



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO CAMPUS MACAÉ**  
**CURSO DE FARMÁCIA**

Análise da expressão gênica durante a  
embriogênese do carrapato *Rhipicephalus*  
(*Boophilus*) *microplus*

BRUNO MARQUES COSTA DE MORAES

Macaé

Dezembro de 2013



BRUNO MARQUES COSTA DE MORAES

Título: Análise da expressão gênica  
durante a embriogênese do carrapato

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Monografia apresentada ao curso  
de Farmácia da Universidade  
Federal do Rio de Janeiro como  
um dos requisitos para obtenção  
do título de farmacêutico

Orientador: Dr. Jorge Luiz da Cunha Moraes

Co-Orientador: Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca

Dedico esse Trabalho  
de conclusão do Curso de  
Farmácia à minha família  
por todo o suporte dado  
ao longo da graduação  
a fim de terminar esta árdua  
etapa da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar;

À Família por todo o apoio;

Ao Prof. Dr Jorge Moraes por esses anos me aturando, ter dado a oportunidade de começar um projeto que me levou a descobrir o que eu quero para minha vida;

À todos do LIBHM que contribuíram para que não fosse apenas um laboratório de pesquisa, mas sim uma verdadeira família, um lugar legal de se trabalhar e onde pretendo ficar mais um longo tempo;

Aos meus colegas de curso, pois só eles sabem da luta que passamos enfrentar um curso como o nosso, em um campus em plena construção e ainda mais longe de casa, definitivamente não foi fácil;

A todos que de alguma forma contribuíram para o crescimento do projeto

A vida.

**“Longe de casa, perto do mar, o vento no seu rosto, histórias pra contar.”**

**Forfun**

## LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1 - O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parasitando seu hospedeiro, o boi (*Bos taurus*). (Em <<http://www.agrovetmarket.com/technicalarticlesui.aspx?.language=2&.article=51>> Acessado em 4/12/2013).

Figura 2 - O ciclo biológico do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Seu desenvolvimento é dividido em duas fases: Uma fase de vida livre e outra parasitando seu hospedeiro, o boi (*Bos taurus*). (Retirado de Gonzales, 1974).

Figura 3 - Algumas das vias metabólicas possuem o objetivo de formar ATP. (Em <<http://qnesc.s bq.org.br/online/qnesc06/atual.pdf>> Acessado em 5/12/2013).

Figura 4 – Sequência Molde para a projeção dos primers.

Figura 5 – Lista de primers projetados para o PCR em tempo real

Essa figura mostra alguns dos primers que foram feitos de acordo com parâmetros pré estabelecidos como ter no máximo vinte pares de base, possuir um produto com até cento e vinte pares de bases e possuir uma melting temperature (TM) adequada.

Figura 6 – Curva de Melting dos Primes

No gráfico da curva de melting podemos extrair importantes informações como em que temperatura o seu primer se encontra metade em fita dupla e a outra em fita simples durante o aquecimento e com isso podemos comparar com a temperatura teórica em que o Primer3Input nos informara na hora da confecção do mesmo.

Além disso, podemos observar um pico único nos dizendo que há apenas um produto sendo gerado afastando a possibilidade de o primer estar amplificando outro gene se não o de interesse (Ririe, K.M. Et al.,1997).

Figura 7 – Padrão de amplificação do primer da enzima PFK no 7º dia

Todos os primers foram testados com o mesmo cDNA de ovo do carrapato no sétimo dia, pois mesmo na teoria ele atendendo aos parâmetros citados anteriormente é necessário ver se na prática o seu primer irá funcionar o qPCR.

#### Figura 8 - Expressão relativa da enzima NADH Glutamato Desidrogenase

A enzima NADH glutamato desidrogenase libera os grupos  $\alpha$ -amino transferidos pelas transaminases. Nota-se um grande salto na sua expressão gênica a partir do sétimo dia, dia chave para a embriogênese. Reforçando a tese que após a celularização ocorre uma degradação intensa de aminoácidos como descrito por MORAES, 2005. –

#### Figura 9 - Expressão relativa da enzima Aspartato Aminotransferase

A aspartato aminotransferase (AAT), tem a capacidade de converter o aspartato diretamente a oxaloacetato, para ser utilizado pela gliconeogênese, Apresenta alta expressão gênica a partir da celularização do embrião assim como a NADH glutamato desidrogenase (FIGURA 4). Seu padrão de expressão gênica é semelhante a sua atividade específica com já demonstrado antes pelo grupo (MORAES, 2005).

#### Figura 10 - Expressão relativa do enzima Oxido Nítrico Sintase

O oxido nítrico tem diversas funções biológicas como no sistema cardiovascular, sistema imune, sistema respiratório entre outras.

Ele utiliza cálcio como cofator da reação enzimática onde arginina se transforma em um intermediário, a N-hidroxi-L-arginina, com a presença de NADPH e  $Ca^{2+}$ , os quais necessitam de outras moléculas de NADPH e  $O_2$  para então formar L-citrulina e NO. Observamos uma possível regulação gênica exercida pelo cálcio onde sua presença como cofator pode vir a controlar o nível de expressão do gene dessa enzima.

#### Figura 11 - Expressão relativa do transportador SERCA

Podemos observar um padrão de expressão gênica semelhante ao da enzima oxido nítrico sintase (FIGURA 6), pois podemos ligá-las ao uso do cálcio, um dos maiores segundos mensageiros que se conhece, sendo assim uma rota essencial a ser estudada.



#### Figura 12 - Expressão relativa da Proteína Ligadora de Cálcio (Calmodulina)

Pode ser observado um padrão de expressão gênica totalmente contrário ao da Oxido Nítrico Sintase e da SERCA sabe-se que essa proteína possui quatro sítios de ligação para o cálcio e a partir dessa ligação o cálcio irá exercer sua função biológica no determinado tecido como em que se encontra como no coração onde o complexo formado calcio-calmodulina é capaz de modular os níveis de AMPc e GMPc. – Pág 40

#### Figura 13 - Expressão relativa da enzima Succinato Desidrogenase

Presente no complexo no complexo II da cadeia transportadora de elétrons é responsável pela oxidação do succinato à fumarato ela está localizada na membrana interna da matriz mitocondrial (Devlin & Michelacci, 2003).

Após a secularização do embrião nota-se um aumento na expressão do gene pelo fato do mesmo necessitar de um aporte maior de ATP pois sabe-se que a cadeia transportadora de elétrons e o ciclo de krebs é responsável pela maior fonte de produção do ATP (Navarro & Boveris, 2007).

#### Figura 14 - Expressão relativa da enzima Piruvato Carboxilase

Observamos um aumento significativo da expressão do gene após o sétimo dia, dia este que é chave no desenvolvimento embrionário do carrapato com a formação do blastoderma celular. Pois é a partir desse dia que enzimas da via gliconeogênicas começam a ter maiores níveis de expressão gênica como a PEPCK (LOGULLO, 2009).

#### Figura 15- Expressão relativa da enzima Fosfofrutoquinase

Esta enzima da via glicolítica possui um nível de expressão totalmente diferente das enzimas da via gliconeogênicas, sugerindo uma preferência da mesma em relação à glicolítica.

## LISTA DE ABREVIações

$\mu$ L-microlitro

cDNA.- DNA complementar

dicarbonato de dietila - DEPC

Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase - PEPCK

Fosfofrutoquinase – PFK

Glicogênio Sintase 3 - GSK3

Mililitro - mL

micromolar - mM

NaOH- hidróxido de sódio

Celcius - °C

PCR quantitativo - qPCR

Reação em cadeia da Polimerase - PCR

Reticulo sarcoplasmático  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase - SERCA

Acido ribonucleico - RNA

RNA dupla fita - dsRNA

Adenosina Trifosfato - ATP

Adenosina Difosfato - ADP

## SUMÁRIO

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| RESUMO.....                         | pag: 1  |
| INTRODUÇÃO.....                     | pag: 2  |
| JUSTIFICATIVA.....                  | pag: 9  |
| OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS..... | pag: 10 |
| MATERIAIS E MÉTODOS.....            | pag: 11 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO.....         | pag: 14 |
| CONCLUSÃO.....                      | pag: 26 |
| REFERÊNCIAS.....                    | pag: 27 |

## RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é ectoparasita hematófago, encontrado em quase todas as regiões do mundo sendo responsável por perdas anuais na ordem de 2 bilhões de dólares para pecuária no Brasil. Os métodos disponíveis atualmente para controle do *R. microplus* como vacinação e banho com carrapaticidas não são suficientes para controlar a infestação de bovinos. Desta forma, a descoberta de novas abordagens como o desenvolvimento de fármacos contra carrapatos torna-se estratégico para tentar reverter este quadro. Neste sentido, a proposta central deste trabalho foi analisar a transcrição gênica por qPCR/PCR em tempo real e a atividade específica de enzimas/proteínas envolvidas com o metabolismo energético e a embriogênese desse carrapato.

Com estudo das enzimas do metabolismo de cálcio podemos propor pelo perfil de expressão da Proteína Ligadora de Cálcio (Calmodulina), do SERCA (retículo sarcoplasmático  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, um transportador de cálcio do citosol para o lumem) e da Oxido nítrico sintase que ocorre uma regulação gênica que implica na modulação do metabolismo do cálcio intracelular, esse mecanismo pode ser semelhante ao dos mamíferos em que a calmodulina forma complexo com o cálcio para desempenhar algumas de suas funções, uma delas de estimular a produção de oxido nítrico pela ação da oxido nítrico sintase que entre outros efeitos se difunde do endotélio dos vasos sanguíneos para os vasos levando o relaxamento dos mesmo, um mecanismo tão importante que é utilizado por uma vasta classe terapêutica de anti-hipertensivos. Analisando os resultados da PFK-1 e da Piruvato Carboxilase vimos que a partir da formação do blastoderma celular, a gliconeogênese é a via predominante. Sobre o metabolismo de aminoácidos pode-se notar que na segunda fase da embriogênese ocorre um aumento da expressão gênica, os metabolitos gerados podem gerar substratos para a gliconeogênese. Comparando o perfil de expressão de genes com resultados anteriores do grupo onde foi medida a atividade das enzimas NADH Glutamato desidrogenase e da Aspartato Aminotransferase observamos que a expressão gênica acompanha o aumento de atividade da enzima Aspartato Aminotransferase e que no caso da NADH Glutamato desidrogenase isso não acontece. Acreditamos que este trabalho dará suporte para escolha das melhores vias metabólicas que poderão ser afetados por fármacos específicos contra este parasita.

Palavras Chave: Carrapato; Expressão Gênica; Embriogênese; qPCR

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O carrapato

Os carrapatos são ectoparasitas obrigatórios. Existem cerca de 830 espécies divididas em duas grandes famílias: Argasidae com 170 espécies e a Ixodidae, com 660 espécies e ainda existe uma terceira família (Nuttalliellidae) com apenas um representante que tem seu habitat na África (NORVAL *et al.*, 1991).

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887; Acari: Ixodidae) é um ectoparasita hematófago obrigatório, originário da Ásia e tem a preferência de parasitar os grandes rebanhos bovinos. Pode ser encontrado em diversos continentes como Américas, África e Oceania além da Ásia, seu local de origem, esses lugares possuem em comum o clima, pois seu desenvolvimento é favorecido pelo mesmo (JONSSON *et al.*, 2000).



Figura 1 - O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parasitando seu hospedeiro, o boi (*Bos taurus*). (Em< <http://www.agrovetmarket.com/technicalarticlesui.aspx?.language=2&.article=51>> Acessado em 4/12/2013)

### 1.2 O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no contexto econômico

O carrapato bovino causa diversos prejuízos econômicos para a criação de gado (JOHNSTON, 1985), e com isso tenta-se elaborar diversas estratégias de controle do mesmo (NARI, 1995). Esse parasita consegue sugar cerca de três ml do hospedeiro (CANAL *et al.*, 1995) levando a muita perda no valor comercial do bovino pois além da produção do leite (Sutherst *et al.*, 1983), ele prejudica o couro pois o mesmo inflama (SEIFERT *et al.*, 1968) e por último a carne do bovino também é afetada (SUTHERST *et al.*, 1983), fazendo com que o animal parasitado chegue a perder até 70% de seu

valor comercial.

Este parasita ainda atua como vetor de doenças, como a tristeza parasitária bovina, causada por protozoários do gênero *Babesia* e pela ricketsia do gênero *Anaplasma* (LEAL *et al.*, 2006), mais um motivo para se buscar um método de controle mais eficaz.

### 1.3 Métodos de controle

Atualmente são empregados produtos químicos como método de controle do carrapato, porém sabe-se que não é aconselhável seu uso, pois ele consegue agir apenas na fase parasitária do carrapato e isso corresponde a aproximadamente a 5% do tempo total de vida do mesmo, além disso, favorece a seleção de animais resistentes funcionando como um agente selecionador (LEAL *et al.*, 2006). O uso desenfreado desses produtos leva a danos ao próprio bovino podendo contaminar carne, leite, e o administrador dos produtos não se esquecendo do meio ambiente (LEAL *et al.*, 2006).

Com todos os problemas que os agentes químicos usados no controle da praga acarretam, se torna importante a busca de um modo mais eficaz de controle do carrapato. Diversos grupos ao redor do mundo trabalham nisso e uma das formas mais seguras e promissoras é a criação de vacinas para erradicar a praga, pois ela é específica pelo fato de ter a capacidade de atingir apenas o parasita e ainda eliminaria o problema de contaminação do meio ambiente. Outra vertente de pesquisa engloba o uso de produtos naturais como forma de controle, em especial o óleo de nim onde o mesmo conseguiu expressiva queda no número de postura da fêmea (MICHELETTI, 2009)

### 1.4 Ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Este ectoparasita está incluso na família Ixodidae com um único hospedeiro no seu ciclo e normalmente parasita bovinos, sendo raramente encontrado em outros animais. Durante seu ciclo de vida a fêmea após a ingestão de sangue ganha a denominação de teleógina e então a mesma se desprende do bovino e começa a postura em algum lugar seguro no pasto, uma única fêmea é capaz de colocar até 3 mil ovos.

Os ovos são pequenos, esféricos e de coloração castanha. Após a eclosão das larvas permanecem abrigadas em algum arbusto ou mesmo na grama ficando a espera do hospedeiro passar para quem assim consiga começar a parasitá-lo dando início a um novo ciclo. Essa mesma larva pode ficar meses a espera de um hospedeiro dependendo das condições climáticas em especial da temperatura e umidade do local. Com a fixação da larva no hospedeiro ela começa a ingestão de sangue e em poucos dias ela irá sofrer a mudança na sua cutícula tornando-se ninfa que por sua vez irá se alimentar por mais uns dias até que sofrerá a diferenciação em macho ou fêmea. É nesse estágio que ocorre a cópula e logo depois a fêmea passará para a fase denominada paternógina onde a mesma se encontra parcialmente ingurgitada e ao final quando ela terminar sua ingestão, se solta do boi e o macho continua no hospedeiro podendo assim copular com novas fêmeas. Todo o período parasitário dura cerca de 21 dias.

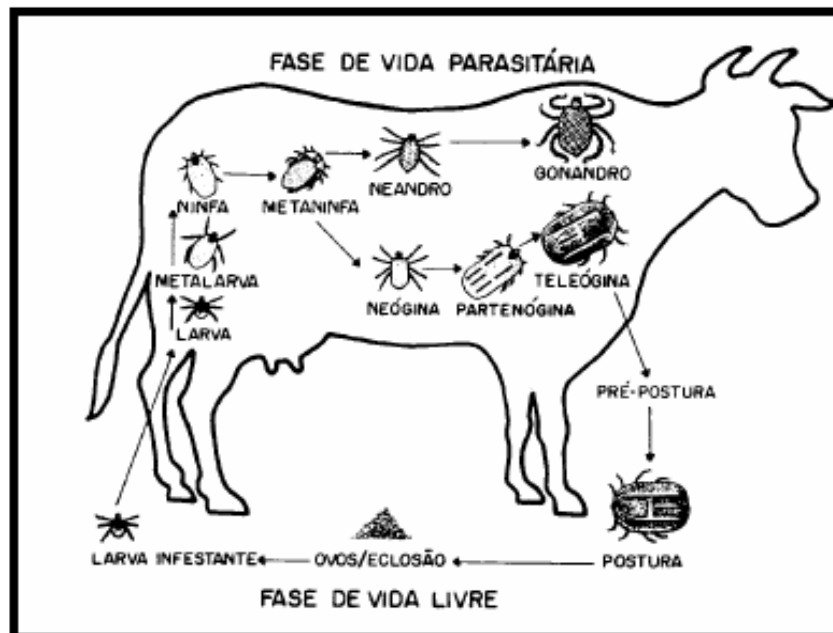


Figura 2: O ciclo biológico do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Seu desenvolvimento é dividido em duas fases: Uma fase de vida livre e outra parasitando seu hospedeiro, o boi (*Bos taurus*). (Retirado de GONZALES, 1974)

### 1.5 Embriogênese e Ovogênese

Diferentemente dos organismos mamíferos onde existe a dependência de nutrientes exógenos para o desenvolvimento do embrião, nos animais ovíparos essa dependência não existe, todos os nutrientes necessários foram doados pela mãe e estocados pelo embrião para seu uso futuro (SONG J.L., et al. 2006); (FAGOTTO F. 1990).

Já no evento da ovogênese ocorre um aumento do tamanho do ovário que pode ser explicado pelo acúmulo de RNAs, carboidratos, lipídeos e proteínas que servirão de nutrientes para abastecer vias metabólicas durante a embriogênese. (CHERRY L.M. 1973); (CHIPPENDALE G.M. 1978.).

Com as diversas mudanças ocorridas durante esse momento chave do ciclo de vida do carrapato, o estudo desse evento é essencial podendo levar a descobertas de novos possíveis alvos moleculares com a finalidade de controlar a praga (SEIXAS A, et al 2010).

## 1.6 Metabolismo Energético

Em 1860 com Louis Pasteur começou a observar alguns micro-organismos com capacidade fermentadora. Anos mais tarde o pesquisador Otto Fritz Meyerhof mostrou que o músculo poderia converter glicogênio em ácido láctico na ausência de oxigênio e caso houvesse a presença do mesmo apenas uma parte do ácido seria oxidada (KRESGE et *al.*, 2005) convertendo a outra novamente em glicogênio com essa contribuição acabou ganhando o premio Nobel em 1922 (KRESGE et *al.*, 2005).

Com a necessidade de suprir energeticamente os seres que habitam o planeta é necessário que os mesmos busquem “fontes energéticas” de alguma forma, seja pela alimentação onde carboidratos, os lipídeos, as proteínas irão ser convertidas em energia ou como os organismos autotróficos que utilizando a luz solar e conseguem a sua fonte energética. Essa famosa energia é denominada de Adenosina Trifosfato (ATP) que gera por meio da sua quebra acaba formando o composto chamado Adenosina Difosfato (ADP) (Em <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc06/atual.pdf>> Acessado em 10/12/2013) essa pesquisa rendeu ao grupo do prof. Jens C. Skou, da Universidade de Aarhus (Dinamarca) o premio Nobel de química no ano de 1997 (Em <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1997/press.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1997/press.html)> Acessado em 12/12/2013).

Sabe-se que o ATP é hidrolisado gerando energia porem essa quebra não é feita de incontrolavelmente, pois possui diversas vias e etapas coordenadas para tal feito, essas diversas etapas são as chamadas vias metabólicas (Em <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc06/atual.pdf>> Acessado em 11/12/2013).



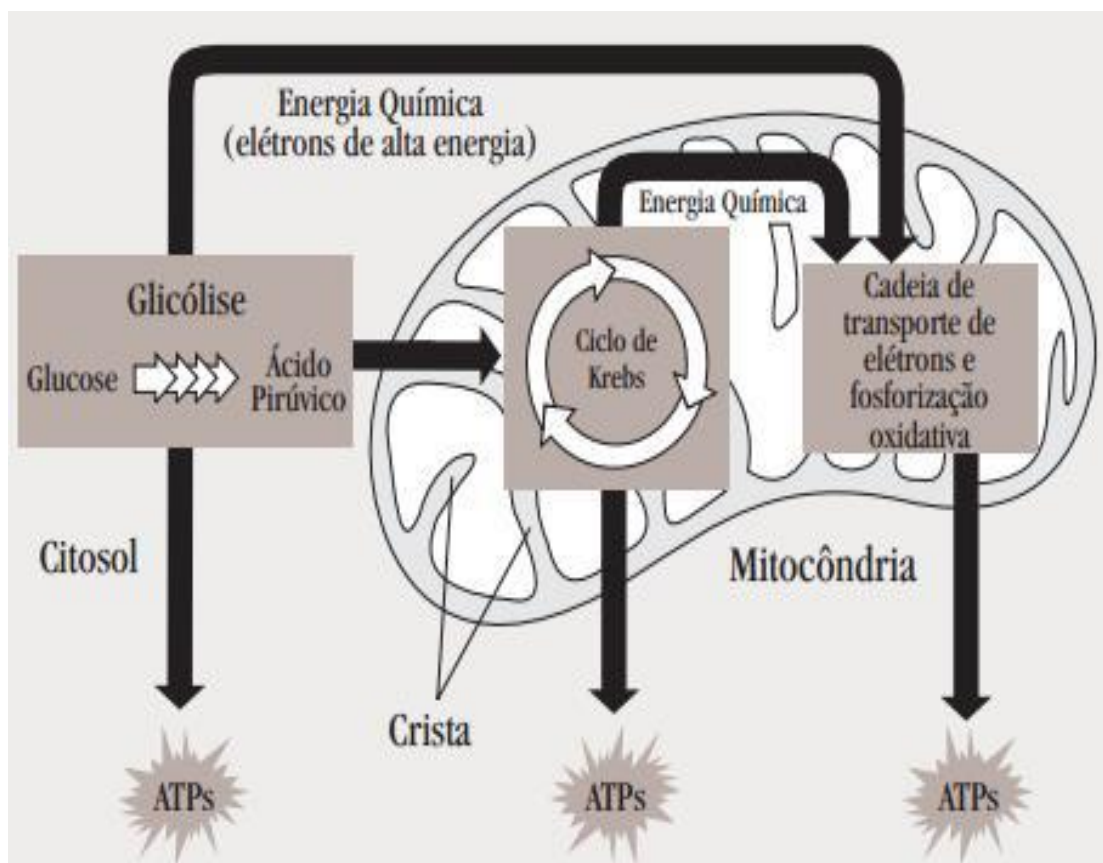


Figura 3 - Algumas das vias metabólicas possuem o objetivo de formar ATP. (Em <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc06/actual.pdf>> Acessado em 5/12/2013).

### 1.7 Metabolismo energético em artrópodes

Encontra-se na literatura diversos estudos relacionados ao metabolismo energético nos artrópodes, eles possuem diversas vias conservadas evolutivamente, porém com alguns detalhes que os diferenciam dentro da sua própria família, pois apesar de serem todos artrópodes os mesmos possuem estratégias de vida totalmente diferentes logo pequenas alterações nas vias conservadas são explicadas por esse fato.

Uma dessas situações é o vôo, que requer demanda energética elevada e para melhor mobilização de moléculas há a necessidade de cooperação e coordenação de vários tecidos como, por exemplo, o mosquito *Anopheles Gambiae* onde o mesmo utiliza o hormônio adipocinético mobilizando diversas fontes de carboidratos e lipídeos que serão utilizados para providenciar energia para o vôo (KAUFMANN e BROWN, 2008).

Outra importante adaptação no metabolismo desses animais em especial o carrapato é em relação à ingestão de sangue que os mesmos fazem, pois sabemos que no mesmo há diversas substâncias tóxicas. Então existe a necessidade da detoxificação do mesmo para que se possa aproveitar a parte do sangue que o animal precisa principalmente para o amadurecimento do ovário e consequente postura de ovos da fêmea completando o ciclo biológico.

Nas últimas décadas houve um aumento da busca por diversos alvos moleculares para o controle dos insetos vetores de doenças, alguns possíveis alvos referentes ao seu metabolismo foram propostos. Dados na literatura mostram que diversas proteínas como a vitelogenina responsável pela formação do vitelo, que funciona como uma reserva de nutrientes (Em <<http://www.brasilescola.com/biologia/ovulos-animais.htm>> Acessado em 11/12/2013) pode indicar muito da estratégia de vida do animal em questão. Vemos que animal que tem a capacidade de voar em direção ao alimento como a *Musca domestica* foi mostrado que o percentual na eclosão dos ovos é próximo de 20% de vitelo (RIBOLLA e DEBIANCHI, 1995). Já em *Rhodnius prolixus* este percentual é maior, eclodindo com 40% do vitelo (OLIVEIRA *et al.*, 1985). No carrapato bovino *R. microplus* esse número chega a 60% (LOGULLO *et al.*, 2002). Como a mosca pode voar para buscar seu alimento, ela necessitaria de menos vitelo. O barbeiro também possui essa capacidade, porém diferentemente da mosca onde a mesma pode ingerir diversas fontes de comida o *Rhodnius prolixus* não, ele se alimenta especificamente de sangue por isso talvez ele necessite de uma maior quantidade de vitelo e finalmente o carrapato que não pode voar, alimenta-se exclusivamente de sangue e ainda precisa aguardar a passagem do boi, necessitando assim de uma maior quantidade de vitelo para uma sobrevivência caso o hospedeiro não passe.

## 1.8 - Interações gênicas

Diversas interações gênicas ocorrem a todo tempo nos seres vivos, desde a primeira célula de um organismo unicelular até os mais complexos. Sabe-se que esses eventos são etapas críticas do desenvolvimento, qualquer erro ocasionado pode acarretar em condições não favoráveis à vida.

Busca-se um melhor entendimento de como uma simples célula de um ovo fertilizado se organiza geneticamente para se que ocorra a multiplicação celular e transforme-se, em um ser complexo.

Dados na literatura apontam que a atividade específica da enzima Glicogênio Sintase 3 (GSK3) está envolvida na expressão gênica da enzima Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase (PEPCK) durante o desenvolvimento embrionário do carrapato *R. microplus* (LOGULLO et al. 2009). Outros genes chave para o sucesso do evento podem estar relacionados a diversas possíveis interações de outros genes, essas interações podem servir de alvos para controle de pragas.

## 2.0 JUSTIFICATIVA

O Brasil possui aproximadamente 170 milhões de cabeças de gado. Conseqüentemente é um dos países com grande predominância do carrapato, sendo o prejuízo maior do que 2 bilhões de dólares por ano, devido principalmente à perda de peso do animal, menor produção de leite e ao enfraquecimento generalizado. Vacinação é uma alternativa para controlar o carrapato *R. microplus*. No entanto, não há uma vacina comercial que seja capaz de controlar os carrapatos que infestam os rebanhos nacionais. A principal forma de controle do *R. microplus* desde a década de 50 é o controle com aplicação de agentes químicos através de banhos de carrapaticidas, cujos compostos mais utilizados são à base de arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, formamida ou piretróides sintéticos. O principal problema deste método é a seleção de populações resistentes, além do risco de contaminação do leite, da carne, dos rios e dos lençóis freáticos, causando danos ao meio ambiente (Jonsson *et al.*, 2000). Outra possibilidade é o desenvolvimento racional de fármacos para uso veterinário, uma molécula que seja, por exemplo, ingerida pelo bovino, que controle ou impeça a infestação por carrapatos. Acreditamos que este trabalho dará suporte ao estudo para desenvolvimento de fármacos contribuindo para elucidação das vias metabólicas que são mais expressas durante a embriogênese do carrapato.

### 3.0 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

#### 3.1 Objetivos Gerais

Monitorar alguns dos principais genes do metabolismo energético durante a embriogênese do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* a fim de tentar entender melhor como o animal se mobiliza geneticamente durante o evento do seu desenvolvimento embrionário

#### 3.2 Objetivos Específicos

Medir quantitativamente alguns genes que possam vir a serem alvos para novos métodos de controle, genes como:

3.2.1) NADH Glutamato desidrogenase

3.2.2) **Aspartato Aminotransferase**

3.2.3) SERCA

3.2.4) Oxido Nítrico Sintase

3.2.5) Proteína Ligadora de Cálcio – Calmodulina

3.2.6) Succinato Desidrogenase -

3.2.7) Piruvato Carboxilase –

3.2.8) **Fosfofrutoquinase (PFK)**

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1) Animais

Os animais utilizados durante as experiências são carrapatos da espécie *S.*, criados em bovinos na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os carrapatos são desenvolvidos em bovinos isolados em estábulos, livres de qualquer contato com o campo. As larvas são colocadas no dorso dos bovinos e após 21 dias, no período modal de queda das teleóginas, o estábulo é lavado e as fêmeas adultas coletadas com auxílio de peneiras, sendo utilizadas para postura dos ovos que são usados nos experimentos.

### 4.2) Manutenção dos ovos

Os ovos são coletados de fêmeas adultas ingurgitadas mantidas a 28°C e umidade de 80 %. Estes ovos desenvolvem-se nessa mesma condição. Os dias de desenvolvimento são contados a partir da oviposição e o desenvolvimento dos ovos é interrompido através de congelamento dos ovos à -20°C.

### 4.3) Extração de RNA

Inicialmente, o gral e o pistilo foram esterilizados por aquecimento em forno à 300 °C por 1 hora e antes do uso foram banhados em NaOH por 30 minutos para eliminação de possíveis RNAses. 1 grama de ovos foram macerados em nitrogênio líquido, subsequentemente, a amostra foi homogeneizada em 10 mL do reagente Trizol. A amostra foi centrifugada a 12000 X g por 10 minutos, o material insolúvel foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado 500 µL de clorofórmio. Em seguida, o material foi homogeneizado por inversão, incubado a temperatura ambiente por 3 minutos, submetido à centrifugação 12000 X g por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e adicionado 500 µL de isopropanol. Posteriormente, a amostra foi homogeneizada por inversão e incubada a -20 °C por 40 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12000 X g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado, a amostra foi lavada com 100 µL de etanol 75 % e após a evaporação do etanol residual o RNA foi utilizado para amplificação da fita de cDNA.

#### 4.4) Síntese da primeira fita de cDNA

O pellet de RNA foi resuspendido em 20  $\mu\text{L}$  de água ultra pura esteril. Em outro tubo próprio para PCR, foi adicionado 2  $\mu\text{L}$  de oligo(dT)<sub>12-18</sub> e em seguida 10  $\mu\text{L}$  da solução de RNA. A amostra foi aquecida a 70 °C por 10 minutos e imediatamente incubada em gelo por 2 minutos. Posteriormente, foi adicionado 4  $\mu\text{L}$  do tampão (first strand buffer) fornecido pelo fabricante para a enzima transcriptase reversa SUPERSCRIPT II (GibcoBRL cat nº 18064-014), 2  $\mu\text{L}$  de DTT 0,1 M e 2  $\mu\text{L}$  de DNTP 10 mM ( 10 mM de ATP, 10 mM de CTP, 10 mM de GTP e 10 mM de TTP). A amostra foi homogeneizada por inversão e incubada em banho-maria a 42 ° C por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  da enzima SUPERSCRIPT II (200 unidades) e o material foi incubada a 42 °C por 1 hora. A enzima foi inativada por aquecimento a 70 °C por 15 minutos.

#### 4.5) Desenho de “Primers” (Oligonucleotídeos inicializadores)

Os primers foram projetados baseados em sequências gênicas depositadas em bancos de dados como o GenBank. O programa de desenho de primer denominado de Primer3Input foi utilizado para desenhar os primers com as seguintes especificações: cerca de 20 nucleotídeos, com Tms próximas de 60 °C e com uma região amplificadora de ate 150 pares de bases.

#### 4.6) Curva de Melt

Para a curva de Melt utilizamos o cDNA com as seguintes diluições: sem diluição, 1:5 , 1:10 , 1:20 e 1:50 com isso vimos que a concentração ideal de uso do cDNA é de 1:20 em todos os primers em uma concentração ótima de 5mM.

Utilizamos 7.5mL do reagente Sybr Green, 0.75  $\mu\text{L}$  dos primers Forward e Reverse, 1 $\mu\text{L}$  de água com dicarbonato de dietila (DEPC) e 5  $\mu\text{L}$  do cDNA do dia analisado.

#### 4.7) Quantificação Relativa (qPCR)

Sabendo das concentrações ótimas de cDNA(1:20) e de Primer (5mM) ,

utilizamos o cDNA dos dias 1 , 5 ,7 ,10 e 16 para compararmos os perfis de expressão gênica. Preparamos um mix para cada enzima e contabilizando 20 reações contendo: 150  $\mu$ L de Mix , 15  $\mu$ L de primer Forward e 15  $\mu$ L do Reverse , 20  $\mu$ L de Água DEPC e mais 5  $\mu$ L de cDNA de diferentes dias da embriogênese.



### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para que pudesse ser feito os primers dos genes de interesse foi necessário ter as sequencias codificantes para que servissem de molde e ai sim construir os primers. Essas sequências estão disponíveis em bancos de dados públicos como o Pubmed e o VectorBase.



Figura 4 – Sequencia Molde para a projeção dos primers

Essa figura mostra alguns dos primers que foram feitos de acordo com os parâmetros pré estabelecidos como ter no máximo vinte pares de base, possuir um produto com até cento e vinte pares de bases e possuir uma melting temperature (TM) adequada.

```

Acetil-coa carboxilase
LEFT PRIMER 4_20 60.14 50.00 3.00 1.00 TTETGCTCTGGCACTGATG
RIGHT PRIMER 124_20 59.43 50.00 6.00 2.00 AATCTGAGAAGTCCGCTTC

Aspartato amino transferase
LEFT PRIMER 467_20 59.53 45.00 4.00 1.00 ACCTTCGTCCAATTCCTTGA
RIGHT PRIMER 581_20 59.69 45.00 4.00 3.00 TGGTTTGAACTCTGGCAATG

Calcium binding
LEFT PRIMER 464_20 60.27 45.00 5.00 1.00 ATAAAGCACATGCTGGACAA
RIGHT PRIMER 581_20 59.99 50.00 4.00 2.00 AGGCAAGGAACCTGTCTCA

Citrato sintase isoforma A
LEFT PRIMER 320_20 59.32 50.00 3.00 2.00 GGACTGGAAGTGGTGTGGAT
RIGHT PRIMER 436_20 59.03 45.00 4.00 0.00 TCGTCTCGGGAAAGAAGAAA

Citrato sintase isoforma B
LEFT PRIMER 106_20 59.72 50.00 5.00 2.00 TTGTGTCAACCAGAGGAAACG
RIGHT PRIMER 225_20 60.13 50.00 5.00 2.00 CGAACCTTCGCTTGTACCAT

Hexoquinase
LEFT PRIMER 252_20 59.95 45.00 4.00 0.00 TGACACATATACGGGGGAAA
RIGHT PRIMER 374_20 59.87 45.00 5.00 1.00 TCGGCCCTCTACAGTGTCT

NAD- glutamato desidrogenase
LEFT PRIMER 520_20 59.97 50.00 5.00 3.00 GAAGATGGCCACAACCTTGGT
RIGHT PRIMER 639_20 60.05 50.00 5.00 1.00 ACACCACGGTACTGTTTGA

Osteoclast growth factor
LEFT PRIMER 353_20 59.95 55.00 3.00 2.00 CCAGGTATGGACAGGAGCAT
RIGHT PRIMER 498_20 60.09 45.00 4.00 0.00 TGCTTTCCAACAAGGTTTC

Oxido nitrico sintase
LEFT PRIMER 527_20 60.41 55.00 4.00 0.00 CGTCTCCCTTTGCATCCTGT
RIGHT PRIMER 643_20 59.99 45.00 4.00 2.00 CGACTATCCACGTTTGGTCT

Paralitic toxin
LEFT PRIMER 862_20 60.07 50.00 5.00 2.00 CCTGAAGTTCTGCCCATTA
RIGHT PRIMER 982_20 59.67 45.00 4.00 3.00 GATGTCCACTCCACGGTCAGA

PFK
LEFT PRIMER 133_20 59.30 50.00 4.00 0.00 TTCCGATCTCACCCTGTTCT
RIGHT PRIMER 253_20 59.87 50.00 4.00 2.00 AGGCCGAACAGCGATAAGTA

```

Figura 5 – Lista de primers projetados para o PCR em tempo real

No gráfico da curva de melting podemos extrair importantes informações como em que temperatura o seu primer se encontra metade em fita dupla e a outra em fita simples durante o aquecimento e com isso podemos comparar com a temperatura teórica em que o Primer3Input nos informara na hora da confecção do mesmo.

Além disso, podemos observar um pico único nos dizendo que há apenas um produto sendo gerado afastando a possibilidade de o primer estar amplificando outro gene se não o de interesse (Ririe, K.M. Et al.,1997).

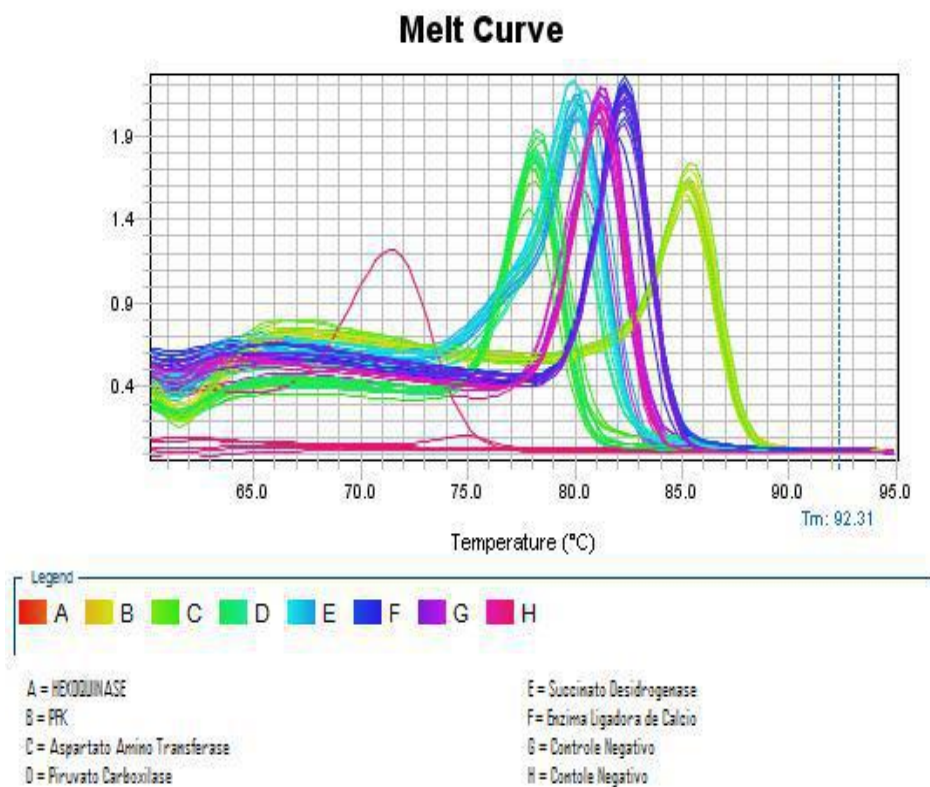


Figura 6 – Curva de Melting dos Primes



Todos os primers foram testados com o mesmo cDNA de ovo do carrapato no sétimo dia, pois mesmo na teoria ele atendendo aos parâmetros citados anteriormente é necessário ver se na pratica o seu primer ira funcionar o qPCR

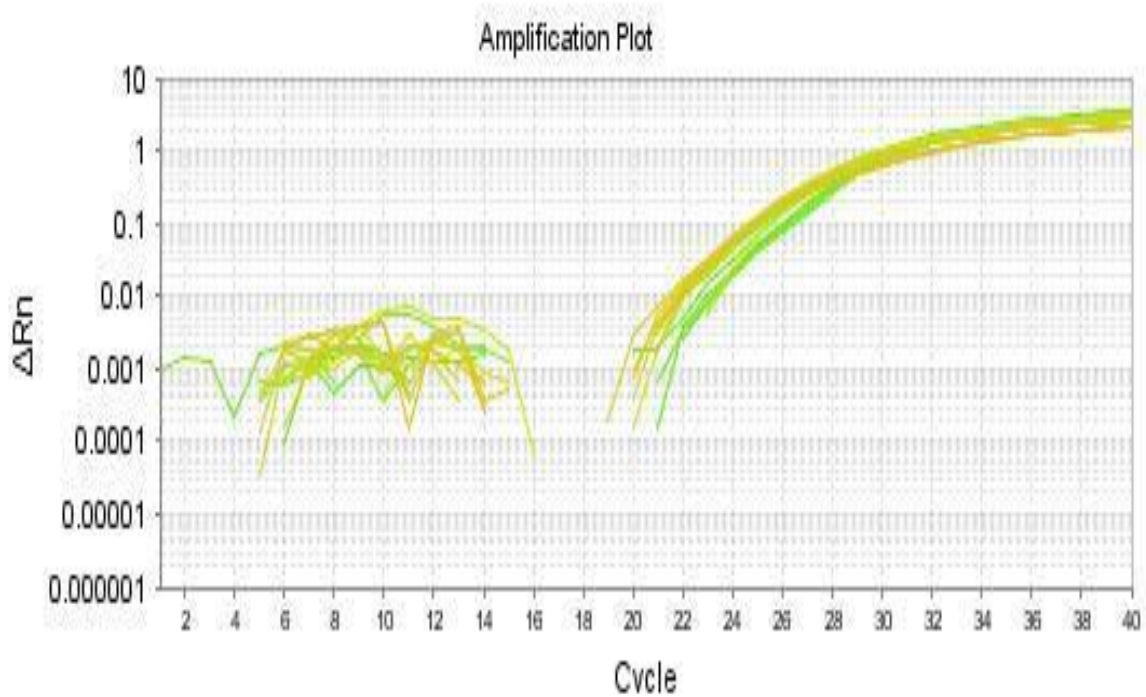


Figura 7 – Padrão de amplificação do primer da enzima PFK no 7º dia

A enzima NADH glutamato desidrogenase libera os grupos  $\alpha$ -amino transferidos pelas transaminases. Nota-se um grande salto na sua expressão gênica a partir do sétimo dia, dia chave para a embriogênese. Reforçando a tese que após a celularização ocorre uma degradação intensa de aminoácidos como descrito por MORAES,2005

Presente no citoplasma e nas mitocôndrias de diversos órgãos como fígado, coração musculo liso entre outros. Essencial para a produção de energia no ciclo de Krebs ela catalisa a transferência do seu grupo amino para o  $\alpha$ -cetoglutarato em uma reação de transaminação e que tem como produto  $\alpha$ -cetoácido (cadeia carbônica remanescente do aminoácido) e glutamato.

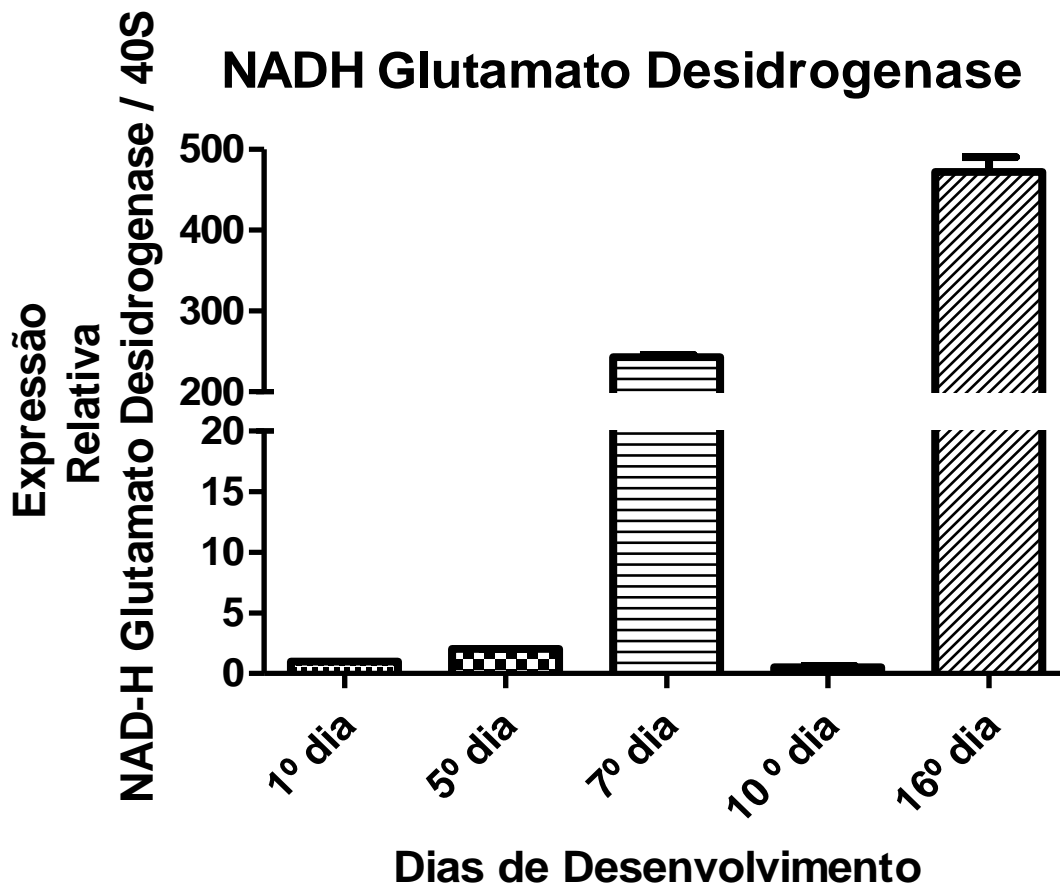


Figura 8 - Expressão relativa da enzima NADH Glutamato Desidrogenase

A aspartato aminotransferase (AAT), tem a capacidade de converter o aspartato diretamente a oxaloacetato, para ser utilizado pela gliconeogênese, Apresenta alta expressão gênica a partir da celularização do embrião assim como a NADH glutamato desidrogenase (FIGURA 4). Seu padrão de expressão gênica é semelhante a sua atividade específica com já demonstrado antes pelo grupo (MORAES, 2005)

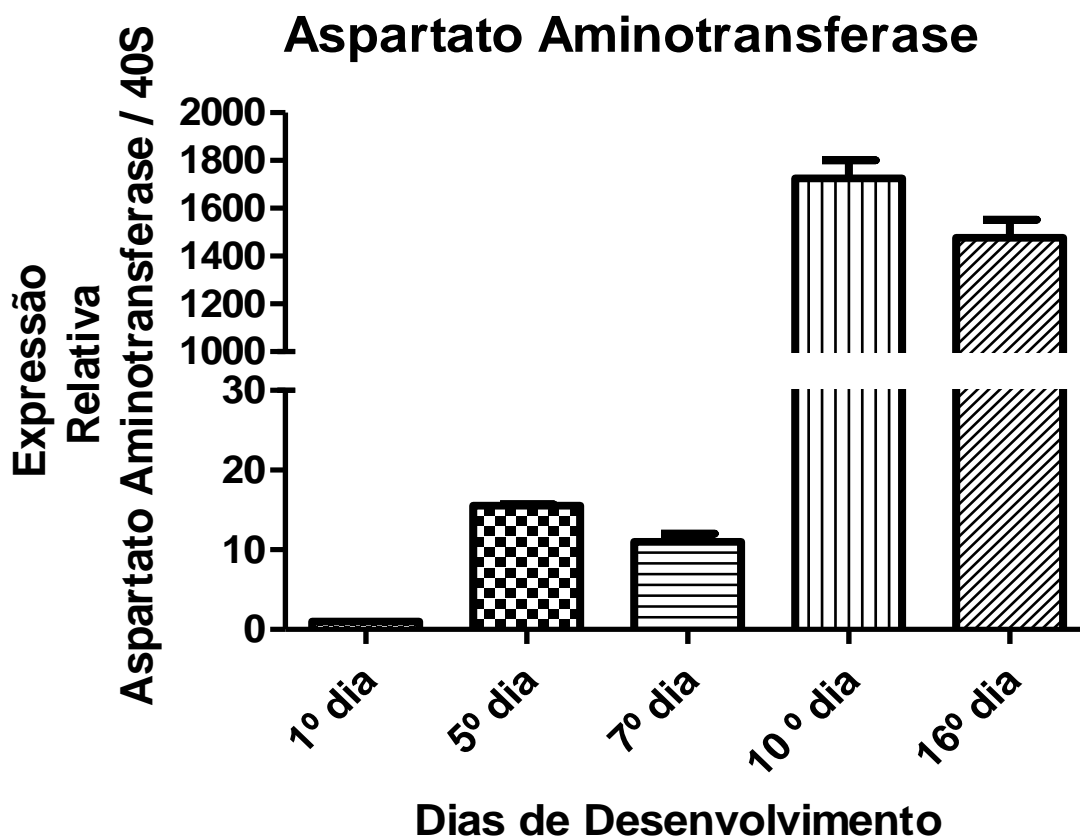


Figura 9 - Expressão relativa da enzima Aspartato Aminotransferase

O óxido nítrico tem diversas funções biológicas como no sistema cardiovascular, sistema imune, sistema respiratório entre outras.

Ele utiliza cálcio como cofator da reação enzimática onde arginina se transforma em um intermediário, a N-hidroxi-L-arginina, com a presença de NADPH e  $\text{Ca}^{2+}$ , os quais necessitam de outras moléculas de NADPH e  $\text{O}_2$  para então formar L-citrulina e NO. Observamos uma possível regulação gênica exercida pelo cálcio onde sua presença como cofator pode vir a controlar o nível de expressão do gene dessa enzima

Ele é um gás altamente lipofílico e solúvel essa propriedade confere a ele uma facilidade para atravessar as membranas biológicas. É um importante sinalizador intracelular e extracelular essa sua função foi descoberta na década de 80 pelo grupo liderado pelos pesquisadores: Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro e Ferid Murad, dando anos mais tarde o prêmio Nobel para o grupo pela sua contribuição (Em: <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1998/index.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1998/index.html)> Acessado em 12/12/2013)

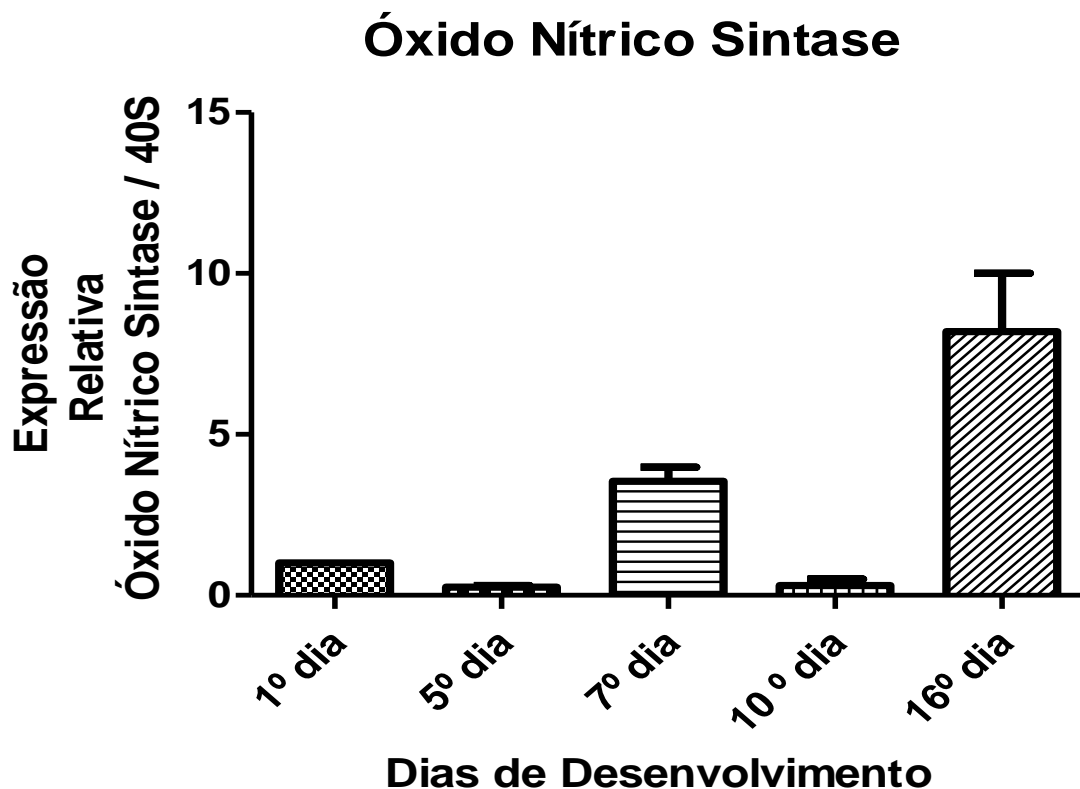


Figura 10 - Expressão relativa do enzima Óxido Nítrico Sintase

Podemos observar um padrão de expressão gênica semelhante ao da enzima óxido nítrico sintase (FIGURA 6), pois podemos ligá-las ao uso do cálcio, um dos maiores segundos mensageiros que se conhece, sendo assim uma rota essencial a ser estudada.

Pertence a família das ATPases que se localiza ligada a membrana celular, são capazes de transportar o íon  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana utilizando a energia química da hidrólise do ATP em ADP (de MEIS L, et al, 2005).

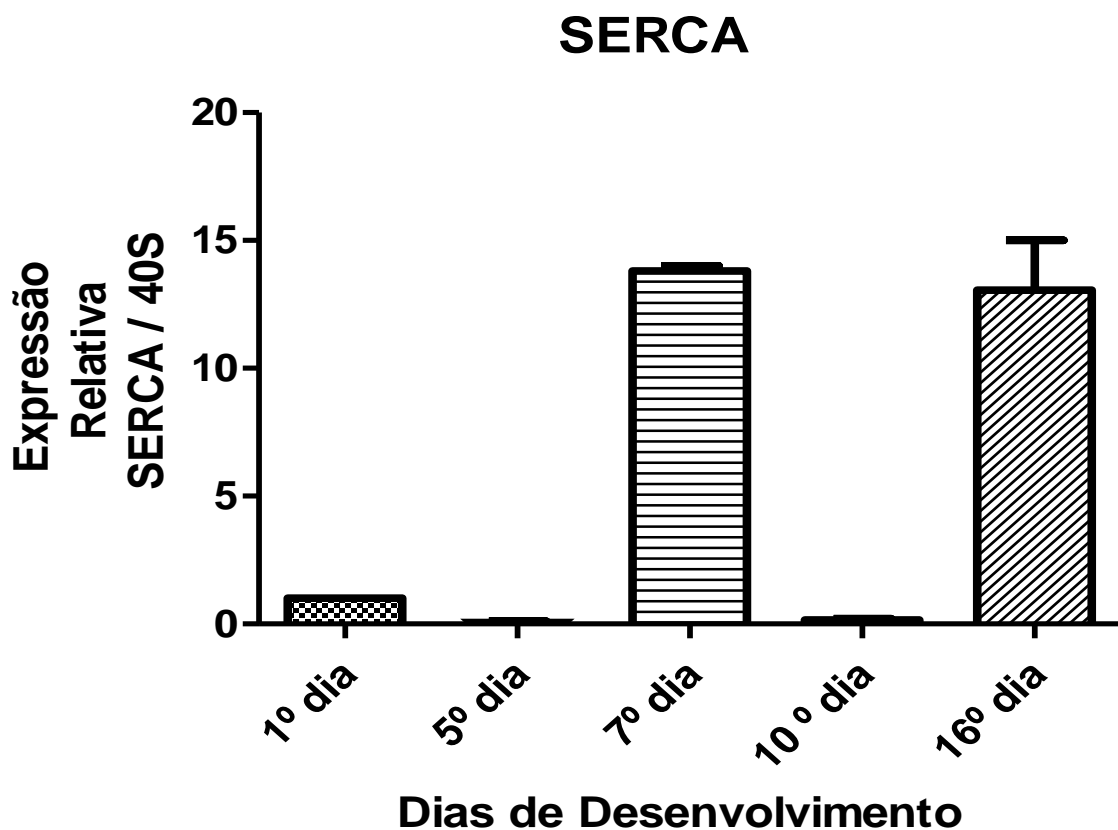


Figura 11 - Expressão relativa do transportador SERCA



Pode ser observado um padrão de expressão gênica totalmente contrario ao da Oxido Nítrico Sintase e da SERCA sabe-se que essa proteína possui quatro sítios de ligação para o cálcio e a partir dessa ligação o cálcio ira exercer sua função biológica no determinado tecido como em que se encontra como no coração onde o complexo formado calcio-calmodulina é capaz de modular os níveis de AMPc e GMPc.

Regula a concentração intracelular do cálcio em vários tecidos e medeia múltiplas funções funcionando como segundo mensageiro acoplado aos íons cálcio formando o complexo conhecido como Calcio-Calmodulina (SALDANHA, 1989).

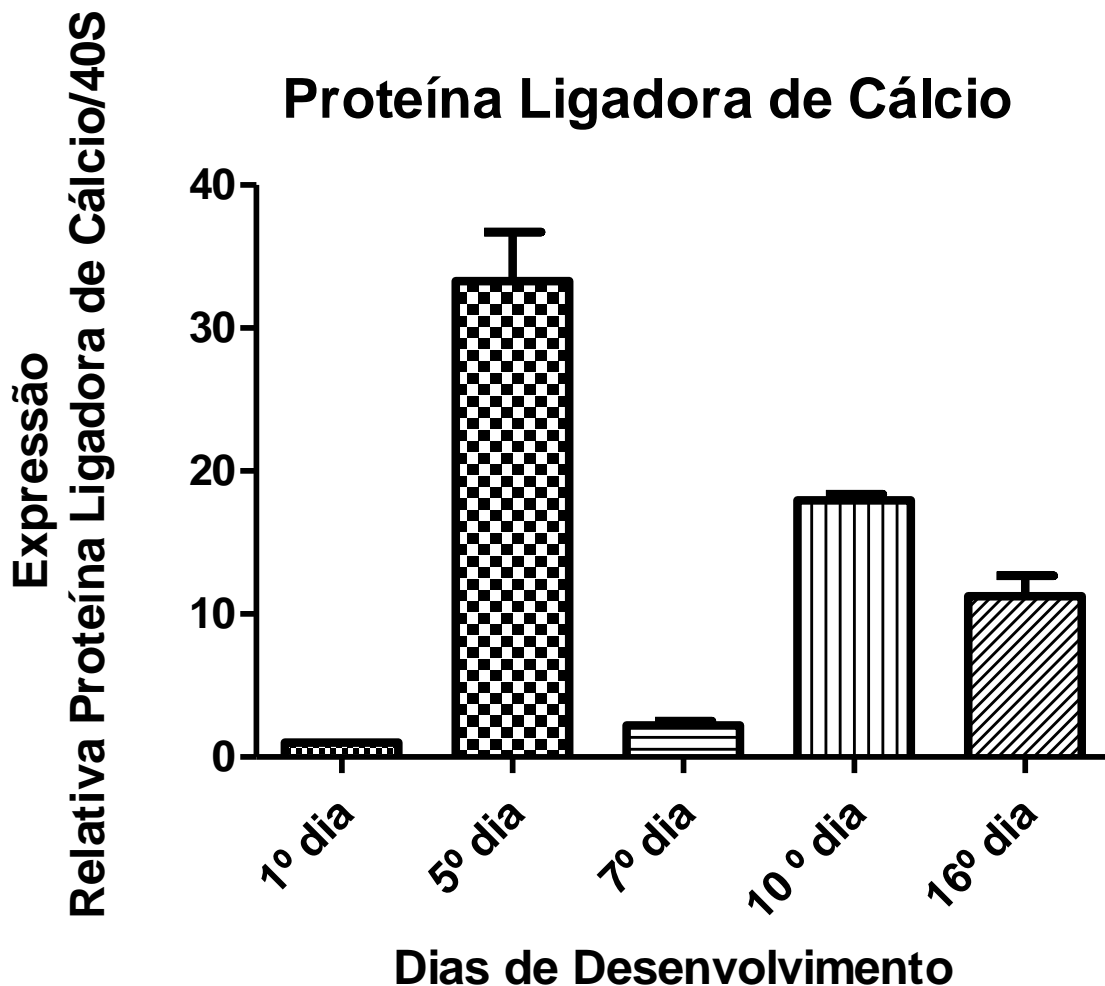


Figura 12 - Expressão relativa da Proteína Ligadora de Cálcio (Calmodulina)

Presente no complexo no complexo II da cadeia transportadora de elétrons é responsável pela oxidação do succinato à fumarato ela está localizada na membrana interna da matriz mitocondrial (Devlin & Michelacci, 2003).

Após a secularização do embrião nota-se um aumento na expressão do gene pelo fato do mesmo necessitar de um aporte maior de ATP pois sabe-se que a cadeia transportadora de elétrons e o ciclo de krebs é responsável pela maior fonte de produção do ATP (Navarro & Boveris, 2007).

Está intimamente ligada a membrana plasmática, retira os elétrons do succinato passando através do FAD para finalmente chegar a cadeia transportadora de eletrons dando seguimento ao ciclo de Krebs. A succinato desidrogenase, catalisa a seguinte reação: Succinato + FAD  $\rightarrow$  Fumarato + FADH<sub>2</sub>

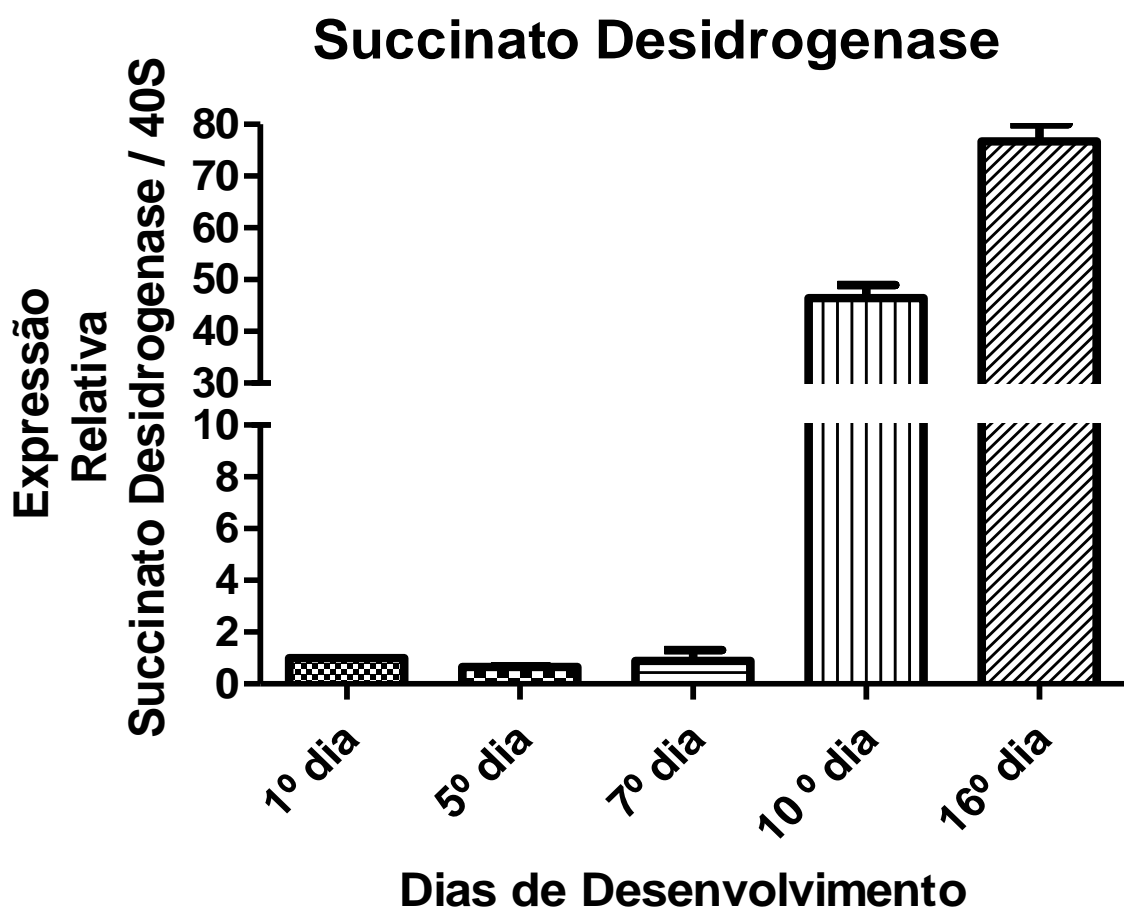


Figura 13 - Expressão relativa da enzima Succinato Desidrogenase

Observamos um aumento significativo da expressão do gene após o sétimo dia, dia este que é chave no desenvolvimento embrionário do carrapato com a formação do blastoderma celular. Pois é a partir desse dia que enzimas da via gliconeogênicas começam a ter maiores níveis de expressão gênica como a PEPCK (LOGULLO, 2009).

Enzima presente na Gliconeogênese, via esta que possui a função de formar açúcar a partir de fontes não glicídicas. É fortemente utilizada em casos de jejum prolongado por exemplo. A enzima é a primeira a entrar em ação utilizando o oxalacetato que é o material de partida para a gliconeogênese catalizando a seguinte reação.

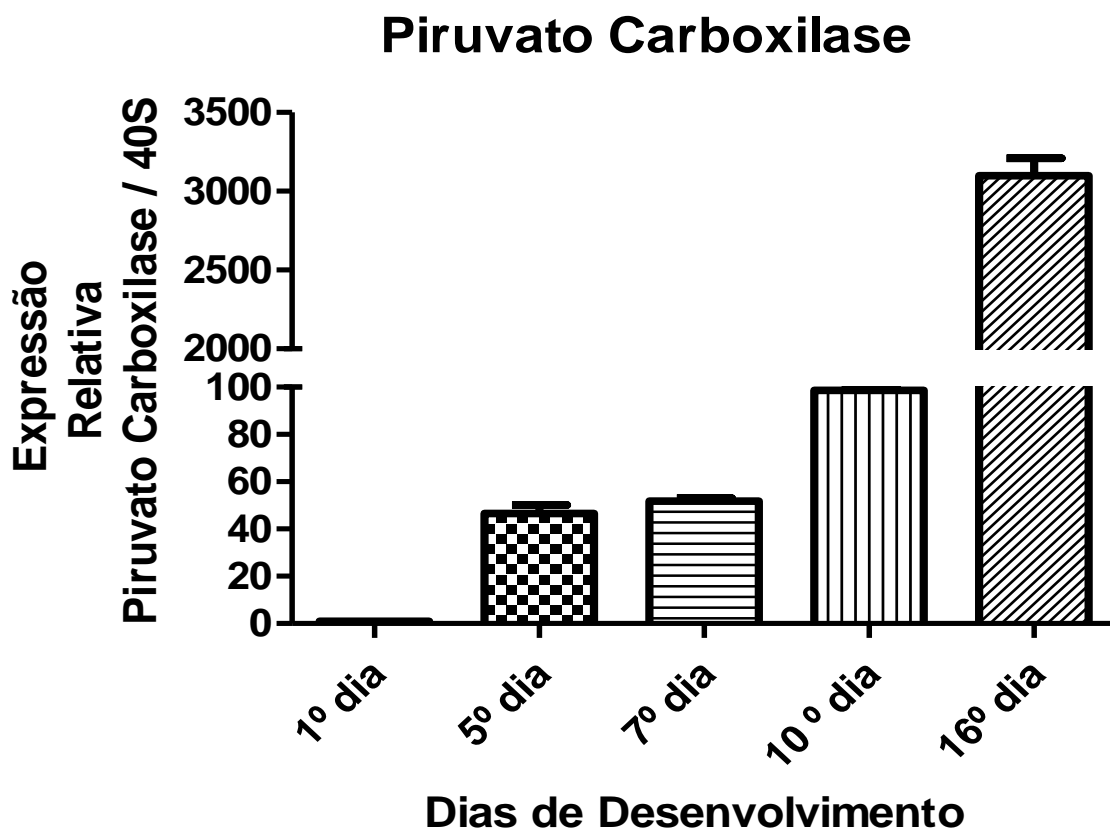


Figura 14 - Expressão relativa da enzima Piruvato Carboxilase

Esta enzima da via glicolítica possui um nível de expressão totalmente diferente das enzimas da via gliconeogênicas, sugerindo uma preferência da mesma em relação a glicolítica

A PFK possui um papel central na regulação da glicólise, junto com a Hexoquinase e a Piruvato Quinase que juntas catalisam as três reações irreversíveis da via glicolítica.

A enzima realiza a reação número 3, onde a célula gasta outra molécula de ATP para fosforilar a frutose-6-fosfato e convertê-la em frutose-1,6-bisfosfato. Sendo assim uma reação irreversível e de controle desta via metabólica (JITRAPAKDEE S et al, 2008)

As enzimas PFK e a Piruvato Carboxilase trabalham em vias opostas enquanto uma participa da “quebra” da glicose a outra participa da formação da mesma

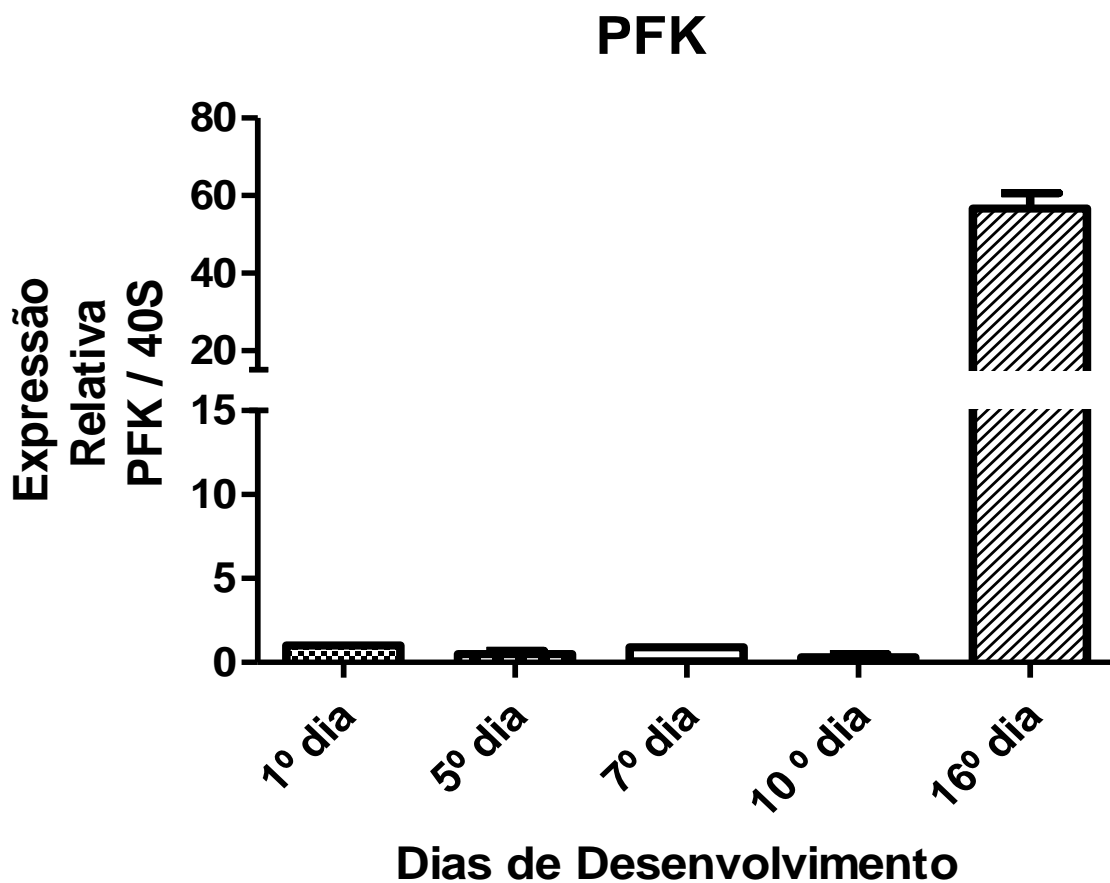


Figura 15 - Expressão relativa da enzima Fosfofrutoquinase

## 6. CONCLUSÃO

Antes de iniciar os experimentos no equipamento “PCR real-time” testamos os primers no PCR comum e vimos que eles funcionavam bem, com esta certeza partimos para o qPCR fazendo a curva de melt dos primers para termos mais uma garantia que eles não formariam dímeros. Com as curvas de melt em mãos estamos analisando e comparando a expressão gênica no 1º, 5º, 7º, 10º e 16º dia.

Com estudo das enzimas do metabolismo de cálcio podemos propor pelo perfil de expressão da Proteína Ligadora de Cálcio (Calmodulina), da SERCA (retículo sarcoplasmático  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, um transportador de cálcio do citosol para o lumen) e da Oxido nítrico sintase que ocorre uma regulação gênica, implicando na modulação do metabolismo do cálcio intracelular, esse mecanismo pode ser semelhante ao dos mamíferos em que a calmodulina forma complexo com o cálcio para desempenhar algumas de suas funções, uma delas de estimular a produção de oxido nítrico pela ação da oxido nítrico sintase que entre outros efeitos se difunde do endotélio dos vasos sanguíneos para os vasos levando o relaxamento dos mesmo, um mecanismo tão importante que é utilizado por uma vasta classe terapêutica de anti-hipertensivos.

Analisando os resultados da PFK-1 e da Piruvato Carboxilase vimos que a partir da formação do blastoderma celular, a gliconeogênese é a via predominante.

Sobre o metabolismo de aminoácidos pode-se notar que na segunda fase da embriogênese ocorre um aumento da expressão gênica, os metabolitos gerados podem gerar substratos para a gliconeogênese.

Comparando o perfil de expressão de genes com resultados anteriores do grupo onde foi medida a atividade das enzimas NADH Glutamato desidrogenase e da Aspartato Aminotransferase observamos que a expressão gênica acompanha o aumento de atividade da enzima Aspartato Aminotransferase e que no caso da NADH Glutamato desidrogenase isso não ocorre.

Com os gráficos em mãos, iremos observar o silenciamento dos genes mais expressos, injetaremos o RNA dupla fita na fêmea paternógina para analisar um possível fenótipo, tanto da fêmea como dos ovos visto que é possível analisar diversos fatores como, por exemplo, aspectos celulares e o número de ovos na postura.

## 7. REFERÊNCIAS

Carlos Logullo, Willian Witola, Caroline Andrade, Josiana Gomes, Itabajara da Silva Vaz, Satoro Konnai, Kazuhiko Ohashi, Saiki Imamura, Misao Onuma, GSK activity is involved to PEPCK gene expression during tick embryo development, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Volume 128, Issues 1–3, 15 March 2009, Page 281, ISSN 0165-2427, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.153>.

Cherry L.M. 1973. The accumulation and utilization of food reserves by adult female cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrine). *Australian Journal of Zoology*. 21: 403-412.

Chippendale G.M. 1978. Carbohydrates in reproduction and embryonic development. In: *Biochemistry of Insects*. New York:Academic Press, pp.42-45.

Christian Kaufmann, Mark R. Brown, Regulation of carbohydrate metabolism and flight performance by a hypertrehalosaemic hormone in the mosquito *Anopheles gambiae*, *Journal of Insect Physiology*, Volume 54, Issue 2, February 2008, Pages 367-377, ISSN 0022-1910, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.10.007>

de Meis L, Arruda AP, Carvalho DP. *Biosci Rep.*2005 Jun-Aug;25(3-4):181-90. *Role of sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in thermogenesis.*

Fagotto F. 1990. Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 14(4): 217-235.

Jitrapakdee S, St Maurice M, Rayment I, Cleland WW, Wallace JC, Attwood PV. Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase.

Jonsson, N.N., Mayer, D.G., & Green, P.E. (2000) Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). *Veterinary Parasitology* 88, 79-92.

M.G. GUIZZO, L.ABREU, A.MASUDA, et al. 2012: Metabolismo de biomoléculas na embriogênese do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

MACKAY, I.M. et al. Real-time PCR in microbiology laboratory. In: *Clin Microbiol Infect* 10(3) 190-212, 2004.

Micheletti (2009) Action of extract and oil neem in the control of *Rhipicephalus*

(*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in laboratory Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 44-48, jan.-mar. 2010

Ririe, K.M.; Rasmussen, R.P.; Wittwer, C.T. (1997), "Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction", *Anal Biochem.* 245(2): 154–60

Saldanha C. CALMODULINA E ATPase DO CÁLCIO Actas Bioq. 1989; 1:15-25

SAUNDERS, N.A Real-time PCR In: Methods Mol Biol 266: 191-211, 2004.  
Fundamentos de bioquímica: A Vida em Nível Molecular Por Donald Voet, Judith G. Voet, Charlotte W. Pratt

Seixas A., Oldiges D.P., da Silva Vaz Jr. I. & Termignoni C. 2010. Endocrinologia e controle da vitelogênese em carrapatos. Acta Scientiae Veterinariae. 38(2):95-111.

Song J.L., Wong J.L. & Wessel G.M. 2006. Oogenesis: Single cell development and differentiation. Developmental Biology. 300(1): 385-405.

VIARO, Fernanda and EVORA, Paulo Roberto B..Expressão das óxido nítrico sintetases na vasculopatia coronariana do transplante cardíaco. *Rev Bras Cir Cardiovasc* [online]. 2000, vol.15, Biochem J.2008 Aug 1;413(3):369-87. doi: 10.1042/BJ20080709.