

SINALIZAÇÃO POR INSULINA EM CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DO
CARRAPATO BOVINO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI:
IXODIDAE) (CANESTRINI, 1887)

LEONARDO ARAUJO DE ABREU

Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF

Campos dos Goytacazes
Maio 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

TESE DE DOUTORADO

SINALIZAÇÃO POR INSULINA EM CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DO
CARRAPATO BOVINO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI:
IXODIDAE) (CANESTRINI, 1887)

LEONARDO ARAUJO DE ABREU

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

Campos dos Goytacazes

Maio 2009

TESE DE DOUTORADO

SINALIZAÇÃO POR INSULINA EM CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DO
CARRAPATO BOVINO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI:
IXODIDAE) (CANESTRINI, 1887)

LEONARDO ARAUJO DE ABREU

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

Aprovado em 29 de maio de 2009.

Comissão Examinadora

Dr^a Clarissa M. Maya-Monteiro – Pesquisadora do Lab. de Imunofarmacologia –
Dept^o de Fisiologia e Farmacodinâmica – Fundação Oswaldo Cruz

Profª Drª Elena Lassounskaia – Profª Associada do Lab. De Biologia do
Reconhecer - UENF

Profª Drª Michelle Frazão Muzitano – Profª Associada do Lab. De Biologia do
Reconhecer - UENF

Prof. Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira – Prof. Associado do Lab.de Química
e Função de Proteínas e Peptídeos – UENF
(orientador)

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao Mauro Rebelo por compartilhar comigo muito além das páginas deste documento.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Aurelina e Raimundo, pelo incentivo constante, apoio incondicional, a torcida e a confiança fervorosas.

Ao Carlos pelas capacidades de agregar, estimular, exigir e partilhar o sucesso de cada um, e de todos.

Ao bom clima de trabalho gerado pelos outros alunos do Carlos com quem convivi durante esse período: Evenilton, Eldo, Helga, Wagner, Luis e Danielle.

Agradeço especialmente ao Jorge, que num seminário do nosso grupo ofereceu sugestões que direcionaram boa parte deste trabalho; à Arianne, pela imensa ajuda com a manutenção das células; à Bárbara pelas mãos extras nos experimentos de morte celular. E à Josiana e Letícia, na padronização dos experimentos de PCR em tempo real.

À professora Sirlei Daffre e sua aluna Eliane Esteves que nos cederam as células BME26, e me ensinaram como mantê-las.

Ao professor Renato daMatta, pela ajuda nos experimentos com microscopia e coloração por Giemsa, e nas discussões iniciais sobre morte celular.

À Juliana, técnica do LBR, pela ajuda nos experimentos com o citômetro de fluxo.

À professora Elena, na observação e aquisição das imagens em microscopia de fluorescência.

Aos professores Itabajara, Aoi e Sandra, por me receberem em seu laboratório da UFRGS para o estágio sanduíche do programa PROCAD/CAPES, em que foi possível

clonar e sequenciar um fragmento de cDNA da proteína quinase B (Akt) do carrapato *Rhipicephalus microplus*. E aos seus alunos e funcionários que contribuíram para que esta fosse uma experiência muito proveitosa: Paula, Caroline, Mariana, Sílvia, Marcelo, Melina, Daiane, Clotilde. Especialmente ao Luiz Fernando Parizi, que durante o seu estágio me permitiu discutir e aprender sobre padronização de PCR em tempo real. E aos bovinos mantidos em Porto Alegre, por nos fornecerem os carrapatos.

À professora Glória Braz, além da amizade e carinho, pelos esclarecimentos e ajuda com Bioinformática e consultas em banco de dados de sequências.

SUMÁRIO

RESUMO.....	XIII
ABSTRACT	XIV
JUSTIFICATIVA	XV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O carrapato Rhipicephalus (Boophilus) microplus e o ciclo de vida	1
1.2 Embriogênese do carrapato	2
1.3 Peptídeos similares à insulina (Insulin-like Peptides, ILP's)	4
1.4 Sinalização por insulina	6
1.4.1 Sinalização por insulina em invertebrados.....	9
1.5 Morte celular por apoptose	12
1.6 Linhagens de células de carrapato.....	14
OBJETIVOS	16
METODOLOGIA.....	18
3.1. Metodologia não publicada.....	18
3.1.1. Clonagem e sequenciamento parcial de Akt	18
3.1.2. Extração plasmidial por lise alcalina (mini-prep).....	19
3.1.3. Análise quantitativa e qualitativa do DNA plasmidial	20
3.1.4. Sequenciamento dos clones obtidos na extração plasmidial	20
3.1.5. Análise da transcrição de Akt por qPCR	21
3.1.6. Ensaios de viabilidade e análise morfológica das células BME26.....	21
3.1.6.1 Coloração por Giemsa.....	21
3.1.6.2 Retirada de nutrientes do meio de cultivo	21
3.1.6.3 Citometria de fluxo.....	22
3.1.6.4 Exposição a espécies reativas de oxigênio	22

3.1.6.5 Exposição à radiação Ultra-Violeta.....	22
3.1.6.6 Exposição aos inibidores da via de sinalização por insulina.....	23
3.1.7. Análise estatística dos resultados obtidos.....	23
RESULTADOS	24
4.1 Análise da sequência parcial da subunidade reguladora p85 de PI3K de R. microplus.....	24
4.2 Sequência parcial da Akt de R. microplus.....	26
4.3 Expressão Relativa de Akt na embriogênese de R. microplus.....	28
4.4 Análise de Expressão Relativa de Akt nas céls BME26 tratadas com Insulina bovina e inibidores de PI3K.....	28
4.5 Alterações morfológicas nas células BME26 em cultivo na ausência de fatores de crescimento ou glicose.....	29
4.6 Alterações morfológicas nas células BME26 mantidas na presença de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	32
4.7 Viabilidade e alterações morfológicas das células BME26 em cultivo expostas a radiação ultravioleta.....	34
4.8 Alterações morfológicas das células BME26 em cultivo na presença de Wortmanina.....	37
4.9 Alterações morfológicas das células BME26 em cultivo na presença de LY294002.....	38
4.10 Alterações morfológicas das células BME26 em cultivo na presença de 10-DEBC.....	39
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do ciclo de vida do carrapato <i>R. microplus</i> _____	2
Figura 2: Etapas do desenvolvimento do carrapato <i>R. microplus</i> . _____	4
Figura 3: Expressão e clivagem proteolítica dos hormônios peptídicos da superfamília da insulina. _____	5
Figura 4 Representação esquemática da cascata de sinalização por insulina. _____	7
Figura 5: Conservação evolutiva da via de sinalização da insulina em diferentes espécies. _____	10
Figura 6: Análise da sequência parcial da subunidade reguladora p85 de PI3K. _____	25
Figura 7: Análise da sequência parcial de Akt. _____	27
Figura 8: Expressão relativa de Akt durante a embriogênese de <i>R. microplus</i> . _____	28
Figura 9: Expressão relativa de Akt em células BME26 tratadas com insulina e inibidores de PI3K. _____	29
Figura 10: A remoção de nutrientes do meio de cultivo induz alterações morfológicas nas células BME26. _____	31
Figura 11: Incubação com H ₂ O ₂ induz alterações morfológicas e nucleares nas células BME26. _____	33
Figura 12: Indução de morte por apoptose em células BME26 expostas à radiação ultra-violeta. _____	35
Figura 13: Quantificação da indução de morte em células BME26 expostas à radiação U.V. _____	36
Figura 14: Alterações morfológicas das células BME26 incubadas com diferentes concentrações de Wortmanina. _____	37
Figura 15: Alterações morfológicas das células BME26 incubadas com diferentes concentrações de LY294002. _____	38
Figura 16: Alterações morfológicas das células BME26 incubadas com diferentes concentrações de 10-DEBC. _____	39

ABREVIATURAS

10-DEBC: Hidrocloroto de 10-[4'-(N,N-Dietilamino)butil]-2-clorophenoxazine

LY294002: Hidrocloroto de 2-(4-Morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopiran-4-ona

SB216463: 3-(2,4-Diclorofenil)-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona

PI3K: Fosfatidil-inositol 3-OH quinase

Akt: Proteína quinase B

GSK3b: Glicogênio sintase quinase 3 beta

SFB: Soro fetal bovino

IGF (*Insulin-like growth factor*): Fator de crescimento similar à insulina

SSC (*side scattering*): espalhamento lateral

RESUMO

O carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* é o ectoparasita hematófago de maior importância na pecuária bovina brasileira. O estudo dos aspectos fisiológicos e metabólicos envolvidos na embriogênese deste carrapato pode contribuir na proposta de novas estratégias de controle. O trabalho atual apresenta dados que permitem afirmar que células embrionárias do carrapato *R. microplus* possuem um maquinário enzimático conservado, capaz de responder à adição de insulina bovina no meio de cultura. Esses dados se baseiam na identificação de cDNA's correspondentes a 3 dos componentes desta via de sinalização, e determinação bioquímica de glicogênio em células tratadas com insulina na presença e na ausência de inibidores da proteína fosfatidil-inositol 3-OH quinase (PI3K). A adição de insulina também foi capaz de alterar a expressão da subunidade reguladora p85 da PI3K, da proteína quinase B (Akt) e da glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3b). Os elevados níveis de transcrição de p85 e GSK3b em ovários sugerem a captação de RNAm que codificam para essas proteínas, no período de formação de ovócitos. Observou-se ainda que os genes de p85, Akt e GSK3b são diferentemente expressos ao longo da embriogênese. Apesar da queda na transcrição de p85 e de GSK3b antes da formação do blastoderma celular, a Akt apresentou um pico nesse mesmo período. A atividade de GSK3b mostrou relação inversa com a distribuição de glicogênio ao longo da embriogênese, reforçando um possível papel no metabolismo de carboidratos. A clonagem e o sequenciamento de um fragmento de cDNA de Akt também é relatado. Foram realizados, inicialmente, procedimentos para obtenção de um padrão morfológico positivo de morte por apoptose nas células BME26. Além da retirada de fatores de crescimento e nutrientes do meio de cultura, e a adição de espécies reativas de oxigênio, os melhores resultados foram obtidos ao expor as células à radiação ultravioleta. Por estar associada à sobrevivência celular, a possibilidade da inibição da via de sinalização por insulina induzir morte celular por apoptose foi testada. Os inibidores utilizados de PI3K e de Akt foram capazes de induzir alterações morfológicas similares às observadas na apoptose.

ABSTRACT

The cattle tick *Rhipicephalus microplus* is the most important haematophagous ectoparasite for the Brazilian cattle herd. The study of physiological and metabolic aspects related to tick embryogenesis may contribute for the proposition of novel control strategies. The present work presents a collection of data which point that embryo cells from the cattle tick *R. microplus* exhibit an enzymatic insulin responsive machinery. These results are based on the identification of 3 components of such signaling pathway, and biochemistry determination of glycogen in insulin treated cells, in absence and presence of PI3K kinase inhibitors. Insulin addition was observed to alter relative expression of PI3K regulatory subunit p85, protein kinase B (Akt) and glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3b). Elevated transcription levels were detected for p85 and GSK3b in ovaries suggest the uptake of RNAs coding for these proteins during oocyte formation. Both p85, Akt and GSK3b genes were observed to be differentially expressed during tick embryogenesis. Though p85 and GSK3b transcription levels decreased before cellular blastoderm formation, Akt levels increased during this same period. GSK3b activity was determined to be inversely correlated with glycogen distribution throughout embryo development, which supports a possible role for this kinase on carbohydrate metabolism. The cloning and sequencing of a cDNA fragment from Akt is also reported. Protocols to induce cell death by apoptosis on BME26 cell line were performed preliminarily. Besides growing factors withdrawal, nutrient removal, and addition of oxygen reactive species, ultraviolet radiation exposure provided better results. For its association with cell survival, the possibility of insulin signaling pathway inhibition to induce death by apoptosis was assayed. The PI3K and Akt inhibitors used induced morphological alterations similar to apoptosis.

JUSTIFICATIVA

Os carrapatos são ectoparasitas hematófagos de maior importância na pecuária mundial. O maior entedimento sobre sua biologia pode auxiliar na proposta de novos mecanismos para o seu controle.

A sinalização por insulina tem sido demonstrada com um elevado grau de conservação evolutiva entre diferentes espécies. Além do seu papel na regulação do metabolismo de glicose, a sinalização por insulina também participa de eventos relacionados à embriogênese de modelos vertebrados e invertebrados.

Estudos do nosso grupo de pesquisa demonstram que ao longo do desenvolvimento embrionário são observadas significativas modificações no metabolismo energético nos ovos do carrapato *R. microplus*, particularmente nos níveis de glicogênio e glicose. O estudo da sinalização por insulina, apresentado nesta tese, visa ampliar a compreensão sobre a participação deste hormônio não apenas no metabolismo energético dos embriões, como também em processos de transdução de sinais necessários à sobrevivência celular.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e o ciclo de vida

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita hematófago pertencente à família Ixodidae, que tem como principal hospedeiro os bovinos, podendo eventualmente infestar búfalos, ovelhas e cavalos. Sua distribuição ocorre entre os paralelos 32°N e 32°S, nas regiões da América, Ásia, África e Oceania (Gonzales, 1975). Em 2003, o *Boophilus microplus* foi reclassificado, com base em análises moleculares e morfológicas, como pertencente ao gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus*, com a nomenclatura de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Murrel e Barker, 2003).

O ciclo biológico do carrapato compreende duas fases de vida, uma parasitária e uma livre. A fase parasitária dura aproximadamente 21 dias, na qual o carrapato diferencia-se nos estágios de larva, ninfa e adulto (Gonzales, 1975). Esta primeira fase de vida se inicia quando as larvas localizam o hospedeiro, seja pelo odor, vibrações, sombreamento e estímulo visual (Waladde e Rice, 1982). As larvas que encontram hospedeiro se fixam em regiões corporais mais propícias para seu desenvolvimento e se alimentam de linfa. Em aproximadamente sete dias, mudam para o estágio de ninfa e estas se diferenciam em adulto, período em que ocorre o dimorfismo sexual. Nesse estágio, ocorre a cópula e a fêmea começa a ingerir sangue até seu ingurgitamento total, que propicia sua queda ao solo. Os machos permanecem no hospedeiro à procura de novas fêmeas, e sobrevivem até duas vezes mais que elas (Roberts, 1968).

A fase de vida livre inicia com a queda da fêmea ingurgitada (teleógina) quando ela realizará a postura dos ovos por aproximadamente 10 dias. Em condições favoráveis de temperatura e umidade, os ovos eclodem em até 3 semanas. As larvas recém emergidas migram para as pontas da vegetação, aguardando o hospedeiro vertebrado para continuarem o ciclo de vida (Figura 1).

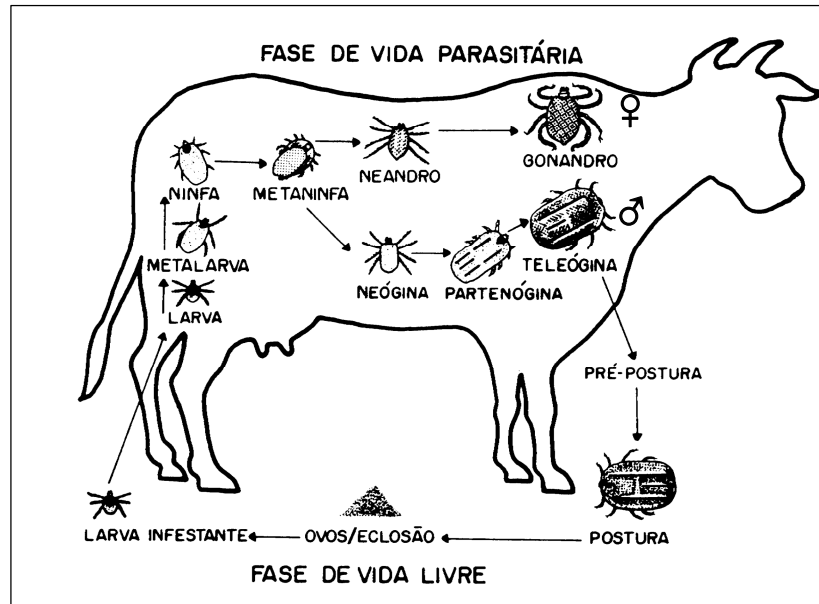


Figura 1: Representação esquemática do ciclo de vida do carrapato *R. microplus* (retirado de Gonzales, 1975).

1.2 Embriogênese do carrapato

O estudo da embriogênese e do metabolismo energético do *R. microplus* tem um papel fundamental no desenvolvimento de novas metodologias para o controle desses vetores. O estudo dessa fase de vida do carrapato possibilita entender como os embriões são capazes de coordenar todo o processo de obtenção de energia e o controle da mobilização e síntese das principais moléculas de reserva.

O embrião necessita de uma alta demanda de energia, que é suprimida pelo catabolismo de biomoléculas, tais como, carboidratos e lipídeos, que participarão de outras vias biossintéticas, para garantir o sucesso do desenvolvimento embrionário (Thompson e Stewart, 1997).

Na embriogênese de ovíparos ocorre uma ausência do aporte de nutrientes exógenos durante o desenvolvimento, sendo dependente dos constituintes energéticos de reserva de origem materna que foram estocados nos oócitos (Song *et al.*, 2006; Sappington e Raikhel, 1998). Depois da maturação, os oócitos aumentam e

acumulam RNA, carboidratos, lipídeos e proteínas que servirão como substratos para vias metabólicas funcionais do desenvolvimento embrionário (De Oliveira *et al.*, 2006).

O desenvolvimento dos embriões do carrapato bovino se dá em um padrão morfogenético semelhante ao descrito para a mosca *Drosophila melanogaster*. Depois da fertilização e da fusão dos núcleos do espermatozóide e do óvulo, o núcleo do zigoto passa por uma série de rápidas divisões mitóticas. Ao contrário da maioria dos embriões de animais, não há clivagem do citoplasma. O resultado é um sincício em que muitos núcleos estão presentes em um citoplasma comum (Wolpert *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2006). No carrapato bovino a formação deste blastoderma sincicial acontece até o 4º dia de desenvolvimento (Figura 2C), e é caracterizada pelo consumo de glicogênio materno (Moraes *et al.*, 2007). Essa fase inicial prossegue até a celularização dos núcleos da estrutura sincicial, quando se forma o blastoderma celular (Figura 2D e E). Na fase seguinte de desenvolvimento, o metabolismo energético é bem marcado pelo catabolismo de aminoácidos e intensa atividade gliconeogênica. Morfologicamente, nessa segunda fase o embrião sofre segmentações (Figura 2F). Além da formação de glicose, há um novo acúmulo de glicogênio nos embriões (Moraes *et al.*, 2007).

A melhor caracterização dos processos que controlam essa fase da vida do carrapato pode fornecer subsídios para o reconhecimento de novos alvos potenciais e o estabelecimento de novas estratégias para o controle deste parasito. Nosso grupo tem se destacado, nos últimos anos, por abordar diferentes aspectos do metabolismo energético em embriões de *R. microplus*.

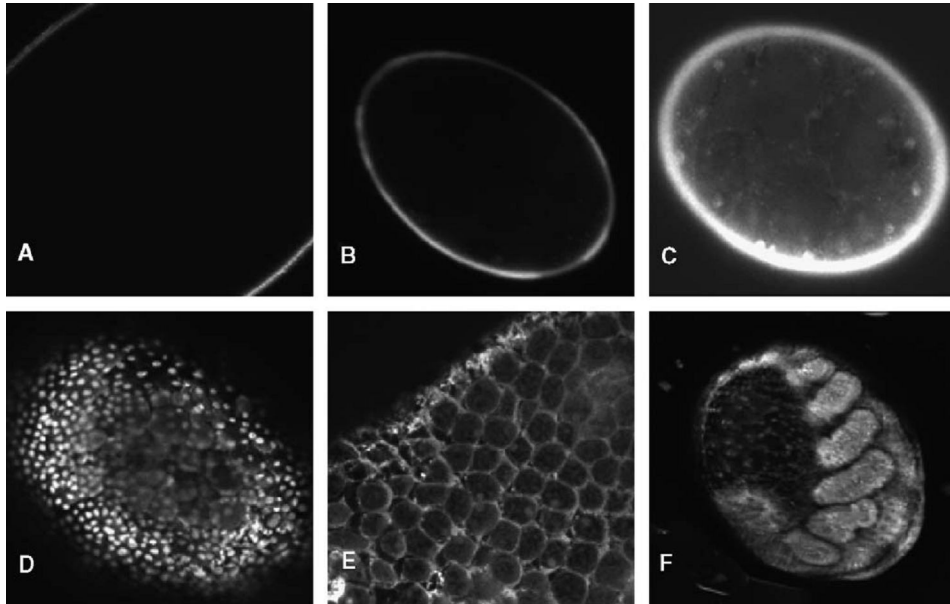


Figura 2: Etapas do desenvolvimento do carrapato *R. microplus*. A- ovo de 6° dia, sem marcação; B- ovo de 1° dia; C- 4 dias (blastoderma sincicial); D- 6 dias (blastoderma celular); E- ovo de 6° dia corado com Azul de Evans, mostrando os limites celulares; F- embrião segmentado aos 7 dias de desenvolvimento. B,C,D e F: marcação com Laranja de Acridina. (Retirado de Campos *et. al.*, 2006).

1.3 Peptídeos similares à insulina (Insulin-like Peptides, ILP's)

A insulina é um hormônio peptídico, mais conhecido como o principal responsável pelo controle da concentração de glicose no sangue de vertebrados. Ela pertence à super família de peptídeos similares à insulina (*Insulin-like Peptides*, ILP's), que compreende ainda a relaxina e o hormônio de crescimento similar à insulina (*Insulin-like Growth Factor*, IGF) (Gutiérrez *et al.*, 2007). Ao todo, essa família compreende 10 polipeptídeos em humanos, sendo essas subdivisões baseadas em suas estruturas primárias, processamento e preferência de ligação à receptores (Brown *et al.*, 2008). Os peptídeos pertencentes à esta família são conhecidos por iniciarem uma grande gama de processos fisiológicos em organismos eucariontes superiores (Riehle *et al.*, 2006).

De um modo geral, os ILP's são expressos como uma molécula precursora, em que, por sucessivos processamentos proteolíticos, ocorre a perda de um peptídeo sinal, e de um fragmento conector (peptídeo C) (Figura 3). A exceção fica por conta dos IGF's, que ainda apresentam uma porção do peptídeo C que não é removida por proteólise

(Riehle *et al.*, 2006; Bathgate *et al.*, 2006). Essas modificações geram um heterodímero composto por um peptídeo A e um B, unidos por 3 ligações de dissulfeto (uma intramolecular na cadeia A, e duas intermoleculares, entre as cadeias A e B), que funciona como o hormônio ativo (Floyd *et al.*, 1999).

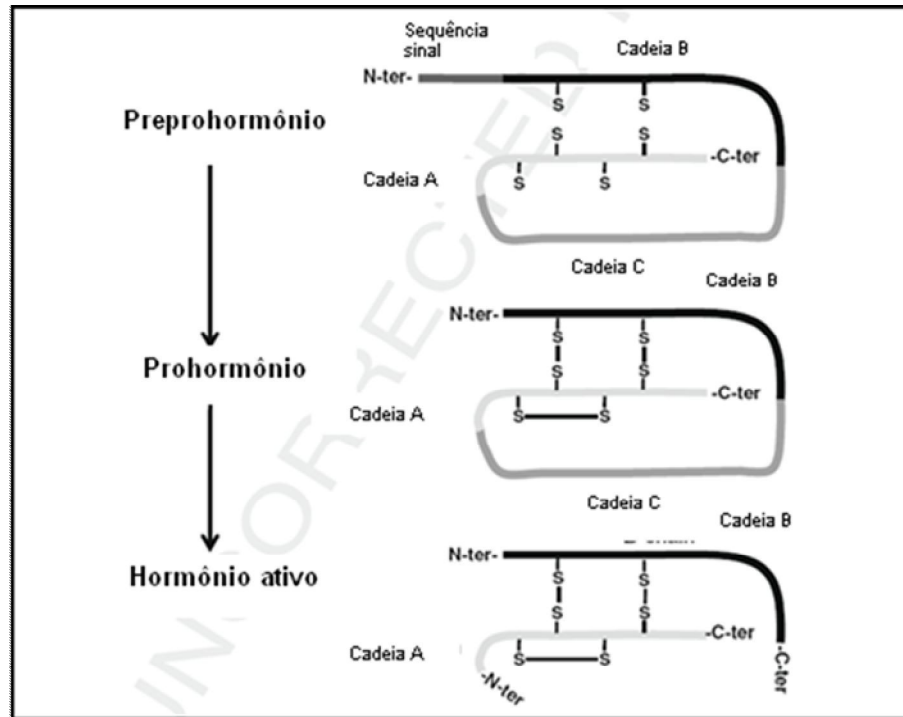


Figura 3: Expressão e clivagem proteolítica dos hormônios peptídicos da superfamília da insulina. Cada um é expresso como pré-pró-hormônio. A clivagem do peptídeo sinal na porção N-terminal (N-ter), seguida da formação de 3 ligações de dissulfeto geram o pró-hormônio, que é processado e origina o hormônio maduro pela retirada do peptídeo C que conecta as cadeias A e B. Exceto para os IGF's, em que a forma ativa do hormônio possui o peptídeo C (Adaptado de Shabanpoor *et al.*, 2009).

A relaxina é um hormônio com papel em processos fisiológicos ligados à gravidez (Büllesbach e Schwabe, 1987). Pode atuar ainda na cicatrização de feridas e na maturação e sobrevivência de células germinativas femininas e masculinas, respectivamente. A recente identificação de receptores de relaxinas (associados à proteína G) tem estimulado a investigação não apenas das ações desses peptídeos, como também o papel daqueles como alvos para tratamento de ansiedade e obesidade (Bathgate *et al.*, 2006; van der Westhuizen, *et al.*, 2008). Já os IGF's são reconhecidos por receptores do tipo tirosina quinase (IGFR), com a participação de proteínas

quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (McDonald *et al.*, 1989). Por sua vez, a insulina se liga com grande afinidade a receptores também do tipo tirosina quinase (IR), desencadeando ativação da via de sinalização envolvendo fosfatidil-inositol 3-OH quinase (PI3K) e a serino/treonina quinase Akt (proteína quinase B, PKB) (Kandel e Hay, 1999).

1.4 Sinalização por insulina

Os efeitos biológicos da insulina são mediados por seu receptor, que possui similaridades estruturais com o receptor para IGF. Ambos são glicoproteínas integrais de membrana celular, compostos de duas subunidades α e duas subunidades β , unidas por pontes de dissulfeto, formando um heterodímero $\alpha_2\beta_2$. As subunidades α são extracelulares, e possuem os domínios de ligação à insulina, enquanto as subunidades β são transmembranares e possuem os domínios tirosina quinase (Greene e Chen, 1999). A ligação com insulina promove a ativação de tais domínios do receptor e as subunidades β são autofosforiladas. Diferentemente de outros receptores do tipo tirosina quinase, o receptor de insulina mobiliza uma família de moléculas adaptadoras chamadas substratos do receptor de insulina (IRS).

As proteínas IRS são rapidamente fosforiladas em resíduos de tirosina, em resposta aos estímulos de insulina e IGF (Burks *et al.*, 2000). Os resíduos fosforilados permitem a ligação e ativação de proteínas que possuam domínios do tipo SH2 (Homologia com o Src), tais como a proteína ligadora do receptor de fator de crescimento (GRB2) e a subunidade reguladora de PI3K (p85) (Baudler *et al.*, 2003). Essa interação sinalizará a ativação da via Ras/MAPK, ou da proteína serina quinase Akt, respectivamente (Figura 4). A formação do complexo Ras, e consequente ativação de MAPK, estimula a ação da insulina sobre o crescimento e proliferação em alguns tecidos (Kido *et al.*, 2001), via fosforilação de fatores de transcrição como Elk-1, induzindo a expressão de genes (Le Roith e Zick, 2001).

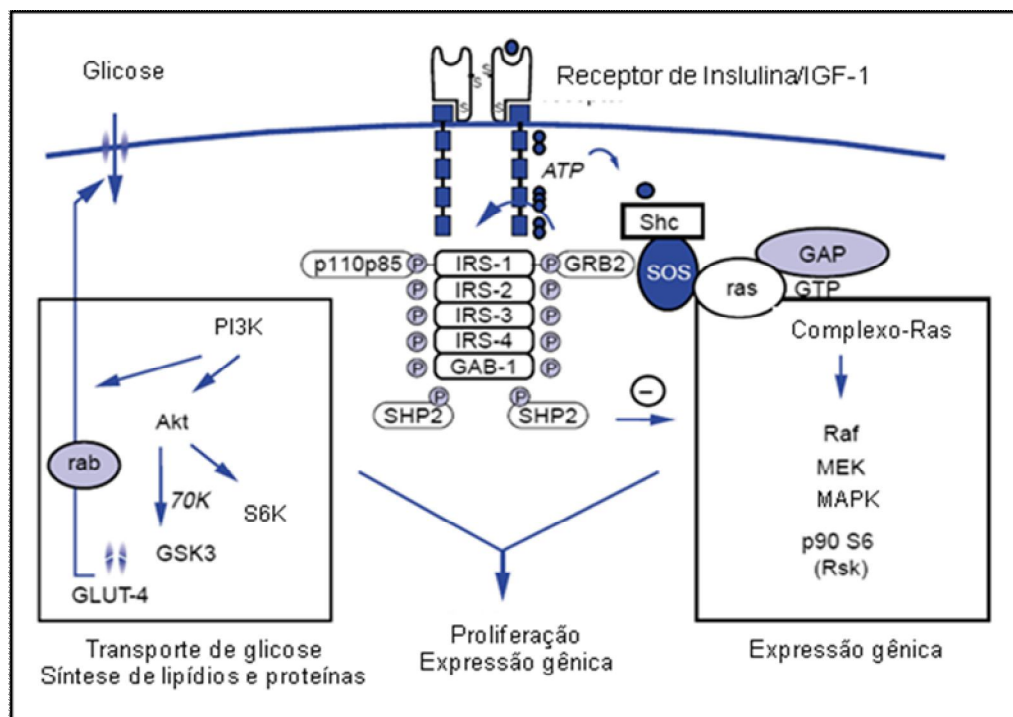


Figura 4: Representação esquemática da cascata de sinalização por insulina (Adaptado de Baudler *et al.*, 2003)

A resposta metabólica à insulina é mediada primariamente pela PI3K (Le Roith e Zick, 2001). A formação do complexo com IRS promove o recrutamento e a ativação da PI3K da classe I_A. Esta enzima cataliza a adição de fosfato na posição D3 do anel inositol dos fosfoinositóis de membrana. Existem múltiplas isoformas de PI3K em eucariotos superiores, mas as pertencentes à classe I_A são as principais responsáveis pela produção de fosfoinosítídeos na posição D3 em resposta a fatores de crescimento (Cantley, 2002). Essas enzimas são compostas por um heterodímero de uma subunidade reguladora p85 e uma subunidade catalítica p110, que converte o substrato fisiológico fosfatidilinositol (4,5) bifosfato (PIP₂) em fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PIP₃) (Barber, *et al.*, 2006). A subunidade reguladora mantém a subunidade catalítica p110 num estado de baixa atividade em células não estimuladas, e promove a ativação desta por interação direta com os resíduos fosfotirosina do receptor de insulina/IGF, ou das proteínas adaptadoras (Cantley, 2002). Esse evento ocorre minutos após a ativação do receptor, e promove a elevação significativa dos níveis de PIP₃ na membrana, que atuará como um segundo mensageiro da sinalização por insulina,

ativando quinases dependentes de fosfatidilinositol (PI) (Lizcano e Alessi, 2002). A conversão de PIP₃ em PIP₂ pela fosfatase PTEN (fosfatase e homólogo de tensina deletada no cromossomo 10) antagoniza a sinalização por PI3K (Paez e Sellers, 2003).

Essa elevação de PIP₃ nas regiões de ativação de PI3K promove ligação e acúmulo de proteínas sinalizadoras com domínios homólogos à pleckstrina (PH), tais como a quinase PI-dependente 1 (PDK1) e a proteína quinase B (PKB, também conhecida como Akt), principal molécula efetora da via de sinalização por insulina. Apenas a interação de PIP₃ com Akt não promove a ativação desta. Ligadas aos PIP₃ da membrana plasmática, PDK1 fosforila o resíduo treonina³⁰⁸ (T308) da Akt. A completa ativação da Akt demanda a fosforilação do resíduo serina⁴⁷³ (S473), que é realizada pelo complexo mTOR2 (mTORC2) (Lizcano e Alessi, 2002; Barber *et al.*, 2006; Manning e Cantley, 2007). Somente após a fosforilação nestes dois resíduos a Akt torna-se completamente ativa (Alessi *et al.*, 1996), dissocia-se da membrana e pode atuar em diversos substratos, tanto no citoplasma como no núcleo, que participarão em processos dependentes de insulina, crescimento e sobrevivência celulares, e regulação do ciclo celular (Cantley, 2002; Lizcano e Alessi, 2002).

Em humanos estão descritas 3 isoformas de Akt, ativadas mediante a sinalização por insulina, mas com papéis fisiológicos não reduntantes. A Akt1 (PKB α) é observada como necessária ao desenvolvimento e crescimento normais, mas dispensável na manutenção da glicemia (Cho *et al.*, 2001a). A isoforma Akt2 (PKB β), a partir de experimentos com camundongos *knockout* para este gen, demonstrou-se essencial para uma glicemia normal (Cho *et al.*, 2001b). Estudos recentes com a isoforma Akt3 (PKB γ) demonstram que ela é pouco necessária à 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).

A maior parte dos substratos de Akt é inibida após a fosforilação. Os fatores de transcrição da família *forkhead*, depois de fosforilados formam complexos que permanecem no citoplasma e inibem a transcrição dos genes regulados por esses fatores. Já a fosforilação da proteína indutora de apoptose Bad inibe a ativação desse processo, e leva a célula a uma resposta de sobrevivência (Brunet *et al.*, 2001; Lizcano e Alessi, 2002). O primeiro substrato de Akt a ser identificado foi a glicogênio sintase

quinase 3, GSK3 (Cross *et al.*, 1995). A GSK3 é uma serino/treonina quinase que, a partir da fosforilação de resíduos específicos de sua estrutura deixa de inibir a ação da glicogênio sintase. Esta última se mantém ativa, elevando os níveis de glicogênio em resposta à sinalização por aquele hormônio (Revisado em Frame e Cohen, 2001). Outro substrato da GSK3 é o fator eucariótico de iniciação eIF2B, que regula a etapa principal da tradução do RNA mensageiro, inibindo-o por fosforilação (Baudler *et al.*, 2003).

1.4.1 Sinalização por insulina em invertebrados

A insulina encontra-se amplamente distribuída na natureza, atribuindo-se cada vez mais novas funções para este hormônio em espécies tão distintas quanto humanos, invertebrados, organismos unicelulares e plantas (Floyd *et al.*, 1999; Leever, 2001; Venâncio *et al.*, 2003). A identificação estrutural de peptídeos similares à insulina (*insulin-like peptides*: ILP's) em invertebrados interrompeu a idéia de um peptídeo hormonal evolutivamente estável. Os ILP'S descritos em insetos e moluscos se mostraram como um grupo diferenciado, codificados por grandes famílias de multi-genes que são expressos unicamente no cérebro e exercem funções adicionais e distintas da insulina de vertebrado (Floyd *et al.*, 1999).

Apesar das inúmeras isoformas de insulina em organismos invertebrados, curiosamente é descrita apenas uma isoforma do receptor de insulina (Riehle, *et al.*, 2002). Entretanto, os primeiros dados demonstrando o grau de conservação dessa via de sinalização em modelos invertebrados não apenas surpreenderam o meio científico, como iniciaram uma nova abordagem nos estudos do papel da insulina na regulação do crescimento e na divisão celular (Leever, 2001) (Figura 4). A caracterização de ILP's já foi descrita para muitos modelos invertebrados: *Bombyx mori* (Nagasawa *et al.*, 1984), *Paniluris argus* (Gallardo *et al.*, 2003) e *Locusta migratoria* (Hetru *et al.*, 1991).

Acredita-se também que dentre os 37 genes de *C. elegans* que codificam ILP's (Figura 5), nem todos possuem ação de agonistas no receptor de insulina (Leever, 2001; Pierce *et al.*, 2001). Mutações nos homólogos de receptor de insulina (*daf-2*) e da subunidade catalítica de PI3K (*Age-1*) provocam um aumento da longevidade e resistência ao estresse, além de induzir a uma fase intermediária de desenvolvimento adaptada à sobrevivência em condições ambientais adversas (Kimura *et al.*, 1997;

Porte, Jr., *et al.*, 2005). Essas descobertas têm permitido influenciar geneticamente na taxa de envelhecimento dos organismos, e não descartam a possibilidade de modulação farmacológica desse processo (Geesaman, 2006).

Diversos estudos com *Drosophila* evidenciaram a presença de 7 genes codificantes de ILP's (Figura 5), e também a importância da via de sinalização por insulina para o desenvolvimento de embriões e adultos. Mutações no receptor de insulina levam à formação de moscas anãs, enquanto a super-expressão de uma das isoformas de insulina acarreta o aumento do organismo pelo aumento do número e do tamanho das células (Brogiolo *et al.*, 2001; Garofalo *et al.*, 2002).

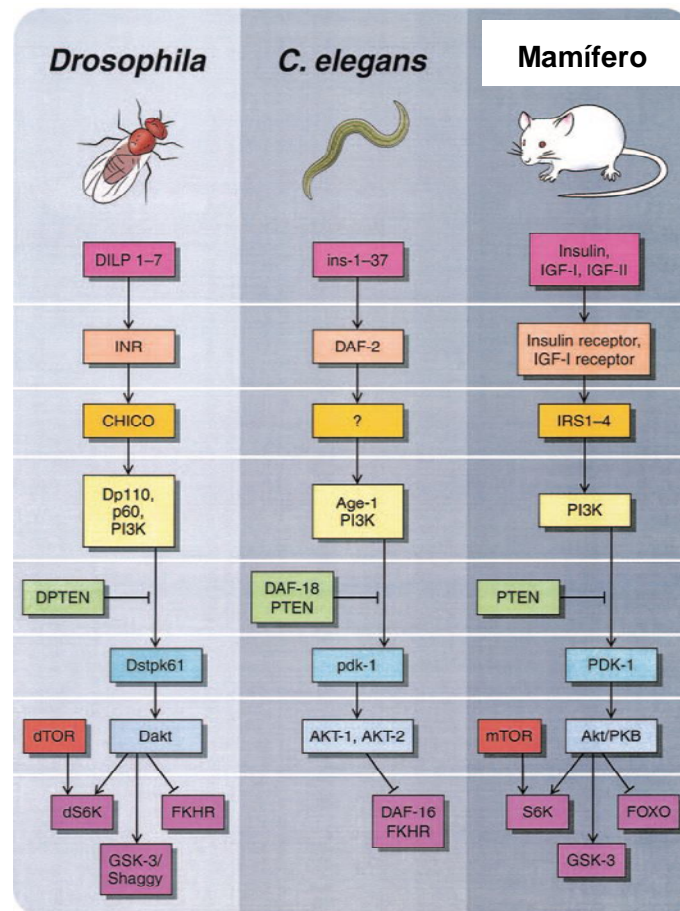


Figura 5: Conservação evolutiva da via de sinalização da insulina em diferentes espécies

(Adaptado de Porte, Jr, *et al.*, 2005).

Em mosquitos, os trabalhos apontam também a presença de diferentes genes para ILP's, além da participação da via de sinalização no processo de ovogênese. Nos ovários, a expressão do receptor de insulina e de Akt participam da maturação dos ovos (Krieger *et al.*, 2004; Riehle *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2008).

Em moluscos, os ILP's controlam o metabolismo de carboidratos, possuem cadeias maiores e uma ligação dissulfeto extra, sendo produzidos por células neurosecretórias (Wu e Brown, 2006).

Diversos trabalhos também exploram a resposta do organismo (ou mesmo em órgãos específicos ou em cultura de células) à presença de insulina *in vitro* ou de componentes da via de sinalização. Lardans *et al.* (2001) caracterizaram um receptor de insulina em células embrionárias de *Biomphalaria glabrata*, e sugerem o envolvimento da sinalização por insulina na interação dessas células com esporocistos de *Schistosoma mansoni*, *in vitro*. Kucharski *et al.* (2002) estimularam a captação de glicose e a síntese de glicogênio em guelras do carangueijo *Chasmagnathus granulata* incubadas com insulina. Gutiérrez *et al.* (2007) observaram que tanto insulina bovina como IGF-1 humano foram capazes de afetar o metabolismo de glicose no camarão *Penaeus vannamei*, sugerindo a presença de uma insulina endógena neste crustáceo.

Experimentos de imunocitoquímica evidenciaram a presença de insulina em células neurosecretórias do singânglion (órgão do sistema nervoso) de duas espécies de carrapato: em adultos de *Ornithodoros parkeri* (Zhu e Oliver, 1991), e em ninfas e adultos de *Dermacentor variabilis* (Davis *et al.*, 1994). Esses trabalhos sugerem uma participação desses peptídeos no desenvolvimento e na reprodução destes carrapatos.

A possibilidade de utilização da via de sinalização por insulina para o controle de vetores ou protozoários já foi sugerida (Riehle *et al.*, 2002; Riehle *et al.*, 2006). Um estudo com *Giardia intestinalis* mostrou a importância da atividade de PI3K na proliferação de trofozoítas (formas flageladas), e sugere a exploração de algumas regiões da molécula como alvo de drogas (Cox *et al.*, 2006).

1.5 Morte celular por apoptose

Evidências morfológicas de morte celular por apoptose em glândula salivar do carrapato *Dermacentor variabilis* foram identificadas a partir de 5 dias após caírem do hospedeiro, e durante o período de postura (L'Amoreaux *et al.*, 2003). Diversos estímulos podem desencadear esse processo.

O termo *apoptosis* foi criado por Kerr *et al.* (1972) para descrever aspectos morfológicos específicos da morte celular. A apoptose compreende os eventos de morte celular, quando ocorre a manifestação de várias das seguintes características morfológicas: arredondamento da célula, retração dos pseudópodos, redução do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, pouca ou nenhuma modificação estrutural de organelas citoplasmáticas, “embolhamento” da membrana plasmática (ainda que sua integridade seja mantida até os estágios finais do processo) e englobamento por fagócitos residentes (*in vivo*) (Baehrecke, 2005).

A apoptose, a destruição controlada de uma célula, é um processo complexo. A influência da atividade de diversos genes compromete a decisão pela morte da célula e ativação de um programa de auto-destruição. Uma vez que a decisão de “morrer” foi tomada, a execução do programa de apoptose requer a ativação coordenada e a propagação de diversos sub-programas. O maquinário básico para morte celular compreende as caspases e as proteínas da família Bcl-2, que interagem de maneira coordenada e regulam a apoptose (Hengartner, 2000; Elmore, 2007).

As caspases estão amplamente distribuídas entre os mais diversos organismos, e apresentam um alto grau de conservação. Dentre as várias caspases já descritas em humanos (e distribuídas em sub-famílias), em torno de dois terços estariam envolvidos com a apoptose (Hengartner, 2000). Caspases são cisteíno proteases expressas como um precursor inativo (pro-caspases) que depende de processamento proteolítico para adquirir atividade catalítica. Uma vez ativada, podem atuar sobre outras pro-caspases, iniciando uma cascata ativação de proteases. Isso provoca a amplificação do sinal apoptótico e conduz a uma morte celular rápida (Elmore, 2007). As caspases atuam seletivamente sobre substratos diversos, em resíduos específicos do tipo Asp-XXX. Esses 4 aminoácidos vão definir a preferência pelo substrato, que geralmente torna-se inativo. A ação das caspases pode ativar direta (pela clivagem de

um domínio regulador negativo) ou indiretamente (inativando uma subunidade reguladora) as proteínas-alvo (Hergartner, 2000). Os dois primeiros genes relacionados à apoptose descritos em carrapatos codificam duas caspases. Tanaka *et al.* (2007) clonaram 2 caspases de *Haemaphysalis longicornis* expressas em glândulas salivares e em intestino.

Os componentes da família Bcl-2 se dividem em 3 grupos, com base em semelhanças estruturais. O grupo I possui atividade anti-apoptótica, enquanto os grupos II e III promovem a morte celular. As interações homo e heterodiméricas resultam na neutralização mútua de proteínas pró e anti-apoptóticas. As células em que “sobram” proteínas pró-apoptóticas, são mais sensíveis à morte, enquanto as células com excesso de proteínas anti-apoptóticas ficam mais resistentes (Hergartner, 2000). Essas proteínas desempenham papel significativo, já que determinam se a célula ficará comprometida com a apoptose, ou se o processo será anulado (Hsu e Hsueh, 2000). Acredita-se que o principal mecanismo de ação da família Bcl-2 seja a regulação da liberação de citocromo C, por alteração de permeabilidade da membrana interna da mitocôndria (Elmore, 2007).

O programa de apoptose pode ser ativado por 2 principais vias. A via extrínseca envolve a ativação de receptores transmembranares. Estes transmitem o sinal de morte da superfície celular para as vias de sinalização intracelulares, por domínios citoplasmáticos chamados de domínios de morte. A associação de diferentes proteínas adaptadoras a esses domínios, envolvendo procaspase 8, forma um complexo sinalizador indutor de morte (DISC), e resulta na ativação da procaspase por auto-proteólise (Zimmermann *et al.*, 2001).

A ativação da apoptose pela via intrínseca envolve uma diversidade de estímulos que não dependem de receptores para produzirem sinais intracelulares que agem diretamente em alvos dentro da célula, e os eventos iniciados a partir da mitocôndria. Estímulos positivos da via intrínseca podem ser radiação ionizante, toxinas, hipóxia, hipertemia, infecções virais e radicais livres. Já a retirada de fatores importantes para a sobrevivência celular (hormônios, fatores de crescimento, citocinas) leva à perda da supressão da apoptose, e sua subsequente ativação (Jordan e Harrison, 2003). Esses estímulos provocam a abertura de poros de

transição de permeabilidade na membrana interna da mitocôndria, perda do potencial de membrana mitocondrial e a liberação no citosol de proteínas pró-apoptóticas, geralmente confinadas no espaço intermembranar. Dentre elas o citocromo C liga-se a e ativa o fator ativador de apoptose (Apaf-1), e a pró-caspase 9. Outras proteínas pró-apoptóticas liberadas pela mitocôndria promovem a apoptose pela inibição de proteínas inibidoras de apoptose (IAP) (Zimmermann *et al.*, 2001; Elmore, 2007). Outras proteínas mitocondriais podem ainda ser translocadas para o núcleo, promovendo uma condensação inicial da cromatina (AIF, fator indutor de apoptose), e a geração de fragmentos oligonucleossomais de DNA (Endonuclease G). Num momento mais tardio, acontece a condensação mais pronunciada e avançada da cromatina, bem como a fragmentação oligonucleossomal do DNA (CAD, DNase ativada por caspase, depois de clivada pela caspase 3) (Hengartner, 2000).

Tanto a via extrínseca como a intrínseca convergem para a fase de execução da apoptose. Esse momento é pontuado pela ativação de caspases tidas como efetoras da apoptose (caspases 3, 6 e 7), e que respondem pelas modificações bioquímicas e morfológicas nas células apoptóticas. Destaca-se a importância da caspase 3, que pode ser ativada pelas caspases iniciadoras 8 e 9. A partir da ativação de caspases efetoras, a célula fica comprometida com o programa de morte por apoptose (Jordan e Harrison, 2003).

A fagocitose da célula apoptótica é a última etapa da apoptose. A externalização de fosfatidilserina na superfície de células apoptóticas facilita o reconhecimento fagocitário não inflamatório. O reconhecimento rápido e a remoção da célula apoptótica sem liberação dos seus constituintes, praticamente elimina uma resposta inflamatória (Bratton *et al.*, 1997; Fadok *et al.*, 2001).

Em fêmeas de *R. microplus*, a perda na massa dos órgãos, após o desprendimento do hospedeiro, coincide com a ativação de caspase-3 e fragmentação de DNA em glândulas salivares e no intestino (Freitas *et al.*, 2006).

1.6 Linhagens de células de carrapato

Atualmente estão disponíveis mais de 40 linhagens de células de 13 espécies de ixodídeos e uma de argasídeo. O sucesso no isolamento e propagação de

patógenos em linhagens de células de carrapato criou um modelo para o estudo das interações destas com agentes patogênicos (bactérias e vírus) e em genômica funcional (Bell-Sakyi *et al.*, 2007). Além disso, já foram descritas a transfecção e o silenciamento por interferência de RNA (RNAi) de linhagens de células de carrapato (Mattila *et al.*, 2006; Kurtti *et al.*, 2008). O potencial de utilização de linhagens de células de carrapato pode expandir os estudos de função gênica na interface carrapato-hospedeiro-patógeno, na investigação da função de proteínas de carrapato em nível celular e na busca por proteínas farmacologicamente ativas ainda não descritas para formulação de vacinas (Willadsen e Jongejan, 1999). Recentemente, Mosqueda *et al.* (2008) relataram a obtenção de culturas primárias de intestino, glândulas salivares e ovários de *R. microplus*. Apesar da cautela quando da transposição de sistema *in vitro* para *in vivo* em carrapatos inteiros, as linhagens de células de carrapato possuem uma importância crescente na pesquisa (Bell-Sakyi *et al.*, 2007).

Apesar de isolada desde 1981, a linhagem BME26, derivada de embriões de *R. microplus* de diferentes idades, só foi caracterizada recentemente. As células possuem inclusões de glicogênio, numerosas mitocôndrias e vesículas com eletrondensidade heterogênea dispersas pelo citoplasma. Tais vesículas apresentam ainda diferentes graus de acidificação, e um grande conteúdo de lipídios, de composição ainda não determinada (Esteves *et al.*, 2008).

Parte dos resultados obtidos durante esta tese foi publicada em dois artigos. Eles são apresentados como ANEXO 1 (Abreu *et al.*, 2009) e ANEXO 2 (Logullo *et al.*, 2009). As informações listadas na METODOLOGIA e RESULTADOS deste documento se referem aos experimentos e dados não publicados. Todo o conjunto de resultados listados aqui, e os apresentados nos AXEXOS 1 e 2 foram discutidos nas conclusões desta tese.

OBJETIVOS

O objetivo desta tese foi a caracterização da via de sinalização por insulina em células embrionárias de *Rhipicephalis microplus*, a partir da identificação de três componentes conservados, e relacionados ao metabolismo de carboidratos e à sobrevivência celular.

Para alcançar tal objetivo, foram estabelecidas as seguintes metas:

1. Observar a resposta de células da linhagem BME26 à adição de insulina no meio de cultura:

- Pelo acúmulo de glicogênio

- Pela inibição seletiva da via de sinalização (inibidores de PI3K)

2. Evidenciar a presença de um maquinário enzimático conservado e responsivo à insulina, de modo coordenado, em células BME26, ovos e órgãos de *R. microplus*:

- Avaliando a expressão relativa da subunidade reguladora (p85) de PI3K em células BME26 e durante a embriogênese

- Clonando a Akt de carrapato e avaliando sua expressão relativa em células BME26 e durante a embriogênese

- Avaliando a expressão relativa de uma molécula alvo regulada pela via de sinalização por insulina (GSK-3b) nas células BME26 e durante a embriogênese

- Avaliar a atividade de GSK-3 ao longo da embriogênese, comparando com os níveis de glicogênio no período

3. Estabelecer a importância da via de sinalização por insulina para a sobrevivência celular mediante a determinação da viabilidade de células BME26 incubadas com inibidores de PI3K e de PKB

- Análise de alterações morfológicas das células mantidas na ausência de soro fetal bovino e de glicose

- Estabelecimento de um padrão positivo de morte por apoptose, por exposição à luz ultravioleta

- Análise de alterações morfológicas das células mantidas em exposição prolongada aos inibidores da via de sinalização por insulina.

METODOLOGIA

Ver ANEXO 1 (Tópico 2), e ANEXO 2 (Tópico 2).

3.1. Metodologia não publicada

3.1.1. Clonagem e sequenciamento parcial de Akt

Diferentemente da abordagem utilizada para a obtenção da sequência de PI3K, utilizamos um protocolo descrito por Riehle e Brown (2003) para a Akt, já que não havia descrita nenhuma sequência para a proteína quinase B de carrapato. Neste protocolo, *primers* degenerados são utilizados em reação de *touchdown* PCR, e foram baseados na sequência de Akt humana. Por esse protocolo, num primeiro momento, a amplificação ocorre a temperaturas elevadas, que durante os ciclos iniciais é reduzida gradativamente. No momento seguinte, a amplificação ocorre em ciclos “convencionais” de PCR, numa temperatura de anelamento baixa. O que acontece é que qualquer fragmento amplificado nos momentos iniciais da reação (maior especificidade) permanecerá no meio de reação e poderá servir de molde para novas cópias nos ciclos seguintes. Desse modo, a reação de PCR mais demorada acaba gerando mais cópias dos fragmentos amplificados na primeira parte da reação.

Aproximadamente 1,2 µg de cDNA obtido de ovos de 17° dia foram utilizados como molde na reação de *touchdown* PCR para amplificação de um fragmento da sequência de AKT. Nesta reação, foram utilizados *primers* degenerados, sendo o *forward* 5'-CARTGGACNACNGT NATYGA-3' e o *reverse* 5'-CCRCACATCATYTCRTACAT-3'. O programa executado no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems):

1ª parte: Especificidade decrescente

17 ciclos iniciais: 95°C/ 5s
60-50°C (-2°C/3 ciclos)/ 7s
72°C/ 10s

2ª parte: Menor especificidade

40 ciclos: 95°C/ 5s
48°C/ 7s
72°C/ 10s, e 10 minutos finais a 72°C.

O produto de PCR foi observado em gel de agarose 0,8%, corado com Brometo

de Edtídio (5µg/mL), e seu tamanho estimado em aproximadamente 850 pb. Esse tamanho se aproxima do descrito em mosquito *Aedes aegypti*, que era de 900 pb. O produto de 4 reações de *touchdown* PCR (20 µL, cada) foi precipitado com 1 mL de etanol gelado, 2 µL de NaOAc 3M, pH 5,2, e mantido a -20°C *overnight*. No dia seguinte, o tubo foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Depois de seco, o *pellet* formado foi ressuspense em água MilliQ® estéril. O fragmento amplificado foi purificado diretamente a partir de outro gel de agarose com o kit GeneClean®II (QBiogene). O *amplicon* foi inserido num vetor de clonagem pGEM®T-Easy (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. A construção do vetor + inserto foi utilizada para transformação por choque térmico de bactérias *Escherichia coli* TOP10. A transformação de *E. coli* por choque térmico de acordo com (Sambrook *et al.*, 1989). Ao DNA plasmidial foram adicionados 100 µL de células competentes (*E. coli* Top 10) e incubados a 4 °C por 30 min. As células foram submetidas ao choque térmico a 42 °C por 40 segundos, 1 minuto em banho de gelo, e pela adição de 1 mL de meio LB líquido. Após incubação a 37 °C por 1 h o material foi centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos, e 950 µL de meio foram descartados. O *pellet* foi ressuspense em 100 µL de meio e foram distribuídos em placas de cultura com meio LB adicionado de ampicilina (100 µg/mL), IPTG (320 µM) e x-GAL (1,6 ng/mL), para seleção das colônias bacterianas transformantes. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h.

3.1.2. Extração plasmidial por lise alcalina (mini-prep)

A técnica foi realizada segundo Sambrook e Russel (2001) com modificações. Foram selecionadas 5 colônias bacterianas brancas, contendo os plasmídeos de interesse, que foram inoculadas em 3 mL de LB líquido, contendo o antibiótico ampicilina e incubadas a 37 °C sob agitação constante (180 rpm) por 16 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 16.900 g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 100 µL da Solução 1 (50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCL, 10 mM de EDTA) com agitações vigorosas, e mantidas por 10 min no gelo. Em seguida foi adicionado 200 µL da solução 2 (0,2 N NaOH, SDS 1 %, e água destilada) homogeneizando por inversão lenta e incubando por 1 minuto no gelo. Após foi acrescentado 150 µL da solução 3 (acetato de potássio 5 M, ácido acético e água) e

novamente homogeneizado por inversão lenta e incubado por 20 min. O homogenato foi mantido por 20 min no gelo e a preparação foi centrifugada a 16.900 g por 20 min a 4 °C. A seguir, o sobrenadante foi tratado uma vez com 1 volume de fenol, centrifugado a 15.000 g por 5 min, a fase superior da solução foi removida para novos microtubos, tratada com 1 volume de fenol/clorofórmio, seguida de nova centrifugação a 15.000 g por 5 minutos. Novamente a fase superior foi removida, adicionado 1 volume de clorofórmio e centrifugado a 15.000 g por 5 min. Ao sobrenadante foi adicionado 0,1 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol 100% ou 1 volume de isopropanol e mantido por 2 horas a -20 °C. O homogeneizado foi centrifugado a 20.400 g por 30 min a 4 °C e removido o sobrenadante. O sedimento de DNA foi lavado (sem ressuspender) com 1 mL de etanol 70%, mantido a temperatura ambiente até a secagem e dissolvido em 100 µL de água milli-Q. A solução de Ribonuclease a 200 ng/mL (Fermentas) foi adicionada à mistura e mantida por 45 min a 37 °C para digestão do RNA.

3.1.3. Análise quantitativa e qualitativa do DNA plasmidial

A concentração e pureza do DNA obtido da extração plasmidial dos clones (GSK-3β/pGEM-TEasy), foi determinada por espectrofotometria pela relação entre as leituras nos comprimentos de onda 260 nm/280 nm. O DNA plasmidial foi hidrolisado com a enzima de restrição EcoRI para liberação do inserto correspondente ao fragmento amplificado de PKB de carrapato e submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8 % com tampão TAE 1X. O tamanho do fragmento gerado na reação foi determinado pela comparação com o marcador de massa molecular lambda/HindIII.

3.1.4. Sequenciamento dos clones obtidos na extração plasmidial

Dois dos clones obtidos foram sequenciados para a confirmação da clonagem de um fragmento da sequência de Akt. Os primers utilizados foram o T7 *promoter* e o Sp6 *terminator*, cada um com uma concentração de 5 pmol/µL. As amostras foram sequenciadas no aparelho MegaBACE 1000 (ABI Prism 3100). Para a análise das sequências de nucleotídeos foi utilizado o programa BioEdit versão 7.0.

3.1.5. Análise da transcrição de Akt por qPCR

Após a confirmação da sequência de Akt, a região da sequência de DNA (a região entre os dois domínios muito conservados) foi escolhida para o desenho de *primers* específicos para estudos em qPCR. O *primer* escolhido como *forward* foi o 5'-AGAAGTTGGCGAGTGAGGAGGA-3', e como *reverse* o 5'-CGCGTCGAGATGCTGAACTTGT-3'. O par de *primers* utilizado amplifica um fragmento de 85 pares de bases. A eficiência de amplificação do par de *primers* foi determinada por uma curva de calibração, preparada com diluições seriadas de cDNA. Tanto nas análises durante a embriogênese, como nos tratamentos com as células foram utilizadas as mesmas amostras dos ensaios para a PI3K (ANEXO 1).

3.1.6. Ensaios de viabilidade e análise morfológica das células BME26

As células BME26 utilizadas nos experimentos descritos aqui, e no ANEXO 1 foram cedidas pela professora Sirlei Daffre (ICB-USP). As células cedidas encontravam-se na 8ª passagem, e têm sido mantidas em nosso laboratório desde 2006. Atualmente, encontram-se na 23ª passagem. A cada 10 passagens, alíquotas de células são criopreservadas em nitrogênio líquido.

3.1.6.1 Coloração por Giemsa

As células mantidas sobre lamínulas de vidro em microplacas de 24 poços foram fixadas em paraformaldeído (solução fresca a 3%, em PBS, por 30 minutos) e coradas com solução de Giemsa 10% por 20 minutos. As lamínulas foram descoradas, por 30 segundos em cada, em misturas de acetona:xilol (10:0, 9:1, 7:3, 3:7, 0:10). Depois de secas, as lamínulas foram montadas em Entelan, sobre lâminas de vidro, e deixadas para secar por 12 horas. Depois desse período, as células foram observadas em microscópio ótico (AxioLab, Zeiss).

3.1.6.2 Retirada de nutrientes do meio de cultivo

Como forma de estabelecer a participação da via de sinalização por insulina também na sobrevivência das células BME26, foram desenvolvidos experimentos de exposição prolongada a diferentes concentrações de inibidores farmacológicos da via. Entretanto, foi necessário, inicialmente, estabelecer um padrão positivo para as

alterações morfológicas decorrentes da morte celular por apoptose. Deste modo foram realizadas diferentes tentativas de estabelecer esse padrão morfológico positivo. Primeiramente as células BME26 foram cultivadas, por diferentes tempos, em microplacas de 24 poços (1×10^5 células/poço), sobre uma lamínula de vidro em meio de cultivo L15B (ANEXOS 3 e 4) sem adição de soro fetal bovino ou sem adição de glicose, e comparados com as células mantidas nas condições ótimas (meio L15B completo, com soro).

3.1.6.3 Citometria de fluxo

Num experimento, as células tratadas conforme descrito no item anterior foram semeadas em microplaca de 24 poços. Ao final do período de incubação, as células foram delicadamente descoladas no próprio meio de cultivo, e a granulidade celular foi analisada diretamente no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD[®]) (10^4 eventos/leitura) em função do espalhamento lateral do laser (SSC).

3.1.6.4 Exposição a espécies reativas de oxigênio

Paralelamente, a morte celular das células foi induzida com a adição de diferentes concentrações de H_2O_2 , para favorecer a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) no meio de cultivo. Possíveis alterações na morfologia das células foram analisadas após a coloração por Giemsa, e observação em microscópio ótico. Alternativamente, as células foram fixadas em paraformaldeído, coradas diretamente com Brometo de Etídio, e observadas em microscópio de fluorescência Axioplan (Zeiss).

3.1.6.5 Exposição à radiação Ultra-Violeta

Outro tratamento a que as células foram submetidas foi a exposição à radiação ultravioleta, num curso temporal com intervalos de 5 minutos. Para isso, a placa com as células foi mantida aberta à luz U.V. do fluxo laminar. Depois de expostas, as células foram mantidas em cultura por 24 horas, e observadas diretamente em microscopia de fluorescência, utilizando como corantes uma mistura 1:1 de Laranja de Acridina (100 $\mu\text{g/mL}$) e Brometo de Etídio (100 $\mu\text{g/mL}$), observadas e fotografadas em microscópio de fluorescência Axioplan (Zeiss).

3.1.6.6 Exposição aos inibidores da via de sinalização por insulina

As células BME26 foram cultivadas em lamínulas e expostas por 24 horas a diferentes concentrações de inibidores de PI3K [Wortmanina ($IC_{50} = 5 \text{ nM}$)] ou LY294002 ($IC_{50} = 1,4 \text{ } \mu\text{M}$)] ou do inibidor de Akt [10-DEBC ($IC_{50} = 6 \text{ } \mu\text{M}$)], na ausência de soro fetal bovino. Ao final desse tempo, as lamínulas foram coradas por Giemsa e observadas em microscópio ótico.

3.1.7. Análise estatística dos resultados obtidos

Os resultados sobre expressão relativa são referentes à média \pm erro padrão de um experimento em triplicata. Já para a coloração com Laranja de acridina/Brometo de etídio das células expostas ao U.V., o gráfico representa a média de um experimento realizado em duplicata.

RESULTADOS

Parte dos resultados obtidos nesta tese está publicada nos ANEXOS 1 e 2. Os resultados listados abaixo não foram publicados.

4.1 Análise da sequência parcial da subunidade reguladora p85 de PI3K de *R. microplus*

Na tentativa de identificar componentes da via de sinalização por insulina, encontrou-se uma sequência parcial de cDNA depositada no DFCI B. *microplus* Gene Index com o código TC18043. A sequência de aminoácidos deduzida desse fragmento (ANEXO 5) mostrou-se homóloga a subunidades reguladoras p85 de PI3K de abelha (*Apis mellifera*, XP_392119.2), mosca (*Drosophila melanogaster*, NP_477270.1), peixe (*Danio rerio*, XP_683819.2), bovino (*Bos taurus*, NP_777000.1), sapo (*Xenopus laevis*, NP_001083940.1) e camundongo (*Mus musculus*, NP_001070963.1) (Figura 6).

A sequência parcial de *R. microplus* apresenta 2 domínios SH2 (destacados em verde na Figura 6), responsáveis pelo reconhecimento de resíduos fosforilados de tirosina, flanqueando a região ligadora da subunidade catalítica p110. Essa é uma organização comum a todas as isoformas descritas para as subunidades reguladoras de PI3K da classe 1A. Entretanto, a identificação de uma parte do domínio ativador de proteínas Rho-GTPase (RhoGAP) (destacado em amarelo na Figura 6) confere uma arquitetura de domínios que é característica das isoformas p85 das subunidades reguladoras de PI3K da classe 1A. As isoformas p85 α e p85 β são descritas como atuantes na transdução de sinal de receptores de superfície com atividade tirosina quinase, via formação de PIP₃, e como produtos de dois genes diferentes em mamíferos (Hawkins *et al.*, 2006). A conclusão da sequência da p85 de carrapato, bem como sua análise, permitirão afirmar a presença de um ou mais genes que codificam essa proteína.

Esses resultados basearam a estratégia para o estudo de análise de expressão relativa de p85 por qPCR nas células BME26 e em ovos de *R. microplus* (Anexo 1).

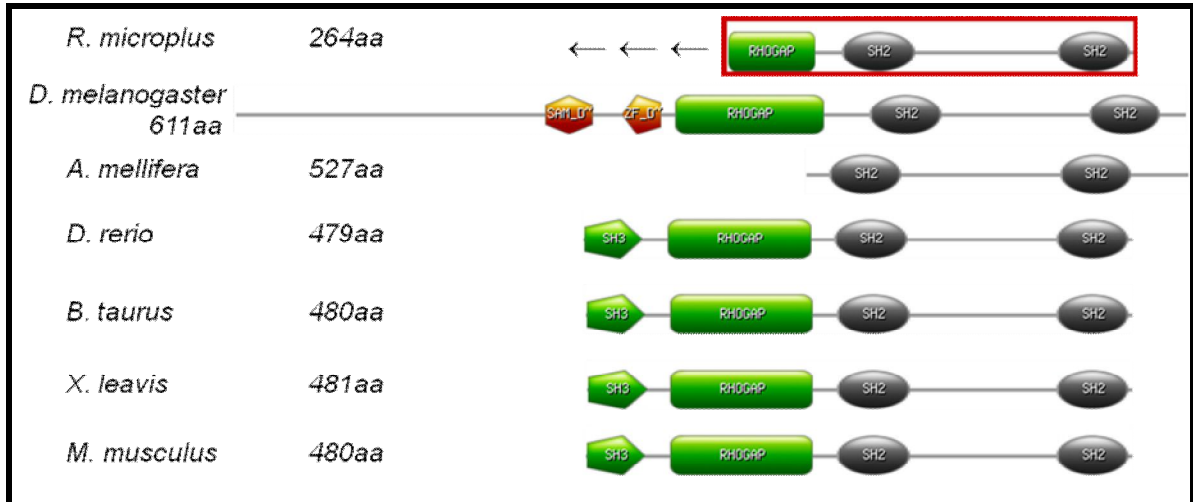


Figura 6: Análise da sequência parcial da subunidade reguladora p85 de PI3K. As sequências de aminoácidos deduzidas de p85 de diferentes espécies foram mapeadas em seus domínios de assinatura no programa PROSITE (<http://ca.expasy.org/prosite/>). Carrapato (*Rmicroplus*), abelha (*Amellifera*), mosca (*Dmelanogaster*), peixe (*Drerio*), bovino (*Btaurus*), sapo (*Xlaevis*) e camundongo (*Mmusculus*). A sequência de carrapato está incompleta na região N-terminal.

4.2 Sequência parcial da Akt de *R. microplus*

Na tentativa de utilizar o mesmo caminho adotado para a PI3K verificou-se que até o momento não existiam sequências de carrapato disponíveis naquele banco de dados (DFCI *B. microplus* Gene Index). Assim, utilizou-se uma estratégia de clonagem para a PKB de carrapato, a partir de primers degenerados, onde um fragmento de aproximadamente 850 pb foi gerado, utilizando cDNA de ovos de 17 dias. O sequenciamento de 2 clones forneceu uma sequência consenso de 793 pb (fase de leitura 1, sentido 5'-3') (ANEXO 6). Foi constatando que a sequência de cDNA dessa proteína ainda não foi identificada no carrapato *R. microplus*. As análises iniciais na sequência de aminoácidos deduzida indicam grande homologia com as isoformas α de Akt descritas para *D. melanogaster* (NP_732113.3), *A. mellifera* (XP_396874.3), *D. rerio* (XP_001923454.1), *B. taurus* (NP_776411.1), *X. laevis* (NP_001083878.1) e *M. musculus* (NP_033782.1) (Figura 7).

A partir da dedução da sequência primária (ANEXO 7), foi possível identificar a presença de porções do domínio PH, para ligação de fosfolipídios (destacado em amarelo na Figura 7), e do domínio de atividade proteína quinase (destacado em verde na Figura 7). Além disso, o domínio quinase apresentou ainda as regiões de assinatura para ligação de ATP (destacado em negrito na Figura 7), e de sítio ativo de Serina/Treonina quinases (destacado como sublinhado na Figura 7). Essa organização dos domínios é muito próxima à descrita para as quinases pertencentes à classe PKB. Isso coincide com a descrição de que os *primers* degenerados foram desenhados para uma porção conservada da enzima (Riehle e Brown, 2003). Entretanto não é possível especificar de que isoforma se trata o fragmento obtido em carrapato.

Baseado nesses resultados decidiu-se pelo desenho de *primers* específicos para a região que apresentou um menor grau de conservação na análise por homologia de sequências.

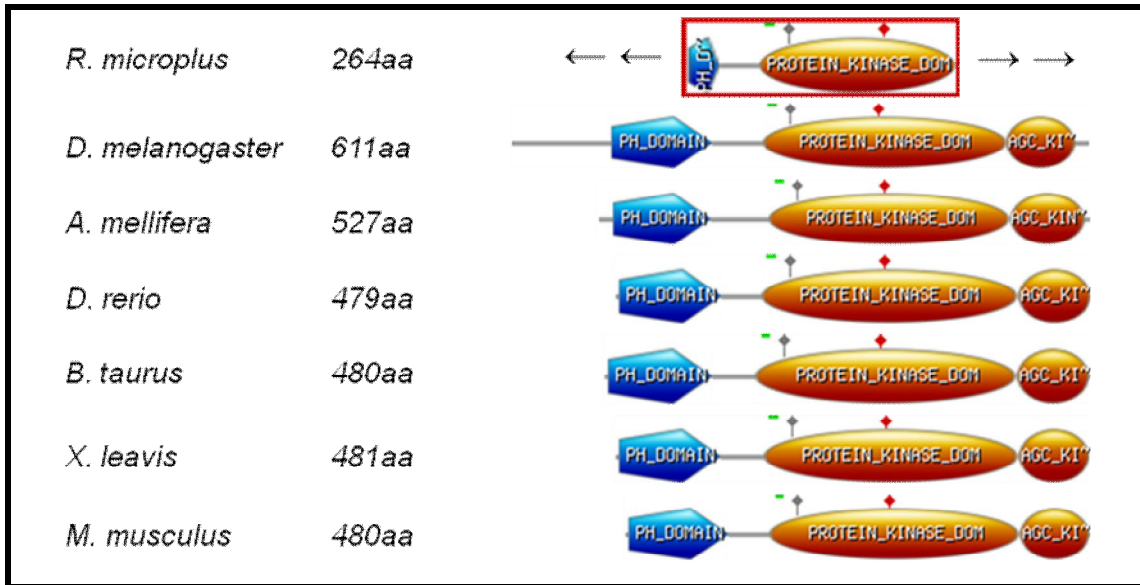


Figura 7: Análise da sequência parcial de Akt. A sequência parcial de aminoácidos foi deduzida do sequenciamento do fragmento obtido em carrapato (*Rmicroplus*), e mapeada em seus domínios de assinatura, juntamente com sequências de Akt de outros organismos, no programa PROSITE (<http://ca.expasy.org/prosite/>). Abelha (*Amellifera*), mosca (*Dmelanogaster*), peixe (*Drerio*), bovino (*Btaurus*), sapo (*Xlaevis*) e camundongo (*Mmusculus*). A sequência obtida de carrapato está incompleta nas regiões N e C terminal.

4.3 Expressão Relativa de Akt na embriogênese de *R. microplus*

O perfil de expressão de Akt mostrou uma grande variação (Figura 8), com uma elevação entre o 1º e o 3º dias, seguido de uma forte queda no 6º dia. No 9º dia ocorreu um pequeno aumento, seguido de um pico de expressão no 12º dia. Já no 15º a expressão cai novamente, chegando ao menor valor no 18º.

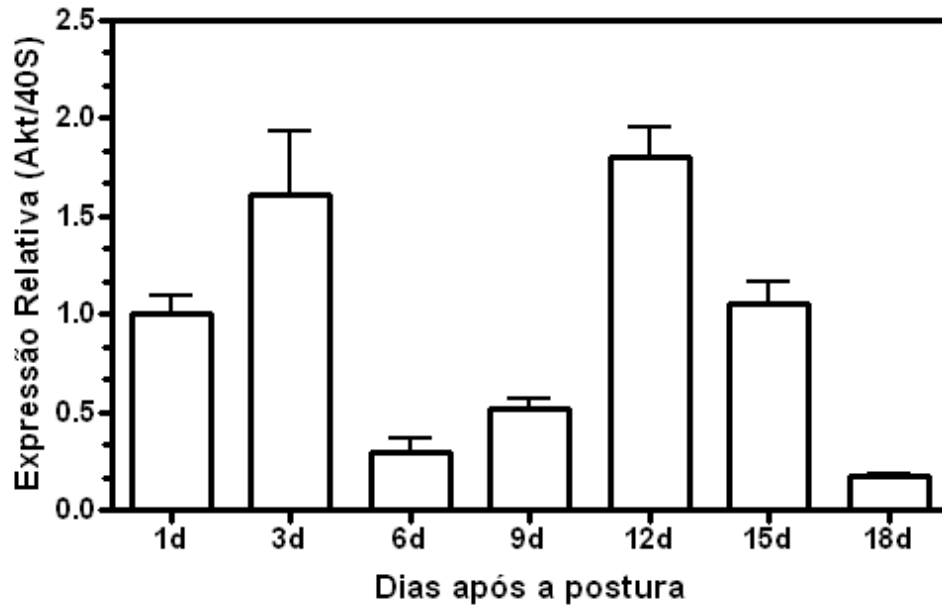


Figura 8: Expressão relativa de Akt durante a embriogênese de *R. microplus* PCR quantitativo foi realizado em amostras de cDNA obtidas de ovos coletados ao longo da embriogênese. A expressão relativa de Akt foi determinada de acordo com Pfaffl (2001), utilizando o gen para a protein ribossomal 40S S3a como referência. Média \pm erro padrão de um experimento em duplicata

4.4 Análise de Expressão Relativa de Akt nas céls BME26 tratadas com Insulina bovina e inibidores de PI3K

A capacidade de insulina influenciar a transcrição de Akt foi analisada por PCR em tempo real, utilizando o gen da proteína ribossomal 40S como referência, nas células expostas à insulina bovina, na presença e na ausência de inibidores de PI3K. Foi observado que a expressão de Akt foi estimulada na presença de insulina, mas que tal efeito foi abolido quando do tratamento prévio com inibidores de PI3K (LY294002 ou

Wortmanina) (Figura 9). Foi observado que a incubação com LY294002 promoveu um nível de expressão muito próximo ao da condição controle.

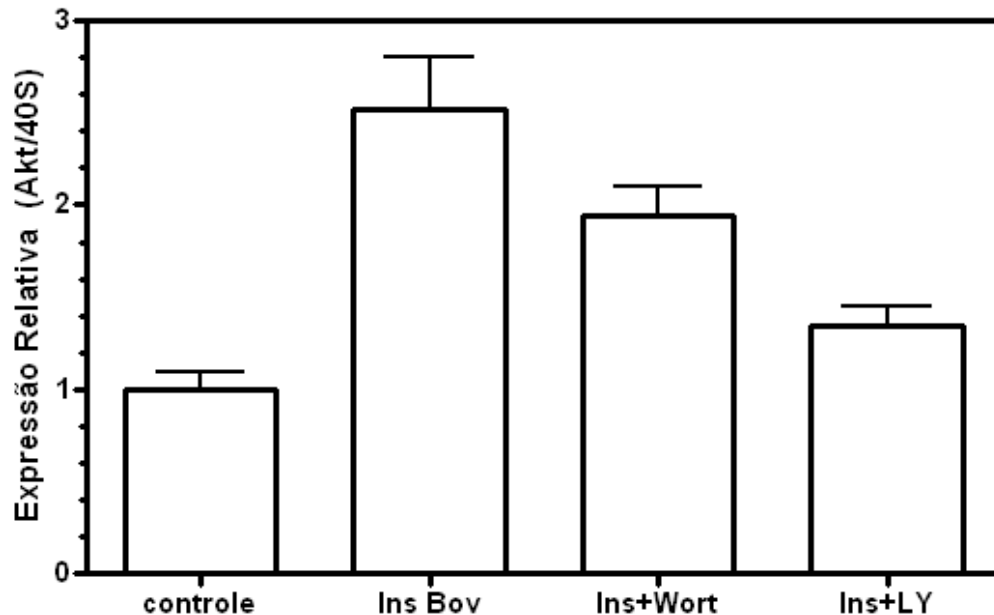


Figura 9: Expressão relativa de Akt em células BME26 tratadas com insulina e inibidores de PI3K

As células foram tratadas por 60 minutos com LY294002 10 μ M (Ins+LY) ou Wortmanina 40 nM (Ins+Wort), antes da adição de insulina bovina 200 nM (InsBov) por 30 minutos. A expressão relativa de Akt foi determinada por qPCR, de acordo com Pfaffl (2001) utilizando o gen para a proteína ribossomal 40S S3a como referência. Controle: células mantidas por 24 horas em ausência de soro fetal bovino. Média \pm erro padrão de um experimento em duplicata

4.5 Alterações morfológicas nas células BME26 em cultivo na ausência de fatores de crescimento ou glicose

Como forma de atribuir uma função da via de sinalização por insulina na sobrevivência das células BME26, a primeira tentativa de indução de morte por apoptose foi a remoção de soro fetal bovino (fatores de crescimento) ou de glicose da formulação do meio de cultivo. As células submetidas a esse tratamento foram comparadas com as células cultivadas em meio completo. As células BME26, quando mantidas em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino apresentam um grande número de vesículas dispersas no citoplasma (Esteves *et al.*, 2008). Essa

característica pode ser observada tanto por coloração por Giemsa (Figura 10A), como pela análise de granulosidade por citometria de fluxo (Figura 10D). A alteração morfológica mais notável nas células BME26, decorrente da retirada de soro fetal bovino (Figura 10B) ou de glicose (Figura 10C) do meio de cultivo, é a redução no número de vesículas dispersas no citoplasma. Essa redução na quantidade de vesículas no citoplasma das células mantidas por até 48 horas sem soro também foi evidenciado por citometria de fluxo (Figura 10E). Isso pode ser observado pelo deslocamento para a esquerda do histograma de granulosidade celular (SSC), quando comparado com o histograma obtido na presença de SFB (Figura 10D).

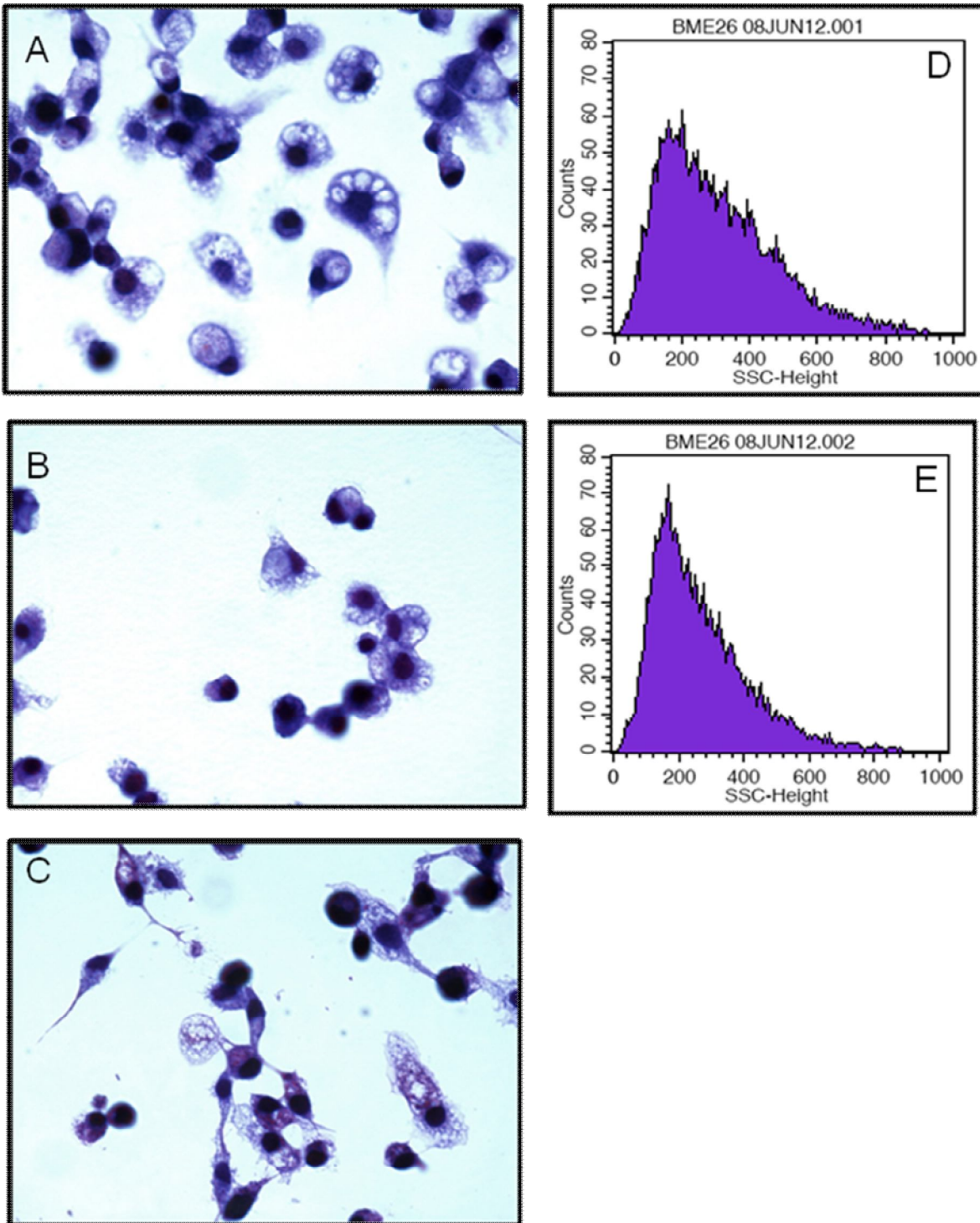


Figura 10: A remoção de nutrientes do meio de cultivo induz alterações morfológicas nas células BME26. A-C: células coradas por Giemsa; D-E: Células analisadas por citometria de fluxo no FACSCalibur. A e D: meio de cultivo completo; B e E: meio sem soro (48hs); C: meio modificado sem glicose (24hs). A-C: Aumento 1000x

4.6 Alterações morfológicas nas células BME26 mantidas na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Outra forma de indução de morte por apoptose foi expor as células BME26 a espécies reativas de oxigênio, a partir da incubação com diferentes concentrações de H₂O₂.

As células BME26, mantidas em meio de cultivo completo apresentam o citoplasma rico em vesículas (Figura 11A). Além disso, as células fixadas e coradas com brometo de etídio apresentam um núcleo com aspecto homogêneo (Figura 11C) por microscopia de fluorescência.

Foi notado que a morfologia das células ficou relativamente preservada em tratamentos com concentrações de H₂O₂ menores do que 500 µM. Na presença de 500 µM de H₂O₂ por 24 horas, a coloração por Giemsa evidenciou não apenas uma redução das vesículas no citoplasma, mas também a emissão de prolongamentos citoplasmáticos (Figura 11B). Já os núcleos de algumas das células submetidas a um tratamento com H₂O₂ por 24 horas exibiram um aspecto heterogêneo (Figura 11D). Em alguns casos foi possível notar a fragmentação do núcleo (Figura 11E).

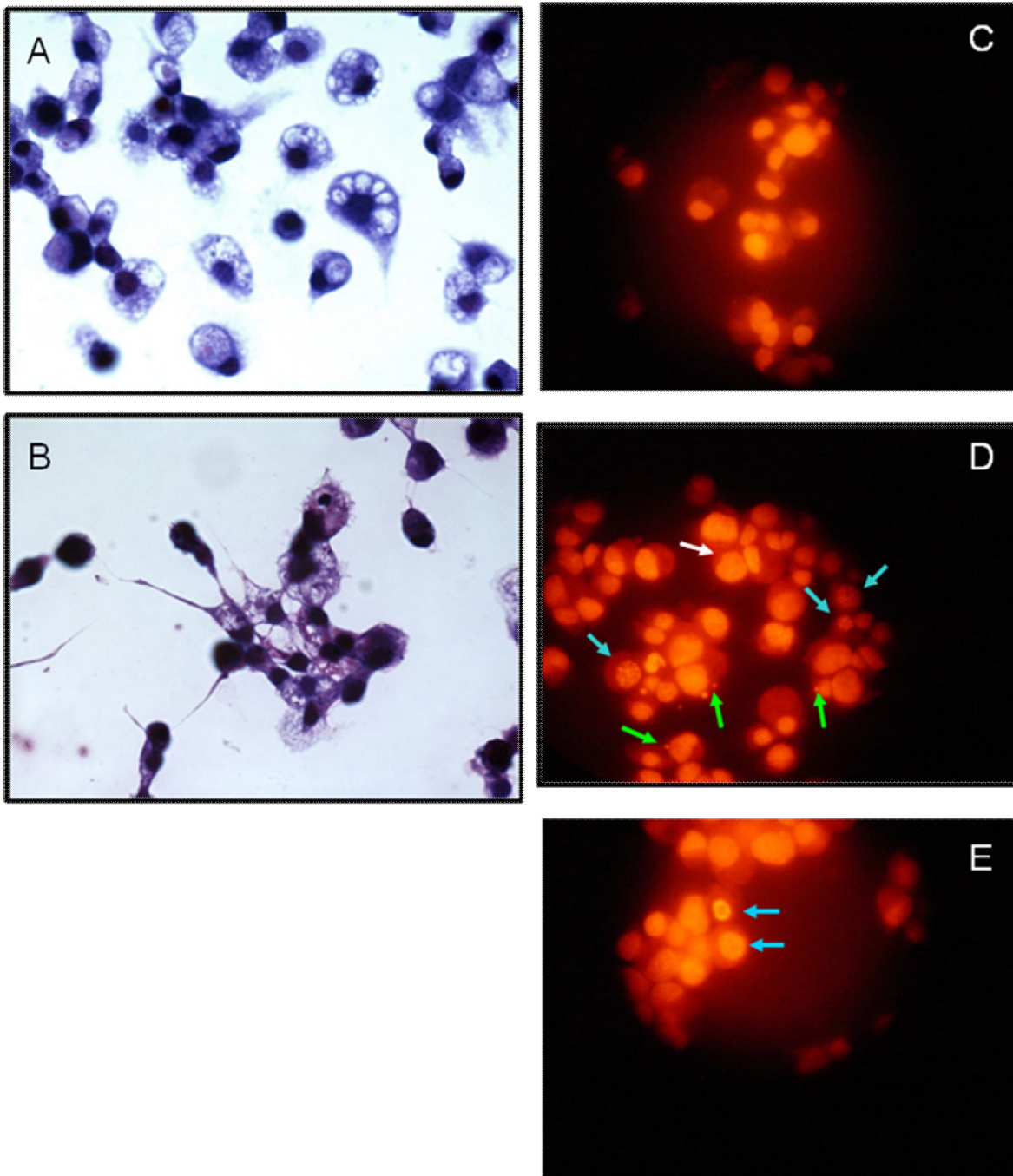


Figura 11: Incubação com H₂O₂ induz alterações morfológicas e nucleares nas células BME26. A-B: células coradas por Giemsa; D-E: Células coradas com Brometo de Etídio (1 mg/mL). A e C: meio de cultivo completo; B: meio sem soro + H₂O₂ 500 μM (24hs); D e E: meio sem soro + H₂O₂ 1 mM (24hs). Setas brancas: alterações nos formatos dos núcleos; Azul: núcleos com aspecto heterogêneo; Verde: fragmentos de material nuclear. A.e B: Aumento 1000x; C-E: Aumento 400x.

4.7 Viabilidade e alterações morfológicas das células BME26 em cultivo expostas a radiação ultravioleta

Após a exposição das células BME26 à radiação ultravioleta, a viabilidade destas foi comparada com as células que não foram expostas, a partir da coloração com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio. As células não expostas ao UV apresentam as vesículas do citoplasma coradas pela Laranja de Acridina, evidenciando diferentes graus de acidez (Figura 12A). Foi possível notar a redução de vesículas no citoplasma das células mantidas na ausência de soro fetal bovino (Figura 12B). A partir da exposição ao UV (Figura 12C-F), as células com a viabilidade comprometida apresentam uma marcação mais intensa com o Laranja de Acridina (verde), decorrente da compactação do material nuclear (apoptose primária). Adicionalmente, foi possível observar a marcação de células inviáveis com o Brometo de Etídio (vermelho, somente em células sem integridade da membrana plasmática), em que o núcleo pode se apresentar compactado (apoptose secundária) ou expandido (necrose). A maior frequência dessas alterações foi observada nos tempos de exposição mais prolongada ao UV.

Esse efeito da radiação U.V. induzindo a morte por apoptose foi quantificada, realizando a contagem das células (100 unidades, em cada hemisfério do poço) e agrupando-as em 3 categorias. A porcentagem de células viáveis (que apresentaram núcleos corados levemente de verde) não apresentou diferença entre as células mantidas na presença ou na ausência de SFB (Figura 13A). Entretanto, com a exposição crescente ao U.V. observa-se a diminuição no percentual de células viáveis. Já o percentual de células consideradas apoptóticas (as que apresentaram núcleo compactado, podendo este estar corado de verde brilhante ou vermelho) foi quase ausente nas células nas expostas à radiação, mas mostrou-se crescente, até 15 minutos de exposição ao U.V., sugerindo uma estabilização aos 20 minutos (Figura 13B). Já as células necróticas (que apresentaram núcleos grandes corados de vermelho), apesar de ausentes entre as células não expostas à radiação, foram pouco frequentes até 10 minutos de exposição ao U.V., mas apresentaram maior porcentagem a partir de 15 minutos (Figura 13C).

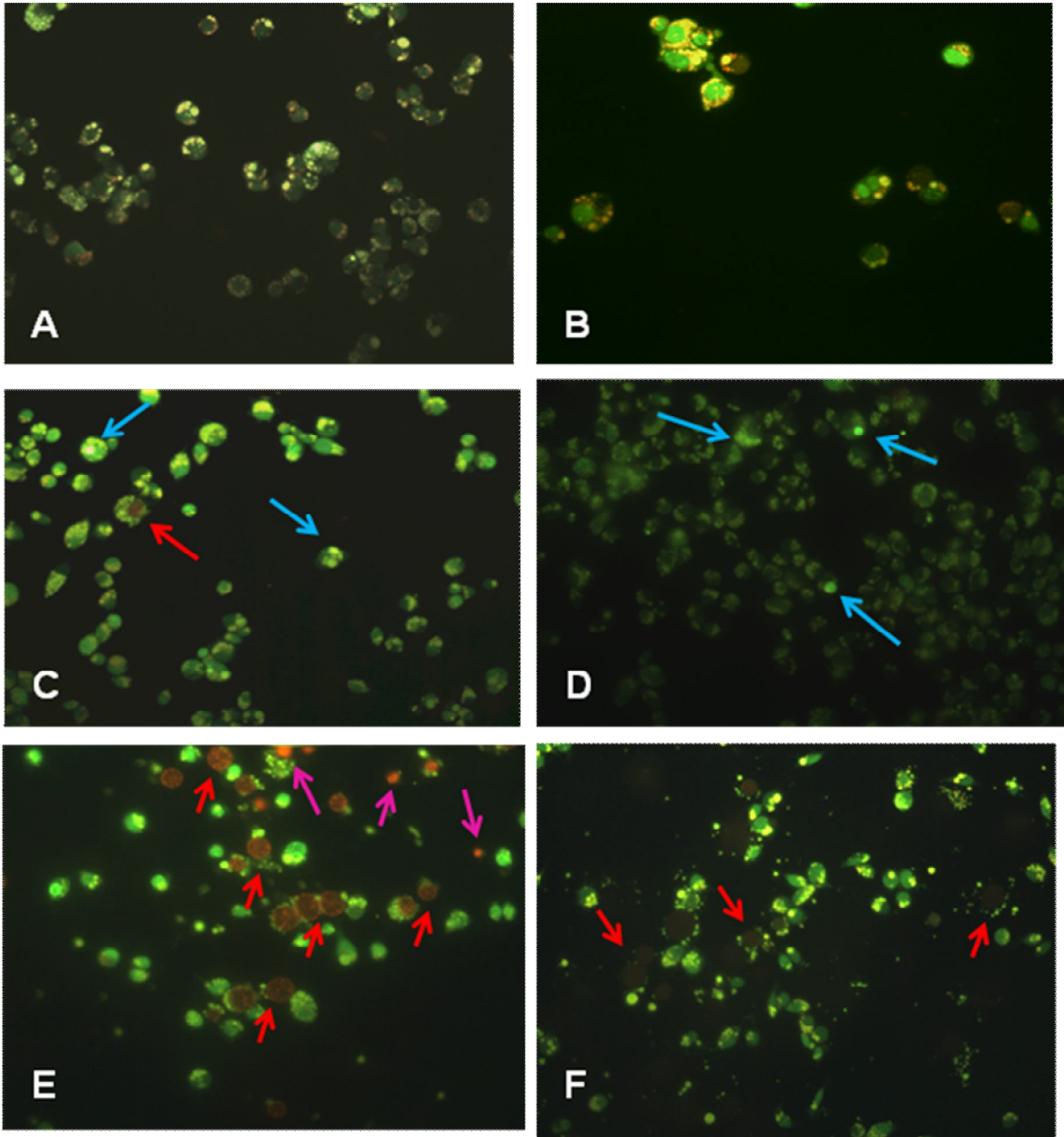


Figura 12: Indução de morte por apoptose em células BME26 expostas à radiação ultra-violeta. Células coradas com Laranja de Acridina/Brometo de Etídio e observadas em microscópio de Fluorescência, 24 horas após a exposição (exceto A e B). A: meio completo; B: meio sem SFB; Tempos de exposição, C: 5 minutos, D: 10 minutos, E: 15 minutos, F: 20 minutos. Seta azul: apoptose primária; Rosa: apoptose secundária; Vermelho: necrose. Aumento 400x

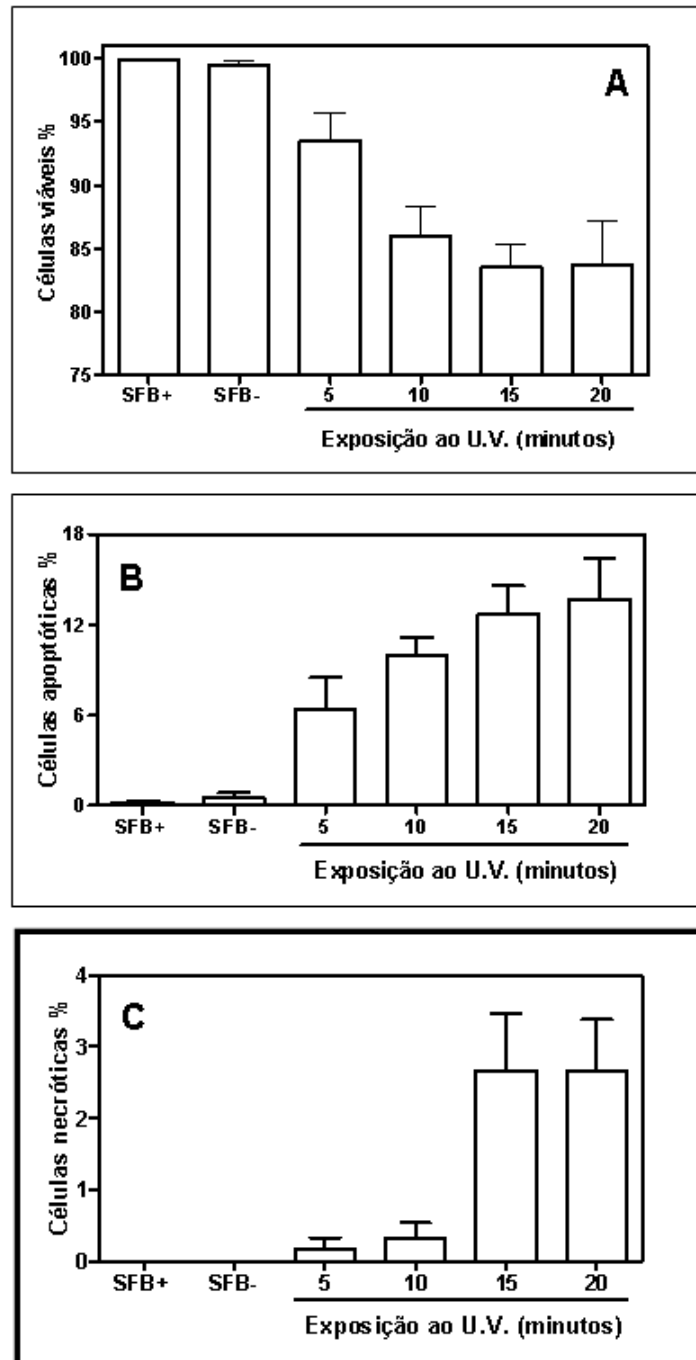


Figura 13: Quantificação da indução de morte em células BME26 expostas à radiação U.V.

Células expostas ao UV foram contadas, e agrupadas de acordo com o padrão de coloração por AO/EB:

A: Células viáveis: exibem núcleos corados levemente de verde

B: Células apoptóticas: exibem núcleos pequenos de verde brilhante, ou pequenos núcleos vermelhos

C: Células necróticas: apresentam grandes núcleos vermelhos

4.8 Alterações morfológicas das células BME26 em cultivo na presença de Wortmanina

As células BME26 tratadas com 31,2 nM de Wortmanina ($6,25 \times IC_{50}$) apresentaram poucas alterações, a partir da coloração por Giemsa (Figura 13A). Na concentração de 62,5 nM ($12,5 \times IC_{50}$) as células começam a apresentar um aspecto fragmentado (Figura 13B), além de apresentarem uma marcação pontilhada na superfície, similar ao descrito como *blebbing*. Nas concentrações de 125 nM ($25 \times IC_{50}$) e de 250 nM ($50 \times IC_{50}$) (Figuras 14C e 14D), notou-se uma maior frequência de células fragmentadas, com *blebbing*, e redução das vesículas citoplasmáticas.

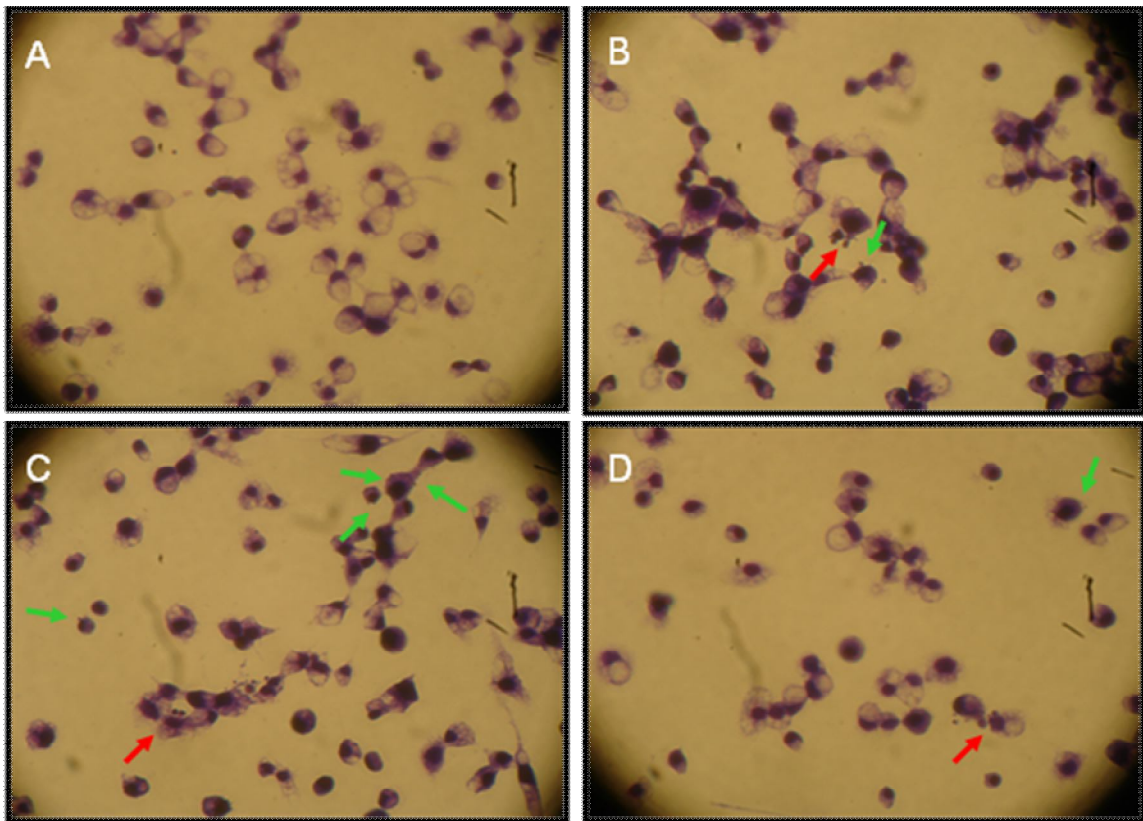


Figura 14: Alterações morfológicas das células BME26 incubadas com diferentes concentrações de Wortmanina. A: 31,2 nM; B: 62,5 nM; C: 125 nM; D: 250 nM. Aumento 400x. Células coradas com Giemsa. Setas vermelhas: fragmentação. Setas verdes: projeções do citoplasma, similares ao *blebbing*.

4.9 Alterações morfológicas das células BME26 em cultivo na presença de LY294002

As células BME26 tratadas com 8,75 μM de LY294002 ($6,25 \times \text{IC}_{50}$) apresentaram poucas alterações, a partir da coloração por Giemsa (Figura 15A). Na concentração de 17,5 μM ($12,5 \times \text{IC}_{50}$) as células começam a apresentar um aspecto fragmentado (Figura 15B), além de apresentarem uma marcação pontilhada na superfície, similar ao descrito como *blebbing*, e prolongamentos da membrana plasmática. Nas concentrações de 35 μM ($25 \times \text{IC}_{50}$) e de 70 μM ($50 \times \text{IC}_{50}$) (Figuras 15C e 15D), nota-se uma maior frequência de células fragmentadas, com *blebbing*, e redução das vesículas citoplasmáticas.

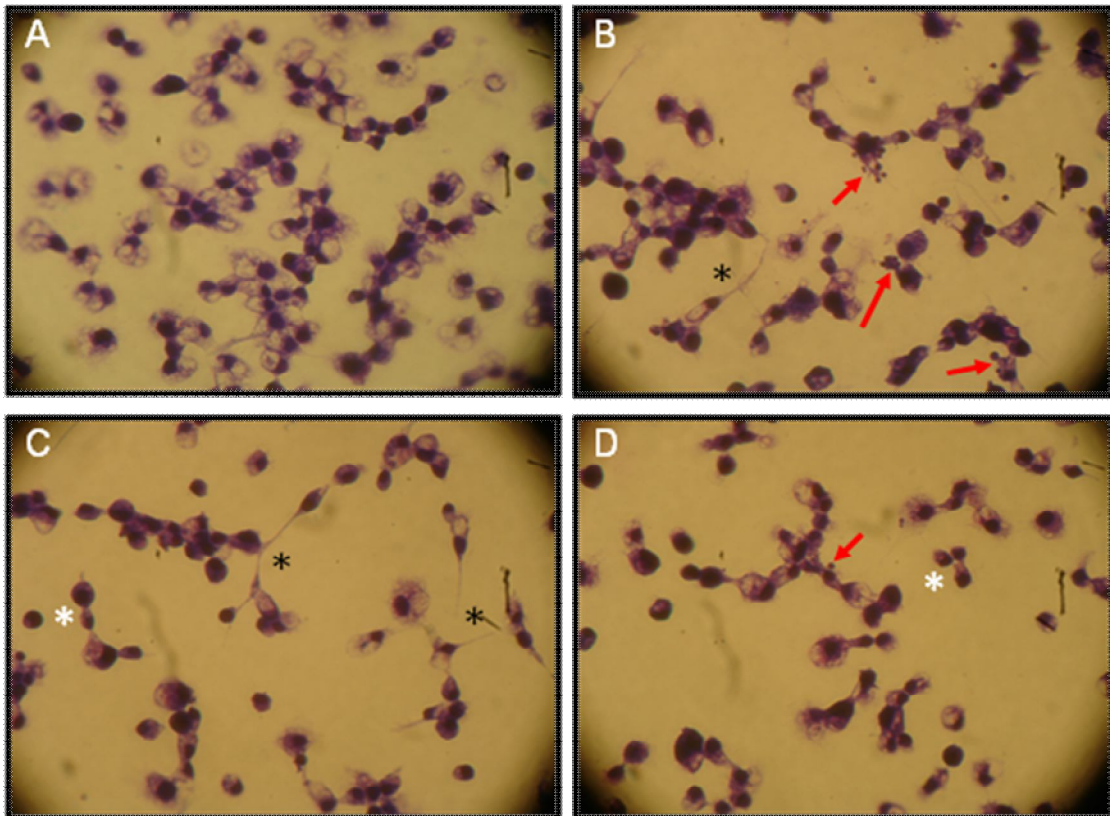


Figura 15: Alterações morfológicas das células BME26 incubadas com diferentes concentrações de LY294002. A: 8,75 μM , B: 17,5 μM , C: 35 μM , D: 70 μM . Aumento 400x. Setas vermelhas: fragmentação. Asterisco branco: redução do citoplasma. Asterisco preto: prolongamentos do citoplasma

4.10 Alterações morfológicas das células BME26 em cultivo na presença de 10-DEBC

As células BME26 tratadas com 20 μM de 10-DEBC ($3 \times \text{IC}_{50}$) apresentaram forte redução das vesículas citoplasmáticas, a partir da coloração por Giemsa (Figura 16A). Na concentração de 37,5 μM ($6,25 \times \text{IC}_{50}$) ocorre uma maior frequência de perda das vesículas citoplasmáticas (Figuras 16B e 16C) e também pode-se notar que um menor número de células permanece aderido à lamínula. Concentrações maiores foram testadas, mas não foi possível observar células aderidas às lamínulas.

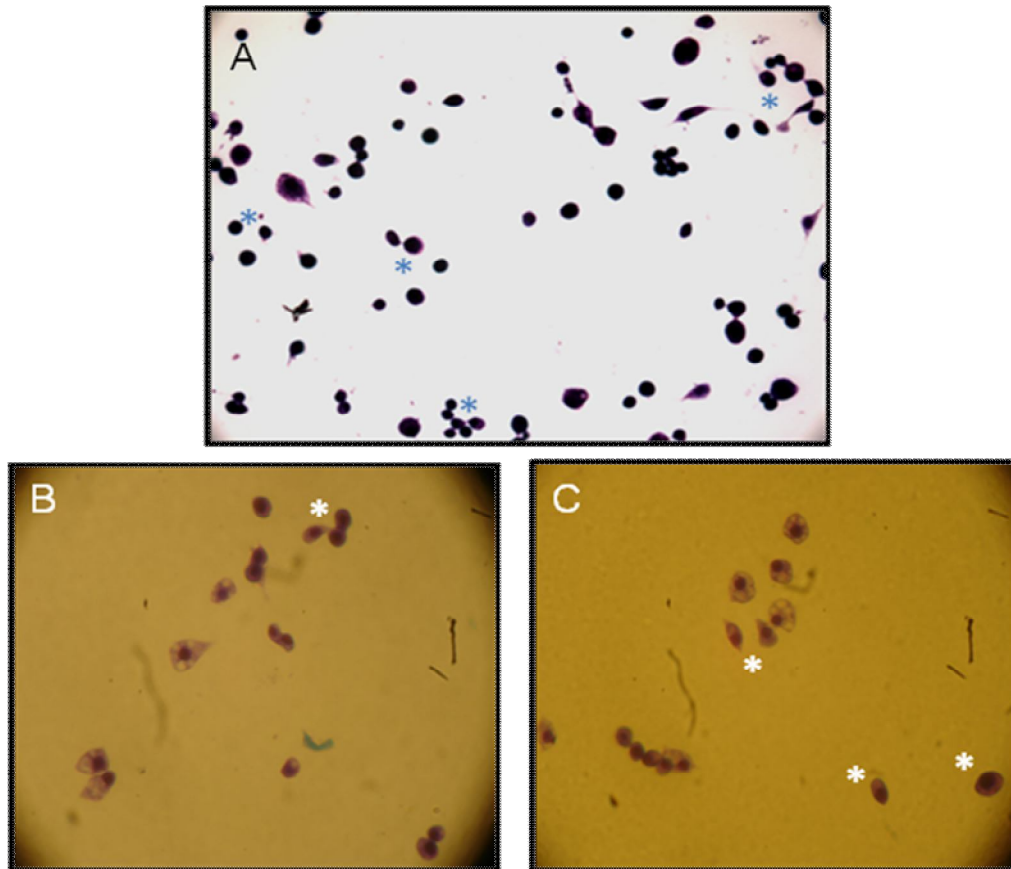


Figura 16: Alterações morfológicas das células BME26 incubadas com diferentes concentrações de 10-DEBC. A: 20 μM (Aumento, 400x), B-C: 37,5 μM (Aumento, 400x). Coradas por Giemsa.

Asteriscos: redução do citoplasma.

DISCUSSÃO

Este trabalho apresenta as primeiras evidências no carrapato *R. microplus* da participação da via de sinalização por insulina no metabolismo de carboidratos, e ampliam as observações anteriores sobre a presença de um peptídeo relacionado à insulina em outras espécies de carrapato (Zhu e Oliver, 1991; Davis *et al.*, 1994). A identificação de um maquinário responsivo à presença de insulina, bem como a caracterização de alvos da regulação por este hormônio abrem novas perspectivas para o estudo do metabolismo energético na embriogênese do carrapato. A primeira evidência sobre esta questão foi observada através da resposta das células BME26 à presença de insulina relacionada ao acúmulo de glicogênio, indicando existir uma relação direta entre o maquinário enzimático conservado, que depende da atividade de PI3K (Figuras 2 e 3 do ANEXO 1).

Apesar do consenso sobre a regulação da atividade das quinases da via de sinalização por insulina por fosforilação (Heeson *et al.*, 1997), foi possível observar que a insulina exógena, adicionada ao meio de cultivo, alterou os níveis de expressão de algumas proteínas constituintes da via, a subunidade reguladora p85 de PI3K (Figura 4 do ANEXO 1) e a proteína quinase B (Figura 8). Os dados indicam que a transcrição da subunidade reguladora (p85) de PI3K, e da proteína quinase Akt são aumentadas na presença de insulina, enquanto os transcritos de GSK3b, uma proteína regulada negativamente (Figura 5 do ANEXO 1) não são alterados. Entretanto, esses efeitos foram revertidos mediante a inibição da atividade de PI3K. Os dados sugerem que nas células BME26 a insulina adicionada pode regular a transcrição desses genes. A regulação da expressão de genes é um dos efeitos mais significativos da ação da insulina, afetando tanto a transcrição, como a estabilidade e a tradução de RNAm de genes envolvidos em diversos fenômenos biológicos (O'Brien *et al.*, 2001).

Especificamente no caso da GSK3b, a transcrição desta enzima foi aumentada em células BME26 quando da inibição de PI3K por Wortmanina (Figura 5 do ANEXO 1). Essa observação sugere que a sinalização por insulina pode controlar a transcrição de GSK3b por algum mecanismo que depende da atividade de PI3K, mantendo dessa forma os níveis de transcritos em níveis similares aos das células mantidas na ausência

de soro. A inibição de GSK3b por insulina depende da fosforilação na Ser⁹, é mediada por Akt (Cross *et al.*, 1995; Cohen, 1999), e necessita ainda ser demonstrada nas células BME26 para que se possa inferir sobre a atividade catalítica de GSK3b nos tratamentos realizados.

Apesar das variações ao longo da embriogênese, a expressão relativa de p85 (Figura 6 do ANEXO 1) exibiu um perfil similar ao da distribuição de glicogênio no mesmo período (Figura 5 do ANEXO 2). Já a transcrição de GSK3b apresentou um pico no 18º dia após a postura (Figura 4 do ANEXO 2), que não coincide com o pico de atividade enzimática (Figura 5 do ANEXO 2). Isso pode ser explicado pela regulação por fosforilação descrita para a GSK3b (Wang *et al.*, 1994). Já a transcrição de Akt apresentou uma elevação antes da formação do blastoderma celular, e outro pico no 12º dia após a postura (Figura 8). A diferença observada entre os níveis de transcrição relativa de p85 em ovos de 1 dia e os ovários de fêmeas teleóginas sugere que possa existir a transferência de RNAm para os ovócitos (Figura 6 do ANEXO 1).

Foi possível identificar que a GSK3b é regulada diferentemente ao longo da embriogênese de carrapato. Além da regulação por fosforilação do resíduo Tirosina²¹⁶, a transcrição do RNAm também é modificada (Figuras 2 e 4 do ANEXO 2, respectivamente). A correlação entre a atividade de GSK3b com baixos níveis de glicogênio na embriogênese sugere a participação desta enzima no metabolismo de carboidratos (Figura 5 do ANEXO 2). Apesar das evidências de acúmulo de glicogênio à presença de insulina nas células embrionárias BME26, é possível que esses efeitos possam contar com a participação da GSK3b. Do mesmo modo, a participação de PI3K e Akt na regulação de GSK3b na embriogênese não pode ser descartada. Novos experimentos serão necessários para avaliar, sobretudo, o grau de fosforilação de Akt em resíduos específicos.

A caracterização e clonagem da GSK3b (ANEXO 2) contribuem ainda mais nos estudos não apenas no âmbito do metabolismo energético, como também a sua possível participação em processos morfológicos já descritos em modelos invertebrados. A GSK3 participa da via de sinalização por Wnt, que está envolvida na regulação da transcrição de genes relacionados com diversos aspectos da embriogênese e desenvolvimento, incluindo proliferação, diferenciação e migração celular, polaridade, sobrevivência e comunicação célula-célula (Emami e Corey, 2007).

A participação da GSK3b de carrapatos numa via tão conservada em diferentes organismos como a Wnt não está descartada, mas ainda necessita ser demonstrada experimentalmente.

O desenvolvimento de substâncias capazes de inibir a GSK3 tem se mostrado uma estratégia promissora para o desenvolvimento de drogas para o combate a patologias humanas como o diabetes tipo 2 e desordens neurológicas como distúrbios bipolares e o sono (Medina e Castro, 2008). Uma das drogas (SB216763), desenvolvidas inicialmente com esse propósito, e disponível comercialmente, mostrou-se capaz de inibir em mais de 70% a atividade de GSK3 em homogenatos de ovos de *R. microplus* (Figura 6 do ANEXO 2). A utilização de inibidores específicos, na determinação da atividade de GSK3b, ou mesmo em tratamentos com as células podem auxiliar na melhor caracterização desta enzima.

O conjunto dos dados obtidos para PI3K, Akt e GSK3b no carrapato *R. microplus* e nas células BME26 permitem o estudo de um importante eixo da via de sinalização por insulina, já que a atividade de PI3K promove a ativação de Akt, regulando negativamente a atividade de GSK3b. A participação da via de sinalização por PI3K/Akt na sobrevivência de células BME26 evidencia uma função adicional para a via neste sistema, e permite sugerir que o mesmo aconteça nos embriões e durante o desenvolvimento de ninfas, larvas e adultos. Essa abordagem pode vir a colaborar também para a caracterização de estruturas ou eventos celulares dessa linhagem. Contudo, maiores estudos com as células serão necessários, dada a natureza complexa da regulação dos processos de apoptose.

A morte celular programada possui um papel fundamental nos organismos multicelulares, seja na formação ou eliminação de estruturas, no controle do número de células no tecido e na eliminação de células anormais ou danificadas (Baehrecke, 2005). Para sobreviverem, as células dos organismos multicelulares dependem da constante repressão desse programa de “suicídio”, a partir de sinais oriundos de outras células. O processo de morte celular programada envolve a reprogramação genética da célula, resultando numa cascata de alterações bioquímicas, dependente de energia. Tais alterações acarretarão mudanças morfológicas dentro da célula, que levarão à morte e eliminação desta (Kiess e Gallaher, 1998). O processo de morte celular pode ser reversível até alcançar um determinado ponto “sem retorno”. Nesse

momento a célula está comprometida a morrer, e pode ser representado por alguns critérios morfológicos ou moleculares: I- perda da integridade da membrana, evidenciada pela incorporação de corantes vitais, *in vitro*; II- a célula, incluindo o núcleo, sofre completa fragmentação em corpúsculos discretos (corpos apoptóticos); e/ou III- os fragmentos gerados pela célula morta foram englobados por fagócito adjacente *in vivo*. Portanto as células já comprometidas diferem das células que ainda estão morrendo, já que esse processo pode ser disparado por vias bioquímicas distintas (Kroemer *et al.*, 2009).

Curiosamente, no carrapato *Haemaphysalis longicornis*, cujo ciclo de vida é pontuado pela alternância de 3 únicos repastos sanguíneos (em hospedeiros diferentes) e longos períodos “em jejum”, sugere-se a participação de genes relacionados à autofagia nos indivíduos não alimentados (Umemiya, *et al.*, 2008). Já no carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, a degeneração da glândula salivar exhibe características clássicas de apoptose (fragmentação do núcleo, perda da forma celular, e corpos apoptóticos) combinados com autofagia (muitos vacúolos no citoplasma), caracterizando uma apoptose atípica, envolvendo a participação de fosfatases ácidas na remoção dos remanescentes citoplasmáticos e da fragmentação celular (Furquim *et al.*, 2008a; Furquim *et al.*, 2008b).

Em fêmeas adultas de *R. microplus*, a apoptose foi observada em glândulas salivares e no ovário, no período pré-postura (que corresponde também à última atividade desses indivíduos, antes da morte) (Freitas *et al.*, 2007). A observação de morte celular por apoptose durante a embriogênese não pode ser descartada, visto que durante esse período do desenvolvimento, em diversos organismos, há a necessidade de excluir células para a correta formação do organismo (Greenwood e Gautier, 2005).

A melhor caracterização do processo de apoptose necessita ainda do detalhamento de modificações bioquímicas nas células BME26 frente aos tratamentos realizados. Os dados obtidos sobre indução de morte por apoptose por exposição à radiação U.V. sugerem fortemente que esse é um processo que pode ser desencadeado nas células BME26 (Figura 12C-F). Isso pode ser corroborado com os dados quantitativos da indução de morte por apoptose (Figura 13), em que foi observada a maior frequência de células apoptóticas quanto maior a exposição ao U.V... Para exercer seus efeitos sobre a célula, a radiação U.V. precisa ser absorvida

por um cromóforo, capaz de transferir a energia para um sinal bioquímico. O DNA da célula funciona como um exclusivo cromóforo para a radiação UVB (290-320 nm), o que provoca a dimerização de bases pirimidínicas, e a formação de outros foto-produtos. A apoptose induzida por U.V. é mediada em boa parte por esses danos ao DNA da célula. Adicionalmente à exposição ao U.V., podem acontecer também: a liberação de ligantes reconhecidos pelos receptores de morte na superfície da célula; a trimerização desses receptores, o que ativa a transdução intracelular do sinal apoptótico pelos domínios de morte; e a liberação de citocromo C da mitocôndria (Kulms e Schwarz, 2002). Apesar dos diferentes estímulos para induzir a morte celular por apoptose nas células BME26, as modificações morfológicas mais similares às descritas foram obtidas após a exposição ao U.V.. A observação em microscopia de fluorescência, utilizando como corantes Laranja de Acridina e Brometo de Etídio permitiu notar que a intensidade dessas alterações aumenta quanto maior o tempo de exposição ao U.V. (Figuras 12 e 13). Ainda foi possível determinar que a exposição prolongada ao U.V. (a partir de 20 minutos) induz a um maior número de morte por necrose, evidenciada pela coloração vermelha de grandes núcleos. A partir destes dados iniciais, pretende-se estabelecer um protocolo para a obtenção de um padrão positivo de morte por apoptose em células BME26, e estabelecer metodologias que possam determinar as modificações bioquímicas decorrentes do processo de morte por apoptose. Para isso, será importante determinar, a fragmentação nucleossomal do DNA, a exposição de resíduos de fosfatidilserina e a atividade de caspases. Não está descartado o estudo da morte celular por apoptose em diferentes estágios de vida do carrapato, de modo a compreender a participação desse processo na fisiologia desse organismo.

Comparativamente, a morfologia das células BME26 ficou levemente alterada, quando mantidas na ausência de SFB (por até 48 horas) (Figura 10B), ou de glicose (Figura 10C): grande redução de vesículas citoplasmáticas, e redução do tamanho e arredondamento da célula. Ainda assim, a coloração por Giemsa, por si só, não permite distinguir dentre as células alteradas quais são as apoptóticas. O monitoramento desses tratamentos com um maior número de pontos ao longo de um período maior de incubação talvez permitisse evidenciar modificações morfológicas mais expressivas, como a fragmentação do núcleo.

O mecanismo de apoptose induzida por radiação compreende 3 vias reguladoras

importantes da morte celular: a mitocondrial (Bcl-2/Apaf-1), os receptores de morte e as proteínas inibidoras de apoptose (Iap's) (Zhou e Steller, 2003). Entretanto, uma ou mais vias podem ser ativas, dependendo do tipo celular. Ainda assim, a literatura carece de maiores informações sobre os genes e proteínas diretamente responsáveis pela morte celular induzida por radiação (Zhou *et al.*, 2008).

O tratamento das células BME26 com espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio, H₂O₂) parece ter exercido poucas alterações morfológicas, quando coradas por Giemsa (Figura 11A). Entretanto, a observação destas mesmas células em microscopia de fluorescência na presença de EtBr evidenciou alterações nucleares compatíveis com os sinais de morte por apoptose, ainda que em um pequeno número de células (Figura 11E). Esses dados com as células divergem dos obtidos com órgãos (glândula salivar, ovário e singânlion) de *R. microplus*, em que 1 mM de H₂O₂ foi estabelecido como um controle positivo (100% de apoptose) no ensaio para determinação da frequência de danos ao DNA nuclear (ensaio cometa) (Freitas *et al.*, 2006). Uma forma de investigar essa provável “resistência” das células BME26 à presença de elevadas concentrações de H₂O₂, seria realizar o mesmo tratamento em outra(s) linhagem(ns) celular(es) reconhecidamente sensível(eis) à ROS. Tanto durante a embriogênese como em larvas senescentes, o carrapato *R. microplus* está sujeito a altos níveis de estresse oxidativo. Dentre os mecanismos de defesa antioxidante em ovos já foi demonstrada a participação de enzimas do tipo glutathione S-transferases e catalases (Freitas *et al.*, 2007). Apesar de não ter sido determinado nas células BME26, esse mesmo mecanismo poderia explicar em parte a “resistência” dessas aos tratamentos realizados com H₂O₂.

O caráter anti-apoptótico da via de sinalização por PI3K/Akt é amplamente descrito na literatura (Duronio, 2008), especialmente em alguns tipos de tumores (Shen *et al.*, 2007). Mesmo em *D. melanogaster* a via da insulina conserva esse caráter anti-apoptótico (Scanga *et al.*, 2000), onde antagoniza o processo de apoptose por mecanismos que incluem a fosforilação e inibição de proteínas pró-apoptóticas como BAD e caspase-9 (Cho *et al.*, 2001). A via de sinalização por insulina encontra-se desregulada em um ou mais pontos em alguns tipos de câncer. Pela promoção da sobrevivência celular, diversos componentes da via têm sido estudados como alvos para a ação de drogas (Lawlor e Alessi, 2001; Bader *et al.*, 2005). Por estarem

relacionados a diversos processos patológicos, tanto PI3K como Akt tem sido amplamente estudadas como alvos terapêuticos (Ward e Finan, 2003; Hanada *et al.*, 2004).

Apesar dos efeitos sobre o metabolismo de glicogênio dos inibidores de PI3K, Wortmanina e LY294002, (Figura 3 do Anexo 1) ainda é desconhecido o efeito da inibição da via de sinalização por insulina na sobrevivência das células BME26. A avaliação das alterações morfológicas após a exposição prolongada a diferentes concentrações dos inibidores sugere que nas células BME26, a maior quantidade de inibidor aumenta a frequência de células alteradas: modificações do formato, tamanho e quantidade de vesículas no citoplasma, e projeções do citoplasma similares às descritas como *blebbing* (Figuras 14 e 15, respectivamente). Curiosamente, nas lamínulas tratadas com o inibidor de Akt (10-DEBC) apresentaram uma expressiva redução na quantidade de células que permaneceram aderidas após a coloração por Giemsa (Figura 16). Isso sugere que a atividade de Akt seja essencial para a sobrevivência das células BME26. São necessários ainda um maior detalhamento das concentrações de inibidores capazes de induzir a apoptose nas célula BME26, não apenas pela análise morfológica, mas também baseados em dados quantitativos. Novos estudos com as células BME26 contam com esta possibilidade de administração de substâncias/drogas, e acompanhamento dos seus efeitos por microscopia (até mesmo *in vivo*), de uma forma muito mais direta, do que se o mesmo fosse realizado em ovos/embriões. A interferência farmacológica em outras vias de sinalização, ou mesmo em processos celulares de interesse amplia ainda mais as possibilidades de estudos com as células BME26.

CONCLUSÕES

- ✓ A adição de insulina ao meio de cultivo das células BME26 foi capaz de induzir o acúmulo de glicogênio, e aumentar os níveis de transcritos da subunidade reguladora p85 da PI3K e da proteína quinase Akt. Todos esses efeitos foram revertidos nos ensaios realizados na presença de inibidores seletivos de PI3K (LY294002 e Wortmanina). Desse modo, a participação da insulina no metabolismo de carboidratos, e na regulação da expressão de genes parece estar conservado nas células da linhagem BME26 do carrapato *R. microplus*. E permite supor a existência de uma molécula endógena capaz de ativar a via de sinalização por insulina.

- ✓ A existência de um maquinário enzimático responsivo à insulina foi evidenciada tanto nas células como em ovos e órgãos de *R. microplus*. Apesar de a análise ter se baseado na transcrição dos genes de Akt e da p85, uma análise com anticorpos comerciais específicos para essas proteínas, sobretudo considerando o grau de fosforilação destas, podem contribuir nos estudos sobre a via de sinalização por insulina. Apesar de a sequência de p85 ter sido identificada no banco de dados de sequências de cDNA de carrapato, a clonagem do fragmento de Akt (durante o estágio na UFRGS) forneceu uma sequência que ainda não foi descrita para o *R. microplus*. Especificamente em ovos de *R. microplus*, a atividade de GSK3b apresentou uma correlação inversa com os níveis de glicogênio durante a embriogênese. Isso parece reforçar o papel conservado dessa enzima no metabolismo de carboidratos.

- ✓ As alterações morfológicas compatíveis com apoptose nas células BME26 expostas por longo período à inibidores de PI3K e de Akt (10-DEBC) sugerem a participação da sinalização por essas enzimas em processos essenciais para a sobrevivência celular. Maiores estudos ainda são necessários de modo a estabelecer um padrão quantitativo de morte celular por apoptose nas células. Os dados iniciais com os protocolos propostos sugerem que a utilização de radiação U.V. pode ser o mais promissor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu,L.A., Fabres,A., Esteves,E., Masuda,A., da Silva,V.I., Jr., Daffre,S., and Logullo,C. (2009): Exogenous insulin stimulates glycogen accumulation in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo cell line BME26 via PI3K/AKT pathway. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.*,
- Alessi,D.R., Andjelkovic,M., Caudwell,B., Cron,P., Morrice,N., Cohen,P., and Hemmings,B.A. (1996): Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.*, 15:6541-6551.
- Bader,A.G., Kang,S., Zhao,L., and Vogt,P.K. (2005): Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat.Rev.Cancer*, 5:921-929.
- Baehrecke,E.H. (2005): Autophagy: dual roles in life and death? *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 6:505-510.
- Barber,M.A. and Welch,H.C. (2006): PI3K and RAC signalling in leukocyte and cancer cell migration. *Bull.Cancer*, 93:E44-E52
- Bastos, C.V. (2005) *Avaliação de condições de manutenção e criopreservação do cultivo in vitro de células IDE8*. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Belo Horizontes – MG, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 40p
- Bathgate,R.A., Ivell,R., Sanborn,B.M., Sherwood,O.D., and Summers,R.J. (2006): International Union of Pharmacology LVII: recommendations for the nomenclature of receptors for relaxin family peptides. *Pharmacol.Rev.*, 58:7-31.
- Baudler,S., Krone,W., and Bruning,J.C. (2003): Genetic manipulation of the insulin signalling cascade in mice--potential insight into the pathomechanism of type 2 diabetes. *Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab*, 17:431-443.
- Bell-Sakyi,L., Zwegarth,E., Blouin,E.F., Gould,E.A., and Jongejan,F. (2007): Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends Parasitol.*, 23:450-457.

- Bratton,D.L., Fadok,V.A., Richter,D.A., Kailey,J.M., Guthrie,L.A., and Henson,P.M. (1997): Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J.Biol.Chem.*, 272:26159-26165.
- Brogiolo,W., Stocker,H., Ikeya,T., Rintelen,F., Fernandez,R., and Hafen,E. (2001): An evolutionarily conserved function of the Drosophila insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr.Biol.*, 11:213-221.
- Brown,M.R., Clark,K.D., Gulia,M., Zhao,Z., Garczynski,S.F., Crim,J.W., Suderman,R.J., and Strand,M.R. (2008): An insulin-like peptide regulates egg maturation and metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 105:5716-5721.
- Brunet,A., Park,J., Tran,H., Hu,L.S., Hemmings,B.A., and Greenberg,M.E. (2001): Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a). *Mol.Cell Biol.*, 21:952-965.
- Bullesbach,E.E. and Schwabe,C. (1987): Relaxin structure. Quasi allosteric effect of the NH2-terminal A-chain helix. *J.Biol.Chem.*, 262:12496-12501.
- Burks,D.J., Font de,M.J., Schubert,M., Withers,D.J., Myers,M.G., Towery,H.H., Altamuro,S.L., Flint,C.L., and White,M.F. (2000): IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature*, 407:377-382.
- Campos, E., Moraes, J., Façanha, A. R., Moreira, E., Valle, D., Abreu, L., Manso, P. P. A., Nascimento, A., Pelajo-Machado, M., Lenzi, H., Masuda, A., Vaz Jr., I. S., Logullo, C. (2006) Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. *Veterinary Parasitology* 138:349-357.
- Cantley,L.C. (2002): The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296:1655-1657.
- Cho,H., Thorvaldsen,J.L., Chu,Q., Feng,F., and Birnbaum,M.J. (2001a): Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose

homeostasis in mice. *J.Biol.Chem.*, 276:38349-38352.

Cho,H., Mu,J., Kim,J.K., Thorvaldsen,J.L., Chu,Q., Crenshaw,E.B., III, Kaestner,K.H., Bartolomei,M.S., Shulman,G.I., and Birnbaum,M.J. (2001b): Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science*, 292:1728-1731.

Cohen,P. and Frame,S. (2001): The renaissance of GSK3. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 2:769-776.

Cox,S.S., van der,G.M., Tarr,S.J., Crompton,M.R., and Tovar,J. (2006): Evidence from bioinformatics, expression and inhibition studies of phosphoinositide-3 kinase signalling in *Giardia intestinalis*. *BMC.Microbiol.*, 6:45

Cross,D.A., Alessi,D.R., Cohen,P., Andjelkovich,M., and Hemmings,B.A. (1995): Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378:785-789.

Davis, H.H., Dotson, E.M. e Oliver,Jr., J.H., (1994): Localization of insulin-like immunoreactivity in the synganglion of nymphal and adult *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarology*, 18: 111-122.

de Oliveira,P.R., Camargo Mathias,M.I., and Bechara,G.H. (2006): *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae): morphological description of the ovary and of vitellogenesis. *Exp.Parasitol.*, 113:179-185.

Duronio,V. (2008): The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem.J.*, 415:333-344.

Easton,R.M., Cho,H., Roovers,K., Shineman,D.W., Mizrahi,M., Forman,M.S., Lee,V.M., Szabolcs,M., de,J.R., Oltersdorf,T., Ludwig,T., Efstratiadis,A., and Birnbaum,M.J. (2005): Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol.Cell Biol.*, 25:1869-1878.

Elmore,S. (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol.Pathol.*, 35:495-516.

- Emami,K.H. and Corey,E. (2007): When prostate cancer meets bone: control by wnts. *Cancer Lett.*, 253:170-179.
- Esteves,E., Lara,F.A., Lorenzini,D.M., Costa,G.H., Fukuzawa,A.H., Pressinotti,L.N., Silva,J.R., Ferro,J.A., Kurtti,T.J., Munderloh,U.G., and Daffre,S. (2008): Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochem.Mol.Biol.*, 38:568-580.
- Fadok,V.A., de,C.A., Daleke,D.L., Henson,P.M., and Bratton,D.L. (2001): Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J.Biol.Chem.*, 276:1071-1077.
- Floyd,P.D., Li,L., Rubakhin,S.S., Sweedler,J.V., Horn,C.C., Kupfermann,I., Alexeeva,V.Y., Ellis,T.A., Dembrow,N.C., Weiss,K.R., and Vilim,F.S. (1999): Insulin prohormone processing, distribution, and relation to metabolism in *Aplysia californica*. *J.Neurosci.*, 19:7732-7741.
- Frame,S. and Cohen,P. (2001): GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem.J.*, 359:1-16.
- Freitas,D.R., Rosa,R.M., Moura,D.J., Seitz,A.L., Colodel,E.M., Driemeier,D., da Silva,V.I., Jr., and Masuda,A. (2007): Cell death during preoviposition period in *Boophilus microplus* tick. *Vet.Parasitol.*, 144:321-327.
- Furquim,K.C., Bechara,G.H., and Camargo Mathias,M.I. (2008a): Degeneration of salivary glands of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). *Vet.Parasitol.*, 154:325-335.
- Furquim,K.C., Bechara,G.H., and Camargo Mathias,M.I. (2008b): Markers of cell death in salivary glands of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). *Parasitol.Int.*, 57:396-404.
- Gallardo,N., Carrillo,O., Molto,E., Deas,M., Gonzalez-Suarez,R., Carrascosa,J.M., Ros,M., and Andres,A. (2003): Isolation and biological characterization of a 6-kDa

- protein from hepatopancreas of lobster *Panulirus argus* with insulin-like effects. *Gen.Comp Endocrinol.*, 131:284-290.
- Garofalo,R.S. (2002): Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila*. *Trends Endocrinol.Metab*, 13:156-162.
- Geesaman,B.J. (2006): Genetics of aging: implications for drug discovery and development. *Am.J.Clin.Nutr.*, 83:466S-469S.
- Greene,M.W. and Chen,T.T. (1999): Characterization of teleost insulin receptor family members. *Gen.Comp Endocrinol.*, 115:254-269.
- Gonzalés, J. C. (1975). O carrapato do boi: vida, resistência e controle. São Paulo: Mestre Jou. 101p.
- Greenwood,J. and Gautier,J. (2005): From oogenesis through gastrulation: developmental regulation of apoptosis. *Semin.Cell Dev.Biol.*, 16:215-224.
- Gutierrez,A., Nieto,J., Pozo,F., Stern,S., and Schoofs,L. (2007): Effect of insulin/IGF-I like peptides on glucose metabolism in the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Gen.Comp Endocrinol.*, 153:170-175.
- Hanada,M., Feng,J., and Hemmings,B.A. (2004): Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim.Biophys.Acta*, 1697:3-16.
- Hawkins,P.T., Anderson,K.E., Davidson,K., and Stephens,L.R. (2006): Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem.Soc.Trans.*, 34:647-662.
- Heeson, K.J., Harbeck, M., Kahn, C.R., Denton, R.M. (1997) Insulin action on metabolism. *Diabetology*, 40: B3-B9.
- Hengartner,M.O. (2000): The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407:770-776.
- Hetru,C., Li,K.W., Bulet,P., Lagueux,M., and Hoffmann,J.A. (1991): Isolation and structural characterization of an insulin-related molecule, a predominant neuropeptide from *Locusta migratoria*. *Eur.J.Biochem.*, 201:495-499.

- Hsu,S.Y. and Hsueh,A.J. (2000): Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. *Physiol Rev.*, 80:593-614.
- Jordan, L.B. e Harrison, D.J. (2003) Apoptosis and cell senescence. *In: Crocker, J. and Murray, P. (eds.) Molecular biology in cellular pathology.* West Sussex: John Wiley and Sons Ltd, 2003, p. 153-179.
- Kandel,E.S. and Hay,N. (1999): The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp.Cell Res.*, 253:210-229.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26:239-257
- Kido,Y., Nakae,J., and Accili,D. (2001): Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 86:972-979.
- Kiess,W. and Gallaher,B. (1998): Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur.J.Endocrinol.*, 138:482-491.
- Kimura,K.D., Tissenbaum,H.A., Liu,Y., and Ruvkun,G. (1997): daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 277:942-946.
- Krieger,M.J., Jahan,N., Riehle,M.A., Cao,C., and Brown,M.R. (2004): Molecular characterization of insulin-like peptide genes and their expression in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol.Biol.*, 13:305-315.
- Kroemer,G., Galluzzi,L., Vandenabeele,P., Abrams,J., Alnemri,E.S., Baehrecke,E.H., Blagosklonny,M.V., El-Deiry,W.S., Golstein,P., Green,D.R., Hengartner,M., Knight,R.A., Kumar,S., Lipton,S.A., Malorni,W., Nunez,G., Peter,M.E., Tschopp,J., Yuan,J., Piacentini,M., Zhivotovsky,B., and Melino,G. (2009): Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death.Differ.*, 16:3-11.
- Kucharski,L.C., Schein,V., Capp,E., and da Silva,R.S. (2002): In vitro insulin stimulatory effect on glucose uptake and glycogen synthesis in the gills of the estuarine crab

Chasmagnathus granulata. *Gen.Comp Endocrinol.*, 125:256-263.

Kulms,D. and Schwarz,T. (2002): Molecular mechanisms involved in UV-induced apoptotic cell death. *Skin Pharmacol.Appl.Skin Physiol*, 15:342-347.

Kurtti,T.J., Mattila,J.T., Herron,M.J., Felsheim,R.F., Baldrige,G.D., Burkhardt,N.Y., Blazar,B.R., Hackett,P.B., Meyer,J.M., and Munderloh,U.G. (2008): Transgene expression and silencing in a tick cell line: A model system for functional tick genomics. *Insect Biochem.Mol.Biol.*, 38:963-968.

L'Amoreaux,W.J., Junaid,L., and Trevidi,S. (2003): Morphological evidence that salivary gland degeneration in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say), involves programmed cell death. *Tissue Cell* , 35:95-99.

Lardans,V., Coppin,J.F., Vicogne,J., Aroca,E., Delcroix,M., and Dissous,C. (2001): Characterization of an insulin receptor-related receptor in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. *Biochim.Biophys.Acta*, 1510:321-329.

Lawlor,M.A. and Alessi,D.R. (2001): PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J.Cell Sci.* , 114:2903-2910.

Le Roith, D. and Zick,Y. (2001): Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care*, 24:588-597.

Leevers,S.J. (2001): Growth control: invertebrate insulin surprises! *Curr.Biol.*, 11:R209-R212

Lizcano,J.M. and Alessi,D.R. (2002): The insulin signalling pathway. *Curr.Biol.*, 12:R236-R238

Logullo, C.; Witola, W.H.. ; Andrade, C ; Abreu, L. ; Gomes, J. ; Vaz Jr., I.; Imamura, S. ; Konnai, S. ; Ohashi, K. ; Onuma, M. (2009). Expression and activity of glycogen synthase kinase during vitellogenesis and embryogenesis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol*, 161: 261-269

Manning,B.D. and Cantley,L.C. (2007): AKT/PKB signaling: navigating downstream.

Cell, 129:1261-1274.

- Mattila, J.T., Baldrige, G.D., Felsheim, R.E., Burkhardt, N.Y., Munderloh, U.G. and Kurtti, T.J. (2006). RNAi-mediated silencing of a DsRed2- expressing *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) cell line. *Society for In Vitro Biology Journal* 42, 32-A.
- McDonald, J.R. and Lawrence, J.C., Jr. (1989): Identification of an adipocyte protein that binds to calmodulin in the absence of Ca²⁺ and is phosphorylated in response to insulin and tumor-promoting phorbol esters. *J.Biol.Chem.*, 264:9611-9618.
- Medina, M. and Castro, A. (2008): Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors reach the clinic. *Curr.Opin.Drug Discov.Devel.*, 11:533-543.
- Moraes, J., Galina, A., Alvarenga, P. H., Rezende, G. L., Masuda, A., Vaz Jr, I. S., Logullo, C. (2007) Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *B. microplus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 146:528-533.
- Mosqueda, J., Cossio-Bayugar, R., Rodriguez, E., Falcon, A., Ramos, A., Figueroa, J.V., and Alvarez, A. (2008): Primary midgut, salivary gland, and ovary cultures from *Boophilus microplus*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1149:49-52.
- Munderloh, U.G. and Kurtti, T.J. (1989): Formulation of medium for tick cell culture. *Exp.Appl.Acarol.*, 7:219-229.
- Murrel, A.; Barker, S. C. (2003) Synonymy of *Boophilus Crutice*, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, 56: 169-172.
- Nagasawa, H., Kataoka, H., Isogai, A., Tamura, S., Suzuki, A., Ishizaki, H., Mizoguchi, A., Fujiwara, Y., and Suzuki, A. (1984): Amino-Terminal Amino Acid Sequence of the Silkworm Prothoracicotropic Hormone: Homology with Insulin. *Science*, 226:1344-1345.
- O'Brien, R.M., Streeper, R.S., Ayala, J.E., Stadelmaier, B.T., and Hornbuckle, L.A. (2001): Insulin-regulated gene expression. *Biochem.Soc.Trans.*, 29:552-558.
- Paez, J. and Sellers, W.R. (2003): PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of

oncogenic signaling. *Cancer Treat.Res.*, 115:145-167.

- Pierce,S.B., Costa,M., Wisotzkey,R., Devadhar,S., Homburger,S.A., Buchman,A.R., Ferguson,K.C., Heller,J., Platt,D.M., Pasquinelli,A.A., Liu,L.X., Doberstein,S.K., and Ruvkun,G. (2001): Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and ins-1, a member of the unusually large and diverse C. elegans insulin gene family. *Genes Dev.*, 15:672-686.
- Porte,D., Jr., Baskin,D.G., and Schwartz,M.W. (2005): Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from C. elegans to humans. *Diabetes*, 54:1264-1276.
- Riehle,M.A., Garczynski,S.F., Crim,J.W., Hill,C.A., and Brown,M.R. (2002): Neuropeptides and peptide hormones in *Anopheles gambiae*. *Science*, 298:172-175.
- Riehle,M.A. and Brown,M.R. (2003): Molecular analysis of the serine/threonine kinase Akt and its expression in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol.Biol.*, 12:225-232.
- Riehle,M.A., Fan,Y., Cao,C., and Brown,M.R. (2006): Molecular characterization of insulin-like peptides in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: expression, cellular localization, and phylogeny. *Peptides*, 27:2547-2560.
- Roberts, J.A. (1968) Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II. Stages of the cycle of the parasite against which resistance is manifest. *Journal of Parasitology*, v. 54: 667-673.
- Sambrook, J. e Russell, D. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. 3nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sappington, T.W. e Raikhel, A.S. (1998) Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28: 277-300.
- Scanga S.E., Ruel L., Binari R.C., Snow B., Stambolic V., Bouchard D., Peters M., Calvieri B., Mak T.W., Woodgett J.R., Manoukian A.S. (2000); The conserved

- PI3K/PTEN/Akt signaling pathway regulates both cell size and survival in *Drosophila*; *Oncogene*; 19 (35); 3971-3977.
- Shabanpoor,F., Separovic,F., and Wade,J.D. (2009): The human insulin superfamily of polypeptide hormones. *Vitam.Horm.*, 80:1-31.
- Shen,J., Jiang,J., Wei,Y., Zhou,L., Liu,D., Zhou,J., and Gu,J. (2007): Two specific inhibitors of the phosphatidylinositol 3-kinase LY294002 and wortmannin up-regulate beta1,4-galactosyltransferase I and thus sensitize SMMC-7721 human hepatocarcinoma cells to cycloheximide-induced apoptosis. *Mol.Cell Biochem.*, 304:361-367.
- Song, J. L., Wong, J.L., Wessel, G.M. (2006) Oogenesis: Single cell development and differentiation. *Developmental Biology*, 300: 385-405.
- Tanaka,M., Liao,M., Zhou,J., Nishikawa,Y., Xuan,X., and Fujisaki,K. (2007): Molecular cloning of two caspase-like genes from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *J.Vet.Med.Sci.*, 69:85-90.
- Thompson, M.B. e Stewart, J.R. (1997) Embryonic metabolism and growth in lizards of the genus *Eumeces*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118A: 647-654.
- Tschopp,O., Yang,Z.Z., Brodbeck,D., Dummler,B.A., Hemmings-Mieszczak,M., Watanabe,T., Michaelis,T., Frahm,J., and Hemmings,B.A. (2005): Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development*, 132:2943-2954.
- Umemiya,R., Matsuo,T., Hatta,T., Sakakibara,S., Boldbaatar,D., and Fujisaki,K. (2008): Autophagy-related genes from a tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Autophagy.*, 4:79-81.
- van der Westhuizen,E.T., Halls,M.L., Samuel,C.S., Bathgate,R.A., Unemori,E.N., Sutton,S.W., and Summers,R.J. (2008): Relaxin family peptide receptors--from orphans to therapeutic targets. *Drug Discov.Today*, 13:640-651.
- Venancio,T.M., Oliveira,A.E., Silva,L.B., Machado,O.L., Fernandes,K.V., and Xavier-

- Filho, J. (2003): A protein with amino acid sequence homology to bovine insulin is present in the legume *Vigna unguiculata* (cowpea). *Braz.J.Med.Biol.Res.*, 36:1167-1173.
- Waladde, S. M. e Rice, M. J. (1982) The sensory basis of tick feeding behaviour. In *Physiology of Ticks* (ed. F. D. Obenchain and R. Galun), pp. 71–118. Oxford: Pergamon.
- Wang, Q.M., Fiol, C.J., Paoli-Roach, A.A., and Roach, P.J. (1994): Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J.Biol.Chem.*, 269:14566-14574.
- Ward, S.G. and Finan, P. (2003): Isoform-specific phosphoinositide 3-kinase inhibitors as therapeutic agents. *Curr.Opin.Pharmacol.*, 3:426-434.
- Willadsen, P. and Jongejans, F. (1999): Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitol.Today*, 15:258-262.
- Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessel, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E. (2000) *Principios de biologia do desenvolvimento*. Trad. Henrique Bunselmeyer Ferreira. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.
- Wu, Q. and Brown, M.R. (2006): Signaling and function of insulin-like peptides in insects. *Annu.Rev.Entomol.*, 51:1-24.
- Zhou, H., Ivanov, V.N., Lien, Y.C., Davidson, M., and Hei, T.K. (2008): Mitochondrial function and nuclear factor-kappaB-mediated signaling in radiation-induced bystander effects. *Cancer Res.*, 68:2233-2240.
- Zhou, L. and Steller, H. (2003): Distinct pathways mediate UV-induced apoptosis in *Drosophila* embryos. *Dev.Cell*, 4:599-605.
- Zhu, X.X. and Oliver, J.H., Jr. (1991): Immunocytochemical localization of an insulin-like substance in the synganglion of the tick *Ornithodoros parkeri* (Acari: Argasidae). *Exp.Appl.Acarol.*, 13:153-159.

Zimmermann,K.C., Bonzon,C., and Green,D.R. (2001): The machinery of programmed cell death. *Pharmacol.Ther.*, 92:57-70.

ANEXOS

ANEXO 1:

Artigo publicado no periódico Comparative Biochemistry and Physiology, Part B

Exogenous insulin stimulates glycogen accumulation in *Rhipicephalus (Boophilus)*
microplus embryo cell line BME26 via PI3K/AKT pathway

Leonardo Araujo de Abreu, Arianne Fabres, Eliane Esteves, Aoi Masuda, Itabajara da
Silva Vaz Jr., Sirlei Daffre, Carlos Logullo

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 153 (2009) 185–190

ANEXO 2

Artigo publicado no periodico Veterinary Parasitology

Expression and activity of glycogen synthase kinase during vitellogenesis and embryogenesis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Carlos Logullo, William H. Witola, Caroline Andrade, **Leonardo Abreu**, Josiana Gomes, Itabajara da Silva Vaz Jr., Saiki Imamura, Satoru Konnai, Kazuhiko Ohashi, Misao Onuma

Veterinary Parasitology 161 (2009) 261-269

ANEXO 3. Preparação do Meio L-15 incompleto (Munderloh e Kurtti, 1989):

1) Preparação de soluções minerais e vitamínicas

Ingredientes	Peso (mg/100ml)
SOLUÇÃO A	
CoCl ₂ .6H ₂ O	20
CuSO ₄ .5H ₂ O	20
MnSO ₄ .H ₂ O	160
ZnSO ₄ .7H ₂ O	200
SOLUÇÃO B	
NaMoO ₄ .2H ₂ O	20
SOLUÇÃO C	
Na ₂ SeO ₃	20
SOLUÇÃO D	
Glutathione (reduzida)	1000
Ácido ascórbico	1000
FeSO ₄ .7H ₂ O	50
Solução A	1 ml
Solução B	1 ml
Solução C	1 ml
Vitaminas	
Ácido p-aminobenzóico	100
Cobalamina Vitamina B12	50
d-biotina	10

Obs: Os ingredientes das soluções devem ser dissolvidos em água estéril na ordem

em que foram listadas e o volume de cada solução deve ser completado para 100 ml.

O estoque da solução D e de vitaminas deve ser feito através de alíquotas de 1 ml a -20°C . Já as soluções A, B e C podem ser estocadas em frascos maiores a -20°C .

2) Dissolver conteúdo L-15 (Sigma®) (para 1 litro de meio) em 900 ml de água estéril e em seguida adicionar:

Ácido L-Aspártico	299mg
Ácido L-Glutamínico	500mg
L-Prolina	300mg
Ácido α -cetoglutâmico	299mg
L-Glutamina	292mg
d-Glicose	14410mg
Solução D	1 ml
Vitaminas	1 ml

3) Manter o recipiente envolto em papel alumínio. Dissolver os ingredientes com agitação leve, por 90 minutos. Se necessário, ajustar o pH para 6,2. Completar volume para 1 litro e filtrar em membrana de $0.22\mu\text{m}$. Estocar por até 2 meses a 4°C (ao abrigo da luz) ou por maior tempo a -20°C .

ANEXO 4: Preparação do Meio L-15B completo (modificado de Munderloh e Kurtti, 1989):

Para preparar 50 ml de meio L-15 completo:

Meio L-15 incompleto	30 mL
Caldo de Triptose Fosfatada	5 mL
Soro Fetal Bovino inativado	5 mL
Penicilina (10.000 U/mL)/Estreptomicina (1000µg/mL)	0,5 mL
Água estéril	9,5 mL

Para preparar o meio sem soro, este foi substituído por água estéril.

ANEXO 5: Sequência de aminoácidos (535 resíduos) da subunidade reguladora p85 de PI3K deduzida com base no cDNA depositado no DFCI B. microplus Gene Index (código TC18043)

1 LKKYLRELASPIIPVHFYERFLEAAKAGDEAAVRLVSQLPAVHFRALRALMAHLCRICR 60
61 LAHSRGRRCERPLRLAHCLAFVVL RPPWEQVVSMAHNAQWHGRVLEILLRGRDWGEPLPAF 120
121 QNGGTPALPPRRTSRSSQOPP IDRSLLEAEWYWGDISREECSEKDKDAADGTFLVRDALD 180
181 RSGDYTLTLRVGGSNKLIKIYQRAGKYGFSEPLTFNSVPELISHYRRESLEHYNNFLNV 240
241 RLLYPVSKYHQPDQDDQREWSVERVGQRLMETNREFLSRSRQFDQFHDQFNRLSQELQLK 300
301 GQALQSFDEAAAMFEEQADLLRHF SRDCCSGEQERRAVEENGALLQRRLLALLREAQGRLA 360
361 DEVRASQAYYKQLEREINGLKLEVAQAAKQREKCAWLQARGVVPKDRINKLLQDSSGQQE 420
421 TTRRSGGSEEVSTDSSWFVADCDRSQAIRLLKGRCDGTFLVRPSKNPGQFALSIVAEGEV 480
481 HHCLILRTERGYGFIEPLTTHPTLRSLVQHYAHNSLEEHNQLLKTMMAYPVFGSS 535

ANEXO 6: Sequência de DNA parcial do fragmento de Akt obtido em carrapato e alinhamento dos *primers* de PCR em tempo real

1 CAGTGGACGACTGTGATTGAACGCATGTTCTGTGTTGACTCTGAAGATGACCGGGAGGGT 60

61 TGGTGCCAGGCCATCCAGCAGGTGTCTGAGAAGTTGGCGAGTGAGGAGGACGTCGAGATG 120

121 GCAGAGCCCAAGGACGAGCAGTCGCTGCGCGACAAGTTCAGCATCTCGACGCGCACGTAC 180

181 GCGACGGGCAACCGCCTCAGCCTGGACAACCTTTGAGTTCCTCAAGGTGCTCGGCAAGGGC 240

241 ACCTTTGGCAAGGTGGTGTCTGTGTCGCGAGAAGTCCACGGAGTCCCTGTACGCGATCAAG 300

301 ATCCTCAAGAAGAAGGTGGTCATAGACAAGGATGAGGTGGCCACACGCTGACTGAGAAC 360

361 AGGGTGCTGCGCAGCACAAAGCACCCGTTCTCATCTCGCTGCGCTACTCCTTCCAGACG 420

421 GCCGACCGGCTCTGCTTCGTCATGGAGTACGTCAATGGCGGCGAGCTCTTCTTCCACTTG 480

481 TCACGCGACCGCGTCTTCACGGAGGAGCGCACCCGCTTCTACTCGGCCGAGATACTGCTC 540

541 GCCCTCGAGTATCTGCACAGCCAGGGCATTATCTACCGGGACCTGAAGCTGGAGAACCTC 600

601 CTGCTGGACAGGGAGGGCCACGTCAAGATTGCAGACTTTTGGCCTCTGCAAGGAGGACATC 660

661 TCTTTCGGGTCCACGACAAAGACCTTCTGCGGCACGCCCGAGTACCTCGCACCCGAGGTG 720

721 CTGGAGGACACCGACTACGGCCGGGCCGTTGACTGGTGGGGGCTGGGCGTGGTCATGTAT 780

781 GAAATGATGTGGG 793

ANEXO 7: Sequência de aminoácidos (264 resíduos) de Akt, deduzida com base no fragmento sequenciado (ANEXO 6)

1 QWTTVIERMFCVDSRDDREGWCQAIQQVSEKLA SEEDVEMAEPKDEQSLRDKFSISTR TY 60

61 ATGNRLSLDNFEFLKVLGKGTFGKVVLCREKSTESLYAIKILKKKVVIDKDEVAHTLTEN 120

121 RVL RSTKHPFLISLRY SFQTADRLCFVMEYVNGGELFFHLSRDRVFTEERTRFYSAEILL 180

181 ALEYLHSQGI IYRDLKLENLLLDREGHVKIADFG LCKEDISFGSTTKTFCGTPEYL APEV 240

241 LEDTDYGRAVDWWGLGVV MYEMMW 264

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)