeo e a terceira coluna apresenta as imagens sobrepostas das duas marcações (Hoechst 33342 e iodeto de propídeo). A primeira linha representa o tratamento controle, a segunda tratamento com 0,2 μM , a terceira com 0,5 μM , a quarta com 1 μM e a quinta com 2 μM de rapamicina, respectivamente. Asteriscos destacam maior número de células com a membrana danificada. Todas as imagens foram observadas no aumento de 400x. A barra de escala corresponde a 20 μm .

O conjunto de evidências até este ponto do trabalho demonstra um papel importante da TOR, provavelmente consorciado e/ou dependente de outros componentes, na viabilidade das células embrionárias BME26. No entanto, para aprofundar a investigação da possível interação e/ou regulação entre os componentes da via da insulina/TOR no carrapato *R. microplus*, foram feitos experimentos de silenciamento gênico de três componentes de sinalização: RmAKT, RmGSK-3 β e RmTOR em células embrionárias BME26 e avaliadas as transcrições relativas de alvos a jusante na via de sinalização. Assim quando silenciada RmAKT os alvos a jusante analisados foram RmGSK-3 β , RmTOR, RmS6K e Rm4E-BP1, quando silenciada RmGSK-3 β os alvos a jusante analisados foram RmTOR, RmS6K e Rm4E-BP1 e quando silenciada RmTOR os alvos a jusante analisados foram RmS6K e Rm4E-BP1.

Neste ponto, vale a pena destacar como foi desenvolvida a estratégia de silenciamento gênico para RmTOR. Especificamente para o desenho da *dsRNA* foram analisadas as seguintes informações: projeção de oligonucleotídeos específicos com e sem a sequência promotora T7 (apresentados na Tabela 2) baseados em análises de regiões do ORF que codificam para esta proteína (Figura 15A) e avaliação da especificidade e possíveis alvos potenciais não específicos estimados a partir do software dsCheck (NAITO et al., 2005) (Figura 15B). Como o genoma do *R. microplus* ainda não está disponível, a especificidade do *dsRNA* foi estimada a partir de um gene ortólogo em *Drosophila melanogaster*.



B **off-target candidate sequences** [\[help\]](#)

mis=0	mis=1	mis=2	name of off-target candidate sequence
499	0	0	gi 24583993 ref NM_080152.2 Drosophila melanogaster CG5092-PA (Tor) mRNA, complete cds
0	4	3	gi 24582020 ref NM_164660.1 Drosophila melanogaster CG9171-PA, isoform A (CG9171) mRNA, complete cds
0	4	3	gi 24582024 ref NM_164661.1 Drosophila melanogaster CG31912-PA (CG31912) mRNA, complete cds
0	4	3	gi 24582022 ref NM_135114.2 Drosophila melanogaster CG9171-PB, isoform B (CG9171) mRNA, complete cds
0	4	2	gi 24644931 ref NM_080111.2 Drosophila melanogaster CG2684-PA (Ids) mRNA, complete cds
0	3	5	gi 24655922 ref NM_138984.2 Drosophila melanogaster CG5712-PA (ACXD) mRNA, complete cds

Figura 15. Projeção da dsRNA para RmTOR.

A) Projeção de oligonucleotídeos específicos baseados em análises de regiões do ORF que codifica para RmTOR. Em destaque verde: oligonucleotídeos projetados; em amarelo: sequência parcial do ORF que codifica para RmTOR; em vermelho: *Stop codon* do ORF. **B)** Relatório da eficiência, especificidade e possíveis alvos potenciais não específicos da dsRNA projetada para RmTOR estimados a partir do software dsCheck.

Pode-se observar que a projeção do RNA de interferência foi baseada no extremo 5'-3' do ORF que codifica a região C-terminal da proteína RmTOR (Figura 15A). Esta região codifica o domínio FATC (Figura 8A), específico do alvo. A validação no software dsCHECK demonstrou alta eficiência e alta especificidade da estratégia do RNA de interferência para RmTOR (Figura 15B). Nos ensaios foi utilizada uma dsTOR de 521 pares de bases obtida a partir de síntese *in vitro*, de acordo com materiais e métodos item 5.2 Estratégias de síntese de dsRNA para RmAKT e RmGSK-3 β são relatadas em Fabres et al (2010) e De Abreu et al (2013) (Anexo 2, Item 2.6) respectivamente.

Sendo sintetizados e validados cada um dos dsRNAs, estes foram usados para o silenciamento gênico em células BME26. O silenciamento foi confirmado para cada um dos alvos por RT-qPCR, após exposição ao tratamento durante 24 horas (Fig. 16).

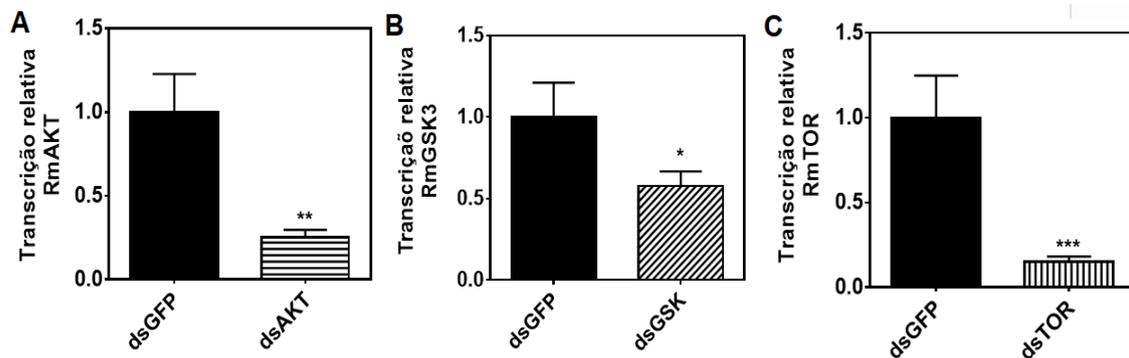


Figura 16. Expressão relativa dos genes A) RmAKT; B) RmGSK3- β e C) RmTOR em células BME26 para confirmação do silenciamento gênico por RT-qPCR.

Células embrionárias BME26 foram tratadas com 4 μ g de *dsRNA* para cada alvo regulador da via de sinalização por insulina/TOR e os controles foram tratados com dsGFP (*dsRNA* não relacionada). Após 24 horas de incubação com este tratamento, as células foram coletadas e processadas para extração de RNA e o silenciamento confirmado por RT-qPCR. A transcrição relativa foi calculada de acordo com o método de Pfaffl (2001) usando ELF-1A como gene de referência (NIJHOF et al., 2009). Os dados foram analisados em Teste t de Student não pareado. As barras apresentam a média \pm DP de três experimentos independentes (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0001$).

De posse da confirmação dos silenciamentos para os três alvos, RmAKT, RmGSK3- β e RmTOR, os próximos passos foram analisar o efeito da perturbação da sinalização da via de insulina na expressão gênica de alvos a jusante para cada um dos tratamentos (TOR, GSK-3, S6K e 4E-BP1) (Figura 17, 18 e 19). Quando as células BME26 foram tratadas com dsAKT (Figura 17), dsGSK3- β (Figura 18) e dsTOR (Figura 19) nenhuma diferença significativa foi observada nas transcrições relativas destes alvos.

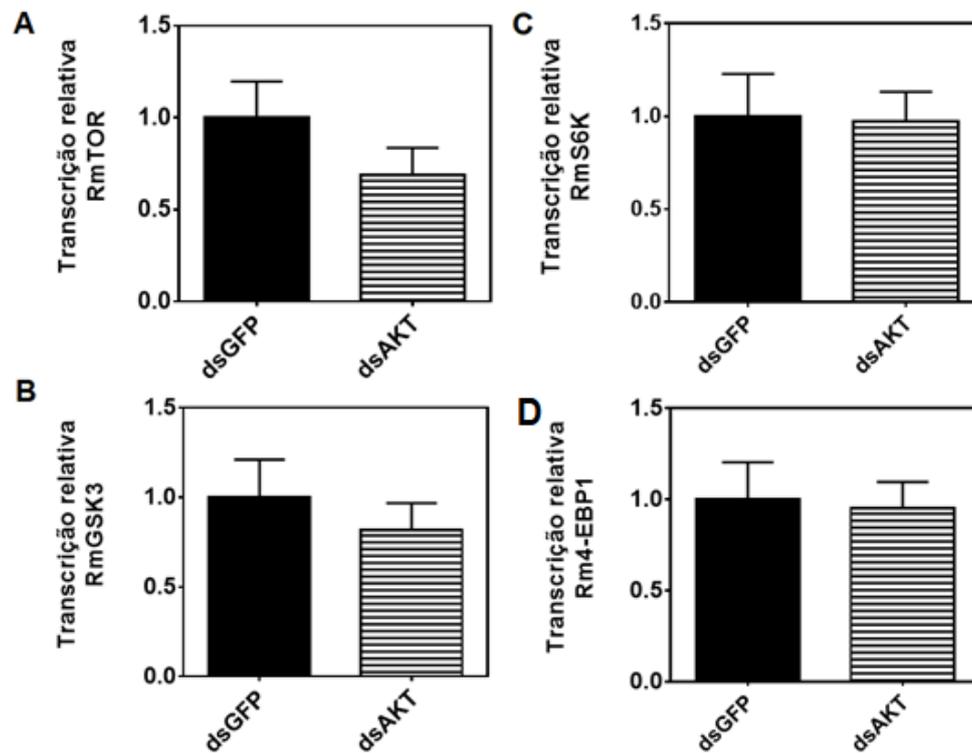


Figura 17. Expressão relativa dos alvos moleculares a jusante A) RmTOR; B) RmGSK-3; C) RmS6K; e D) Rm4E-BP1 em células BME26 tratadas com dsAKT.

Células embrionárias BME26 foram tratadas com 4 μ g de *dsRNA* AKT ou dsGFP como controle (*dsRNA* não relacionada). Após 24 horas de incubação com ambos os tratamentos, as células foram coletadas e processadas para extração de RNA e transcrições relativas para alvos a jusante foram avaliadas por RT-qPCR. A transcrição relativa foi calculada de acordo com o método de Pfaffl (2001) usando *ELF-1A* como gene de referência (NIJHOF et al., 2009). Os dados foram analisados em teste t não pareado. As barras apresentam a média \pm DP de três experimentos independentes.

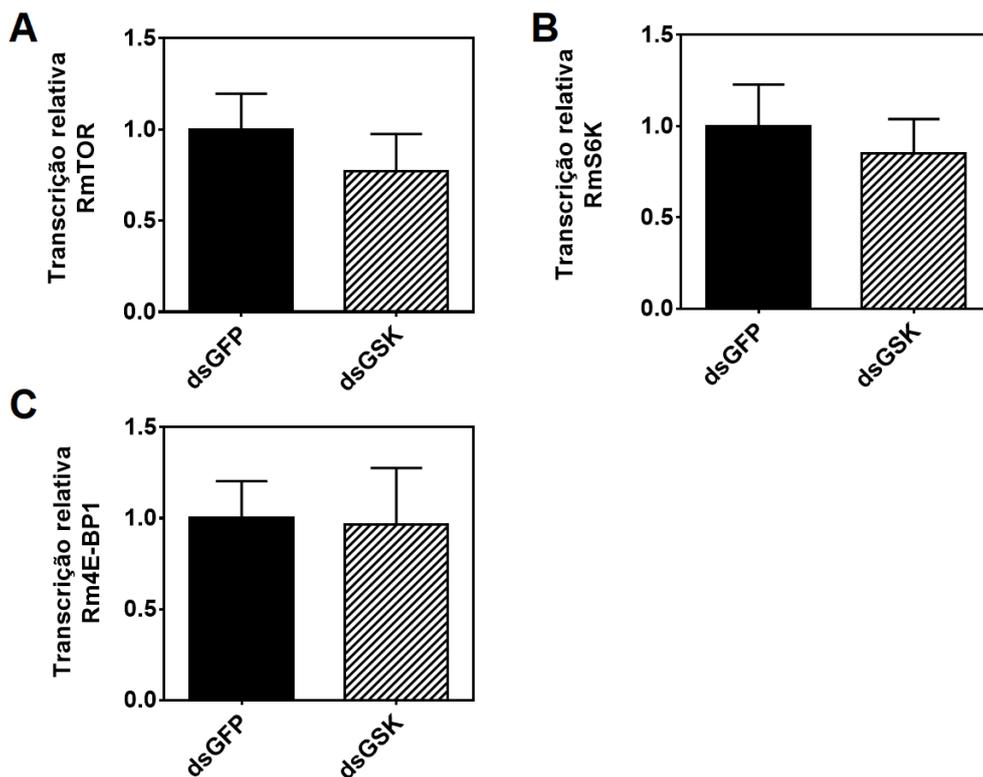


Figura 18. Expressão relativa dos alvos moleculares a jusante A) RmTOR; B) RmS6K; e C) Rm4E-BP1 em células BME26 tratadas com dsGSK-3.

Células embrionárias BME26 foram tratadas com 4 μg de *dsRNA* GSK-3 ou dsGFP como controle (*dsRNA* não relacionada). Após 24 horas de incubação com ambos o tratamento, as células foram coletadas e processadas para extração de RNA e transcrições relativas para alvos a jusante foram avaliadas por RT-qPCR. A transcrição relativa foi calculada de acordo com o método de Pfaffl (2001) usando ELF-1A como gene de referência (NIJHOF et al., 2009). Os dados foram analisados em teste t não pareado. As barras apresentam a média \pm DP de três experimentos independentes.

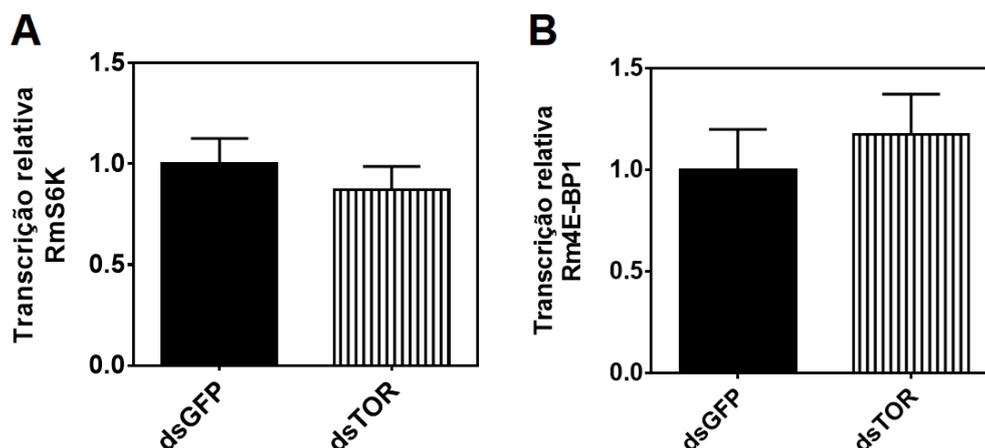


Figura 19. Expressão relativa dos alvos moleculares a jusante A) RmS6K; e B) Rm4E-BP1 em células BME26 tratadas com dsTOR.

Células embrionárias BME26 foram tratadas com 4 μg de *dsRNA* GSK-3 ou dsGFP como controle (*dsRNA* não relacionada). Após 24 horas de incubação com ambos os tratamentos, as células foram coletadas e processadas para extração de RNA e transcrições relativas para alvos a jusante foram avaliadas por RT-qPCR. A transcrição relativa foi calculada de acordo com o método de Pfaffl (2001) usando *ELF-1A* como gene de referência (NIJHOF et al., 2009). Os dados foram analisados em teste t não pareado. As barras apresentam a média \pm DP de três experimentos independentes.

O próximo conjunto de experimentos foi desenhado para avaliar os efeitos de tratamentos com inibição química para estes mesmos alvos reguladores da via de sinalização por insulina em células embrionárias BME26 (RmAKT, RmGSK-3 β e RmTOR) e, posteriormente, avaliar as transcrições relativas dos dois principais alvos a jusante da cascata, a RmS6K e a Rm4E-BP1. Desta forma, para a inibição da AKT, foi usado o inibidor químico 10-DEBC (12 μM) (Figura 20). Assim mesmo, para a inibição da GSK-3 β foi usado o inibidor químico alsterpaullone (nas concentrações de 40, 400 e 4000 nM) (Figura 21). De forma similar ao que ocorreu para o silenciamento gênico, nenhuma diferença significativa foi observada no perfil das transcrições relativas. Estes resultados sugerem que a regulação da via não acontece de forma transcricional. Resultados contrastantes foram observados quando as células BME26 foram tratadas com o inibidor específico da TOR, a rapamicina (Figura 22). O tratamento com rapamicina causou uma menor transcrição relativa da RmS6K e Rm4E-BP1 quando comparado aos tratamentos controle. Os resultados sugerem que só a proteína TOR seja capaz de regular a via de sinalização e seus alvos a

jusante através de mecanismos pós-transcricionais no carrapato *R. microplus*.

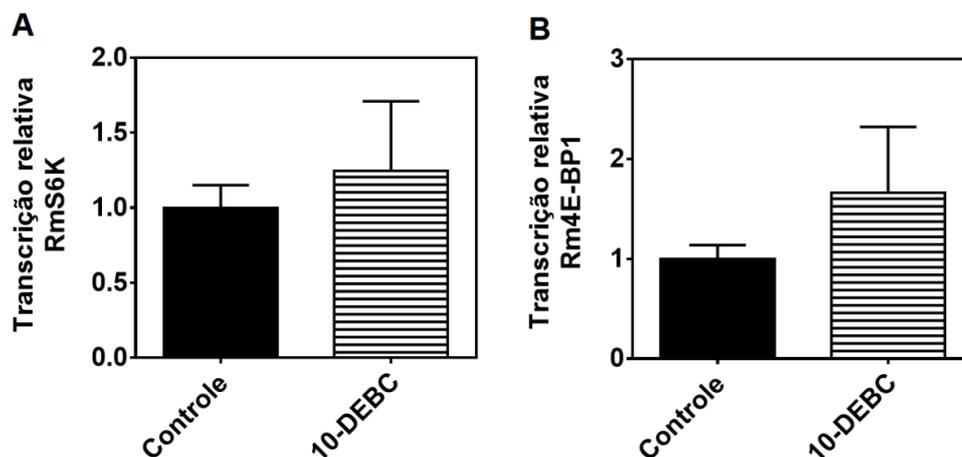


Figura 20. Expressão relativa dos alvos moleculares a jusante A) RmS6K e B) Rm4E-BP1 após inibição química da AKT em células embrionárias BME26.

Células embrionárias BME26 foram tratadas com 12 μ M de 10-DEBC ou DMSO unicamente como controle. Após 24 horas de incubação com este tratamento, as células foram coletadas e processadas para extração de RNA e transcrições relativas para alvos a jusante foram avaliadas por RT-qPCR. A transcrição relativa foi calculada de acordo com o método de Pfaffl (2001) usando ELF-1A como gene de referência (NIJHOF et al., 2009). Os dados foram analisados utilizando o Teste t de Student não pareado. As barras apresentam a média \pm DP de três experimentos independentes.

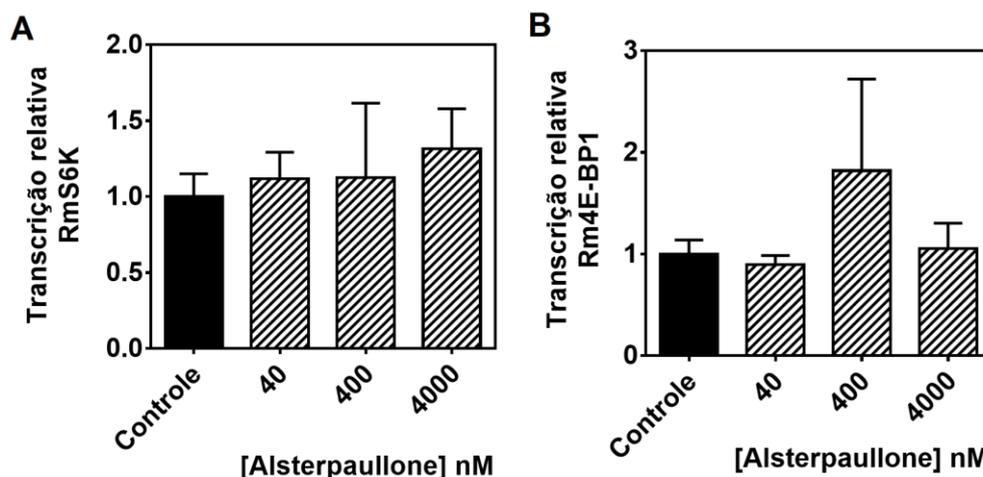


Figura 21. Expressão relativa dos alvos moleculares a jusante A) RmS6K e B) Rm4E-BP1 após inibição química da GSK-3 em células embrionárias BME26.

Células embrionárias BME26 foram tratadas com 12 μ M de 10-DEBC ou DMSO unicamente como controle. Após 24 horas de incubação com este tratamento, as células foram coletadas e processadas para extração de RNA e transcrições relativas para alvos a jusante foram avaliadas por RT-qPCR. A transcrição relativa foi calculada de acordo com o método de Pfaffl (2001) usando ELF-1A como gene de referência (NIJHOF et al., 2009). Os dados foram analisados utilizando o Teste t de Student não pareado. As barras apresentam a média \pm DP de três experimentos independentes.

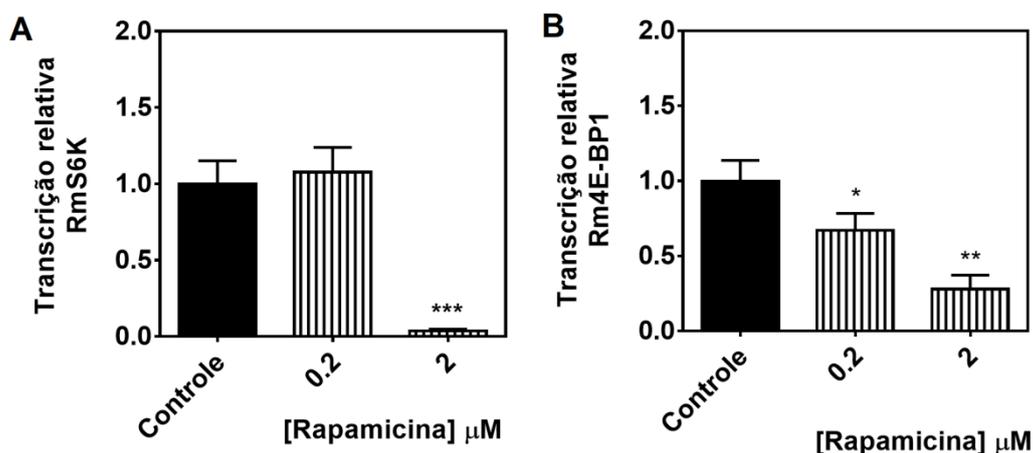


Figura 22. Expressão relativa dos alvos moleculares a jusante A) RmS6K e B) Rm4E-BP1 após inibição química da TOR em células embrionárias BME26.

Células embrionárias BME26 foram tratadas com 12 μM de 10-DEBC ou DMSO unicamente como controle. Após 24 horas de incubação com este tratamento, as células foram coletadas e processadas para extração de RNA e transcrições relativas para alvos a jusante foram avaliadas por RT-qPCR. A transcrição relativa foi calculada de acordo com o método de Pfaffl (2001) usando ELF-1A como gene de referência (NIJHOF et al., 2009). Os dados foram analisados utilizando o Teste t de Student não pareado. As barras apresentam a média ± DP de três experimentos independentes (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0001$).

Neste ponto vale a pena destacar que experimentos de Western blot para analisar a atividade dos alvos aqui estudados foram realizados; no entanto, os resultados não foram satisfatórios. Este é um problema recorrente na utilização deste organismo modelo e nosso grupo de pesquisa continua tentando ter anticorpos suficientes para desenvolver essa linha de ação.

Adicionalmente, com o objetivo de investigar o papel da via de sinalização TOR na embriogênese do carrapato *R. microplus*, foi avaliado o perfil transcricional da RmTOR, RmS6K e Rm4E-BP1 durante o desenvolvimento embrionário (Figura 23). Vale a pena destacar que análises para a RmAKT e RmGSK-3β foram publicados anteriormente pelo grupo (DE ABREU et al., 2013, Anexo 2, Figura 9 e FABRES et al., 2009). Para a análise deste resultado, três estágios do desenvolvimento embrionário foram destacados: o estágio inicial que representa do 1º ao 3º dia após a oviposição, o estágio intermediário corresponde ao 6º e 7º dia após da oviposição e o estágio final compreende do 15º ao 18º dia após da oviposição, caracterizados no Quadro 1 deste trabalho (os estágios estão representados na Figura 23A). Os maiores níveis de transcrição relativa da RmTOR foram observados no 1º, 15º e 18º dias após da oviposição,

correspondentes ao estágio inicial e final do desenvolvimento embrionário deste artrópode (Figura 23B). Um perfil similar foi observado para RmGSK-3 β (LOGULLO et al., 2009). Diferentemente, os níveis transcricionais de RmS6K e Rm4E-BP1 foram maiores no 1º dia após a oviposição e menores durante todo o restante do período de embriogênese (Figura 23C e D). Um perfil similar foi observado para RmAKT (DE ABREU et al., 2013, Anexo 2, Figura 9). Os dados indicam que há uma correlação gênica entre RmTOR, RmAKT e RmGSK-3 β durante todo o desenvolvimento embrionário do carrapato. Adicionalmente, estes genes podem estar se relacionando com a RmS6K e Rm4E-BP1 na primeira fase da embriogênese durante o processo de celularização destes embriões.

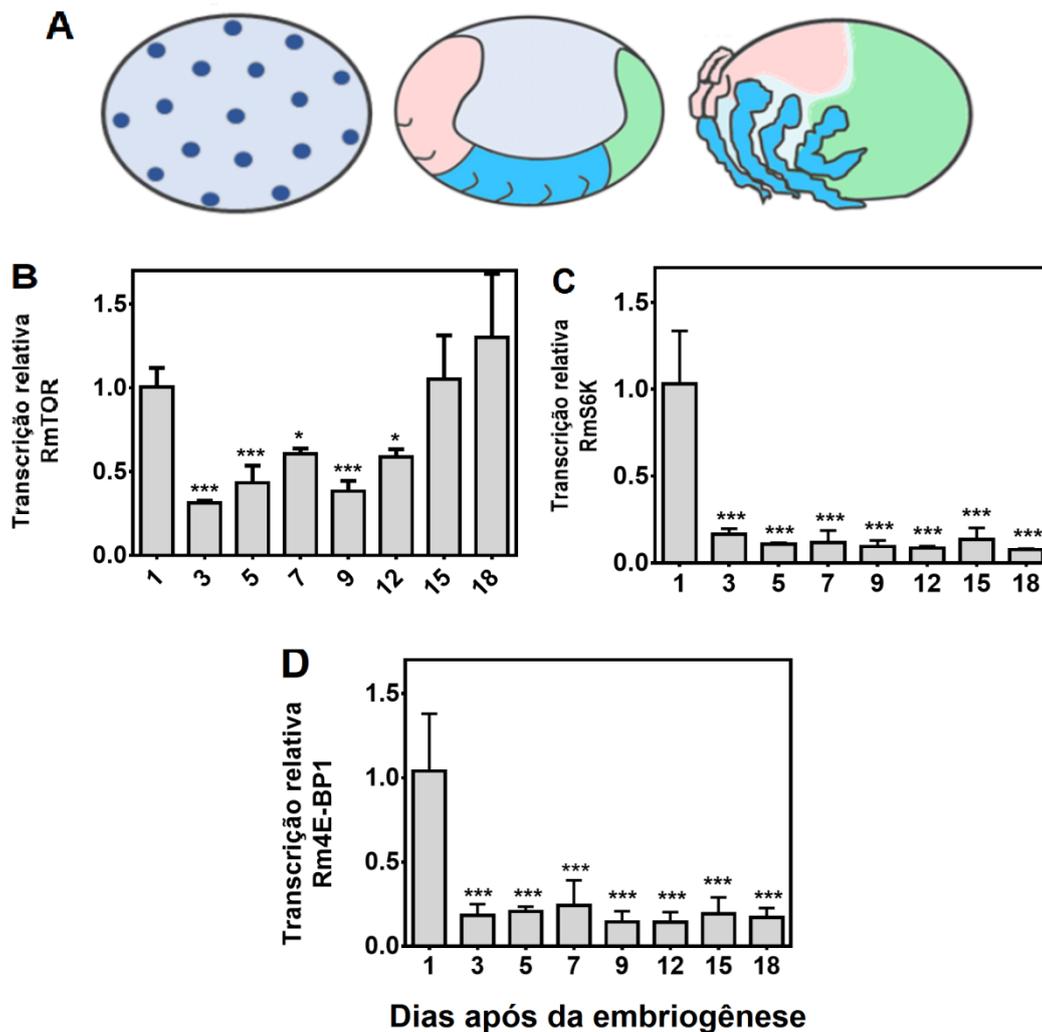


Figura 23. Representação esquemática dos estágios de desenvolvimento seguindo os dias após a oviposição e análise da expressão relativa dos alvos moleculares durante a embriogênese do carrapato *R. microplus*.

Em (A) são representadas as diferentes fases do desenvolvimento do embrião de *R. microplus* (de acordo com Santos et al., 2013) sendo um o estágio inicial, o outro o estágio intermediário e o último o estágio final. Transcrições relativas da RmTOR (B), RmS6K (C) e Rm4E-BP1 (D) durante a embriogênese também são representadas. Ovos de diferentes dias durante a embriogênese (50 mg para cada dia do desenvolvimento embrionário coletado em três momentos diferentes) foram coletados e processados para extração de RNA e síntese de cDNA. As transcrições relativas foram determinadas por RT-qPCR. A transcrição relativa foi calculada de acordo com o método de Pfaffl (2001) usando ELF-1A como gene de referência (NIJHOF et al., 2009) e os dados foram analisados por ANOVA one-way, seguido pelo teste de Dunnett, onde todas as amostras foram comparadas com o primeiro dia da embriogênese. As barras apresentam média \pm DP de três experimentos independentes (* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,0001$ comparado com o primeiro dia após a oviposição).

Com intuito de compreender melhor o papel da TOR no desenvolvimento deste carrapato, realizamos o silenciamento gênico da RmTOR em carrapatos parcialmente ingurgitados. Foi observada uma menor

transcrição relativa da RmTOR, aproximadamente 80%, em ovários de carrapatos tratados com *dsRNA* quando comparado ao grupo controle injetado com *dsGFP* (Figura 24).

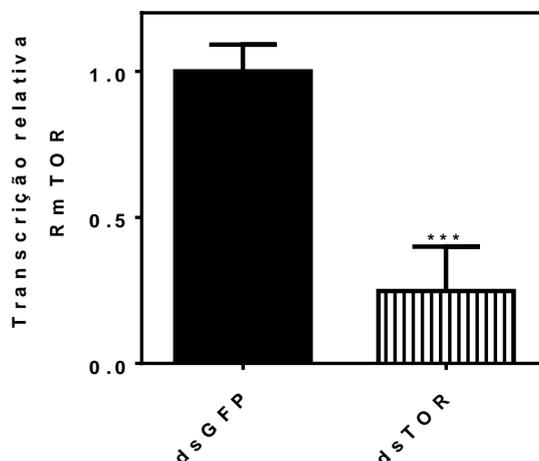


Figura 24. Expressão relativa do alvo RmTOR em fêmeas do carrapato *R. microplus* parcialmente ingurgitadas.

Fêmeas parcialmente ingurgitadas foram injetadas com 4 µg de *dsTOR* ou *dsGFP* como controle. Após 24 horas de tratamento, ovários foram dissecados e processados para extração de RNA e o silenciamento confirmado por RT-qPCR. A transcrição relativa foi calculada de acordo com o método de Pfaffl (2001) usando *ELF-1A* como gene de referência (NIJHOF et al., 2009). Os dados foram analisados utilizando Teste t de Student não pareado. As barras apresentam a média ± DP de dois experimentos independentes (***) = $p < 0,0001$).

Após checar a eficiência do silenciamento por RT-qPCR, ovários de 48 horas de tratamento com *dsTOR* foram dissecados para análises do desenvolvimento ovariano utilizando densidade de cores de imagens obtidas por microscopia (Figura 25). As fêmeas tratadas com *dsTOR* mostraram um desenvolvimento ligeiramente retardado em comparação aos controles (Figura 25). De acordo com o protocolo descrito por Seixas et al. (2008), as fêmeas injetadas com *dsTOR* tiveram ovários classificados como estágio 3 de desenvolvimento (chamado de OGP ou Fase de Crescimento Ovariano pelo nome inglês *Ovarian Growth Phase*), mais imaturos que os ovários do grupo controle PBS, classificados no estágio 4. Além disso, os ovários do grupo *dsTOR* mostraram uma proporção reduzida de folículos maduros (Figura 25, área preta em gráficos de pizza). Além disso, ovos colocados por fêmeas tratadas com *dsTOR*, *dsGFP* ou PBS foram analisados no 5º dia após do início da oviposição. Os ovos mostraram uma aparência externa

atípica, menos brilhosos e ressecados (setas vermelhas na Figura 26) quando comparados com a morfologia típica (setas pretas na Figura 26) de ovos dos grupos controle (PBS e dsGFP) (Figura 26).

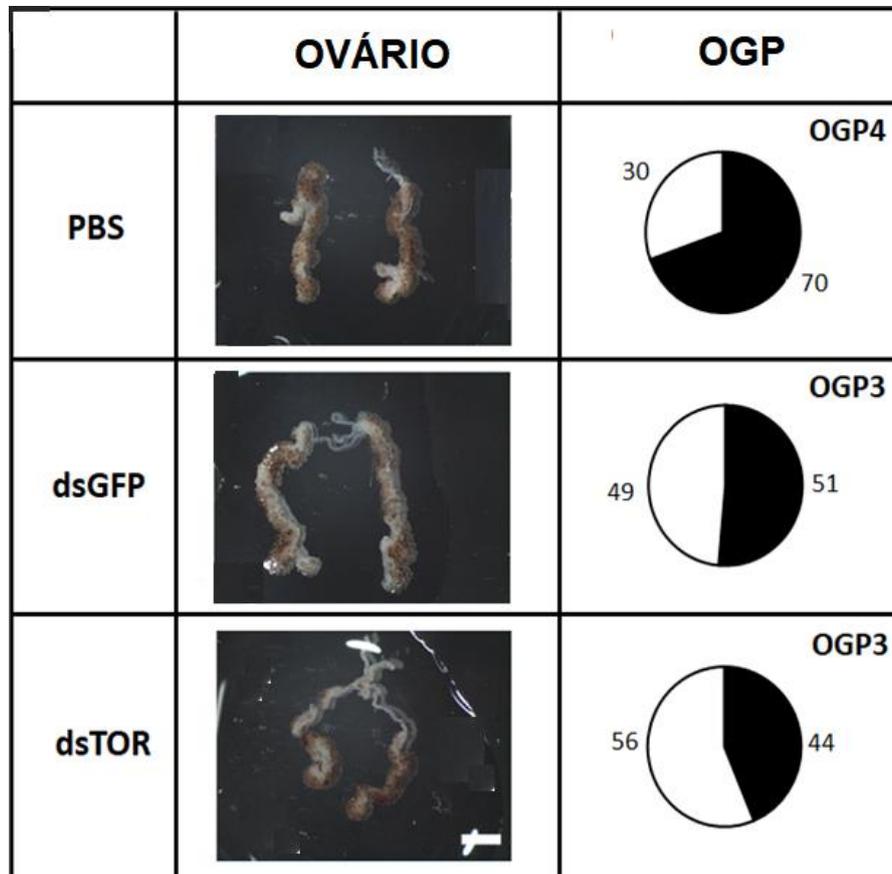


Figura 25. Desenvolvimento ovariano de fêmeas tratadas com RNAi para RmTOR.

Fêmeas parcialmente ingurgitadas foram injetadas com 4 μ g de dsTOR e foram utilizados dois controles experimentais, injetados com dsGFP e PBS. Após 48 horas de tratamento os ovários foram coletados para avaliação óptica do desenvolvimento ovariano. Os ovários foram examinados em lupa EZ4 (Leica, Alemanha) e a proporção relativa de ovócitos maduros (vitelogênicos) a imaturos (pre-vitelogênicos) foi analisada por medidas de área. A proporção de área ocupada por ovócitos maduros (vitelogênicos) se destaca em preto nos gráficos de pizza. Barra de escala: 2 mm.

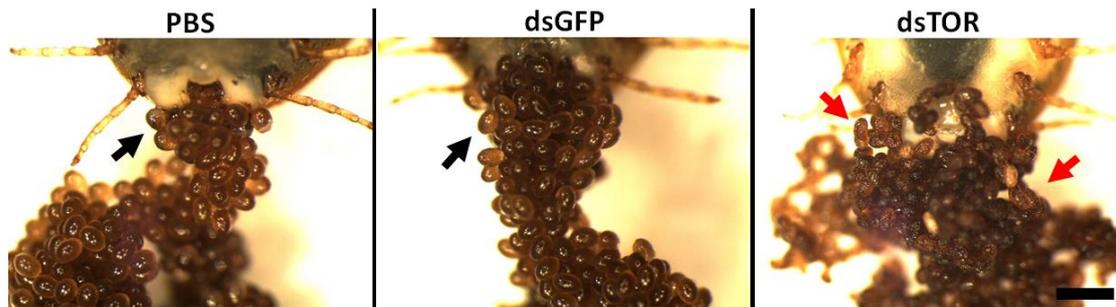


Figura 26. Observação morfológica de ovos de fêmeas tratadas com RNAi para RmTOR.

Imagens representativas da oviposição demonstram o efeito da injeção de *dsRNA* (*dsTOR*, *dsGFP* ou controle de PBS) em carrapatos parcialmente ingurgitados. Os ovos foram examinados em lupa EZ4 (Leica, Alemanha) 5 dias após do início da oviposição. Os ovos normais são indicados por setas pretas e os ovos atípicos são indicados por setas vermelhas. Barra de escala: 1 mm.

As análises do índice de eficiência nutricional (Figura 27A) demonstraram que os fenômenos observados não foram provocados pela alimentação artificial, pois todos os grupos se alimentaram homoganeamente. Além disso, o fenômeno da aparência morfológica atípica dos ovos após tratamento com *dsTOR* não demonstrou efeito sobre o peso total de ovos colocados pelas fêmeas em nenhum tratamento (Figura 27B e C).

Em contraste, uma redução significativa no peso das larvas e na taxa de eclosão foi observada após o silenciamento do gene TOR em comparação com os grupos controle após 40 dias (Figura 28), confirmando um papel fundamental da TOR na embriogênese deste carrapato.

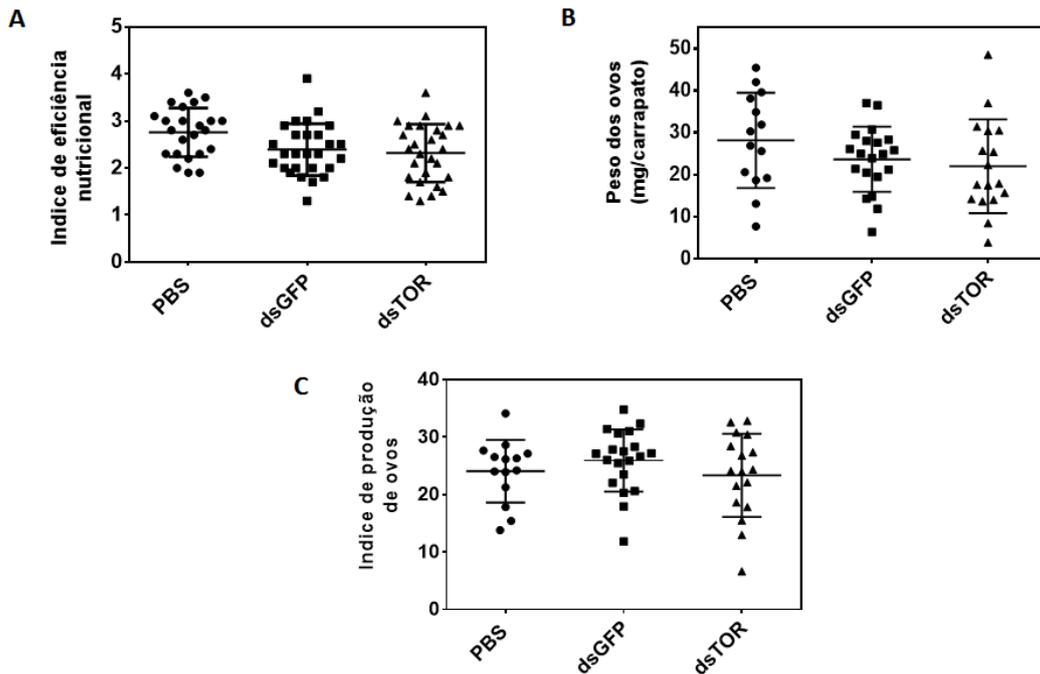


Figura 27. Índice de eficiência nutricional, peso dos ovos e índice de produção de ovos de fêmeas tratadas com RNAi.

Parâmetros biológicos foram analisados após o tratamento com *dsRNA* (dsTOR, dsGFP ou PBS) relacionados à alimentação artificial e à oviposição em fêmeas parcialmente ingurgitadas. Em (A) índice de eficácia nutricional; em (B) peso dos ovos (mg/carrapato); em (C) índice de produção de ovos para cada tratamento. Os dados foram analisados utilizando o teste ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Dunnett, onde todas as amostras foram comparadas com os controles. Se apresentam média \pm DP de dois experimentos independentes.

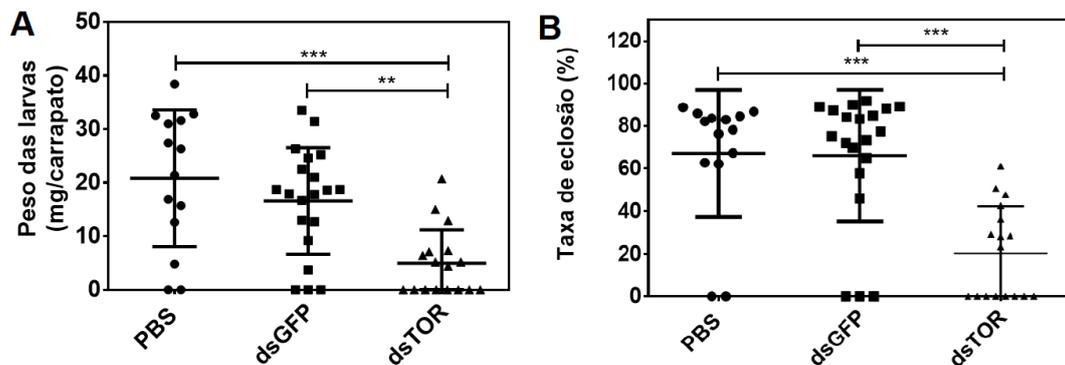


Figura 28. Efeitos do silenciamento com RNAi sobre a eclosão de larvas.

Parâmetros biológicos foram analisados após o tratamento com *dsRNA* (dsTOR, dsGFP ou PBS) relacionados a eclosão. Em (A) peso das larvas (mg/carrapato); em (B) taxa de eclosão (%). Os dados foram analisados utilizando o teste ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Dunnett, onde todas as amostras foram comparadas com os controles. Os gráficos apresentam média \pm DP de dois experimentos independentes. (** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0001$).

Na tentativa de aprofundar os estudos sobre o papel da TOR no desenvolvimento do carrapato, analisou-se a vitelogênese assumindo que este fenômeno pode ser regulado pela via de sinalização TOR/S6K, conforme descrito em outro modelo de carrapato (UMEMIYA-SHIRAFUJI et al., 2012b). Para isso, determinou-se o conteúdo de vitelina em ovos no estágio intermediário (com 9 dias após da oviposição) de fêmeas submetidas a silenciamento gênico (Figura 29), pois nesta fase o conteúdo de vitelina no ovo se faz evidente. Verificou-se uma redução significativa do conteúdo de vitelina nos ovos silenciados para RmTOR. SDS-PAGE, seguido por análises das três principais subunidades de vitelina com tamanhos entre 120, 105 e 70 kDa e dot blot demonstraram um menor teor de vitelina no estágio intermediário da embriogênese em ovos colocados por fêmeas tratadas com dsTOR quando comparado com controles (Figura 29). Da mesma forma, também observamos um menor teor de proteína total nesses ovos.



Figura 29. SDS-PAGE e dot blot anti-VT de amostras de ovos de 9 dias colocados por fêmeas tratadas com *dsRNA*.

Ovos de fêmeas tratadas com injeção de *dsRNA* (dsGFP e dsTOR) ou PBS foram coletados no estágio intermediário (9 dias após a oviposição). As amostras foram utilizadas para determinação do teor de vitelina por SDS-PAGE e dot blot.

7. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi identificado que a via de sinalização insulina/TOR está envolvida no controle da formação de ovos do carrapato *R. microplus* e conseqüentemente interfere no desenvolvimento embrionário. Este fenômeno foi demonstrado através das seguintes estratégias: (i) Análises da conservação de alvos da via através de sequenciamentos para RmTOR, RmS6K e Rm4E-BP1, ainda não descritos para este organismo, (ii) análises dos efeitos da inibição química da RmTOR sobre a viabilidade de células embrionárias do carrapato bovino BME26 através de ensaios de viabilidade e marcação com fluoróforos, (iii) análises de possíveis regulações da via de sinalização insulina/TOR nas células embrionárias BME26 através da inibição química e do silenciamento gênico dos principais alvos reguladores, (iv) análises dos perfis transcricionais dos alvos deste estudo durante a embriogênese através da análise de PCR em tempo real e (v) estudo dos efeitos do silenciamento gênico da TOR no desenvolvimento ovariano, depósito de vitelina, oviposição, desenvolvimento embrionário e taxa de eclosão.

Este estudo foi desenvolvido a partir da descrição do envolvimento da cascata de insulina no controle do metabolismo do glicogênio e na viabilidade celular desenvolvido previamente em células embrionárias BME26 (Anexo 2). Neste trabalho foram caracterizados dois alvos, também estudados nesta tese, a RmAKT e a RmGSK-3 β , fundamentais no controle do metabolismo do glicogênio durante a embriogênese do carrapato bovino (Figura 2). Previamente, verificou-se que a RmAKT e RmGSK-3 β têm transcrição relativa diferenciada durante a embriogênese, destacando-se dois picos característicos: um no início da embriogênese e outro no final (DE ABREU et al., 2013, Anexo 2, Figura 9 e FABRES et al., 2009). Dentro deste contexto, os estudos desta tese iniciaram indagando-se que correlação existiria entre a via de sinalização por insulina e a via TOR. Para isso, foi demonstrado que sequências de nucleotídeos parciais ou completas que codificam para as proteínas TOR, S6K e 4E-BP1 são conservadas no carrapato *R. microplus* (Figuras 8 a 10, Tabelas 5 a 7). Classicamente, a proteína TOR é

estruturalmente definida pela presença de vários domínios conservados, como os domínios de repetição HEAT, os domínios alvo de adesão focal (FAT), domínio de ligação a rapamicina (FKBP12 ou FRB), um domínio quinase e o domínio terminal FATC (YANG et al., 2013; MAEGAWA et al., 2015). No carrapato *R. microplus*, a sequência de aminoácidos deduzida do ORF para RmTOR foram identificados três domínios: o domínio FRB, o domínio catalítico e o domínio FATC, que demonstram ter um alto grau de identidade com sequências ortólogas (Figura 8 e Tabela 5). Os principais alvos desta proteína são a proteína ribossomal S6 (S6K) e a proteína de ligação do fator 4E iniciador da tradução em eucariotos (4E-BP1) (DOWLING et al., 2010; LAPLANTE; SABATINI, 2012; YOON, 2017), parcial ou completamente sequenciadas neste estudo (Figuras 9 e 10).

A sequência de aminoácidos deduzida do ORF para S6K possui parte do domínio catalítico conservado para este alvo (Figura 9) (HANKS; QUINN, 1991; HUNTER, 1991). De forma similar, a sequência de aminoácidos deduzida do ORF para 4E-BP1 possui três *motifs* conservados descritos na literatura: o RAIP, o TOS e o YXXXXL ϕ , que funcionam como importantes sítios regulatórios (destacados com caixas na Figura 10) (MADER et al., 1995; LAWRENCE; ABRAHAM, 1997; GINGRAS et al., 1999; SCHALM; BLENIS, 2002; TEE; PROUD, 2002). O grau de identidade destas duas proteínas foi considerado como moderado, pois a porcentagem variou entre 40 a 78% quando comparadas as sequências ortólogas (Tabela 6 e 7). No caso da 4E-BP1 vale a pena destacar que três isoformas desta proteína foram identificadas em vertebrados (PAUSE et al., 1994; ROUSSEAU et al., 1996; POULIN et al., 1998), enquanto apenas uma isoforma tem sido identificada em artrópodes (GUTZEIT et al., 1994; BERNAL; KIMBRELL, 2000; LASKO, 2000; CORMIER et al., 2001; MIRON et al., 2001; GU et al., 2011; KUME et al., 2012). No presente estudo, apenas uma isoforma da 4E-BP1 foi identificada para *R. microplus*.

Após análises sobre a conservação de alvos da via ainda não descritos na literatura, estudos foram desenvolvidos para avaliar se a TOR pode ser estimulada, positiva ou negativamente, por insulina no carrapato *R. microplus* (Figura 11B). Para isso, células embrionárias BME26 foram

expostas à insulina exógena e a transcrição relativa de dois componentes da via, RmAKT e RmTOR, foram avaliadas. Foi observado uma maior transcrição relativa dos dois alvos quando as células foram incubadas com insulina na ausência de soro fetal bovino em comparação aos tratamentos controle (Figura 11). Estes resultados sugerem que existe uma sinalização por insulina que estimula a transcrição relativa da RmAKT e da RmTOR no carrapato bovino. Essa interação entre insulina/AKT/TOR foi demonstrada anteriormente para diversos organismos (HAY; SONENBERG, 2004; MARTIN; HALL, 2005; WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006; HASSAN et al., 2013; TAKAHARA; MAEDA, 2013; HATEM et al., 2015; YOON, 2017). Também pode-se observar que a abundância de mRNA codificando para RmAKT foi mais acentuada quando comparada com a transcrição relativa da RmTOR nas mesmas condições (Figura 11). Isto pode ser atribuído à regulação direta que a insulina tem sobre RmAKT, anteriormente descrita na literatura pelo nosso grupo (DE ABREU et al., 2009, 2013). Assim, já foi demonstrado que a linhagem de células embrionárias BME26 exibe um mecanismo responsivo à insulina exógena e que o eixo insulina/RmAKT/RmGSK3- β está envolvido no metabolismo do glicogênio e na viabilidade celular, conforme mencionado anteriormente (Figura 2) (DE ABREU et al., 2009, 2013).

Estudos realizados por Riehle e Brown no mosquito *Aedes aegypti* revelaram que a insulina bovina estimula a síntese de ecdisteróides ovarianos e que este efeito foi transduzido através da via IR/PI3K/AKT (RIEHLE; BROWN *apud* KANG et al., 2008). Além dos efeitos da insulina exógena em diferentes tecidos, ILPs ou seus transcritos são detectáveis em numerosos tecidos de mosquitos, incluindo as cabeças e intestinos médios de *A. aegypti* e de *A. gambiae* (RIEHLE et al.; KRIEGER et al.; *apud* KANG et al., 2008). Em conjunto, essas observações sugeriram que a insulina ingerida com sangue poderia funcionar como um sinal para múltiplos tecidos do mosquito, para ter efeitos de longo alcance sobre a fisiologia destes artrópodes vetores (KANG et al., 2008).

Tendo como base estes estudos, considerou-se reconhecer outras informações fisiológicas e de controle molecular importantes no

desenvolvimento embrionário do carrapato *R. microplus* para os novos alvos analisados. Neste sentido, foram feitos ensaios para avaliar os efeitos da inibição química da RmTOR sobre a viabilidade celular (Figuras 12 a 14). Células BME26 tratadas com concentrações de rapamicina superiores a 0,12 μM apresentaram uma diminuição significativa na viabilidade celular quando foram feitas análises tanto com MTT como contagem celular (Figura 12 e 13). A concentração de 8 μM causou a redução de 49% da viabilidade celular; no entanto, nenhuma concentração atingiu ou superou o IC_{50} (Figura 12B). Isto provavelmente se deve a que se atingiu a eficácia máxima do inibidor neste tipo celular.

Além disso, foi observado que as células BME26 tratadas com concentrações superiores a 0.2 μM demonstraram uma maior intensidade na coloração com iodeto de propídio comparado com as células controle (Figura 14), o que sugere que o tratamento com rapamicina afeta a integridade das membranas das células tratadas. Resultados semelhantes foram descritos para linfócitos T e células endoteliais (BARILLI et al., 2008; WANG et al., 2012). Provavelmente este efeito pode ser causado pelo mecanismo de ação da rapamicina sobre a proteína TOR.

Vários efeitos tem sido demonstrado para este inibidor, tais como: promove uma parada na fase G1 do ciclo celular que bloqueia a transição de fase G1 para a fase S em fibroblastos e células B-CLL (HASHIMOLHOSSEINI et al., 1998; DECKER et al., 2003). Também pode causar a desregulação das duas proteínas efetoras da via, a S6K e a 4E-BP1, causando impacto negativo no início da tradução cap-dependente (BERETTA et al., 1996), na migração celular (POON et al., 1996), e ativando a morte celular por apoptose ou necrose (SHI et al., 1995; BARILLI et al., 2008). Em conjunto, estes resultados sugerem que mesmo que a proteína TOR esteja envolvida no processo de viabilidade celular na linhagem de células BME26 é provável que seu papel fundamental não esteja somente relacionado com este processo e sim por efeitos em cascata que afetam este e outros fenômenos, ainda não estudados neste modelo experimental.

Posteriormente, com o objetivo de estudar a interconexão entre as vias de sinalização insulina/TOR no carrapato bovino, buscou-se estudar a

transcrição de alvos a jusante quando silenciados ou inibidos alvos a montante (Figuras 17 a 22). Os resultados mostraram uma transcrição relativa menor para S6K e 4E-BP1 quando as células BME26 foram tratadas com rapamicina quando comparadas com células controle, demonstrando um efeito inibitório e sugerindo uma função potencialmente conservada da via de TOR em carrapatos (Figura 22). Neste ponto, vale a pena destacar que o tratamento com rapamicina têm permitido a investigação dos papéis da via de sinalização TOR em diversos processos, por exemplo: regulação do hormônio juvenil e expressão de vitelogenina na barata *Blattella germanica* (MAESTRO; COBO; BELLÉS, 2009); depósito de proteínas importantes para a embriogênese em fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas com sangue (GULIA-NUSS et al., 2011; PÉREZ-HEDO; RIVERA-PEREZ; NORIEGA, 2013); e regulação das proteínas S6K e 4E-BP1 em diferentes organismos artrópodes (STEWART et al., 1996; MONTAGNE et al., 1999; OLDHAM et al., 2000; UMEMIYA-SHIRAFUJI et al., 2012b).

Em contraste com o resultado anterior, não foi observada nenhuma diferença na transcrição relativa de alvos a jusante em células BME26 quando foram tratadas com os inibidores químicos de AKT ou GSK-3 β (Figuras 20 e 21), sugerindo que estas proteínas não estão envolvidas na regulação de S6K e 4E-BP1. Além disso, quando as células BME26 foram tratadas com RNAi para AKT, GSK-3 β ou TOR, a transcrição de alvos a jusante também parecem não serem afetadas (Figuras 17 a 19), sugerindo que o efeito de silenciamento gênico não foi, aparentemente, suficiente para afetar a função protéica e que a regulação ocorre, principalmente, a nível pós-transcricional, como classicamente tem sido descrito (ALI; HOEFLICH; WOODGETT, 2001; RIEHLE; BROWN, 2003; HAY; SONENBERG, 2004; SARBASSOV et al., 2005; ALBERT; HALL, 2015).

Os eventos iniciais da embriogênese caracterizam-se pela ausência de transcrição de mRNA zigóticos. Assim, dois processos acontecem durante a transição do controle do desenvolvimento de materno para o zigoto (processo chamado de *Maternal-to-zygotic transition* ou MZT) primeiro, um subconjunto de mRNAs maternos é degradado e segundo, o genoma do zigoto é ativado (DE RENZIS et al., 2007; SEMOTOK et al., 2008; TADROS; LIPSHITZ,

2009). Com o objetivo de investigar o papel da via de sinalização TOR na embriogênese do *R. microplus*, foi avaliado o perfil transcricional da RmTOR, RmS6K e Rm4E-BP1 durante o desenvolvimento embrionário deste organismo (Figura 23). Como comentado anteriormente, o perfil transcricional de RmTOR demonstra uma grande deposição de mRNA de origem materna no primeiro dia da embriogênese (Figura 23B), seguido por níveis menores de transcrição durante a fase intermediária. Quando analisadas as fases finais, em que o fechamento dorsal está acontecendo e o embrião está quase finalizando seu desenvolvimento, foi observado que os níveis de transcrição da TOR apresentam níveis maiores de transcrição equivalentes ao estágio inicial, o que sugere a transcrição zigótica deste alvo nesta fase. Um perfil similar foi observado para RmGSK-3 β (LOGULLO et al., 2009). Neste ponto, vale a pena destacar que em mosquitos, a TOR serve como uma reguladora chave para completar a vitelogênese (HANSEN et al., 2004, 2005). Estes estudos demonstraram que a inibição química da TOR com rapamicina ou depleção de genes mediada por RNAi em mosquitos adultos resulta em uma significativa regulação negativa da transcrição de vitelogenina após estímulo com aminoácidos, que afeta tanto a constituição do corpo gorduroso como o desenvolvimento dos ovos (HANSEN et al., 2004, 2005).

Com relação aos perfis transcricionais de RmS6K e Rm4E-BP1 na embriogênese do carrapato bovino (Figura 23 C e D) foram observados níveis de transcrição maiores no primeiro dia após a oviposição, seguido de níveis menores nos dias seguintes de desenvolvimento, o que sugere que o embrião depende dos transcritos de origem materna destes alvos para se desenvolver. Um perfil similar foi observado para RmAKT (DE ABREU et al., 2013, Anexo 2, Figura 9). No carrapato *H. longicornis*, a TOR controla a vitelogênese via ativação da S6 quinase (S6K) no estágio pré-oviposicional (UMEMIYA-SHIRAFUJI et al., 2012b) e a 4E-BP1 é altamente relevante para o armazenamento de lipídios durante os períodos de privação alimentar (KUME et al., 2012). Estas duas proteínas, a S6K e a 4E-BP1 também estão relacionadas ao desenvolvimento de embriões em outros modelos. Por exemplo, em *Xenopus laevis*, a atividade da S6K é maior imediatamente após a fertilização, presumivelmente por alterar a capacidade de tradução

para mRNAs que não possuem uma região 5'-TOP (SCHWAB et al., 1999). Além disso, em embriões de ouriço-do-mar, *Sphaerechinus granularis*, a dissociação de 4E-BP1 de seu alvo, o fator de iniciação eucariótica 4E (eIF4E), é funcionalmente importante para a primeira divisão mitótica (SALAÜN et al., 2004; SALAUN et al., 2005). No mosquito *Aedes aegypti*, a depleção do gene S6K mediada por RNAi demonstrou que a via TOR é necessária para o desenvolvimento de ovos de mosquitos (HANSEN et al., 2005), enquanto a depleção da 4E-BP1 afeta a longevidade e é crítica na modulação de eventos translacionais que dependem de condições nutricionais, de desenvolvimento e estresse (ROY; RAIKHEL, 2012).

Quando foram analisadas as funções da RmTOR *in vivo* usando silenciamento gênico em fêmeas parcialmente ingurgitadas, foi observado quatro fenômenos importantes: i) os ovários de fêmeas tratadas com dsTOR mostraram um desenvolvimento ligeiramente retardado em comparação com os grupos controle (Figura 25); ii) os ovos colocados por fêmeas tratadas com dsTOR mostraram uma aparência externa atípica quando observados em contraste com a morfologia típica de ovos dos grupos controle (Figura 26); iii) os ovos colocados por fêmeas tratadas com dsTOR apresentam uma redução significativa do conteúdo de vitelina assim como um menor teor de proteína total quando comparados aos ovos do grupo controle (Figura 29); e iv) o peso das larvas e a taxa de eclosão foi afetada pelo tratamento com dsTOR, pois uma redução significativa foi observada neste grupo em comparação com os grupos controle (Figura 28). Ao mesmo tempo, foi demonstrado que os efeitos observados não foram provocados pela alimentação artificial, pois todos os grupos se alimentaram homoganeamente (Figura 27A). Em conjunto estes resultados reforçam um papel fundamental da RmTOR na embriogênese do carrapato bovino *R. microplus*.

Os dados apresentados até o momento corroboram os estudos desenvolvidos em outros artrópodes. Por exemplo, em *D. melanogaster*, quando usada a tecnologia de RNAs de *hairpins* curtos (do inglês *short hairpin RNA* ou shRNA), observou-se que os ovos de fêmeas tratados com shRNA-TOR eram menores que os ovos dos grupos controle (KUHN et al., 2015), o que foi relacionado a efeitos negativos do silenciamento sobre o

catabolismo de vitelo nesta fase de desenvolvimento. No besouro da farinha, *Tribolium castaneum*, a utilização da técnica de interferência do RNA para genes envolvidos nas vias de sinalização da insulina e da TOR demonstrou que ambas cascatas desempenham papéis-chave na síntese de vitelogenina e na maturação dos ovócitos (PARTHASARATHY; PALLI, 2011). No modelo *Nilaparvata lugens*, um hemíptero que se alimenta de plantas de arroz, foi demonstrado que a via de sinalização TOR induz a biossíntese de hormônio juvenil que, por sua vez, regula a síntese de vitelogenina mediada por aminoácidos (ZHAI et al., 2015; LU et al., 2016). No modelo *Lepeophtheirus salmonis*, uma espécie de piolho de salmão, o silenciamento gênico mediado por RNAi da TOR demonstrou efeitos na maturação do ovo (SANDLUND et al., 2018). Na presente tese os resultados obtidos suportam os dados observados no mosquito *Aedes aegypti* e no carrapato *Haemaphysalis longicornis* discutidos previamente (HANSEN et al., 2004, 2005; GULIANUSS et al., 2011; UMEMIYA-SHIRAFUJI et al., 2012b).

O conjunto de dados deste trabalho demonstram que a RmTOR é importante para a reprodução do carrapato *R. microplus* e quando analisados com dados anteriores do grupo (DE ABREU et al., 2013) reforçam a hipótese que a via insulina/TOR/AKT representa um sistema regulatório decisivo na embriogênese de *Rhipicephalus microplus*. Vislumbra-se então que estes achados podem ser considerados como importantes alvos para o desenvolvimento de estratégias de controle de carrapatos no futuro. Além disso, acredita-se que estudos futuros devem ser capazes de entender os efeitos colaterais da inibição química em outros processos celulares deste carrapato na tentativa de buscar um aprofundamento deste trabalho.

CONCLUSÕES

1. Os *ORFs* da RmTOR, RmS6K e Rm4E-BP1 foram sequenciados. Quando analisados através de alinhamentos com sequências ortólogas, os alvos demonstraram identidade de 98 a 58% no caso da RmTOR, 78% e 44% para RmS6K e 74% a 40% para Rm4E-BP1.
2. Foi demonstrado que insulina exógena pode estimular a via de sinalização AKT/TOR, como relatado em outros organismos artrópodes. Assim mesmo, os alvos RmAKT e RmTOR demonstraram ser importantes na manutenção da viabilidade celular.
3. Existe um efeito inibitório da rapamicina para alvos a jusante da via de sinalização TOR, sugerindo uma função potencialmente conservada desta via em carrapatos. No entanto, quando as células BME26 foram tratadas com RNAi para AKT, GSK-3 β ou TOR, a transcrição de alvos a jusante não pareceu ser afetada sugerindo que o efeito de silenciamento gênico não foi aparentemente suficiente para afetar a função proteica e que a regulação ocorre principalmente no nível pós-transcricional.
4. O perfil transcricional de RmTOR demonstra uma grande deposição de mRNA de origem materna no primeiro dia da embriogênese, seguido por níveis menores de transcrição durante a fase intermediária. Quando analisadas as fases finais foi observado que os níveis de transcrição da RmTOR apresentam níveis maiores de transcrição equivalentes ao estágio inicial, o que sugere a transcrição zigótica deste alvo nesta fase. Com relação aos níveis transcricionais de RmS6K e Rm4E-BP1 na embriogênese do carrapato bovino foram observados níveis de transcrição maiores no primeiro dia após a oviposição, seguido de níveis menores nos dias seguintes de desenvolvimento, o que sugere que o embrião depende dos transcritos de origem materna destes alvos para se desenvolver.

5. O tratamento com dsTOR em fêmeas parcialmente ingurgitadas revelaram ovários com desenvolvimento ligeiramente retardado, os ovos ovipostos mostraram uma aparência externa atípica e redução significativa do conteúdo de vitelina assim como um menor teor de proteína total, e o peso das larvas e a taxa de eclosão foi afetada pelo tratamento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, R. Z. et al. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1–2, p. 6–20, 16 jun. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24709006>>. Acesso em: 6 mar. 2019.
- ABRÀMOFF, M.; MAGALHÃES, P.; RAM, S. Image processing with imageJ. **Biophotonics Int.**, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1117/1.3589100>>.
- ALBERT, V.; HALL, M. N. mTOR signaling in cellular and organismal energetics. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 33, p. 55–66, abr. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25554914>>. Acesso em: 7 abr. 2018.
- ALI, A.; HOEFLICH, K. P.; WOODGETT, J. R. Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. **Chemical reviews**, v. 101, n. 8, p. 2527–40, ago. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11749387>>. Acesso em: 25 mar. 2016.
- ALMAZAN, C. et al. Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 23, p. 1535–1551, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29293449>>. Acesso em: 9 mar. 2019.
- ALTINDIS, E. et al. Viral insulin-like peptides activate human insulin and IGF-1 receptor signaling: A paradigm shift for host–microbe interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 10, p. 2461–2466, 6 mar. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29467286>>. Acesso em: 3 maio. 2019.
- ARTHUR, D. **Ticks: A monograph of the Ixodoidea. On the genera Dermacentor, Anocentor, Cosmiomma, Boophilus and Margaropus**. London.: Cambridge University Press, 1960.
- BANDYOPADHYAY, G. et al. Activation of protein kinase C (alpha, beta, and zeta) by insulin in 3T3/L1 cells. Transfection studies suggest a role for PKC-zeta in glucose transport. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 4, p. 2551–8, 24 jan. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8999972>>. Acesso em: 25 mar. 2016.
- BANUMATHI, B. et al. Exploitation of chemical, herbal and nanoformulated acaricides to control the cattle tick, Rhipicephalus (Boophilus) microplus – A review. **Veterinary Parasitology**, v. 244, p. 102–110, set. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401717303217>>. Acesso em: 6 mar. 2019.
- BARILLI, A. et al. In human endothelial cells rapamycin causes mTORC2 inhibition and impairs cell viability and function. **Cardiovascular Research**, v. 78, n. 3, p. 563–571, 1 jun. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18250144>>. Acesso em: 4 maio. 2018.
- BATEMAN, J. M.; MCNEILL, H. Temporal Control of Differentiation by the Insulin Receptor/Tor Pathway in Drosophila. **Cell**, v. 119, n. 1, p. 87–96, 1 out. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15454083>>. Acesso em: 5 abr. 2019.
- BEAUCHAMP, E. M.; PLATANIAS, L. C. The evolution of the TOR pathway and its role in cancer. **Oncogene**, v. 32, n. 34, p. 3923–32, 22 ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23246968>>. Acesso

em: 31 jan. 2016.

BELL-SAKYI, L. et al. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 9, p. 450–457, 2007.

BENMIMOUN, B. et al. Dual role for Insulin/TOR signaling in the control of hematopoietic progenitor maintenance in *Drosophila*. **Development (Cambridge, England)**, v. 139, n. 10, p. 1713–7, maio 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22510984>>. Acesso em: 1 abr. 2016.

BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). II. Influence of temperature, humidity and light. **Acarologia**, v. 16, n. 2, p. 251–7, out. 1974. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4466310>>. Acesso em: 23 mar. 2016.

BERETTA, L. et al. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. **The EMBO journal**, v. 15, n. 3, p. 658–64, 1 fev. 1996. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8599949>>. Acesso em: 4 maio. 2018.

BERNAL, A.; KIMBRELL, D. A. *Drosophila* Thor participates in host immune defense and connects a translational regulator with innate immunity.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 97, n. 11, p. 6019–24, 23 maio 2000. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=18551&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3 maio. 2016.

BIFANO, T. D. et al. Knockdown of the *Rhipicephalus microplus* Cytochrome c Oxidase Subunit III Gene Is Associated with a Failure of *Anaplasma marginale* Transmission. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e98614, 30 maio 2014.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24878588>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

BRAZ, V. et al. Inhibition of energy metabolism by 3-bromopyruvate in the hard tick *Rhipicephalus microplus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 218, p. 55–61, abr. 2019.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30580107>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

BULLER, C. L. et al. A GSK-3/TSC2/mTOR pathway regulates glucose uptake and GLUT1 glucose transporter expression. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 295, n. 3, p. C836–C843, set. 2008.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650261>>. Acesso em: 3 maio. 2019.

BURGER, T. D.; SHAO, R.; BARKER, S. C. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, contains a cryptic species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 76, p. 241–253, jul. 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24685498>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

CAMPOS, E. et al. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarida: Ixodidae) embryonic development. **Veterinary parasitology**, v. 138, n. 3–4, p. 349–57, 15 jun. 2006. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569482>>. Acesso em: 21 mar. 2016.

CAMPOS, E. et al. Exopolyphosphatases in nuclear and mitochondrial fractions during embryogenesis of the hard tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 151, n. 3, p. 311–316, nov. 2008.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18706514>>. Acesso

em: 10 mar. 2019.

CANAL, C. W. et al. Changing patterns of vitellin-related peptides during development of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental & applied acarology**, v. 19, n. 6, p. 325–36, jun. 1995. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521746>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

CARVALHEIRA, J.B., ZECCHIN, H.G., SAAD, M. J. et al. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, n. 4, p. 419–425, ago. 2002.

CELL SIGNALING. **mTOR**. Disponível em:

<<http://flipper.diff.org/apprulesitems/pathways/595>>. Acesso em: 2 abr. 2019.

CHERRY, L. The accumulation and utilization of food reserves by the adult female cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Zoology**, v. 21, n. 3, p. 403, 1 jan. 1973. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/240509913_The_accumulation_and_utilization_of_food_reserves_by_the_adult_female_cattle_tick_Boophilus_microplus_Canestrini>. Acesso em: 2 jun. 2016.

CHIPPENDALE, G. Carbohydrates in reproduction and embryonic development. In: **Biochemistry of Insects**. New York: Academic Press, 1978. p. 42–45.

CHO, H. et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). **Science (New York, N.Y.)**, v. 292, n. 5522, p. 1728–31, 1 jun. 2001a. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11387480>>. Acesso em: 25 mar. 2016.

CHO, H. et al. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 42, p. 38349–52, 19 out. 2001b. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11533044>>. Acesso em: 25 mar. 2016.

CORMIER, P. et al. eIF4E Association with 4E-BP Decreases Rapidly Following Fertilization in Sea Urchin. **Developmental Biology**, v. 232, n. 2, p. 275–283, 15 abr. 2001. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11401391>>. Acesso em: 3 maio. 2018.

CROSS, D. A. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 785–9, jan. 1995.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8524413>>. Acesso em: 17 set. 2015.

DAS, D.; ARUR, S. Conserved insulin signaling in the regulation of oocyte growth, development, and maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, n. 6, p. 444–459, jun. 2017.

DE ABREU, L. A. **Sinalização por insulina em células embrionárias do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) (Canestrini, 1887)**. 2009. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2009. Disponível em:

<http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/PGBB_6667_1247247785.pdf>.

DE ABREU, L. A. et al. Exogenous insulin stimulates glycogen accumulation in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo cell line BME26 via PI3K/AKT pathway. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 153, n. 2, p. 185–90, jun. 2009.

Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096495909000633>>. Acesso em: 12 abr. 2016.

- DE ABREU, L. A. et al. 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**, v. 1830, n. 3, p. 2574–82, mar. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23274741>>. Acesso em: 26 fev. 2016.
- DE LA FUENTE, J. et al. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, p. 6938–46, 1 maio 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508706>>. Acesso em: 2 set. 2017.
- DE LA FUENTE, J. et al. Strategies for new and improved vaccines against ticks and tick-borne diseases. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 12, p. 754–769, dez. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27203187>>. Acesso em: 6 mar. 2019.
- DE LA FUENTE, J.; CONTRERAS, M. Tick vaccines: current status and future directions. **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 10, p. 1367–1376, 3 out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26289976>>. Acesso em: 6 mar. 2019.
- DE LA FUENTE, J. de la et al. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 01, p. 23–28, 13 jun. 2007. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1466252307001193/type/journal_article>. Acesso em: 9 mar. 2019.
- DE RENZIS, S. et al. Unmasking Activation of the Zygotic Genome Using Chromosomal Deletions in the *Drosophila* Embryo. **PLoS Biology**, v. 5, n. 5, p. e117, 24 abr. 2007. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0050117>>. Acesso em: 3 maio. 2019.
- DECKER, T. et al. Rapamycin-induced G1 arrest in cycling B-CLL cells is associated with reduced expression of cyclin D3, cyclin E, cyclin A, and survivin. **Blood**, v. 101, n. 1, p. 278–285, 1 jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12393642>>. Acesso em: 4 maio. 2018.
- DELLA NOCE, B. et al. Carbohydrate Metabolic Compensation Coupled to High Tolerance to Oxidative Stress in Ticks. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4753, 18 dez. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30894596>>. Acesso em: 5 abr. 2019.
- DICKSON, B. J. Development. Wiring the brain with insulin. **Science (New York, N.Y.)**, v. 300, n. 5618, p. 440–1, 18 abr. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12702863>>. Acesso em: 25 mar. 2016.
- DOBRENEL, T. et al. TOR Signaling and Nutrient Sensing. **Annual Review of Plant Biology**, v. 67, n. 1, p. 261–285, 29 abr. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26905651>>. Acesso em: 2 abr. 2019.
- DOUBE, B. M.; KEMP, D. H. The influence of temperature, relative humidity and host factors on the attachment and survival of *Boophilus microplus* (Canestrini) larvae to skin slices. **International journal for parasitology**, v. 9, n. 5, p. 449–54, out. 1979. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/528141>>. Acesso em: 24 mar. 2016.
- DOWLING, R. J. O. et al. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. **Science (New York, N.Y.)**, v. 328, n. 5982, p. 1172–6, 28 maio 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2893390&tool=pm>>

- centrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 1 mar. 2016.
- EASTON, R. M. et al. Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 5, p. 1869–78, mar. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15713641>>. Acesso em: 5 out. 2016.
- EBBERINK, R. H. M.; SMIT, A. B.; MINNEN, J. Van. The Insulin Family: Evolution of Structure and Function in Vertebrates and Invertebrates. **Biol. Bull.**, v. 177, n. 2, p. 176–182, 1989. Disponível em: <[http://www.jstor.org/stable/1541928%5Cnfiles/2658/Ebberink et al. - 1989 - The Insulin Family Evolution of Structure and Fun.pdf](http://www.jstor.org/stable/1541928%5Cnfiles/2658/Ebberink%20et%20al.%20-%201989%20-%20The%20Insulin%20Family%20Evolution%20of%20Structure%20and%20Fun.pdf)>.
- ELMADHUN, N. et al. Alcohol Consumption Improves Insulin Signaling in the Myocardium. **Surgery**, v. 154, n. 2, p. 320–327, 2013.
- ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA. **Rhipicephalus microplus Archives**. Disponível em: <<https://entomologytoday.org/tag/rhipicephalus-microplus/>>. Acesso em: 9 mar. 2019.
- ESTEVES, E. et al. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 5, p. 568–580, maio 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18405834>>. Acesso em: 4 set. 2017.
- ESTEVES, E. et al. Propagation of a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale* with appendage in a tick cell line (BME26) derived from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 1–2, p. 150–153, 6 abr. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19150177>>. Acesso em: 13 mar. 2019.
- FABRES, A. et al. Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi on tick oviposition and egg hatching. **Parasitology**, v. 137, n. 10, p. 1537–46, 26 set. 2010. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182010000284>. Acesso em: 25 mar. 2016.
- FARIAS, N. **Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina**. Guaíba: Agropecuária, 1995.
- FERREIRA, T.; RASBAND, W. **ImageJ User Guide ImageJ User Guide IJ 1.46r**. Disponível em: <<https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>>.
- FOLLI, F. et al. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 31, p. 22171–7, 5 nov. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1385396>>. Acesso em: 25 mar. 2016.
- FONSECA, R; GOMES, H; ARAÚJO, H. Aspectos morfofuncionais da embriologia dos artrópodes. In: **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. [s.l.] Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012.
- FRAME, S.; COHEN, P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. **The Biochemical journal**, v. 359, n. Pt 1, p. 1–16, 1 out. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11563964>>. Acesso em: 2 out. 2017.
- GANCZ, D.; GILBOA, L. Insulin and Target of rapamycin signaling orchestrate the development of ovarian niche-stem cell units in *Drosophila*. **Development**, v. 140, n. 20, p. 4145–4154, 15 out. 2013. Disponível em:

- <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24026119>>. Acesso em: 11 set. 2017.
- GINGRAS, A. C. et al. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. **Genes & development**, v. 13, n. 11, p. 1422–37, 1 jun. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364159>>. Acesso em: 18 abr. 2018.
- GLATTER, T. et al. Modularity and hormone sensitivity of the *Drosophila melanogaster* insulin receptor/target of rapamycin interaction proteome. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 547–547, 16 abr. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22068330>>. Acesso em: 5 abr. 2019.
- GOMES, H. et al. Identification and Structural-Functional Analysis of Cyclin-Dependent Kinases of the Cattle Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e76128, 11 out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24146826>>. Acesso em: 13 mar. 2019.
- GONSIOROSKI, A. V. et al. Anti-tick monoclonal antibody applied by artificial capillary feeding in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 4, p. 359–363, 1 abr. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489412000446?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 mar. 2018.
- GONZALES, J., SILVA, N., FRANCO, N. A vida livre do *Boophilus microplus*. **Arq. Fac. Vet.**, v. 3, p. 21–28, 1974.
- GONZÁLES, J. **O controle do carrapato do boi**. 3ª edição. ed. Porto Alegre: Universidade de Passo Fundo., 2003.
- GRAZE, R. M. et al. Perturbation of IIS/TOR signaling alters the landscape of sex-differential gene expression in *Drosophila*. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 893, 10 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30526477>>. Acesso em: 5 abr. 2019.
- GREWAL, S. S. Insulin/TOR signaling in growth and homeostasis: a view from the fly world. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 5, p. 1006–10, maio 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18992839>>. Acesso em: 8 mar. 2016.
- GU, S.-H. et al. Involvement of 4E-BP phosphorylation in embryonic development of the silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 7, p. 978–985, jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21600900>>. Acesso em: 18 abr. 2018.
- GU, S.-H. et al. TOR signaling is involved in PTTH-stimulated ecdysteroidogenesis by prothoracic glands in the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 42, n. 4, p. 296–303, abr. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22227406>>. Acesso em: 8 mar. 2016.
- GUERTIN, D. A.; SABATINI, D. M. Defining the role of mTOR in cancer. **Cancer cell**, v. 12, n. 1, p. 9–22, jul. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17613433>>. Acesso em: 13 jul. 2014.
- GULIA-NUSS, M. et al. Insulin-like peptides and the target of rapamycin pathway coordinately regulate blood digestion and egg maturation in the mosquito *Aedes aegypti*. **PLoS one**, v. 6, n. 5, p. e20401, 27 jan. 2011. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0020401>>. Acesso em: 8 mar. 2016.
- GUTZEIT, H. O. et al. Glycogen stores in mature ovarian follicles and young

embryos of *Drosophila*: ultrastructural changes and some biochemical correlates. **European journal of cell biology**, v. 63, n. 1, p. 52–60, fev. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8005105>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HANKS, S. K.; QUINN, A. M. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. **Methods in enzymology**, v. 200, p. 38–62, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1956325>>.

Acesso em: 2 mar. 2019.

HANSEN, I. A. et al. Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 29, p. 10626–31, 20 jul. 2004.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=489984&tool=pmc.entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 mar. 2016.

HANSEN, I. A. et al. Target of rapamycin-dependent activation of S6 kinase is a central step in the transduction of nutritional signals during egg development in a mosquito. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 21, p. 20565–72, 27 maio 2005. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15788394>>. Acesso em: 8 mar. 2016.

HASHEMOLHOSSEINI, S. et al. Rapamycin inhibition of the G1 to S transition is mediated by effects on cyclin D1 mRNA and protein stability. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 23, p. 14424–9, 5 jun. 1998.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9603954>>. Acesso em: 4 maio. 2018.

HASSAN, B. et al. Targeting the PI3-Kinase/Akt/mTOR Signaling Pathway. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 22, n. 4, p. 641–664, out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24012393>>.

Acesso em: 4 set. 2017.

HATEM, N. E. et al. The role of juvenile hormone and insulin/TOR signaling in the growth of *Manduca sexta*. **BMC Biology**, v. 13, n. 1, p. 44, 25 dez. 2015.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26108483>>. Acesso em: 6 mar. 2019.

HATTING, M. et al. Insulin regulation of gluconeogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1411, n. 1, p. 21–35, jan. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28868790>>. Acesso em: 1 abr. 2019.

HAY, N.; SONENBERG, N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes & development**, v. 18, n. 16, p. 1926–45, 15 ago. 2004. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15314020>>. Acesso em: 11 jul. 2014.

HORAK, I. G., CAMICAS, J., KEIRANS, J. E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari:Ixodida): a world list of valid tick names. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 28, p. 27–54, 2002.

HUNTER, T. Protein kinase classification. **Methods in Enzymology**, v. 200, p. 3–37, 1 jan. 1991. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799100125G>>.

Acesso em: 2 mar. 2019.

IBAR, C. et al. Drosophila p53-related protein kinase is required for PI3K/TOR pathway-dependent growth. **Development**, v. 140, n. 6, p. 1282–1291, 15 mar. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23444356>>. Acesso em: 5 abr. 2019.

JIA, K.; CHEN, D.; RIDDLE, D. L. The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. **Development (Cambridge, England)**, v. 131, n. 16, p. 3897–906, 15 ago. 2004. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11782415>>. Acesso em: 6 mar. 2019.

JUNG, C. H. et al. mTOR regulation of autophagy. **FEBS letters**, v. 584, n. 7, p. 1287–95, 2 abr. 2010. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2846630&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24 dez. 2015.

KAKANJ, P. et al. Insulin and TOR signal in parallel through FOXO and S6K to promote epithelial wound healing. **Nature communications**, v. 7, p. 12972, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27713427>>.

Acesso em: 5 abr. 2019.

KALIL, S. P. et al. Immune-related redox metabolism of embryonic cells of the tick *Rhipicephalus microplus* (BME26) in response to infection with *Anaplasma marginale*. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 613, 19 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29258559>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

KANG, M.-A. et al. Insulin regulates aging and oxidative stress in *Anopheles stephensi*. **The Journal of experimental biology**, v. 211, n. Pt 5, p. 741–8, mar. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18281336>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

KANNAN, K.; FRIDELL, Y.-W. C. Functional implications of Drosophila insulin-like peptides in metabolism, aging, and dietary restriction. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 288, 16 out. 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24137131>>. Acesso em: 5 abr. 2019.

KATEWA, S. D.; KAPAHI, P. Role of TOR signaling in aging and related biological processes in *Drosophila melanogaster*. **Experimental gerontology**, v. 46, n. 5, p. 382–90, maio 2011. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3058120&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 mar. 2016.

KEIRANS, J. E. Systematics of the Ixodida (Argasidae, Ixodidae, Nuttalliellidae): An overview and some problems. In: FIVAZ, B. H., PETNEY, T.N., HORAK, I. G. (Ed.). **Tick Vector Biology. Medical and Veterinary Aspects**. Ed. Springer ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1992. p. 1–21.

KEMP, D., STONE, B., B. K. Tick attachment and feeding: Role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions, and the host response. In: GALUN., O. & (Ed.). **Physiology of ticks**. Oxford: Pergamon Press Ltd, 1982. p. 119–167.

KENNEDY, B. K. et al. The Mechanistic Target of Rapamycin: The Grand Conductor of Metabolism and Aging. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 6, p. 990–1003, jun. 2016. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413116302273>>. Acesso em: 20 jul. 2016.

KIM, A.-R.; CHOI, K.-W. TRiC/CCT chaperonins are essential for organ growth by interacting with insulin/TOR signaling in *Drosophila*. **Oncogene**, 21

fev. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30792539>>. Acesso em: 5 abr. 2019.

KIM, J.; GUAN, K.-L. Amino acid signaling in TOR activation. **Annual review of biochemistry**, v. 80, p. 1001–32, jan. 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21548787>>. Acesso em: 19 fev. 2016.

KITAMURA, T. et al. Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. **Molecular and cellular biology**, v. 18, n. 7, p. 3708–17, jul. 1998. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=108953&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 mar. 2016.

KOHN, A. D. et al. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 49, p. 31372–8, 6 dez. 1996. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8940145>>. Acesso em: 3 fev. 2016.

KOTANI, K. et al. Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular and cellular biology**, v. 18, n. 12, p. 6971–82, dez. 1998.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=109280&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 mar. 2016.

KUHN, H. et al. The Atg1-Tor pathway regulates yolk catabolism in Drosophila embryos. **Development (Cambridge, England)**, v. 142, n. 22, p. 3869–78, 15 nov. 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26395483>>. Acesso em: 8 mar. 2016.

KUME, A. et al. RNAi of the translation inhibition gene 4E-BP identified from the hard tick, Haemaphysalis longicornis, affects lipid storage during the off-host starvation period of ticks. **Parasitology research**, v. 111, n. 2, p. 889–96, 23 ago. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-012-2915-9>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

KURTTI, T. J. et al. Borrelia burgdorferi in Tick Cell Culture: Growth and Cellular Adherence. **Journal of Medical Entomology**, v. 25, n. 4, p. 256–261, 1 jul. 1988. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3404544>>. Acesso em: 4 jul. 2019.

KURTTI, T. J. et al. Adhesion to and invasion of cultured tick (Acarina: Ixodidae) cells by Borrelia burgdorferi (Spirochaetales: Spirochaetaceae) and maintenance of infectivity. **Journal of medical entomology**, v. 30, n. 3, p. 586–96, maio 1993. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8510118>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 15 ago. 1970.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>>. Acesso em: 2 mar. 2019.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 2, fev. 2012. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3281571&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21 out. 2015.

LASKO, P. The drosophila melanogaster genome: translation factors and RNA binding proteins. **The Journal of cell biology**, v. 150, n. 2, p. F51-6, 24

- jul. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10908586>>. Acesso em: 18 abr. 2018.
- LAWRENCE, J. C.; ABRAHAM, R. T. PHAS/4E-BPs as regulators of mRNA translation and cell proliferation. **Trends in biochemical sciences**, v. 22, n. 9, p. 345–9, set. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9301335>>. Acesso em: 18 abr. 2018.
- LEEVERS, S. J. Growth control: invertebrate insulin surprises! **Current biology : CB**, v. 11, n. 6, p. R209-12, 20 mar. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11301264>>. Acesso em: 25 mar. 2016.
- LÉOPOLD, P. Neuronal Differentiation. **Cell**, v. 119, n. 1, p. 4–5, 1 out. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15454075>>. Acesso em: 5 abr. 2019.
- LEW-TABOR, A. E.; RODRIGUEZ VALLE, M. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 4, p. 573–585, jun. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26723274>>. Acesso em: 5 mar. 2019.
- LIETZKE, S. E. et al. Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. **Molecular cell**, v. 6, n. 2, p. 385–94, 1 ago. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10983985>>. Acesso em: 25 mar. 2016.
- LOGULLO, C. et al. Expression and activity of glycogen synthase kinase during vitellogenesis and embryogenesis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 3–4, p. 261–269, 12 maio 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030440170900082X>>. Acesso em: 12 jul. 2017.
- LONDT, J., ARTHUR, D. The structure and parasitic life cycle of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888) in South Africa (Acarina: Ixodidae). **J. Ent. Soc. Sth. Afr.**, v. 38, p. 321–340, 1975.
- LOUIS, K.; SIEGEL, A. Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. In: MARTIN J. STODDART (Ed.). **Mammalian Cell Viability**. [s.l.] Humana Press, 2011.
- LOW, V. L. et al. Molecular characterisation of the tick *Rhipicephalus microplus* in Malaysia: new insights into the cryptic diversity and distinct genetic assemblages throughout the world. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 341, 24 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26104478>>. Acesso em: 10 mar. 2019.
- LU, K. et al. TOR Pathway-Mediated Juvenile Hormone Synthesis Regulates Nutrient-Dependent Female Reproduction in *Nilaparvata lugens* (Stål). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p. 438, 28 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27043527>>. Acesso em: 15 set. 2017.
- MADER, S. et al. The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. **Molecular and cellular biology**, v. 15, n. 9, p. 4990–7, set. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7651417>>. Acesso em: 18 abr. 2018.
- MAEGAWA, K. et al. Evolutionary conservation of TORC1 components, TOR, Raptor, and LST8, between rice and yeast. **Molecular Genetics and**

- Genomics**, v. 290, n. 5, p. 2019–2030, 9 out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25956502>>. Acesso em: 2 mar. 2019.
- MAESTRO, J. L.; COBO, J.; BELLÉS, X. Target of rapamycin (TOR) mediates the transduction of nutritional signals into juvenile hormone production. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 9, p. 5506–13, 27 fev. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19106101>>. Acesso em: 8 mar. 2016.
- MARTIN, D. E.; HALL, M. N. The expanding TOR signaling network. **Current opinion in cell biology**, v. 17, n. 2, p. 158–66, abr. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15780592>>. Acesso em: 10 mar. 2016.
- MARTINS, R. et al. Non-Classical Gluconeogenesis-Dependent Glucose Metabolism in *Rhipicephalus microplus* Embryonic Cell Line BME26. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 16, n. 1, p. 1821–1839, 14 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25594873>>. Acesso em: 2 set. 2017.
- MARTINS, R. et al. The dynamics of energy metabolism in the tick embryo. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v. 27, n. 3, p. 259–266, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30133594>>. Acesso em: 28 fev. 2019.
- MATTILA, J. T. et al. Isolation of cell lines and a rickettsial endosymbiont from the soft tick *Carios capensis* (Acari: Argasidae: Ornithodorinae). **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 6, p. 1091–101, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18047211>>. Acesso em: 4 jul. 2019.
- MIRON, M. et al. The translational inhibitor 4E-BP is an effector of PI(3)K/Akt signalling and cell growth in *Drosophila*. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 6, p. 596–601, 1 jun. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11389445>>. Acesso em: 3 maio. 2018.
- MIRTH, C. K.; SHINGLETON, A. W. The roles of juvenile hormone, insulin/target of rapamycin, and ecdysone signaling in regulating body size in *Drosophila*. **Communicative & Integrative Biology**, v. 7, n. 5, p. e971568, 20 out. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26842847>>. Acesso em: 5 abr. 2019.
- MIYAZAKI, T. et al. Insulin-like peptide 3 expressed in the silkworm possesses intrinsic disulfide bonds and full biological activity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 17339, 11 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-17707-1>>. Acesso em: 3 maio. 2019.
- MONTAGNE, J. et al. *Drosophila* S6 kinase: a regulator of cell size. **Science (New York, N.Y.)**, v. 285, n. 5436, p. 2126–9, 24 set. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10497130>>. Acesso em: 27 mar. 2016.
- MORAES, J. et al. Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 146, n. 4, p. 528–33, abr. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16904922>>. Acesso em: 21 mar. 2016.
- MOURA-MARTINIANO, N. O. et al. Relative transcription of autophagy-related genes in *Amblyomma sculptum* and *Rhipicephalus microplus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 73, n. 3–4, p. 401–428, 27 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29181673>>. Acesso em: 13 mar. 2019.
- MULENGA, A.; KHUMTHONG, R. Silencing of three *Amblyomma*

americanum (L.) insulin-like growth factor binding protein-related proteins prevents ticks from feeding to repletion. **The Journal of experimental biology**, v. 213, n. Pt 7, p. 1153–61, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20228352>>. Acesso em: 18 set. 2017.

MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. Formulation of medium for tick cell culture. **Experimental & Applied Acarology**, v. 7, n. 3, p. 219–229, 1989.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of Boophilus Curtice, 1891 with Rhipicephalus Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic parasitology**, v. 56, n. 3, p. 169–72, nov. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14707501>>. Acesso em: 9 mar. 2019.

NAITO, Y. et al. dsCheck: highly sensitive off-target search software for double-stranded RNA-mediated RNA interference. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Web Server, p. W589–W591, 1 jul. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980542>>. Acesso em: 18 set. 2017.

NÄSSEL, D. R.; BROECK, J. Vanden. Insulin/IGF signaling in Drosophila and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 2, p. 271–290, 15 jan. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26472340>>. Acesso em: 1 out. 2017.

NICARETTA, J. **DINÂMICA POPULACIONAL DE Rhipicephalus microplus EM UMA REGIÃO DE CLIMA TROPICAL SEMIÚMIDO**. 2018. Universidade Federal de Goiás, 2018. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/8200/5/Dissertação - João Eduardo Nicaretta - 2018.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

NIJHOF, A. M. et al. 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**, v. 10, n. 1, p. 112, 2009. Disponível em: <<http://bmcmolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2199-10-112>>. Acesso em: 9 jul. 2017.

OLDHAM, S. et al. Genetic and biochemical characterization of dTOR, the Drosophila homolog of the target of rapamycin. **Genes & development**, v. 14, n. 21, p. 2689–94, 1 nov. 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=317036&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 mar. 2016.

OLDHAM, S.; HAFEN, E. Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. **Trends in cell biology**, v. 13, n. 2, p. 79–85, mar. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12559758>>. Acesso em: 30 mar. 2016.

PAN, H.; FINKEL, T. Key proteins and pathways that regulate lifespan. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 16, p. 6452–6460, 21 abr. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28264931>>. Acesso em: 1 abr. 2019.

PARIZI, L. F. et al. The quest for a universal vaccine against ticks: cross-immunity insights. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 194, n. 2, p. 158–65, nov. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22766309>>. Acesso em: 29 jan. 2016.

PARTHASARATHY, R.; PALLI, S. R. Molecular analysis of nutritional and hormonal regulation of female reproduction in the red flour beetle, Tribolium castaneum. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 41, n. 5, p. 294–

- 305, maio 2011. Disponível em:
 <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3066291&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 mar. 2016.
- PATTI, M.-E.; KAHN, C. R. The Insulin Receptor - A Critical Link in Glucose Homeostasis and Insulin Action. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 9, n. 2–4, p. 89–110, jan. 1998.
- PAUSE, A. et al. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. **Nature**, v. 371, n. 6500, p. 762–767, 27 out. 1994. Disponível em:
 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7935836>>. Acesso em: 3 maio. 2018.
- PÉREZ-HEDO, M.; RIVERA-PEREZ, C.; NORIEGA, F. G. The insulin/TOR signal transduction pathway is involved in the nutritional regulation of juvenile hormone synthesis in *Aedes aegypti*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 43, n. 6, p. 495–500, jun. 2013. Disponível em:
 <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3650097&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 mar. 2016.
- PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 1 maio 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>>. Acesso em: 26 jun. 2017.
- POHL, P. C. et al. In vitro establishment of ivermectin-resistant *Rhipicephalus microplus* cell line and the contribution of ABC transporters on the resistance mechanism. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 204, p. 316–322, 2014.
- POON, M. et al. Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 10, p. 2277–2283, 15 nov. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8941644>>. Acesso em: 4 maio. 2018.
- PORTE, D.; BASKIN, D. G.; SCHWARTZ, M. W. Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. **Diabetes**, v. 54, n. 5, p. 1264–76, maio 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855309>>. Acesso em: 25 mar. 2016.
- POULIN, F. et al. 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 22, p. 14002–7, 29 maio 1998. Disponível em:
 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593750>>. Acesso em: 18 abr. 2018.
- PRITCHETT, T. L.; MCCALL, K. Role of the insulin/Tor signaling network in starvation-induced programmed cell death in *Drosophila* oogenesis. **Cell death and differentiation**, v. 19, n. 6, p. 1069–79, jun. 2012. Disponível em:
 <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3354059&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 mar. 2016.
- RECK, J. et al. Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. **Research in veterinary science**, v. 86, n. 1, p. 56–62, fev. 2009. Disponível em:
 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528808001112>>. Acesso em: 2 mar. 2019.
- RIEHLE, M. A. et al. Molecular characterization of insulin-like peptides in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: expression, cellular localization, and phylogeny. **Peptides**, v. 27, n. 11, p. 2547–60, nov. 2006. Disponível em:
 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16934367>>. Acesso em: 19 set. 2016.

- RIEHLE, M. A.; BROWN, M. R. Molecular analysis of the serine/threonine kinase Akt and its expression in the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect molecular biology**, v. 12, n. 3, p. 225–32, jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12752655>>. Acesso em: 12 abr. 2016.
- RODRÍGUEZ-MALLON, A. Developing Anti-tick Vaccines. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l.: s.n.]1404p. 243–259.
- RODRIGUEZ-VIVAS, R. I. I. et al. Evolution of acaricide resistance: phenotypic and genotypic changes in field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in response to pyrethroid selection pressure. **International journal for parasitology**, v. 41, n. 8, p. 895–903, jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21570981>>. Acesso em: 23 mar. 2016.
- RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; JONSSON, N. N.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology research**, v. 117, n. 1, p. 3–29, jan. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29152691>>. Acesso em: 9 mar. 2019.
- RODRÍGUEZ, M. et al. High level expression of the B. *microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **Journal of Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 135–146, 31 mar. 1994. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168165694901066?via%3Dihub>>. Acesso em: 9 mar. 2019.
- ROSA, R. D. et al. Exploring the immune signalling pathway-related genes of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: From molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 59, p. 1–14, jun. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26724380>>. Acesso em: 5 abr. 2019.
- ROUSSEAU, D. et al. The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth. **Oncogene**, v. 13, n. 11, p. 2415–20, 5 dez. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8957083>>. Acesso em: 18 abr. 2018.
- ROY, S. G.; RAIKHEL, A. S. Nutritional and hormonal regulation of the TOR effector 4E-binding protein (4E-BP) in the mosquito *Aedes aegypti*. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 26, n. 3, p. 1334–42, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3289498&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 mar. 2016.
- SAAD, M. J. et al. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 90, n. 5, p. 1839–49, nov. 1992. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=443244&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 mar. 2016.
- SAAD, M. J. et al. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. **The Journal of clinical investigation**, v. 92, n. 4, p. 2065–72, out. 1993. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=288376&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 mar. 2016.
- SABERS, C. J. et al. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin

complex in mammalian cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 2, p. 815–22, 13 jan. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7822316>>. Acesso em: 27 mar. 2016.

SALAÜN, P. et al. Embryonic-stage-dependent changes in the level of eIF4E-binding proteins during early development of sea urchin embryos. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 7, p. 1385–1394, 1 abr. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15769855>>. Acesso em: 3 maio. 2018.

SALAÜN, P. et al. Signal transduction pathways that contribute to CDK1/cyclin B activation during the first mitotic division in sea urchin embryos. **Experimental Cell Research**, v. 296, n. 2, p. 347–357, 10 jun. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15149864>>. Acesso em: 3 maio. 2018.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3a Edição. ed. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2001.

SANDLUND, L. et al. Molecular characterization and functional analysis of components of the TOR pathway of the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1838). **Experimental Parasitology**, abr. 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489418300031>>. Acesso em: 7 abr. 2018.

SANTOS, V. T. et al. The embryogenesis of the tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*: the establishment of a new chelicerate model system. **Genesis (New York, N.Y. : 2000)**, v. 51, n. 12, p. 803–18, dez. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24166799>>. Acesso em: 15 maio. 2016.

SARAMAGO, L. et al. Inhibition of Enzyme Activity of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* Triosephosphate Isomerase and BME26 Cell Growth by Monoclonal Antibodies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 13118–13133, 12 out. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23202941>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

SARAMAGO, L. et al. Novel and Selective *Rhipicephalus microplus* Triosephosphate Isomerase Inhibitors with Acaricidal Activity. **Veterinary Sciences**, v. 5, n. 3, p. 74, 23 ago. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30142944>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

SARBASSOV, D. D. et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science (New York, N.Y.)**, v. 307, n. 5712, p. 1098–101, 18 fev. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15718470>>. Acesso em: 13 jul. 2014.

SAUCEDO, L. J. et al. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. **Nature Cell Biology**, v. 5, n. 6, p. 566–571, 27 jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12766776>>. Acesso em: 5 abr. 2019.

SCHALM, S. S.; BLENIS, J. Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. **Current biology : CB**, v. 12, n. 8, p. 632–9, 16 abr. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11967149>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

SCHETTERS, T. et al. Cattle tick vaccine researchers join forces in CATVAC. **Parasites & vectors**, v. 9, p. 105, 24 fev. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26911668>>. Acesso em: 6 mar. 2019.

SCHWAB, M. S. et al. p70(S6K) controls selective mRNA translation during oocyte maturation and early embryogenesis in *Xenopus laevis*. **Molecular**

- and cellular biology**, v. 19, n. 4, p. 2485–94, abr. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10082514>>. Acesso em: 3 maio. 2018.
- SEIXAS, A. et al. Rhipicephalus (Boophilus) microplus embryo proteins as target for tick vaccine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 148, n. 1–2, p. 149–156, 15 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21620488>>. Acesso em: 28 fev. 2019.
- SEIXAS, A. et al. Expression profile of Rhipicephalus microplus vitellogenin receptor during oogenesis. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 1, p. 72–81, jan. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29054547>>. Acesso em: 28 fev. 2019.
- SEIXAS, A.; FRIESEN, K. J.; KAUFMAN, W. R. Effect of 20-hydroxyecdysone and haemolymph on oogenesis in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, n. 7, p. 1175–1183, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18634796>>. Acesso em: 26 jun. 2017.
- SEMOTOK, J. L. et al. Measuring mRNA Stability During Early *Drosophila* Embryogenesis. In: **Methods in enzymology**. [s.l.: s.n.]448p. 299–334.
- SHEPHERD, P. R.; NAVÉ, B. T.; SIDDLE, K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. **The Biochemical journal**, v. 305 (Pt 1, p. 25–8, 1 jan. 1995. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1136424&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 mar. 2016.
- SHI, Y. et al. Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro. **Cancer research**, v. 55, n. 9, p. 1982–8, 1 maio 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7728769>>. Acesso em: 4 maio. 2018.
- SHOR, B. et al. Targeting mTOR globally in cancer: thinking beyond rapamycin. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 8, n. 23, p. 3831–7, 28 dez. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19901542>>. Acesso em: 10 mar. 2016.
- SMYKAL, V.; RAIKHEL, A. S. Nutritional Control of Insect Reproduction. **Current opinion in insect science**, v. 11, p. 31–38, 1 out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26644995>>. Acesso em: 1 jun. 2019.
- SONENSHINE, D. **Biology of ticks**. New York: Oxford University Press, 1991. v. 1
- SOULARD, A.; COHEN, A.; HALL, M. N. TOR signaling in invertebrates. **Current opinion in cell biology**, v. 21, n. 6, p. 825–36, dez. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19767189>>. Acesso em: 28 jan. 2016.
- STEWART, M. J. et al. The *Drosophila* p70s6k homolog exhibits conserved regulatory elements and rapamycin sensitivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 20, p. 10791–6, 1 out. 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38234&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 mar. 2016.
- TABOR, A. E. et al. Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*-Host Interface: A Review of Resistant and Susceptible Host Responses. **Frontiers in Cellular**

- and Infection Microbiology**, v. 7, p. 506, 11 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29322033>>. Acesso em: 28 fev. 2019.
- TADROS, W.; LIPSHITZ, H. D. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. **Development (Cambridge, England)**, v. 136, n. 18, p. 3033–42, 15 set. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19700615>>. Acesso em: 3 maio. 2019.
- TAKAHARA, T.; MAEDA, T. Evolutionarily conserved regulation of TOR signalling. **Journal of biochemistry**, v. 154, n. 1, p. 1–10, 1 jul. 2013. Disponível em: <<http://jb.oxfordjournals.org/content/154/1/1.long>>. Acesso em: 3 maio. 2016.
- TEE, A. R.; PROUD, C. G. Caspase cleavage of initiation factor 4E-binding protein 1 yields a dominant inhibitor of cap-dependent translation and reveals a novel regulatory motif. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 6, p. 1674–83, mar. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11865047>>. Acesso em: 18 abr. 2018.
- THOMSON, A. W.; TURNQUIST, H. R.; RAIMONDI, G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 5, p. 324–337, maio 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2847476&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13 nov. 2015.
- THOREEN, C. C. et al. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 12, p. 8023–32, 20 mar. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19150980>>. Acesso em: 28 set. 2015.
- TOIVONEN, J. M.; PARTRIDGE, L. Endocrine regulation of aging and reproduction in *Drosophila*. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 299, n. 1, p. 39–50, 5 fev. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18682271>>. Acesso em: 5 abr. 2019.
- TSCHOPP, O. et al. Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. **Development (Cambridge, England)**, v. 132, n. 13, p. 2943–54, 1 jul. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15930105>>. Acesso em: 1 out. 2017.
- UMEMIYA-SHIRAFUJI, R. et al. Akt is an essential player in regulating cell/organ growth at the adult stage in the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 3, p. 164–173, mar. 2012a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174811002116>>. Acesso em: 16 ago. 2016.
- UMEMIYA-SHIRAFUJI, R. et al. Target of rapamycin (TOR) controls vitellogenesis via activation of the S6 kinase in the fat body of the tick, *Haemaphysalis longicornis*. **International journal for parasitology**, v. 42, n. 11, p. 991–8, out. 2012b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22985802>>. Acesso em: 27 mar. 2016.
- VARMA, M. G.; PUDNEY, M.; LEAKE, C. J. The establishment of three cell lines from the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) and their infection with some arboviruses. **Journal of medical entomology**, v. 11, n. 6, p. 698–706, 10 jan. 1975. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1123829>>. Acesso em: 5 abr. 2019.

- VITAL, W. et al. Germ band retraction as a landmark in glucose metabolism during *Aedes aegypti* embryogenesis. **BMC developmental biology**, v. 10, n. 1, p. 25, 25 jan. 2010. Disponível em: <<http://bmcdevbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-213X-10-25>>. Acesso em: 2 abr. 2016.
- WAGLAND, B. M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animal. **Aust. J. Agri. Res.**, v. 29, p. 401–409, 1978.
- WANG, B. et al. Rapamycin inhibiting Jurkat T cells viability through changing mRNA expression of serine/threonine protein phosphatase 2A. **Transplant Immunology**, v. 26, n. 1, p. 50–54, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22061624>>. Acesso em: 3 maio. 2018.
- WHITE, M. F.; YENUSH, L. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. **Recent progress in hormone research**, v. 53, p. 119–38, jan. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9769706>>. Acesso em: 4 fev. 2016.
- WILLADSEN, P. et al. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v. 110 Suppl, p. S43-50, jan. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7784128>>. Acesso em: 3 jun. 2016.
- WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. **Parasitology**, v. 129 Suppl, p. S367-87, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15938519>>. Acesso em: 6 mar. 2019.
- WOODGETT, J. R. Regulation and functions of the glycogen synthase kinase-3 subfamily. **Seminars in cancer biology**, v. 5, n. 4, p. 269–75, ago. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7803763>>. Acesso em: 25 mar. 2016.
- WU, P.; HU, Y.-Z. PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in cancer: a perspective on clinical progress. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 35, p. 4326–41, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20939811>>. Acesso em: 10 mar. 2016.
- WU, Q.; BROWN, M. R. SIGNALING AND FUNCTION OF INSULIN-LIKE PEPTIDES IN INSECTS. **Annual Review of Entomology**, v. 51, n. 1, p. 1–24, jan. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16332201>>. Acesso em: 11 set. 2017.
- WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 471–84, 10 fev. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16469695>>. Acesso em: 23 maio. 2014.
- YANG, H. et al. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. **Nature**, v. 497, n. 7448, p. 217–223, 1 maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23636326>>. Acesso em: 2 mar. 2019.
- YOON, M.-S. The Role of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Insulin Signaling. **Nutrients**, v. 9, n. 11, p. 1176, 27 out. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29077002>>. Acesso em: 6 mar. 2019.
- ZAYTSEVA, Y. Y. et al. mTOR inhibitors in cancer therapy. **Cancer letters**, v. 319, n. 1, p. 1–7, 1 jun. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22261336>>. Acesso em: 16 fev. 2016.
- ZHAI, Y. et al. Activation of the TOR Signalling Pathway by Glutamine Regulates Insect Fecundity. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 10694, 29 jan.

2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26024507>>.

Acesso em: 3 maio. 2016.

ZIVKOVIC, Z. et al. Differential expression of genes in salivary glands of male *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in response to infection with *Anaplasma marginale*. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 186, 18 mar. 2010. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20298599>>. Acesso em: 5 abr. 2019.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 1, p. 21–35, jan. 2011. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3390257&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13 jul. 2014.

ANEXOS

ANEXO 1

Sequências de nucleotídeos e aminoácidos da RmTOR, RmS6K e Rm4E-BP1 depositadas no Genbank

- RmTOR (Código MK598842)

Sequência de nucleotídeos:

GTACCAGCGTTCCTTGAATGTCAAAGATCTCACTCAAGCTTGGGACCTCT
ACTACCACGTGTTCCGTGCGATCTCCAAGCAACTGCCACAGCTCACCTC
CCTGGAGCTGCAGTACGTGTCACCAAAGCTCCTCATGTGCCGTGACTTT
GAGCTGGCCGTGCCCGGCAGCTACAATCCAAACCAGCCTGTCATCCGC
ATTGCTCGCATTGAGAGTTCACTCCAGGTCATCACCAGCAAACAGAGGC
CCAGGAAGTTGTGCATCAAGGGGAGCAATGGCAAAGACTACATGTTCTT
GTTGAAGGGGCATGAAGACTTGAGGCAAGATGAAAGAGTGATGCAGCTG
TTTGGCCTTGTCAATACTGCTTGTGAATGACCCAGAAACATCACGTAG
GAATCTGACTATTCAGCGCTACTCAGTCATCCCGTTGTCCACAAACAGTG
GGCTCATTGGCTGGGTGCCTCACTGTGACACTCTGCATACGCTCATTG
AGATTACAGGGACAAAAAGAAGATTTTGCTCAACATTGAACACCGAATTA
TGCTAAGGATGGCACCAGACTATGATCACCTGACTCTCATGCAAAAGGT
GGAGGTCTTTGAGCACGCTCTTGAACACACCAATGGGGATGACCTAGCC
AAGCTACTCTGGCTGAAGAGCCCCAGCTCAGAGGTGTGGTTTGATCGGC
GCACCAACTACACGAGGTCATTGGCTGTCATGTCCATGGTCCGGCTACGT
ACTTGGACTTGGAGACAGGCATCCTTCCAACCTTAATGTTGGACCGGTTG
AGTGGAAGATTCTGCACATAGACTTTGGAGACTGCTTTGAAGTTGCCAT
GACACGTGAGAAGTTTCCAGAGAAAATTCCTTTTCGACTCACCAGGATGC
TCATCAATGCCATGGAGGTGACTGGCATTGAGGGCACATATCGAATGAC
CTGTGCAAAGGTGATGAAGGTCTGCGTGGGAACAAGGACAGTCTTATG
GCTGTCCTTGAAGCCTTTGTCTATGACCCTCTGCTCAATTGGAGGTTGAT
GGATGCACAGCCCCAAAGTGAAACATTCTAAAACAAGAGGTGGCTCTGCC
CCTTGCAGCCACGACCAAGGAGATATTCTGGAAGCAGTGGATATTGGTT

CCCAGCCCACCGCAAAGAAAGCAGTTGACGCCGTTTCTGGTATTGGTGA
TAGTGAAGGAGGCCAGCCAGAGGCTCTGAACAAAAAGGCTTTGGCCATA
ATTAACAGGGTGCGAGATAAGCTTACAGGGCGAGATTTTCGCACCAGATG
AGACTTTGGATGTTCTGAACAAGTGGAACTTTTGATAAAGCAGGGCACA
TCTCACGAAAATTTGTGCCAGTGCTATATTGGATGGTGCCCGTTTTGG

Sequência de aminoácidos:

YQRSLNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKQLPQLTSLELQYVSPKLLMCRDFELA
VPGSYNPNQPVIRIARIESSLQVITSKQRPRKLCIKGSNGKDYMFLLKGHEDL
RQDERVMQLFGLVNTLLVNDPETSRRNLTIQRYSVIPLSTNSGLIGWVPHCD
TLHTLIRDYRDKKILLNIEHRIMLRMAPDYDHLTLMQKVEVFEHALEHTNGD
DLAKLLWLKSPSSEVWFDRRTNYTRSLAVMSMVGYYVLGLGDRHPSNLMLD
RLSGKILHIDFGDCFEVAMTREKFPEKIPFRLTRMLINAMEVTGIEGTYRMTC
AKVMKVLRGNKDSLMAVLEAFVYDPLLNWRLMDAQPKVKHSTRGGSAPC
SHDQGDILEAVDIGSQPTAKKAVIDAVSGIGDSEGGQPEALNKKALAIINRVR
DKLTGRDFAPDETLDVPEQVELLIKQATSHENLCQCYIGWCPFW

- RmS6K (Código MK598841)

Sequência de nucleotídeos:

AGGACCTCTGTCCTCATGACGTCCTTTTGGGAGAAGGGGGTCATGTGGT
CCTCACGTA CTGCTGCTACTTCAATTGTGTTGATCGGTCACCCAGTCAGT
TTGCTCGGGAGAATCAGTATTGTGCTCCAGAAATCGACA ACTTGGGTCC
TGTGACGCCAGCATGTGATTGGTGGAGTTTTGGAGCGCTGTTGTACGAG
CTGTTGCTGAAGCTCCATTGATATTATGCCATCCCGGTGGTGTACACC
AAGCACTCGCCTTTATATTCCCGCCCATGTTTCTGCCGAAGCTGCAGACT
TGTTGGAAAAGCTCTTGGAATACCATGCTCATCAGCGTCTTGGCCACGG
CCCCACGGGCACCGAAGACGTCAAGCGTCACCCCTTCTTTGCAGCGATA
GACTGGAAAAGAATGAGTCTCCCGAAGTGA

Sequência de aminoácidos:

DLCPHDVLLGEGGHVVLTYCCYFNVD RSPSQFARENQYCAPEIDNLGPVT
PACDWWSFGALLYELFAEAPLILCHPGGVTPSTRLYIPAHVSAEAADLLEKLL

EYHAHQRLGHGPTGTEDVKRHPFFAAIDWKRMSLPK

- Rm4E-BP1 (Código MK598840)

Sequência de nucleotídeos:

ATGTCTGCACACTCTCCCGAGCACAAAGTGACCACTAGCCGCAGCATAC
CGACTCGGCGGATTGTCATCAACGATGCGAGTCAGCTGCCTCAAGACTA
CAGCTCGACGCCCGGGGGCACCATATTCTCCACCACTCCGGGTGGCTC
ACGCATCGTCTATGACCGGAGCTTCCTTATGCAGATGCGCCACTCTCCA
TTGGCCCAAACGCCACCCAAAGACTTGCCTGTGATCCCTGGGGTGACCC
TTTCCAGCAGCCCAGATGTCTCCAAGGCCAGTGGATCTCCCATGAAGCC
CACAGAGAATGGTGCTTTGTCATCTCCAATCAAGGGTGCCAAGCCTGAA
GGATCGGGTGACGAACCACAGTTTGCAATGGACATCTAG

Sequência de aminoácidos:

MSAHSPEHKVTTSRSIPTRRIVINDASQLPQDYSSTPGGTIFSTTPGGSRIVY
DRSFLMQMRHSPLAQTTPKDLPVIPGVTLSSSPDVSKASGSPMKPTENGAL
SSPIKGAKPEGSGDEPQFAMDI

ANEXO 2

DE ABREU, L. A. et al. 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**, v. 1830, n. 3, p. 2574–82, mar. 2013.



The conserved role of the AKT/GSK3 axis in cell survival and glycogen metabolism in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo tick cell line BME26

Leonardo Araujo de Abreu^{a,c}, Christiano Calixto^a, Camila Fernanda Waltero^a, Bárbara Pitta Della Noce^a, Naftaly Wang'ombe Githaka^c, Adriana Seixas^{b,d}, Luís Fernando Parizi^b, Satoru Konnai^c, Itabajara da Silva Vaz Jr.^b, Kazuhiko Ohashi^c, Carlos Logullo^{a,*}

^a IQFPP, CBB and Unidade de Experimentação Animal, RJ, UENF, Avenida Alberto Lamego, 2000, Horto, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

^b Centro de Biotecnologia and Faculdade de Veterinária, UFRGS, CP. 15005, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43421, Campus do Vale, CEP 91501-870, Porto Alegre RS, Brazil

^c Laboratory of Infectious Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita 18, Nishi 9, Kita-ku Sapporo, 060-0818, Japan

^d Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, R. Sacramento Leite, 245, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 September 2012

Received in revised form 23 November 2012

Accepted 15 December 2012

Available online 27 December 2012

Keywords:

Tick cell line

Glycogen metabolism

Cell survival

Gene silencing

Protein kinase B (AKT/PKB)

Glycogen synthase kinase 3 (GSK3)

ABSTRACT

Background: Tick embryogenesis is a metabolically intensive process developed under tightly controlled conditions and whose components are poorly understood.

Methods: In order to characterize the role of AKT (protein kinase B) in glycogen metabolism and cell viability, glycogen determination, identification and cloning of an AKT from *Rhipicephalus microplus* were carried out, in parallel with experiments using RNA interference (RNAi) and chemical inhibition.

Results: A decrease in glycogen content was observed when AKT was chemically inhibited by 10-DEBC treatment, while GSK3 inhibition by alsterpaullone had an opposing effect. RmAKT ORF15 is 1584-bp long and encodes a polypeptide chain of 60.1 kDa. Phylogenetic and sequence analyses showed significant differences between vertebrate and tick AKTs. Either AKT or GSK3 knocked down cells showed a 70% reduction in target transcript levels, but decrease in AKT also reduced glycogen content, cell viability and altered cell membrane permeability. However, the GSK3 reduction promoted an increase in glycogen content. Additionally, either GSK3 inhibition or gene silencing had a protective effect on BME26 viability after exposure to ultraviolet radiation. *R. microplus* AKT and GSK3 were widely expressed during embryo development. Taken together, our data support an antagonistic role for AKT and GSK3, and strongly suggest that such a signaling axis is conserved in tick embryos, with AKT located upstream of GSK3.

General significance: The AKT/GSK3 axis is conserved in tick in a way that integrates glycogen metabolism and cell survival, and exhibits phylogenetic differences that could be important for the development of novel control methods.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Recent studies on energy metabolism during tick embryo development demonstrate that it is strongly associated with carbohydrate mobilization. Glucose and glycogen levels have been shown to oscillate during *Rhipicephalus microplus* embryogenesis in a way greatly

supported by gluconeogenesis [1]. Additionally, during tick embryo development, the transition from syncytial to cellular blastoderm represents not only a decisive moment in embryo formation, but also a shift in embryo metabolism in order to reduce the consumption of glucose reserves coupled with increased protein degradation to sustain gluconeogenesis [1,2]. Interestingly, cellular processes that take place before and after *Aedes aegypti* mosquito embryo germband retraction are known to greatly affect glucose metabolism as well [3].

Globally, ectoparasites have medical, veterinary and economic importance, primarily due to their ability to transmit a diverse range of pathogens, and also due to the toxic and immunosuppressive components in their saliva [4]. Thus, elucidating the physiological processes of disease vectors is central to the development of new control methods. The establishment of tick cell lines provided a powerful tool for studying vector-pathogen interactions at cellular level and also to understand the mechanisms behind pesticide resistance [5–8]. A better

Abbreviations: 10-DEBC, 10-(4'-((N,N-Diethylamino) butyl)-2-chlorophenoxazinyl) hydrochloride; AKT, Protein kinase B; CN, Negative control; DMSO, Dimethyl sulfoxide; dsRNA, Double-stranded RNA; dsCN, Unrelated dsRNA; dsAKT, Double-stranded RNA for protein kinase B; dsGSK, Double-stranded RNA for glycogen synthase kinase 3; HES, Fetal bovine serum; GSK3, Glycogen synthase kinase 3; IC₅₀, Inhibitory concentration to reduce cell viability by 50%; IGF, Insulin/insulin-like growth factor signaling pathway; IGF, Insulin-like growth factor; MIT, 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; ORF, Open reading frame; PKB, Phosphatidylinositol 3-OH kinase; RTK, Receptor tyrosine kinase; RNAi, Ribonucleic acid interference; RACE, Rapid amplification of cDNA ends; RmAKT, *Rhipicephalus microplus* protein kinase B.

* Corresponding author. Tel.: +55 22 2739 7134; fax: +55 22 2739 7178.

E-mail address: logullo@uenf.br (C. Logullo).

understanding of the physiological and metabolic processes used by these cells may contribute to the discovery of novel pathways that can be targeted in the design of anti-tick control measures [9,10].

Cell metabolism, growth, survival and replication are dependent on extracellular signals that require receptor-mediated transduction to intracellular components [11]. Growth factors responsive machinery coordinates such events in a mechanism whose components are highly conserved in metazoan species: the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT (also known as protein kinase B, PKB) pathway [12,13]. In mammals, the activation of PI3K/AKT pathway facilitates glucose uptake in, but not limited to insulin-responsive tissues [14–16]. Normally, PI3K is activated upon stimulation of membrane receptor tyrosine kinase (RTK), G protein-coupled receptors (GPCRs) and cytokines receptors via extracellular growth factors [17]. Activated PI3K generates phosphatidylinositol lipids which lead to recruitment and activation of additional kinases, especially AKT. AKT activation is fully accomplished by phosphorylation at two specific residues and represents a node of major regulation of the many cellular effects of insulin/insulin-like growth factors signaling pathway (ISP) [18–21]. A diversity of AKT substrates is associated with the promotion of cell survival, inhibition of apoptosis, stimulation of glycogen, protein and lipid synthesis, inhibition of gluconeogenesis and promotion of glycolytic enzymes [12].

Previous studies reported the immunodetection of insulin-like proteins in tick synganglion [22–24]. Although such endogenous peptides remain to be identified, IGF-binding proteins (IGFBP) have been characterized in ticks before, suggesting modulation of the insulin/IGF pathway to complete bloodmeal acquisition [25]. Moreover, the BME26 cell line was shown to be responsive to the addition of exogenous insulin that is marked by an increase in glycogen content, and this effect was completely abolished in the presence of PI3K inhibitors [26]. Insulin addition alone was also able to alter the relative transcription of PI3K regulatory subunit p85. Recent identification of AKT in parthenogenic *Haemaphysalis longicornis* ticks points to its role in blood feeding and cell and organ growth in adult stages [27].

One of the target proteins negatively regulated by the PI3K/AKT pathway is glycogen synthase kinase 3 (GSK3), a conserved eukaryotic serine/threonine kinase, which is inhibited by phosphorylation at Ser²¹ (GSK3 α) or Ser⁹ (GSK3 β) positions by AKT [28]. GSK3 is reported to affect several cellular functions such as cell cycle, gene transcription, apoptosis and development, besides its role in carbohydrate metabolism, where it inhibits glycogen synthase by phosphorylation. Tick GSK3 exists only in one isoform, and it has been found that its enzymatic activity is inversely related to embryo glycogen content [29]. Similarly, mosquito GSK3 activity also varied oppositely with glycogen content during initial stages of *A. aegypti* embryo development [3]. Importantly, GSK3 activity is also necessary for tick oviposition and egg viability, as evidenced from both chemical inhibition and adult gene knockdown [30].

Although GSK3 role in oviposition and embryo development has been characterized in other models [31], the upstream regulators that control tick metabolism are unknown. Herein, we report the identification and cloning of an AKT from *R. microplus*, and characterized its role in glycogen metabolism and cell viability as an upstream regulator of GSK3 in BME26 cells using both RNA interference (RNAi) and chemical inhibition methods. The antagonistic roles observed for AKT and GSK3 strongly suggest that such a signaling axis is conserved in tick embryos.

2. Experimental procedures

2.1. Chemicals

The AKT inhibitor 10-DEBC [10-[4'-(N,N-Diethylamino)butyl]-2-chlorophenoxazine hydrochloride] and PI3K inhibitor, wortmannin, were purchased from Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA). LY294002, an additional inhibitor for PI3K was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). GSK3 inhibitor, alsterpaullone

[9-Nitro-7, 12-dihydroindolo [3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-one], Hoechst 33342, Propidium iodide, MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide], Leibovitz's 15 culture medium and α -amylglucosidase were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Nutricell Nutrientes Celulares (Campinas, SP, Brazil). Other reagents and chemicals used were of analytical grade and purchased locally.

2.2. BME26 cell line

Cells were maintained as previously described [32]. Attached cells from confluent flasks (25 cm²) were resuspended in fresh complete medium using a 22-gauge needle with bent tip fitted to a 5-mL plastic syringe. Cells were passaged every 3–4 weeks, and the medium replaced weekly. Culture density was determined using a Neubauer hemocytometer and cell viability was determined by trypan blue exclusion (0.4%, Sigma) technique. Two weeks prior to their use in experiments, synchronized cells were prepared by transferring 1×10^7 cells into 5 mL of fresh complete medium (final volume), and incubated at 34 °C to promote doubling (within 2 weeks), and the medium replaced weekly. BME26 cell line is derived from embryos of different ages of *Rhipicephalus microplus* ticks, first isolated in the 1980s and described in 2008 [32].

2.3. Viability assay

BME26 cell suspension was seeded into 24-well plates (5×10^5 cells/well) to a final volume of 500 μ L of complete medium and allowed to attach. After 24-h incubation at 34 °C, chemical inhibitors were added at the final concentrations indicated, and whereas 0.05% DMSO was used in negative control wells. After 24 h of treatment, 50 μ L MTT prepared in serum-free medium (5 mg/mL) was added to each well. After additional 2-h incubation, media were completely discarded and 1 mL of acid-isopropyl alcohol (0.15% HCl in isopropyl alcohol) was added to dissolve the formazan crystals. The mixture was transferred to 1.5-mL tubes, spun at 6000 \times g for 15 min, and the clear supernatant collected in new tubes for absorbance measurement at 570 nm using quartz cuvettes in an UVmini-1240 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu, Japan). Unless otherwise stated, absorbance values of control treatment were used for normalization (100% viability).

2.4. RmAKT cloning

The degenerate primers, forward 5'-CARTGGACNACNGTATYGA-3' and reverse 5'-CCRCACATCATYTCRTACAT-3' [33] were used to amplify a partial AKT sequence from *R. microplus* egg cDNA containing the conserved regions of AKT, the PH (pleckstrin homology) and kinase domains, by touchdown PCR. The cycling program was as follows: 94 °C for 5 min; 95 °C for 30s, 60 °C to 50 °C (decreasing 0.6 °C at each cycle) for 45 s, 72 °C for 1 min, 17 cycles followed by 95 °C for 30 s, 48 °C for 45 s, 72 °C for 1 min, 40 cycles; and a final extension at 72 °C for 5 min, in 200- μ L microtubes. A 793-bp PCR product was purified using the Gene Clean III DNA purification kit (QBiogene, Carlsbad, CA, USA), and cloned into pGEM-T vector (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions, followed by propagation in *Escherichia coli* (DH5 α strain). Recombinant plasmid DNA was extracted using Qiagen Miniprep kit (Qiagen, Hilden, Germany) and DNA sequencing performed by CEQ 2000 Dye Terminator Cycle with Quick Start kit (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA). To obtain the entire cDNA sequence coding for RmAKT, 3' and 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) amplifications were performed using the nucleotide sequence of the 793-bp amplified fragment. The first-strand cDNA for 3'-RACE was obtained through the reaction of SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) with total RNA and an oligo (dT) adaptor primer. The cDNA was amplified with the

gene-specific forward primer and adaptor primer. First-strand cDNA for 5'-RACE was synthesized from total RNA using the oligonucleotide 5'-CCTTGAGGAACTCAAAG-3' and reverse transcriptase enzyme, as specified by the manufacturer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The PCR-amplified dC-tailed cDNA was made using the abridged anchor primer AUAP and a nested gene-specific primer 5'-CCTTGAGGAACTCAAAG-3'. A second nested specific primer 5'-CGACTGCTCGTCC TTGGGC-3' was used to perform a second PCR. The product was cloned into pGEM-T and sequenced. Subsequently, using primers designed from the 5'-RACE (forward primer ATGATGGAAGCGCC ATTGGC) and 3'-RACE (reverse primer TCAGGAGAGGATGGCCT TGGGTC) products, the full-coding cDNA was amplified by RT-PCR and sequenced to confirm the coding region of AKT. The amplified fragment was cloned into pGEM-T and sequenced.

2.5. Sequence analyses

Nucleotide analysis and deduced amino acid sequences were carried out using a commercial software package, GENETYX-Win version 4.04 (Software development Co. LTD, Tokyo, Japan) and with BioEdit version 7.09.0 [34]. The new sequence was aligned with related sequences retrieved from the Genbank using CLUSTAL W [35], and conserved regions identified by the PROSITE algorithm [36]. A phylogenetic tree was constructed using neighbor-joining method [37] executed in Mega version 5.0. module.

2.6. Double-stranded RNA (dsRNA) synthesis

A 595-bp dsRNA was designed for *R. microplus* AKT coding sequence. Since *R. microplus* genome is not yet available, dsRNA specificity and potential off-targets were estimated from similar genes in other species with dsCheck (*Drosophila melanogaster* and *Rattus norvegicus*) [38] and DEQOR (*D. melanogaster* and *Anopheles gambiae*) [39] programs. Oligonucleotide primers containing T7 promoter sequences (lower case letters) for *in vitro* transcription and synthesis of dsRNA were synthesized to amplify the DNA-encoding tick AKT (595 bp) (GenBank Accession number JX648548). The primer sequences were as follows: RmAKT17f 5'-taatacagctcactatagggTCAGCCTGGACAACITTTGAGTTCTC C-3', and RmAKT17r 5'-taatacagctcactatagggATTTCATACATGACCCG CCCAGC-3'. The amplicon (635 bp) generated from 1-day-old eggs cDNA were purified by gel filtration in a 5-400 spin column (Amersham) and a 2- μ g aliquot was used for *in vitro* transcription of dsRNA using the T7 Ribomax™ Express RNAi System (Promega). Purification of dsRNA was performed according to manufacturer's instructions, quantitated at 260 nm and its integrity confirmed by agarose gel electrophoresis. Double-stranded RNA synthesis for RmGSK3 β was conducted as described previously [30]. The negative control for RNAi induced gene silencing was an unrelated dsRNA designed for *E. coli* β -galactosidase [kindly donated by Professor Marcos H. Sorgine, Instituto de Bioquímica Médica (IBQM), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)]. Double-stranded RNA complexes sizes: dsAKT - 635 bp, dsCN - 800 bp and dsGSK - 798 bp.

2.7. dsRNA delivery into BME26 cells

BME26 cell suspension was seeded into 24-well plates (5×10^5 cells/well) to a final volume of 500 μ L of complete medium. After 24-h incubation at 34 °C, culture medium was replaced by 200 μ L of fresh medium containing 4–8 μ g of dsRNA/well and the plate was gently mixed. After additional 24-h incubation, 300 μ L of complete medium/well were added, and kept at 34 °C for 48 h [8]. Culture medium was then fully replaced by 500 μ L of fresh complete medium and incubated for additional 72 h. Cells were then collected and processed as indicated (prolonged exposure assay). Alternatively, cells were exposed to dsRNA for 24 h in 200 μ L, and then collected for assays.

2.8. Confirmation of gene silencing by RT-qPCR

Total RNA was extracted using Trizol Reagent (Invitrogen) from cells exposed to dsRNA for 24 h. Two micrograms of total RNA were reverse transcribed with High Capacity cDNA Reverse transcription kit (Applied Biosciences). qPCR amplifications were performed with a LightCycler 1.5 capillary platform (Roche). Serial dilutions of the cDNA were used to construct calibration curves and amplification efficiencies (85–100%) determined for each set of primer pairs based on the calibration curves in 10- μ L reactions. The sequences of the primers used were: 5'-GAAGTTGGCGAGTGAGGAGGA-3' (forward), 5'-GGCGTCCGAGATGCTGAACCTTGT-3' (reverse) for RmAKT ($T_m = 56$ °C, Amplicon 86 bp). Specific primers for *R. microplus* Elongation Factor 1A (EF1A) (accession number EW679365) [40], for RmGSK3 (accession number EF142066) [29] and for Rm40S ribosomal protein (accession no. EW679928) [41] were the same as described previously. Relative expression was determined using the C_p values from each run on Relative Expression Software Tool—REST [42]. EF1A was used as reference gene for RmAKT analysis and Rm40S was the reference gene for RmGSK3 analysis. cDNA from BME26 not exposed to dsRNA was used as calibrator.

2.9. Glycogen content determination

Cell lysates (in triplicate) were incubated with 1 unit α -amylglucosidase in acetate buffer (200 mM, pH 4.8) for 4 h at 40 °C. The reaction was stopped with phosphate buffer (100 mM, pH 7.4). Liberated glucose was detected with a commercial kit for glucose concentration (Glucose®; Doles) at 510 nm. Control conditions (without α -amylglucosidase) were used to determine basal glucose level and subtracted from test conditions. Glycogen content was determined using a standard curve submitted to the same conditions [1], and normalized by total protein content. Results are presented as mean and standard deviation from three independent experiments.

2.10. Membrane integrity analysis

BME26 cells were plated (3×10^5 cell/well) over glass coverslips placed at the bottom of 24-well plate. Cells were treated either with dsRNA for tick AKT, or with unrelated dsRNA. After prolonged exposure assay, BME26 cells were directly stained by adding Hoechst 33342 (0.4 μ g/mL, final concentration) for 5 min, and then propidium iodide (2 μ g/mL, final concentration) for additional 2 min. Incubations at room temperature were performed protected from light. Well content was discarded, coverslips were washed with PBS and mounted over glass slides with 5 μ L of glycerol. Cells were observed under fluorescence microscope (model Eclipse 80i, Nikon, Japan), and pictures were obtained at 400 \times magnification.

2.11. Protein determination

Total protein was determined according to Bradford [43], using bovine serum albumin as standard.

2.12. RmAKT expression during embryogenesis

Total RNA was extracted from *R. microplus* eggs on different days after oviposition with TRIZOL reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. One microgram of total RNA was converted into complementary DNA with the High Capacity cDNA Reverse transcription kit (Applied Biosciences). Quantitative PCR analysis was performed using 200 ng of cDNA in 10- μ L reactions in a LightCycler platform, as described above. Relative expression determination was performed as described earlier, using one-day-old eggs as calibrators.

and E1f1A as reference gene. The results represent mean ± SD from 3 different experiments performed in triplicates (independent samples).

2.13. Ultraviolet light exposure

BME26 cells treated with dsRNA for tick GSK3 were exposed to UV light (254 nm) within a distance of 5.4 cm, for 8 min in order to induce cell death [44]. After treatment, cells were incubated for 24 h and viability determined by the MTT assay. Values were normalized with cells not treated with dsRNA and comparisons done with treatment with unrelated dsRNA.

In other experiments, BME26 cells were incubated with alsterpaullone or vehicle alone (0.05% DMSO) for 60 min at 34 °C prior to UV light exposure (15 min), and cell viability was determined by MTT after additional 24-h incubation. Viability values were normalized by those obtained for cells in vehicle alone not exposed to UV.

2.14. Statistical analysis

Non-parametric analysis was used in glycogen and viability comparisons between inhibition/knock down of AKT and GSK3. Results for AKT expression were analyzed by one-way ANOVA. The GraphPad Prism 5.03 Software was used in all analyses.

3. Results

3.1. AKT or GSK3 inhibition has different effects on BME26 cell viability

To examine the effects of AKT inhibition on viability, BME26 cells were treated with different concentrations of 10-DEBC (AKT inhibitor) or vehicle alone (0.05% DMSO) for 24 h. Cell viability as determined by MTT, which revealed that AKT inhibition with 10-DEBC decreased viability in a dose-dependent manner within the range of 24 and 96 μM (Fig. 1A). Cell viability was slightly altered up to 24 μM 10-DEBC, but it significantly decreased in the presence of 48–96 μM 10-DEBC. The IC₅₀ value for 10-DEBC inhibitor was determined to be approximately 48 μM (insert). In order to determine the effects of 10-DEBC on glycogen content, we used concentrations lower than the corresponding IC₅₀. Alsterpaullone, a chemical inhibitor of GSK3, had no significant effect on BME26 viability, when used in concentrations ranging from 4 to 400 nM (Fig. 1B). Treatment with PI3K inhibitors LY294002 and wortmannin mildly affected BME26 viability (Supplementary Fig. 2).

3.2. Effects of AKT and GSK3 inhibition on BME26 glycogen content

The participation of AKT and GSK3β in glycogen metabolism in BME26 cells was determined by culturing them in the presence of inhibitors in the growth medium. Glycogen content decreased 30.4% and 36.5% in cells exposed to 6 and 12 μM 10-DEBC, respectively, compared to cells treated with vehicle alone (0.05% DMSO) (Fig. 2A). On the other hand, cells treated with 1 μM alsterpaullone (GSK3 inhibitor) showed a nearly 50% increase in glycogen level (Fig. 2B).

3.3. Cloning and sequence analysis of RmAKT

PCR with egg cDNA yielded a fragment that encodes an AKT-like protein sequence when searched against protein sequences in the NCBI Full-length tick AKT cDNA (1584 bp) was determined from sequence data obtained by cloning RACE PCR products and from sequences available in nucleotide database. The deduced RmAKT amino acid sequence (527 aa) was aligned with homologous proteins with ClustalW (Supplementary Fig. 1). ScanProsite analysis showed that the Pleckstrin Homology (PH) domain ranges from positions 39 to 141, the Serine/Threonine (Ser/Thr) kinase domain is between positions 180 and 437, and a hydrophobic motif is present from positions

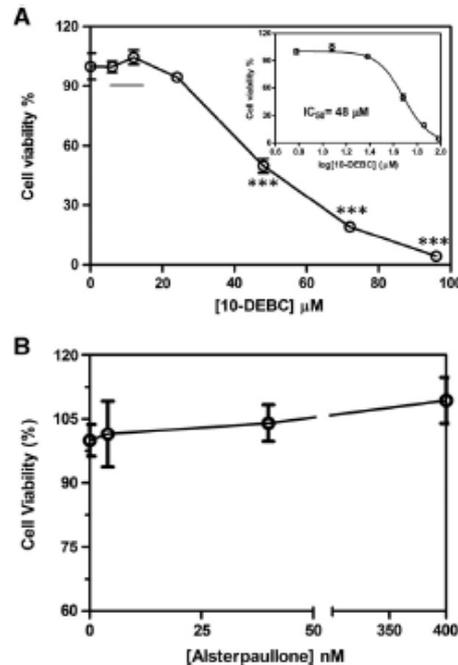


Fig. 1. Inhibition of AKT or GSK3 activity promotes different effects on BME26 cells viability. BME26 cells were treated for 24 h in the presence of different concentrations of AKT inhibitor 10-DEBC (A) or GSK3 inhibitor alsterpaullone (B) in complete medium in triplicate wells. Cell viability was not altered by alsterpaullone exposure (4–400 nM). Treatment with 10-DEBC (0–96 μM) decreased cell viability in a concentration-dependent fashion. Cell viability was measured by MTT assay, and the results were normalized against control exposed to vehicle alone (0.05% DMSO). Gray line indicates the concentration interval to be used for further analysis. Inset: IC₅₀ of 48 μM was determined for 10-DEBC treatment. Plots represent mean ± SD from at least two independent experiments. *** = *p* < 0.001, compared to control treatment.

501 to 506. The putative phosphorylation sites are also conserved at Thr³³⁶ and Ser⁵⁰⁵ residues.

RmAKT and amino acid sequences of related proteins were subjected to phylogenetic analysis, and a tree was constructed (Fig. 3). The phylogeny consists of two protein clades; one that includes RmAKT and other AKTs from arthropods, and one bearing mammalian AKTs. In addition, the RmAKT sequence pairs with AKT homologue from *H. longicornis*, with high bootstrap values.

3.4. Effects of RmAKT and RmGSK3 silencing on BME26 cells

Possible accidental targets of AKT and GSK3 silencing by RNAi were selected based on orthologous sequences of *D. melanogaster* and *C. elegans*, since the entire *R. microplus* genome is unavailable. Both DEQOR and dsCheck analyses showed high efficiency and specificity of the iRNAs, and revealed that the chances of non-target inhibition would be significantly lower in comparison with the desired targets (data not shown).

The RNAi mediated gene silencing for AKT and GSK3β in BME26 cells was greater than 70% (Fig. 4A and B), as determined by relative expression analysis using RT-qPCR within the first 24 h of dsRNA exposure. Additionally, glycogen content in AKT silenced cells decreased by approximately 30% (Fig. 5A). On the other hand, glycogen content was increased in cells silenced for GSK3β by almost 50% (Fig. 5B). Glycogen

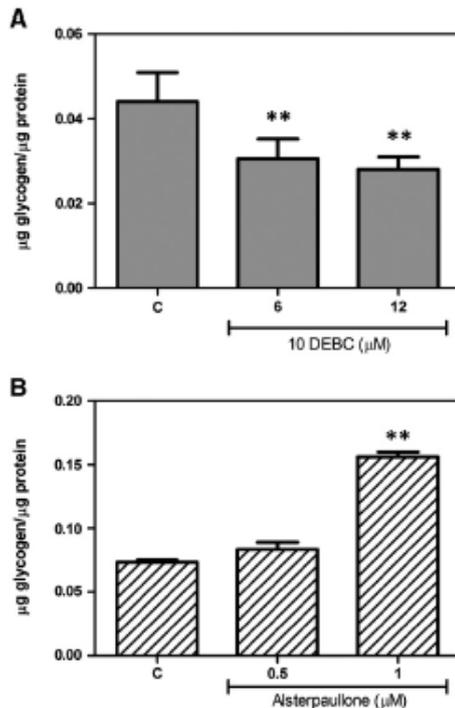


Fig. 2. Glycogen content alteration by inhibition of AKT or GSK3. BME26 cells were treated with increasing concentrations of 10-DEBC for 24 h (A) or alsterpaullone for 2 h (B). Glycogen content was enzymatically determined (see Methodology item 2.9). The plots represent mean \pm SD from three independent experiments. ** = $p < 0.01$, compared to control (DMSO) treatment.

determination was performed in samples obtained after prolonged exposure assay.

BME26 cells silenced for AKT exhibited a near 30% reduction in cell viability, as determined by the MIT assay (Fig. 6A). It was also observed that cells treated with dsAKT double-stained with propidium iodide and Hoechst 33342 (pink nuclei in Fig. 6C) at higher intensity, compared to cells exposed to the unrelated dsRNA (Hoechst 33342 blue stained nuclei in Fig. 6B).

BME26 cells were exposed to UV light for 8 min and cell viability determined by the MIT assay after 24 h (Fig. 7A). There was no significant difference between cells treated with test dsRNA (black bar) and those treated with unrelated control dsRNA (white bar). However, cells previously silenced for GSK3 β showed a significant increase (17%) in cell viability (dashed bars). Chemical inhibition of GSK3 by alsterpaullone treatment prior to UV light exposure also protected BME26 viability (Fig. 7B) in a dose-dependent manner. Cells treated with 1 μM alsterpaullone were as viable as those not exposed to UV.

Fig. 8 is a schematic representation of the proposed model of the conserved role of the AKT/GSK3 axis in cell viability and glycogen metabolism in *R. microplus* tick embryo cell line BME26.

3.5. RmAKT is transcribed during tick embryogenesis

In tick embryos of different ages, the AKT gene was found to be expressed at the highest level in day 1 embryos, at significantly lesser amounts in day 3 embryos, and thereafter remained unaltered until day 18 (Fig. 9).

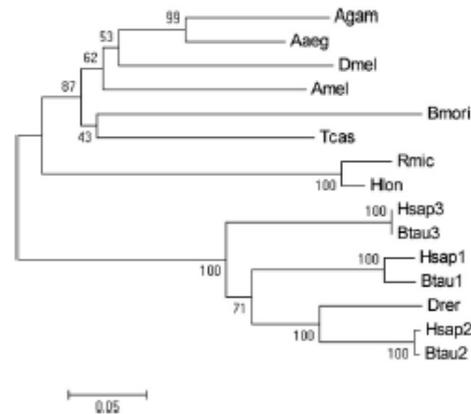


Fig. 3. Phylogenetic analysis of AKT from different species. Phylogenetic tree representing the sum of evolutionary distances for branches (0.05) using Muscle tool in 5.0 MEGA software. NCBI sequences used for comparison analysis were *Haemaphysalis longicornis* BAK26531.1 (Hlon), *Bombyx mori*: ABY50539.1 (Bmori), *Drosophila melanogaster*: NP_732114.1 (Dmel), *Anopheles gambiae*: EA403708.5 (Agam), *Aedes aegypti*: AAF37655.1 (Aaeg), *Apis mellifera*: XP_396874.4 (Amel), *Tribolium castaneum*: XP_968049.2 (Tcas), *Caenorhabditis elegans*: NP_001023646.1 (Cele), *Homo sapiens* 1: AAL5573.2.1 (Hsap1), *Homo sapiens* 2: AAJ05996.1 (Hsap2), *Homo sapiens* 3: AAD24196.1 (Hsap3), *Bos taurus* 1: CAA43371.1 (Btau1), *Bos taurus* 2: DAA19835.1 (Btau2), *Bos taurus* 3: DAA21408.1 (Btau3) and *Danio rerio*: NP_537789.1 (Drer).

4. Discussion

Here, we describe an important signal transduction axis that integrates our previous knowledge about the PI3K/AKT signaling pathway in BME26 cells and the importance of GSK3 in tick embryogenesis [26,30]. The importance of AKT signaling has been demonstrated in a number of organisms, and supports a conserved role in the regulation of cell metabolism [45]. It is strongly associated with some types of human cancer, and acts mainly by increasing the inhibition of pro-apoptotic components and improving energy metabolism [46]. AKT kinase is an important downstream effector of the PI3K pathway that can be activated by growth factors, cytokines and peptides related to the insulin family [11,12]. Remarkably, dysfunctional AKT activity has emerged as a promising target in the development of drugs against some forms of cancer [47].

In *D. melanogaster*, AKT activity has been shown to be at the core of nutrient sensing mechanisms that incorporate hormonal and growth factors pathways, and processes associated with reproduction [45,48]. More recently, activation of AKT signaling in *Anopheles stephensi* mosquitoes was shown to reduce malaria parasite infectivity [49]. Moreover, *Bombyx mori* AKT has been shown to be phosphorylated following stimulation by bombyxin, an endogenous insulin-like peptide, as well as by dietary intake [50].

AKT regulation during glycogen metabolism has largely been deduced from correlating the phosphorylation status of both AKT (active upon phosphorylation at Ser/Thr residues) and GSK3 (is inhibited upon phosphorylation at Ser^{9/21} by AKT) [19,31,51]. In the present study, we show that glycogen distribution is tilted in opposite directions when either AKT or GSK3 β is genetically silenced (Fig. 5). Our data also strongly suggest that GSK3 is a downstream target of AKT regulation during glycogen metabolism in tick cells (Fig. 8). Chemical inhibition of either AKT or GSK3 (Fig. 2) promoted opposing effects in glycogen content, which reinforces our observations. Interestingly, even though cells treated with low concentrations of alsterpaullone exhibited an increase in glycogen content, cell viability was not altered within the range of 4 and 400 nM (Figs. 1B and 2B). On the other hand, a

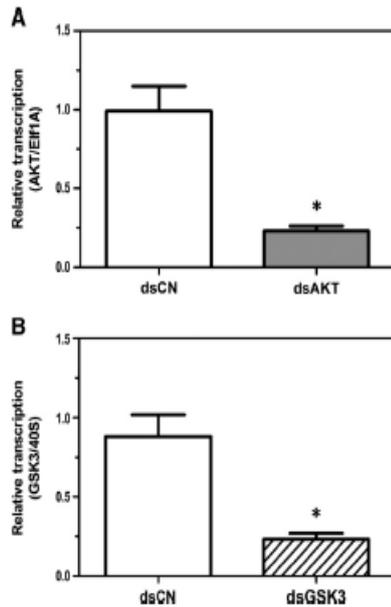


Fig. 4. Confirmation of RNAi mediated gene silencing by RT-qPCR in BME26 cells. BME26 cells were treated with dsRNA for AKT (A) or GSK3 (B) genes independently, and relative transcription was determined by RT-qPCR. AKT silencing was confirmed 24 h after dsRNA treatment. GSK3 silencing was confirmed at the end of the prolonged exposure assay. The plots represent mean \pm SE from three independent experiments. * = $p < 0.05$, with respect to cells treated with unrelated dsRNA (dsCN), and using EIF1A (A) or 40S (B) as reference genes to determine relative transcription using the Pfaffl (2001) method.

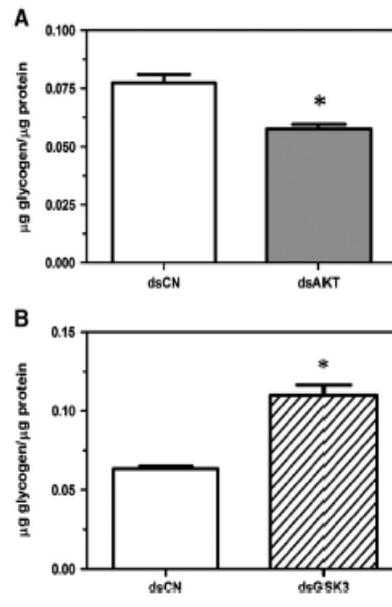


Fig. 5. Glycogen content is differently affected by AKT and GSK3 gene silencing. BME26 cells were treated with dsRNA for AKT (A) or GSK3 (B) genes independently, and glycogen content was enzymatically determined (see Methodology) by the end of the prolonged exposure assay. Glycogen content was decreased upon AKT silencing but increased by GSK3 silencing. The plots represent mean \pm SD from three independent experiments in triplicates. * = $p < 0.05$.

decrease in glycogen content was observed following AKT inhibition at concentrations below the IC_{50} determined (Figs. 1A and 2A). These data support a prevalent role of AKT in the regulation of BME26 cell survival.

Besides the suggested roles of AKT/GSK3 pathway in cell metabolism and survival, the data presented here also support its participation *in vivo* during *R. microplus* embryogenesis (Fig. 9). In such context, tick embryogenesis emerges as a tempting target in identifying novel pathways whose inhibition would have significant impact on tick physiology [52,53]. Studies using neuronal cell lines depict a differential modulation of AKT/GSK3 β pathway in the regulation of apoptotic and cytoprotective signaling responses [54]. Similarly, in the current study, AKT knockdown resulted in reduced viability of BME26 cells (Fig. 6A) and disturbed cell permeability (Fig. 6B and C), which strongly suggests that an apoptotic pathway may also occur in BME26 cells. However, the type of cell death promoted by AKT knockdown in BME26 cells was not the focus of the present work. Previous studies reported programmed cell death in adult *Rhipicephalus sanguineus* [55,56], *R. microplus* [57] and *Dermacentor variabilis* [58] ticks. The observations that both AKT (Fig. 9) and GSK3 β [29] are expressed during tick embryogenesis do not rule out the possibility that AKT/GSK3 β signaling exerts similar importance *in vivo*, and at other life stages.

The results presented here further suggest that GSK3 β is also involved in cell survival in addition to glycogen metabolism in BME26 cell line. UV light exposure is thought to induce cell death mainly through the deleterious effects on DNA, which then compromise some protein functions [59]. GSK3 β knocked-down BME26 cells challenged

by UV exposure exhibited extended longevity as determined by MMT assay, in comparison with controls (Fig. 7A). Moreover, GSK3 β inhibition prior to UV exposure promoted a protective effect for cell viability (Fig. 7B). These results support the importance and functional conservation of GSK3 β activity for BME26 cell line. *In vitro* studies in mammal cell culture demonstrate that GSK3 β inhibition attenuates or fully abrogates apoptosis [60]. Taken together with findings from other studies, these observations place GSK3 β as a promoter of apoptosis due to inhibition of prosurvival transcription factors and facilitation of proapoptotic transcription factors [61]. Such protective effect of deleting GSK3 β is also focus of developing novel radioprotectors. The use of GSK3 β inhibitors in animals undergoing radiotherapy were shown to protect normal tissues from radiation-induced apoptosis and attenuate neurocognitive dysfunction resulting from cranial irradiation [62].

Conversely, overexpression of wild-type GSK3 β induces apoptosis in various cell types in culture, and specific inhibition of GSK3 β ameliorates apoptosis [63,64]. GSK3 inhibition was shown to inhibit apoptotic cell death in neuroblastoma cell line SH-SY5Y upon treatment with fipronil [65]. More recently, GSK3 β inhibitors have also been used in pharmacologic prophylaxis to protect normal tissues during radiotherapy in cancer patients, due to its key role in regulation of radiation-induced apoptosis [62]. Previous observations of GSK3 β role during tick and mosquito embryogenesis support a strict control in respect to glycogen metabolism and mobilization [3,29]. Additionally, GSK3 β activity was recently shown to greatly influence tick oviposition and normal embryo development [30].

Targeting ISP components has been proposed for *Giardia intestinalis* by selective inhibition of PBK [66]. In insects, ISP regulates growth, nutritional status and reproduction. Inhibition of PBK mimics the effects of starvation and reduction of Insulin Receptor signaling reduces

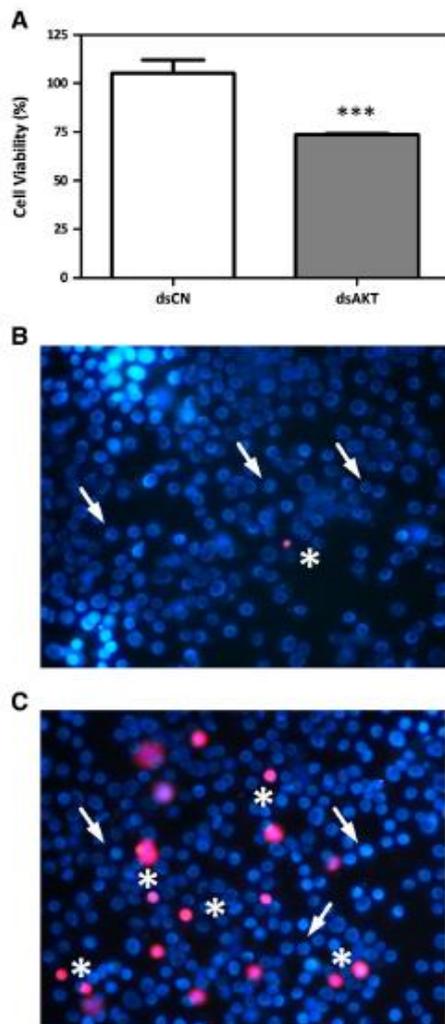


Fig. 6. AKT silencing effects on cell viability and membrane permeability. BME26 cells were silenced for AKT using the prolonged exposure assay, and then cell viability was determined by the MTT assay (A). Loss of membrane integrity was also detected in cells stained with Hoechst 33342/Propidium iodide observed with pink nuclei (asterisks) under fluorescence microscope (Nikon 80i). Hoechst 33342 permeable cells were stained with blue nuclei (arrows). Compare pink signal in B and C. The plot represents mean \pm SD from two independent experiments in triplicates. *** = $p < 0.001$, compared to control treatment (B, unrelated dsRNA). Magnification: 400 \times . Pictures are representative of 2 independent experiments in triplicates.

fertility [10]. *In vitro* treatment of an adult *Schistosoma japonicum* with specific inhibitors for or antisera against ligand binding domains of Insulin Receptor blocks glucose uptake [67]. These observations suggested that designed inhibitors capable of blocking the binding site of Insulin receptor or inhibiting downstream signals could starve the worms. The growing reports on the insulin signaling pathway present a new opportunity on the emerging need for expertise in arachno-entomology [68].

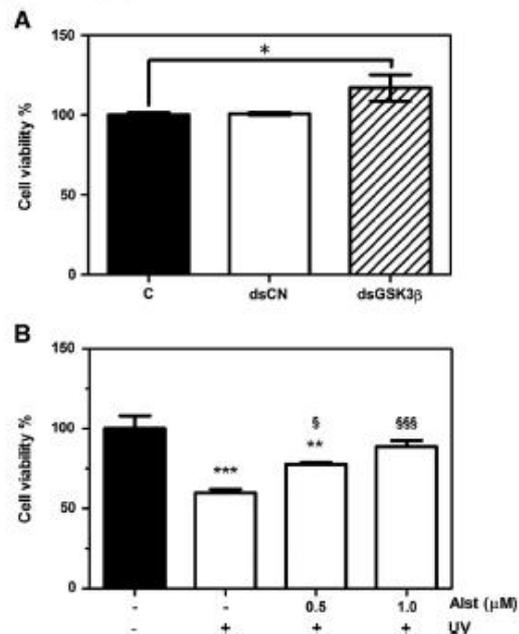


Fig. 7. GSK3 blockade effects on cell viability after death inducing UV exposure. A: BME26 cells were silenced for GSK3 using the prolonged exposure assay, and then exposed to UV light for 8 min. Cell viability was determined by the MTT assay 24 h after UV exposure, and normalized by the viability of cells not treated with dsRNA (black bar). White bar – unrelated dsRNA, Dashed bar – GSK3 gene silenced cells. The plot represents mean \pm SD. * = $p < 0.05$. B: BME26 cells not treated with dsRNA were incubated with alsterpaullone (Alst) or vehicle alone (0.05% DMSO, black bar) by 60 min at 34 °C prior to UV. Light exposure (15 min), and after additional 24 h incubation cell viability was determined by MTT assay. Viability values were normalized by those obtained for cells in vehicle alone not exposed to UV. Plots represent mean \pm S.D. from 3 independent experiments in triplicate. Asterisks represent significant differences from treatment with vehicle alone (* = $p < 0.1$; *** = $p < 0.01$). Paragraph symbol indicates significant differences from treatment with vehicle and UV exposure (§ = $p < 0.5$; §§§ = $p < 0.01$).

Characterizing gene functions by RNAi silencing has become an essential procedure for tick biologists [69]. RNAi using dsRNA was successfully performed on BME26 cells with a transcription reduction over 70%, being detected 24 h post exposure (Fig. 4). Past reports on gene silencing in BME26 cells focused on the mechanisms underlying RNAi pathway in ticks [70] and to determine genes that are differentially expressed in response to infection with *Anaplasma marginale* [8]. Moreover, the majority of studies that have reported using RNAi in tick cell lines have focused on tick-borne pathogen pathology and the function of genes either in vector-pathogen relationships or as candidate targets for anti-tick control methods [71]. In the present work, we extend the application of RNAi in tick cell lines to examine the AKT/GSK3 β axis. Our data suggest that such a pathway is conserved in ticks and tick cell lines in a way that integrates both glycogen metabolism and cell survival (Fig. 8). Both processes are essential for proper embryo development, and cannot be ignored in adult life stages of ticks. Further studies are necessary to better understand the mechanisms involved on the regulation of cell survival in ticks. The correlation between signal transduction and metabolic pathways emerges as an attractive area for tick cell line research, and may be extrapolated to other tick life stages.

Although mammalian and arthropod AKT proteins have similar biochemical properties, sequence and phylogenetic analyses coupled

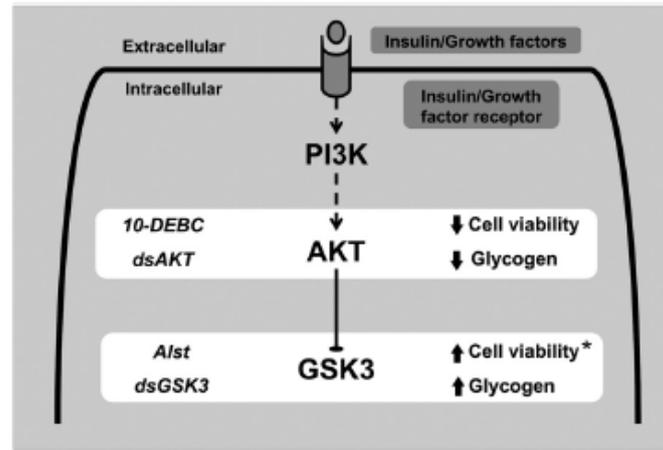


Fig. 8. Schematic model showing the conserved role of the AKT-GSK3 axis on cell viability and glycogen metabolism in BME26 cells. BME26 cells were treated as indicated by the left side of the white boxes in order to block the activity of either AKT or GSK3. The effects on cell viability and glycogen content are indicated on the right side of the white boxes. ↑: increase, ↓: decrease, blunt arrow head: direct inhibition, dashed arrow: multi step signal transduction, ★: GSK3 knocked down cells exposed to UV, PI3K: phosphatidylinositol 3-OH kinase.

with RmAKT silencing indicate that these enzymes differ significantly (Fig. 3). Therefore, it could be possible to exploit these differences in the design of new inhibitors that selectively impair the arthropod vector while causing minimal effects on the mammalian host, a prerequisite for commercial acaricides. With existing acaricidal products rapidly losing their efficacy, there is urgent need to explore alternative control methods against ticks. The discovery and characterization of physiological pathways could lead to novel drug targets, candidate drugs or antigens while at the same time reveal new processes that are essential to ticks' complex physiological adaptations.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.12.016>

Acknowledgements

The authors would like to thank professor Gloria R. Braz, Instituto de Química (IQ) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, for her assistance on the complete assembly of RmAKT nucleotide sequence. This work was supported by grants from CNPq-Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Entomologia Molecular, FINEP, CAPES, UENF, CNPq,

FAPERJ and FAPERGS (Brazil) and Ministry of Science, Culture and Education and JSPS (Japan).

References

- [1] J. Moraes, A. Galina, P.H. Alvarenga, G.L. Rezende, A. Masuda, I. da Silva Vaz Jr., C. Logullo, Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*, *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 146 (2007) 528–533.
- [2] E. Campos, J. Moraes, A.R. Façanha, E. Morein, D. Valle, L. Abreu, P.P.A. Manso, A. Nascimento, M. Pelajo-Machado, H. Lenz, A. Masuda, I. da S. Vaz Jr., C. Logullo, Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development, *Vet. Parasitol.* 138 (2006) 349–357.
- [3] W. Vital, G.L. Rezende, L. Abreu, J. Moraes, F.J.A. Lemos, I. da S. Vaz Jr., C. Logullo, Germ band retraction as a landmark in glucose metabolism during *Aedes aegypti* embryogenesis, *BMC Dev. Biol.* 10 (2010) 25.
- [4] F. Jongejans, G. Uilenberg, The global importance of ticks, *Parasitology* 129 (2004) S3–S14.
- [5] R. Cossio-Bayugar, R. Barhoumi, R.C. Bughardt, G.G. Wagner, P.J. Holman, Basal cellular alterations of esterase, glutathione, glutathione S-transferase, intracellular calcium, and membrane potentials in coumaphos-resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cell lines, *Pestic. Biochem. Physiol.* 72 (2002) 1–9.
- [6] R. Cossio-Bayugar, G.G. Wagner, P.J. Holman, In vitro generation of organophosphate resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cell lines, *J. Med. Entomol.* 39 (2002) 278–284.
- [7] I. Bell-Sakyi, E. Zweggarth, E.F. Blouin, E.A. Gould, F. Jongejans, Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research, *Trends Parasitol.* 23 (2007) 450–457.
- [8] Z. Zivkovic, E. Esteves, C. Almazán, S. Daffre, A.M. Nijhof, K.M. Kocan, F. Jongejans, J. de la Huenté, Differential expression of genes in salivary glands of male *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in response to infection with *Anaplasma marginale*, *BMC Genomics* 11 (2010) 1–12.
- [9] D.J. Woods, T.M. Williams, The challenges of developing novel antiparasitic drugs, *Invert. Neurosci.* 7 (2007) 245–250.
- [10] M.B. Hiel, T. Loy, J. Poels, H.P. Vandersmissen, H. Verlinden, L. Badisco, J. Broeck, Neuropeptide receptors as possible targets for development of insect pest control agents, in: T.G. Geary, A.G. Maule (Eds.), *Neuropeptide Systems as Targets for Parasite and Pest Control*, Springer, New York, 2010, pp. 211–226.
- [11] P.S. Ward, C.B. Thompson, Signaling in control of cell growth and metabolism, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4 (2012) a006783.
- [12] E.L. Whiteman, H. Cho, M.J. Birnbaum, Role of Akt/protein kinase B in metabolism, *Trends Endocrinol. Metab.* 13 (2002) 444–451.
- [13] D.C.I. Goberdhan, C. Wilson, The functions of insulin signaling: size isn't everything even in *Drosophila*, *Differentiation* 71 (2003) 375–397.
- [14] S.J. Leavers, Growth control: invertebrate insulin surprises! *Curr. Biol.* 11 (2001) R209–R212.
- [15] J.C. Rathmell, C.J. Fox, D.R. Plas, P.S. Hammerman, R.M. Cinali, C.B. Thompson, Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival, *Mol. Cell Biol.* 23 (2003) 7315–7328.
- [16] D. Porte Jr., D.G. Baskin, M.W. Schwartz, Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans, *Diabetes* 54 (2005) 1264–1276.

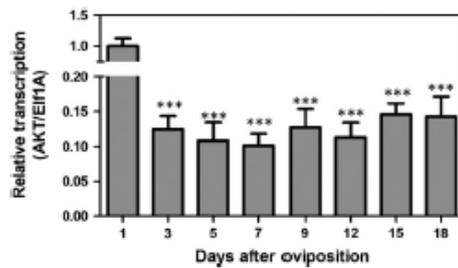


Fig. 9. RmAKT expression during embryo development. Relative transcription of RmAKT was determined by RT-qPCR using cDNA obtained from eggs collected on the days indicated (see details on Methodology). EIF1A was used as reference gene. Plot represents mean ± SE from three experiments in triplicates. *** = $p < 0.001$, compared to first day after oviposition.

- [17] B. Vanhaesebroeck, L. Stephens, P. Hawkins, PI3K signalling: the path to discovery and understanding, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012) 195–203.
- [18] I. Claeys, C. Simonet, J. Poels, T. Van Loy, L. Veeramen, A. De Loof, J. Vanden Broeck, Insulin-related peptides and their conserved signal transduction pathway, *Peptides* 23 (2002) 807–816.
- [19] J.M. Lizcano, D.R. Alessi, The insulin signalling pathway, *Curr. Biol.* 12 (2002) R236–R238.
- [20] D.F. Barber, M. Alvando-Kristensson, A. González-Carriá, R. Pulido, A.C. Carrera, PTEN regulation, a novel function for the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase, *Sci. STKE* 362 (2006) e49.
- [21] R.D. Manning, L.C. Cantley, AKT/PKB signaling: navigating downstream, *Cell* 129 (2007) 1261–1274.
- [22] X.X. Zhu, J.H. Oliver Jr., Immunocytochemical localization of an insulin-like substance in the synganglion of the tick *Ornithodoros parkeri* (Acari: Argasidae), *Exp. Appl. Acarol.* 13 (1991) 153–159.
- [23] H.H. Davis, E.M. Dobson, J.H. Oliver Jr., Localization of insulin-like immunoreactivity in the synganglion of nymphal and adult *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae), *Exp. Appl. Acarol.* 18 (1994) 111–122.
- [24] L. Simo, M. Slováčková, Y. Park, D. Ziman, Identification of a complex peptidergic neuroendocrine network in the hard tick, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Cell Tissue Res.* 335 (2008) 639–655.
- [25] A. Muleng, R. Khumthong, Silencing of three *Amblyomma americanum* (L.) insulin-like growth factor binding protein-related proteins prevents ticks from feeding to repletion, *J. Exp. Biol.* 213 (2010) 1153–1161.
- [26] L.A. de Abreu, A. Fabres, E. Esteves, A. Masada, L. da Silva Vaz Jr., S. Duffre, C. Logullo, Exogenous insulin stimulates glycogen accumulation in *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus embryo cell line BME26 via PI3K/AKT pathway, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 153 (2008) 185–190.
- [27] R. Umeyama-Shirafuji, T. Tanaka, D. Boldbaatar, T. Tanaka, K. Fujisaki, Akt is an essential player in regulating cell/organ growth at the adult stage in the hard tick *Haemaphysalis longicornis*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42 (2012) 164–173.
- [28] D.A. Cross, D.R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, R.A. Hemmings, Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B, *Nature* 378 (1995) 785–789.
- [29] C. Logullo, W.H. Witola, C. Andrade, L. Abreu, J. Gomes, L. da Silva Vaz Jr., S. Imamura, S. Konnai, K. Ohashi, M. Onuma, Expression and activity of glycogen synthase kinase during vitellogenesis and embryogenesis of *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus, *Vet. Parasitol.* 161 (2009) 261–269.
- [30] A. Fabres, C.P. de Andrade, M. Gutzo, M.H.F. Sogine, C.D.O. Paiva-Silva, A. Masada, L.D.S. Vaz Jr., C. Logullo, Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNA on tick oviposition and egg hatching, *Parasitology* 137 (2010) 1537–1546.
- [31] S. Iwama, P. Cohen, GSK3 takes centre stage: more than 20 years after its discovery, *Biochem. J.* 359 (2001) 1–16.
- [32] E. Esteves, F.A. Lam, D.M. Lorenzini, G.H.N. Costa, A.H. Fukuzawa, L.N. Presidanti, J.R.M.C. Silva, J.A. Ferro, T.J. Kurts, U.G. Munderloh, S. Duffre, Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38 (2008) 568–580.
- [33] M.A. Riehle, M.R. Brown, Molecular analysis of the serine/threonine kinase Akt and its expression in the mosquito *Aedes aegypti*, *Insect Mol. Biol.* 12 (2003) 225–232.
- [34] T.A. Hall, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41 (1998) 95–98.
- [35] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.
- [36] C.J.A. Sigrist, L. Cerutti, E. de Castro, P.S. Langendijk-Genevaux, V. Bulliard, A. Baloch, N. Hulo, PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) D161–D166.
- [37] N. Saitou, M. Nei, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.* 4 (1987) 406–425.
- [38] Y. Naito, T. Yamada, T. Matsumiya, K. Uti-Tes, K. Saigo, S. Morishita, dsCheck: highly sensitive off-target search software for double-stranded RNA-mediated RNA interference, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) W589–W591.
- [39] A. Henschel, F. Buchholz, B. Habermann, DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) W113–W120.
- [40] A.M. Nijhof, J.A. Balk, M. Postigo, F. Jongejans, Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks and determination of the expression profile of Bmi1, *BMC Mol. Biol.* 10 (2009) 1–14.
- [41] P.C. Pohl, M.H.F. Sogine, A.T. Leal, C. Logullo, P.L. Oliveira, L. da S. Vaz Jr., A. Masada, An extracellular aspartic protease accumulated in tick oocytes with vitellin-degradation activity, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 151 (2008) 392–399.
- [42] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 1–6.
- [43] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [44] G. Aparna, A.K. Bhuyan, S. Sahdev, S.E. Hasnain, R.J. Kaufman, K.V.A. Ramaiah, Stress-induced apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (SF9) cells: baculovirus p35 mitigates eIF2 α phosphorylation, *Biochemistry* 42 (2003) 15352–15360.
- [45] A.A. Teلمان, Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*, *Biochem. J.* 425 (2010) 13–26.
- [46] G. Hatzivasilias, C. Andreadis, C.B. Thompson, Akt-directed metabolic alterations in cancer, *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 2 (2005) 255–262.
- [47] I. Hers, E.E. Vincent, J.M. Tavaré, Akt signalling in health and disease, *Cell. Signal.* 23 (2011) 1515–1527.
- [48] H. Kubota, R. Noguchi, Y. Toyoshima, Y.-I. Ozaki, S. Ueda, K. Watanabe, W. Ogawa, S. Kuroda, Temporal coding of insulin action through multiplexing of the AKT pathway, *Mol. Cell* 46 (2012) 820–832.
- [49] V. Corby-Harris, A. Drexler, L. Watkins de Jong, Y. Antonova, N. Pálpour, R. Ziegler, F. Ramberg, E.E. Lewis, J.M. Brown, S. Luckhart, M.A. Riehle, Activation of Akt signaling reduces the prevalence and intensity of malaria parasite infection and lifespan in *Anopheles stephensi* mosquitoes, *PLoS Pathog.* 6 (2010) e1001003.
- [50] S. Nagata, F. Hakuno, S.-I. Takahashi, H. Nagasawa, Identification of *Bombyx mori* Akt and its phosphorylation by bombyxin stimulation, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 151 (2008) 355–360.
- [51] D.R. Alessi, M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen, B.A. Hemmings, Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1, *EMBO J.* 15 (1996) 6541–6551.
- [52] C. Almazán, R. Lagunes, M. Villar, M. Canales, R. Rosario-Cruz, F. Jongejans, J. de la Fuente, Identification and characterization of *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations, *Parasitol. Res.* 106 (2010) 471–479.
- [53] A. Seixas, P. Oliveira, C. Termignoni, C. Logullo, A. Masada, L. da Silva Vaz Jr., *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus embryo proteins as target for tick vaccine, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 148 (2012) 149–156.
- [54] V.D. Nair, C.W. Olanow, Differential modulation of Akt/glycogen synthase kinase-3 β pathway regulates apoptotic and cytoprotective signaling responses, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 15469–15478.
- [55] K.C.S. Furquim, G.H. Bechara, M.I. Camargo Mathias, Degeneration of salivary glands of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae), *Vet. Parasitol.* 154 (2008) 325–335.
- [56] K.C.S. Furquim, C.H. Bechara, M.I. Camargo Mathias, Markers of cell death in salivary glands of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae), *Parasitol. Int.* 57 (2008) 396–404.
- [57] D.R.J. Freitas, R.M. Rosa, D.J. Moura, A.L. Setz, E.M. Colodod, D. Driemeier, L. Da Silva Vaz Jr., A. Masada, Cell death during preoviposition period in *Boophilus microplus* tick, *Vet. Parasitol.* 144 (2007) 321–327.
- [58] W.J. L'Amoreaux, L. Janaid, S. Trewdi, Morphological evidence that salivary gland degeneration in the American dog tick *Dermacentor variabilis* (Say), involves programmed cell death, *Tissue Cell* 35 (2003) 95–99.
- [59] D. Kulms, T. Schwarz, Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis, *Photochem. Photobiophys. Photomed.* 16 (2000) 195–201.
- [60] M. Pap, C.M. Cooper, Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 19929–19932.
- [61] K.M. Jacobs, S.R. Bhawe, D.J. Ferraro, J.J. Jaboin, D.E. Hallahan, D. Thotala, GSK-3 β : a bifunctional role in cell death pathways, *Int. J. Cell Biol.* 2012 (2012) 930710.
- [62] D.K. Thotala, L. Gong, A.K. Dickey, D.E. Hallahan, E.M. Vazirovskaya, A new class of molecular targeted radioprotectors: GSK-3 β inhibitors, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 76 (2010) 557–565.
- [63] G.N. Bijar, P. De Sarno, K.S. Jope, Glycogen synthase kinase-3 β facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis, *Protection by lithium*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 7583–7590.
- [64] J.F. Sanchez, L.F. Snidman, A.L. Williamson, S. Fan, S. Chakraborty-Sett, S.B. Maggiora, Glycogen synthase kinase 3 β -mediated apoptosis of primary cortical astrocytes involves inhibition of nuclear factor kappaB signaling, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 4649–4662.
- [65] J.E. Lee, J.S. Kang, Y.-W. Ki, S.-H. Lee, S.-J. Lee, K.S. Lee, H.C. Koh, Akt/GSK3 β signaling is involved in Fipronil-induced apoptotic cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Toxicol. Lett.* 202 (2011) 133–141.
- [66] S.S.E. Cox, M. van der Giezen, S.J. Yarr, M.R. Crompton, J. Towar, Evidence from bioinformatics, expression and inhibition studies of phosphoinositide-3 kinase signalling in *Giardia intestinalis*, *BMC Microbiol.* 6 (2006) 1–16.
- [67] H. You, G.N. Gobert, M.K. Jones, W. Zhang, D.P. McManus, Signalling pathways and the host-parasite relationship: putative targets for control interventions against schistosomiasis: signalling pathways and future anti-schistosome therapies, *Bioessays* 33 (2011) 203–214.
- [68] H. Mehlhorn, K.A.S. Al-Kasheid, S. Al-Quraishi, F. Abd-el-Chaffar, Research and increase of expertise in arachno-entomology are urgently needed, *Parasitol. Res.* 110 (2012) 259–265.
- [69] S. Karim, S.W. Adamson, RNA interference in ticks: a functional genomics tool for the study of physiology, in: E. Jockusch (Ed.), *Advances in Insect Physiology – Small RNAs: Their Diversity, Roles and Practical Uses*, Academic Press, London, 2012, pp. 119–154.
- [70] S. Kurscheid, A.E. Low-Tabor, M.R. Valle, A.G. Bruyeres, V.J. Doogan, U.G. Munderloh, F.D. Guerrero, R.A. Barren, M.J. Bellgard, Evidence of a tick RNAi pathway by comparative genomics and reverse genetics screen of targets with known loss-of-function phenotypes in *Drosophila*, *BMC Mol. Biol.* 10 (2009) 1–21.
- [71] G. Barry, P. Alberdi, E. Schmetzler, S. Weisheit, A. Kohl, J.K. Fazalierley, L. Bell-Sakiy, Gene silencing in tick cell lines using small interfering or long double-stranded RNA, *Exp. Appl. Acarol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-012-9598-x>.