



Caracterização funcional de proteínas da saliva do carrapato *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae)

Maria Luiza Chaves Oliveira^{1*}, Cristielen Dantas Colen², Maycos Luiz Anjos da Silva¹, Sarah Kahey Perdigão¹, Bruna Diogo de Souza¹, Izabela Cosso Tavares Ribeiro², Ricardo Nascimento Araujo³.

¹Discente no Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil – *Contato: mlco2023@ufmg.br ²Discente no Programa de Pós-Graduação em Parasitologia Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil ³Docente do Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

INTRODUÇÃO

O carrapato *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888, pertence à família Ixodidae e é um artrópode hematófago obrigatório, popularmente conhecido como Carrapato-estrela, que causa grande prejuízo à saúde humana e animal, por ser o principal vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, causadora da febre maculosa brasileira, uma doença de alta letalidade e que representa um desafio de saúde pública^{6,7}. O seu controle é feito principalmente por meio do uso de acaricidas químicos, que são eficazes, mas possuem um alto custo e podem causar contaminações ao ambiente e em produtos de origem animal, além do possível desenvolvimento de resistência por parte dos carrapatos, caso sejam manejados incorretamente^{7,8}. Na busca de novas alternativas para otimizar o controle de *A. sculptum*, trabalhos anteriores estudaram a fisiologia desse artrópode e identificaram proteínas salivares importantes para o repasto sanguíneo e digestão do sangue, como a AsBasicTail (BT), a As8.9 kDa (8.9) e a AsKunitz (K)⁴. Essas proteínas foram usadas como potenciais antígenos vacinais e apresentaram resultados promissores^{3,4}. Entretanto, apesar dos estudos anteriores, ainda não se sabe qual o papel biológico e a importância dessas proteínas para a hematofagia dos carrapatos. Dessa forma, o emprego de técnicas de estudo funcional de genes, como o RNA interferente (RNAi), é útil para a inibição de proteínas específicas, permitindo sua caracterização funcional. O RNAi é um mecanismo de regulação gênica existente em diversos organismos, o qual utiliza pequenos fragmentos de RNA de fita dupla (dsRNA), que se ligam a RNA mensageiros (mRNAs) advindos do núcleo celular com intuito de inibir a síntese proteica². Esse processo pode ser mimetizado laboratorialmente, sendo o objetivo deste trabalho inibir a proteína salivar BT utilizando o RNAi a fim de caracterizá-la funcionalmente.

METODOLOGIA

Fêmeas de *A. sculptum* alimentadas tiveram suas glândulas salivares dissecadas em solução salina 0,9%. As glândulas foram armazenadas em microtubos de 1,5 mL com 200 µL de Trizol Reagent® (Life Technologies) ou de tampão de lise do Total RNA Purification Kit® (Cellco Biotech), onde foi feita a maceração mecânica com auxílio de um pistilo, depois tratamento por banho em um processador ultrassônico e os demais procedimentos para a extração do RNA de acordo com as instruções de cada fabricante. O RNA extraído, utilizando o Trizol Reagent®, foi quantificado em um espectrofotômetro, enquanto o extraído pelo Total RNA Purification Kit® não foi quantificado antes da síntese de DNA complementar (cDNA). A produção do cDNA foi feita utilizando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase® (Promega), com auxílio de um termociclador PTC-100® (Bio-Rad), e foram seguidas as instruções do fabricante. A amplificação do cDNA foi feita por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando conjuntos de iniciadores específicos para a BT, além de um conjunto que amplifica um gene constitutivo continuamente expresso pelo *A. sculptum*, chamado ActinaB (ACT). A amplificação foi avaliada por meio de eletroforese em gel de Agarose 1,5%, utilizando um padrão de peso molecular de 100 pb com as amostras de BT e ACT. Com isso, a partir do produto de PCR, utilizou-se o MEGAscript™ T7 transcription kit (Biosearch Technologies) para sintetizar o dsRNA e foi feita então sua quantificação em um espectrofotômetro para avaliar a concentração de RNA presente na amostra. Em seguida, o dsRNA foi preparado para a aplicação, sendo dissolvido novamente em solução salina 0,9% autoclavada na concentração de 0,5 µg/µL. Foram selecionadas quatro fêmeas de *A. sculptum*, de 9 a 12 dias após a muda e em jejum, para aplicação do dsRNA e outras quatro para servir de grupo controle recebendo apenas salina autoclavada. A injeção foi feita na hemolinfa dos carrapatos, utilizando um microinjetor Nanoject II® (Drummond Scientific Company) e depois foram armazenados em uma estufa BOD em condições ideais de temperatura e umidade, por 15 dias para posteriormente serem dissecados. Repetiu-se então os processos de extração de RNA e síntese de cDNA para

a realização de uma PCR quantitativa (qPCR), em duplicata, utilizando 5µL do Power SYBR Green PCR Master Mix Kit® (Applied Biosystems) e um promotor T7 próprio para a BT.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de RNA foi realizada inicialmente usando o TRI Reagent® (trizol), a qual apresentou quantidade muito reduzida de RNA total (abaixo de 1 µg por glândula) e de baixa qualidade ao apresentar valor inferior a 2,0 na razão entre absorvâncias medidas em 260 nm e 280 nm no espectrofotômetro. Além disso, o perfil cromatológico da amostra indicou a presença de contaminação com fenol, mesmo após a extração, devido à sua solubilidade parcial. Dessa forma, traços da substância podem permanecer na amostra. Ainda assim, as amostras foram submetidas a síntese de cDNA e PCR, porém, não houve a amplificação de produtos usando os iniciadores para BT e ACT.

Em seguida, foi utilizado o Total RNA Purification Kit® (Cellco Biotech), sendo escolhido esse método para extração de RNA total, uma vez que as PCRs apresentaram produtos de peso molecular correto e intensidade que permitiram a visualização por eletroforese em géis de agarose.

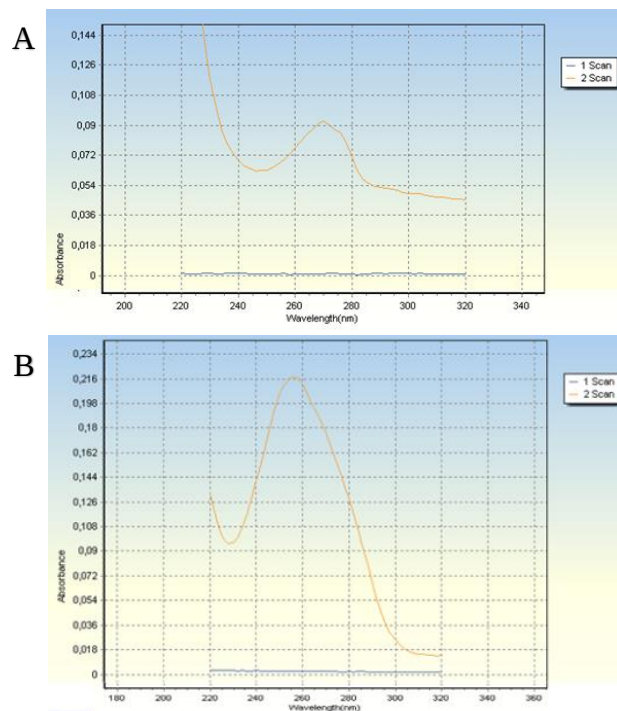


Figura 1: Medição da qualidade e concentração do RNA total extraído das glândulas salivares dos carrapatos. A-Cromatografia do RNA da amostra utilizando TRI Reagent® e B-amostra utilizando o Total RNA Purification Kit® no espectrofotômetro.

Os resultados da PCR variaram de acordo com os conjuntos de iniciadores testados. O conjunto 710/711, com 146 pb, apresentou o melhor resultado, ao gerar um amplificado de alta intensidade na eletroforese em gel de agarose. Outros conjuntos testados foram o 654/655, com 459 pb e o 681/682, com 124 pb, acompanhados do conjunto de iniciadores da ACT, com 154 pb. Destes, apenas a ACT apresentou amplificado com qualidade semelhante ao conjunto 710/711, enquanto os outros apresentaram bandas de 100 a 200 pb, porém de baixa intensidade. Na PCR realizada para a síntese de dsRNA, foi utilizado um conjunto de iniciadores contendo o promotor T7 (728/729), gerando um amplificado de 516 pb que foi usado

XV Colóquio Técnico Científico de Saúde Única, Ciências Agrárias e Meio Ambiente



como molde para síntese de dsRNA e que gerou um produto de alta intensidade na eletroforese. A dosagem de dsRNA, apresentou uma concentração de 3,38 µg/µL perfazendo um total de 203,13 µg de dsRNA na amostra.

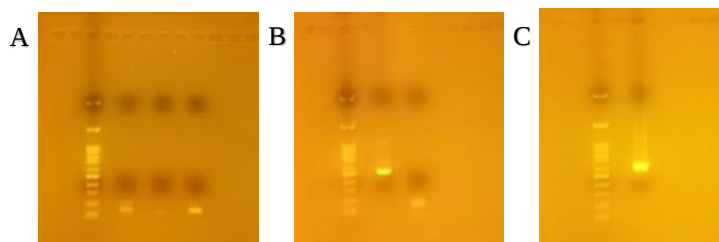


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR e da síntese de dsRNA. A- colunas: padrão de peso molecular de 100 pb (PPM – 100 pb), seguido de produtos da PCR da BT com os iniciadores 710/711 (147 pb) e 681/682 (124 pb), e produtos de PCR da ActinaB (154 pb). B- colunas: PPM – 100 pb, seguido de produtos da PCR da BT com os iniciadores 728/729 (516 pb) e da ActinaB (154 pb) e C- colunas: PPM – 100 pb, seguido dos produtos da síntese de dsRNA com o DNA de 516 pb como molde.

Após a injeção de dsRNA, as fêmeas tiveram suas glândulas isoladas e avaliadas quanto aos níveis de mRNA que codificam a BT por meio de uma qPCR, a qual evidenciou que os carrapatos do grupo controle apresentaram níveis de mRNA 99,9% superiores aos níveis dos carrapatos injetados com o dsRNA, indicando que houve silenciamento dos genes responsáveis pela expressão da BT.

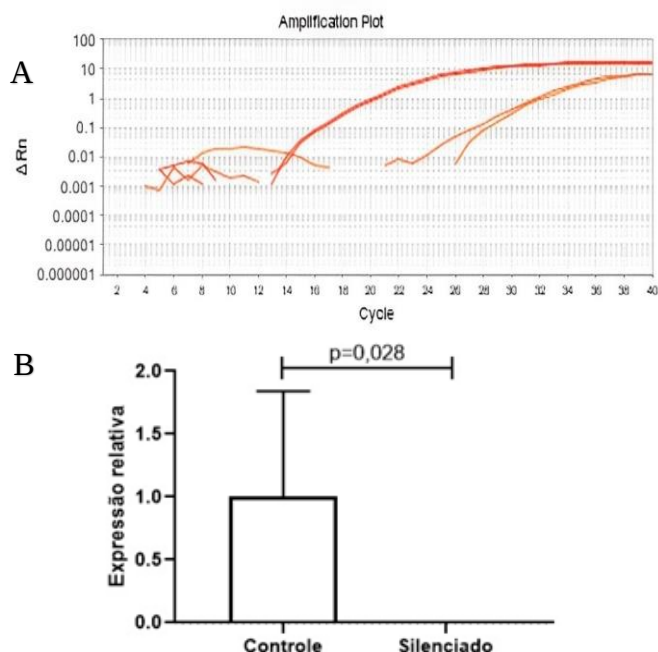


Figura 4: Resultados da qPCR para avaliar os níveis de mRNA da BT em A. sculptum. A-Detecção da amplificação na qPCR e B- níveis de mRNA da BT, controle - carrapatos injetados com salina, silenciado - carrapatos injetados com dsRNA da BT.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A injeção de dsRNA em carrapatos *A. sculptum* adultos induz redução nos níveis de mRNA da BT em mais de 99%, indicando que a injeção reduz a expressão dessa proteína utilizada para a hematofagia. Com isso, a próxima etapa do experimento envolve colocar fêmeas de *A. sculptum* injetadas com dsRNA para se alimentarem em hospedeiro, a fim de avaliar os parâmetros reprodutivos e de desenvolvimento, ao avaliar a postura de ovos em quantidade e viabilidade e depois as demais fases de desenvolvimento do carrapato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- linhagens de camundongos e desenvolvimento de resposta imune antissaliva. 2021. Tese (Doutorado em Ciências – Área de concentração: Entomologia) – Programa de Pós-graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.
- MANJUNATHACHAR, H. V. et al. **Screening for the “Achilles Heel” of Hyalomma anatolicum Ticks by RNA Interference Technology and an Update on Anti-Tick Vaccine Design.** Vaccine Design: Methods and Protocols, Volume 2. Vaccines for Veterinary Diseases, p. 307-330, Janeiro de 2022.
- COSTA, Gabriel Cerqueira Alves. **Identificação e avaliação de eficácia de antígenos vacinais contra o carrapato estrela (Amblyomma sculptum).** 2019. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências – Área de concentração: Entomologia) – Programa de Pós-graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.
- COSTA, Gabriel Cerqueira Alves et al. **Amblyomma sculptum salivary protease inhibitors as potential anti-tick vaccines.** Frontiers in immunology, v. 11, p. 611104, 2021.
- DE LA FUENTE J, Kocan KM. **The Impact of RNA Interference in Tick Research. Pathogens.** 2022 Jul 23;11(8):827. doi: 10.3390/pathogens11080827. PMID: 35894050; PMCID: PMC9394339.
- PAULA, L. G. F. de et al. **Dinâmica sazonal de Amblyomma sculptum: uma revisão.** Vetores de parasitas, v. 15, p. 193, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05311-w>.
- LABRUNA, M. B. **Ecology of Rickettsia in South America.** Annals of the New York Academy of Sciences, New York, v. 1166, p. 156-166, maio 2009.
- CARDOSO, E. R. N. et al. **Susceptibility of Amblyomma sculptum, vector of Rickettsia rickettsii, ticks from a national park and an experimental farm to different synthetic acaricides.** Pathogens, v. 12, p. 1304, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens12111304>
- RAMAKRISHNAN VG, Aljamali MN, Sauer JR, Essenberg RC. **Application of RNA interference in tick salivary gland research.** J Biomol Tech. 2005 Dec;16(4):297-305. PMID: 16522848; PMCID: PMC2291763.
- GALAY, R.L., Hernandez, E.P., Talactac, M.R., Maeda, H., Kusakisako, K., Umemiya-Shirafuji, R., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T. (2016). **Induction of gene silencing in Haemaphysalis longicornis ticks through immersion in double-stranded RNA.** Ticks and Tick-borne Diseases, 7 (5), 813-816. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.03.018>.

APOIO:

