



PI3K em células embrionária de *Rhipicephalus microplus* (BME26)

Christiano Calixto, Vaz Jr I. , Abreu L. , Logullo C.

As respostas metabólicas à insulina são mediadas inicialmente por fosfatidilinositol 3 – OH quinase (PI3K), uma enzima heterodimérica com uma subunidade catalítica (p110) e outra regulatória (p85). A PI3K promove a sinalização acima da proteína quinase B (AKT) na via de sinalização de insulina, que é amplamente descrita como crucial para a embriogênese de vertebrados e invertebrados. A inibição química de PI3K nas células BME26 bloqueia o acúmulo de glicogênio induzido pela adição de insulina exógena pelo eixo AKT/GSK, que é conservado em carrapatos, e integra viabilidade celular e metabolismo energético. Devido ao envolvimento da via de sinalização por PI3K em tais processos celulares, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito de moduladores químicos de PI3K e de ferramentas de genômica funcional nas células BME26. O efeito da inibição química (LY294002 ou Wortmanina) ou ativação (740Y-P) de PI3K foi avaliado usando o ensaio de viabilidade por MTT nas células BME26. Além disso, também foi realizado o silenciamento gênico por interferência de RNA (RNAi) da p85 nessas células. Foi feita análise de sequência e de homologia que levou à identificação de sequências parciais de nucleotídeos correspondentes às subunidades catalítica, p110 (1.362 pb) e regulatória, p85 (1.703 pb) de *R. microplus*. Um fragmento de cDNA foi amplificado, clonado e sequenciado para confirmar a sequência da p85 e elaborar uma estratégia de RNAi. O silenciamento gênico induziu uma redução de 50% nos transcritos para p85 (confirmado por qRT-PCR) e não alterou a viabilidade celular. Além disso, a viabilidade celular não foi alterada nos experimentos de ativação química (740Y-P, por 24 horas) realizados na presença de soro fetal bovino (SFB). Quando as células foram mantidas na ausência de SFB houve uma redução de 20% na viabilidade celular. Entretanto, adição de insulina bovina 400nM em substituição ao SFB, manteve a viabilidade celular similar ao valor do controle (com SFB). Estudos adicionais de viabilidade celular e conteúdo de glicogênio estão sendo desenvolvidos para entender a participação da PI3K nesses processos nas células BME26, baseados em abordagens imunológicas e de genômica funcional. A compreensão da via de sinalização de insulina em carrapatos, bem como seus componentes, pode ampliar o conhecimento atual sobre a fisiologia deste ectoparasita.

Palavras chave: BME26, PI3K, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Suportado por: INCT-Molecular Entomology, FAPERJ, PROCAD/CAPES.