

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCAS BOCHNIA BUENO

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE RNA DE INTERFERÊNCIA NO SILENCIAMENTO  
DOS GENES *glc-5*, *DIM-1*, *GAPDH*, *GDH* E  $\beta$ -TUBULINA DE *Haemonchus*  
*contortus*

CURITIBA

2018

LUCAS BOCHNIA BUENO

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE RNA DE INTERFERÊNCIA NO SILENCIAMENTO  
DOS GENES *glc-5*, DIM-1, GAPDH, GDH E  $\beta$ -TUBULINA DE *Haemonchus*  
*contortus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de Concentração em Parasitologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento

Co-orientador: Prof. Dr. Wanderson Duarte Da Rocha

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Bueno, Lucas Bochnia

Aplicação da técnica de RNA de interferência no silenciamento dos genes *glc-5*, *DIM-1*, *GAPDH*, *GDH* e *B-Tubulina* de *Haemonchus contortus*. / Lucas Bochnia Bueno. – Curitiba, 2018.

90 f. : il. ; 30cm.

Orientador: Marcelo Beltrão Molento.

Coorientador: Wanderson Duarte da Rocha.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Parasitologia veterinária. 2. Ovino. 3. *Haemonchus*. 4. Técnicas de Silenciamento de Genes. 5. Doenças Parasitárias I. Título. II. Molento, Marcelo Beltrão. III. Rocha, Wanderson Duarte da. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 636.089.696

## TERMO DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,  
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de LUCAS BOCHNIA BUENO intitulada: **APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE RNA DE INTERFERÊNCIA NO SILENCIAMENTO DOS GENES glc-5, DIM-1, GAPDH, GDH E -TUBULINA DE Haemonchus contortus**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 12 de Novembro de 2018.



MARCELO BELTRÃO MOLENTO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



LARISSA REIFUR

Avaliador Externo (UFPR /DPB)



JORDANA ANDRIOLI SALGADO

Avaliador Externo (UFPR)

À minha mãe Cintia Lucia Bochnia Bueno, que até seu último suspiro me apoiou e incentivou; ao meu noivo Eduardo Marcomini que me incentivou a ingressar nessa jornada; e principalmente ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento por ter tornado tudo isso possível,

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida, saúde, perseverança e persistência a mim dados e por permitir a realização de mais um sonho.

À minha mãe Cintia L. B. Bueno (*in memoriam*) que sempre esteve presente em minha vida e sempre se deu de corpo e alma para me proporcionar um futuro melhor, juntamente com meu pai Jair R. Bueno que me apoiou nos momentos difíceis.

À todos os meus familiares que um dia me apoiaram.

Aos meus amigos que compreenderam e apoiaram as minhas escolhas para o meu futuro; em especial aos amigos Bruno B. Bortoluzzi, Juliana C. de Azevedo e Giovanna Z. Cândido, que conheci durante o mestrado e me fazem rir sempre, levoo- os para a vida.

Ao meu noivo, Eduardo Marcomini, que me incentivou a ingressar no mestrado e sempre me apoiou nesse período de dois anos, compreendendo os estresses, as ausências e os sacrifícios.

Ao meu orientador Marcelo, que mesmo sem me conhecer, me aceitou como aluno e sempre se mostrou presente durante o período do mestrado, dando sugestões e ouvindo as ideias para o projeto.

Ao meu co-orientador Wanderson pelo auxílio com os experimentos de Biologia Molecular, juntamente com os alunos do laboratório GFP (Genômica Funcional de Parasitos).

Aos alunos dos laboratórios de Epigenética, Nefrologia Experimental e Microbiologia por auxiliarem com diversas dúvidas técnicas.

Ao grupo do *Facebook* “Bolsistas CAPES” por mostrar que quaisquer que sejam as dificuldades enfrentadas na pós-graduação, você não está sozinho, além de distrair e fazer rir com experiências próprias de cada um dos pós-graduandos desse Brasil.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias que sempre estiveram dispostos a ajudar e ensinar, mas principalmente à Maria C. R. Cintra que me ajudou

de modo extremamente significativo com as análises estatísticas e à Izanara C. Pritsch que foi essencial com as traduções para a língua inglesa.

À Prof.<sup>a</sup> Dr. Alda Lúcia Monteiro e toda a equipe do Laboratório de Produção de Ovinos e Caprinos da UFPR, por toda a colaboração e disponibilidade para a realização dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da UFPR e aos professores da pós, meu muito obrigado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro destinado à minha pesquisa.

E a todos os que colaboraram direta ou indiretamente para a realização do meu mestrado.

“Quando tudo parecer dar errado em sua vida, lembre-se  
que o avião decola contra o vento, e não a favor dele. ”

*Henry Ford*



## RESUMO

Dos parasitos que infectam ovinos, o que mais se destaca é o *Haemonchus contortus*, devido ao fato de ser um parasito hematófago. O controle deste é feito com o uso constante de produtos de largo-espectro o que gera a seleção de populações resistentes, tornando inviável a utilização de diversas drogas comerciais. Assim, é necessário desenvolver métodos inovadores de controle para esta parasitose, como por exemplo, o uso da técnica de RNA de interferência (RNAi). Essa técnica utiliza pequenas moléculas de RNA para interferir com a expressão de um gene, causando seu silenciamento. Este trabalho teve o objetivo de desenvolver uma estratégia biotecnológica com o uso de RNAi para alvejar diversos genes de *H. contortus*. Parasitos adultos foram obtidos de ovinos da fazenda da UFPR na região de Curitiba, Paraná, Brasil. Amostras de RNA foram obtidas destes parasitos e utilizadas para a produção de DNA complementar, utilizando primers específicos contendo promotores T7, que por sua vez foram clonados e transformados em cepas de *Escherichia coli* TOP10 e BL21 (DE3). A identidade dos produtos clonados foi checada por sequenciamento e transferidos para estirpe de *E. coli* carregando o gene de T7 RNA polimerase. Culturas de bactérias carregando os segmentos codificadores flanqueados por promotores T7 foram testadas em larvas de terceiro estágio (L3) de *H. contortus* em teste *in vitro*, para avaliar a eficiência do silenciamento na redução de motilidade das L3. O teste de migração de L3 mostrou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos tratados e controle, além de diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre o mesmo grupo nas avaliações depois de 24 e 48 horas em população de 74% de *H. contortus*. A técnica de RNAi se mostrou promissora no silenciamento *in vitro*, com resultados que incentivam o avanço para testes *in vivo* para comprovação da eficácia da técnica como alternativa para o tratamento antiparasitário.

**Palavras-chave:** Endoparasito, ovinos, haemoncose, silenciamento, tratamento alternativo.

## ABSTRACT

The parasite that most significantly affects sheep is *Haemonchus contortus*, due to the fact that it is a hematophagous parasite. The control of this parasite is achieved through the constant use of broad-spectrum antiparasitic drugs, which generate the selection of resistant populations, making the use of several commercial drugs ineffective and thus unfeasible. As a result, it is necessary to develop innovative control methods for this parasitosis, for example, the interfering RNA (RNAi) technique. This technique uses small RNA molecules to interfere with the expression of a gene, causing its silencing. This work aimed to develop a biotechnological strategy using RNAi to target several *H. contortus* genes. Adult parasites were collected from sheep at the UFPR farm in Curitiba, Paraná, Brazil. RNA samples were obtained from these parasites and used for the production of cDNA using specific primers containing T7 promoters for further cloning and transformation into *Escherichia coli* TOP10 and BL21 (DE3) strains. The identity of the cloned products was checked by sequencing and transferred to *E. coli* strain carrying the T7 RNA polymerase gene. Bacterial cultures carrying the coding segments flanked by T7 promoters were tested in third instars larvae (L3) of *H. contortus* in *in vitro* test, to evaluate the efficiency of the silencing through the reduction of L3 motility. The test of L3 migration showed a significant difference ( $p \leq 0,05$ ) between the treated and control groups. In addition, a notable difference ( $p \leq 0,05$ ) was observed in the evaluations of the same group, between a 24 and 48 h exposition, in a population of 74% of *H. contortus*. The RNAi technique proved to be promising in *in vitro* silencing, with results that encourage the advancement of *in vivo* testing to prove the efficacy of the technique as an antiparasitic treatment alternative.

**Key words:** Endoparasite, sheep, haemoncosis, silencing, alternative treatment.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- REBANHOS DO BRASIL NO ANO DE 2016.....	24
FIGURA 2	- CICLOS DA GLICÓLISE E GLICONEOGÊNESE.....	30
FIGURA 3	- REAÇÃO CATALISADA PELA GLUTAMATO- DESIDROGENASE.....	31
FIGURA 4	- AS VIAS siRNA (ESQUERDA) E miRNA (DIREITA) DE INTERFERÊNCIA DE RNA.....	33
FIGURA 5	- ARTIGOS PUBLICADOS ENTRE OS ANOS DE 2000 E 2017 REFERENTES À RNAI E PARASITOS.....	35
FIGURA 6	- PLASMÍDEO DO <i>KIT TOPO TA CLONING</i> (INVITROGEN).....	40
FIGURA 7	- DESENHO EXPERIMENTAL DAS ETAPAS DA METODOLOGIA.....	47
FIGURA 8	- GEL DE AGAROSE 1% DAS AMOSTRAS DE EXTRAÇÃO DE RNA.....	48
FIGURA 9	- GEL DE AGAROSE 2% DAS AMOSTRAS DE PLASMÍDEO OBTIDAS DAS CEPAS DE <i>E. coli</i> TOP10 E ENTÃO AMPLIFICADAS COM O PAR DE <i>PRIMER</i> ESPECÍFICO PARA CADA SEQUÊNCIA.....	49
FIGURA 10	- GEL DE AGAROSE 2% DAS AMOSTRAS DE PLASMÍDEO OBTIDAS DAS CEPAS DE <i>E. coli</i> BL21 E ENTÃO AMPLIFICADAS COM O PAR DE <i>PRIMER</i> ESPECÍFICO PARA CADA SEQUÊNCIA.....	53
FIGURA 11	- PERCENTUAL DE PREVALÊNCIA DOS GÊNEROS DE PARASITOS IDENTIFICADOS NA COPROCULTURA.....	53
FIGURA 12	- PERCENTUAL DE MIGRAÇÃO DAS LARVAS L <sub>3</sub> CONTADOS APÓS O TEMPO DE EXPOSIÇÃO DE 24 E 48 HORAS PARA CADA GRUPO DE TRATAMENTO.....	54
FIGURA 13	- CERTIFICADO EMITIDO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS.....	69

FIGURA 14	-	PLACAS DE MEIO LA COM SM 120µg/mL, AMP 100µg/mL, X-GAL E IPTG APÓS INCUBAÇÃO A 37°C <i>OVERNIGHT</i> .....	74
FIGURA 15	-	PLACAS DE MEIO LA COM AMP 100µg/mL, FRASCOS COM MEIO LB E AMP 100µg/mL.....	75
FIGURA 16	-	FRASCOS ERLLENMEYER PARA REALIZAÇÃO DA INDUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM <i>E. coli</i> BL21.....	76
FIGURA 17	-	LARVAS L <sub>3</sub> OBTIDAS NA COPROCULTURA.....	77
FIGURA 18	-	LARVAS L <sub>3</sub> IDENTIFICADAS COM AUXÍLIO DE LUGOL EM AUMENTO DE 10X.....	78
FIGURA 19	-	APARATO UTILIZADO NO TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAR (TML).....	80
FIGURA 20	-	PLACAS DE CULTURA DE 24 POÇOS PREPARADAS PARA O TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAR (TML).....	81
FIGURA 21	-	LARVAS OBSERVADAS EM AUMENTO DE 10X NO POÇO DA PLACA APÓS A MIGRAÇÃO.....	82
FIGURA 22	-	BLASTN DOS AMPLICONS DOS GENES COM AS ESPÉCIES <i>COOPERIA</i> SP., <i>CHABERTIA</i> SP., <i>TRICHOSTRONGYLUS</i> SP. E <i>OSTERTAGIA</i> SP.....	84
FIGURA 23	-	ALINHAMENTO DO GENE β-TUBULINA COM AS SEQUÊNCIAS MAIS SEMELHANTES.....	85
FIGURA 24	-	ALINHAMENTO DO FRAGMENTO 2 DO GENE <i>GLC-5</i> COM A SEQUÊNCIA MAIS SEMELHANTE.....	86
FIGURA 25	-	ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA <i>INTERNATIONAL JOURNAL FOR PARASITOLOGY</i> , COM FATOR DE IMPACTO IGUAL A 3,07 (B1).....	90

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1	- DIVISÃO DOS GRUPOS DE TRATAMENTO E CONCENTRAÇÃO FINAL DAS SOLUÇÕES ADICIONADAS EM CADA POÇO PARA CADA GRUPO DISTINTO.....	45
TABELA 2	- VALORES DE MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA CADA GRUPO TRATAMENTO NOS TEMPOS 24 E 48H, SEGUIDO DE COMPARAÇÃO DE DIFERENÇA ESTATÍSTICA EM SOBRESCRITO.....	55
QUADRO 1	- SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DOS <i>PRIMERS FOWARD</i> E <i>REVERSE</i> PARA CADA GENE TRABALHADO.....	38
QUADRO 2	- IDENTIFICAÇÃO POR GÊNERO DAS LARVAS L <sub>3</sub> OBTIDAS NA COPROCULTURA.....	79
QUADRO 3	- CONTAGEM DE PARASITOS EM CADA POÇO PÓS MIGRAÇÃO NOS DIVERSOS GRUPOS DE TRATAMENTO.....	83
QUADRO 4	- VALORES DE <i>p</i> PARA CADA CONFRONTO DE DADOS INTERGRUPOS POSSÍVEL NOS TEMPOS 24 E 48 HORAS E PARA CONFRONTO INTRAGRUPO 24/48 HORAS PARA DETERMINAR DIFERENÇA SIGNIFICATIVA OU NÃO CONSIDERANDO $p \leq 0,05$ .....	87

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

A260	-	Absorbância a 260 nanômetros
A280	-	Absorbância a 280 nanômetros
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
cDNA	-	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
EDTA	-	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
RNA	-	Ácido Ribonucleico
RNAi	-	Ácido Ribonucleico de Interferência
dsRNA	-	Ácido Ribonucleico de Dupla Fita
H <sub>2</sub> O	-	Água
A	-	Alanina
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-	Amônio
Amp	-	Ampicilina
Glu-Cl	-	Canal de Glutamato Mediado por Cloro
CaCl <sub>2</sub>	-	Cloreto de Cálcio
CEUA	-	Comissão de Ética no Uso de Animais
RISC	-	Complexo de Silenciamento Induzido por Ácido Ribonucleico
D.O.	-	Densidade Óptica
DEPC	-	Dietilpirocarbonato
SDS	-	Dodecil Sulfato de Sódio
dsRBD	-	Dominio de ligação de Ácido Ribonucleico de cadeia dupla
DL50	-	Dose Letal para 50% da população
TRBP	-	Elemento de resposta de transativação da proteína de ligação ao Ácido Ribonucleico
Sm	-	Estreptomicina
BOD	-	Estufa Incubadora com Demanda Bioquímica de Oxigênio
F	-	Fenilalanina
xG	-	Força G
GluCIF1	-	Fragmento 1 do Canal de Glutamato mediado por Cloro
GluCIF2	-	Fragmento 2 do Canal de Glutamato mediado por Cloro
glc-5	-	Gene codificante da porção alfa do Canal de Glutamato Mediado por Cloro

G	-	Glicina
GAPDH	-	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase
GDH	-	Glutamato Desidrogenase
°C	-	Graus Celsius
NaOH	-	Hidróxido de Sódio
IBGE	-	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPTG	-	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranoside
IVM	-	Ivermectina
LAPOC	-	Laboratório de Produção de Ovinos e Caprinos da UFPR
L <sub>3</sub>	-	Larvas no estágio 3 de desenvolvimento
L	-	Leucina
LB	-	Meio Luria-Bertani
LA	-	Meio Luria-Bertani Ágar
miRNA	-	Micro Ácido Ribonucleico
μL	-	Microlitro
μm	-	Micrômetro
mg	-	Miligrama
mL	-	Mililitro
mM	-	Milimolar
M	-	Molar
nm	-	Nanômetro
NAD <sup>+</sup>	-	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	-	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
pb	-	Pares de base
siRNA	-	Pequeno Ácido Ribonucleico de interferência
P	-	Prolina
dsRBP	-	Proteína de ligação de Ácido Ribonucleico de cadeia dupla
DIM-1	-	Proteína Muscular Desorganizada
q.s.p.	-	Quantidade suficiente para
kg	-	Quilograma
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase
RT-PCR	-	Reação da Transcriptase Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase

R\$	-	Reais
DGCR8	-	Região crítica 8 da síndrome de DiGeorge
RNase	-	Ribonuclease
RPM	-	Rotações por Minuto
S	-	Serina
HcGluCl $\alpha$	-	Subunidade alfa do Canal de Glutamato Mediado por Cloro
HcGluCl $\beta$	-	Subunidade beta do Canal de Glutamato Mediado por Cloro
HcGluCl3A	-	Subunidade 3A do Canal de Glutamato Mediado por Cloro
HcGluCl3B	-	Subunidade 3B do Canal de Glutamato Mediado por Cloro
TML	-	Teste de Migração Larvar
Y	-	Tirosina
F18S	-	Transição no códon 18 do gene do Canal de Glutamato mediado por Cloro
G19S	-	Transição no códon 19 do gene do Canal de Glutamato mediado por Cloro
S86A	-	Transição no códon 86 do gene do Canal de Glutamato mediado por Cloro
L95P	-	Transição no códon 95 do gene da Glutamato Desidrogenase
F200Y	-	Transversão no códon 200 do gene da Beta-Tubulina
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná
HIV	-	Vírus da Imunodeficiência Humana
TRIS	-	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
X-gal	-	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	-	Alfa
$\cong$	-	Aproximadamente
$\beta$	-	Beta
©	-	<i>Copyright</i>
$\pm$	-	Mais ou menos
®	-	Marca Registrada
$\leq$	-	Menor ou igual a
-	-	Menos
%	-	Por cento

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	21
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	23
<b>3</b>	<b>REVISÃO LITERÁRIA</b>	24
3.1.	<i>Ovinocultura</i>	24
3.2.	<i>Infecção por <u>Haemonchus contortus</u></i>	25
3.3.	<i>Os antiparasitários</i>	26
3.4.	<i>A Ivermectina</i>	27
3.5.	<i>Resistência parasitária</i>	27
3.6.	<i>Mecanismos moleculares da resistência</i>	28
3.7.	<i>Seleção dos genes</i>	28
3.7.1.	<i>Canal GluCl</i>	29
3.7.2.	<i>DIM-1</i>	29
3.7.3.	<i>GAPDH</i>	29
3.7.4.	<i>GDH</i>	30
3.7.5.	<i><math>\beta</math>-Tubulina</i>	31
3.8.	<i>Novas tecnologias para o controle parasitário</i>	31
3.8.1.	<i>RNA de interferência (RNAi)</i>	32
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	36
4.1.	<i>Objetivo Geral</i>	36
4.2.	<i>Objetivos Específicos</i>	36
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	37
5.1.	<i>Extração de RNA total de <u>Haemonchus contortus</u></i>	37
5.2.	<i>Quantificação de RNA</i>	38
5.3.	<i>Desenho de oligonucleotídeos</i>	38
5.4.	<i>Síntese de DNA complementar (cDNA)</i>	39
5.5.	<i>Amplificação do DNA in vitro</i>	40

5.6.	<i>Clonagem do inserto</i> .....	40
5.7.	<i>Produção de bactérias Quimiocompetentes</i> .....	41
5.8.	<i>Transformação em <u>E. coli</u> TOP10</i> .....	41
5.9.	<i>Preparação das placas</i> .....	41
5.10.	<i>Isolamento das colônias</i> .....	42
5.11.	<i>Miniprep</i> .....	42
5.12.	<i>PCR plasmidial</i> .....	42
5.13.	<i>Quantificação de plasmídeos</i> .....	42
5.14.	<i>Sequenciamento</i> .....	43
5.15.	<i>Transformação em <u>E. coli</u> BL21 star (DE3)</i> .....	43
5.16.	<i>Indução da Expressão Gênica</i> .....	43
5.17.	<i>Coleta de fezes</i> .....	44
5.18.	<i>Coprocultura e identificação de larvas L<sub>3</sub></i> .....	44
5.19.	<i>Desembainhamento</i> .....	44
5.20.	<i>Divisão de grupos para alimentação larvar</i> .....	44
5.21.	<i>Teste de migração larvar - TML</i> .....	45
5.22.	<i>Análise estatística</i> .....	46
5.23.	<i>Desenho experimental</i> .....	47
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
6.1.	<i>Quantificação de RNA</i> .....	48
6.2.	<i>Plasmídeos obtidos pela <u>E. coli</u> TOP10</i> .....	49
6.3.	<i>Sequenciamento</i> .....	49
6.3.1.	<i>GDH</i> .....	50
6.3.2.	<i>GAPDH</i> .....	50
6.3.3.	<i>DIM-1</i> .....	51
6.3.4.	<i><math>\beta</math>-Tubulina</i> .....	51
6.3.5.	<i>Canal de Glutamato Mediado por Cloro</i> .....	51

6.3.5.1. <i>GluCI F1</i> .....	52
6.3.5.2. <i>GluCI F2</i> .....	52
6.4. <i>Plasmídeos obtidos pela E. coli BL21</i> .....	52
6.5. <i>Identificação larvar</i> .....	53
6.6. <i>Teste de Migração Larvar - TML</i> .....	54
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>61</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>69</b>
<b>VITA</b> .....	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Ovinos são animais que continuamente estão expostos a infecções parasitárias por diversos nematoides gastrintestinais. Destes, tem-se o *Haemonchus contortus*, um endoparasita hematófago de importância mundial. Prevalendo sua infecção principalmente em meses mais quentes e estando presente em praticamente todos os rebanhos. Sendo um dos parasitos mais prevalentes e causador de inúmeros danos para a saúde do animal, produção e economia ao ovinocultor (AMARANTE, 2014; BESIÉ et al., 2016). Os danos se dão devido à perda volêmica do animal, causada pela parasitose, resultando em diversas manifestações como anemia profunda, anorexia, perda de peso, redução no crescimento da lã, depressão e morte (SIMPSON, 2000).

No ano de 2016, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o rebanho brasileiro de ovinos era superior a 18 milhões de cabeças, sendo estes principalmente criados nos estados do Rio Grande do Sul ( $\cong 3$  milhões), Bahia ( $\cong 3$  milhões), Ceará ( $\cong 2$  milhões) e Pernambuco ( $\cong 2$  milhões). Resultando em um total de mais de 9,7 mil toneladas de lã, girando um capital de aproximadamente 87,1 milhões de reais no período relatado (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2016).

Entretanto, essa produção se apresenta em risco devido às parasitoses dos ovinos, principalmente pelo desenvolvimento de resistência destes parasitos, sendo ocasionada pelo uso inapropriado das drogas, sendo aplicadas em curtos intervalos de tempo, emprego de superdoses e mudanças constantes de princípios ativos. Atividades essas que ocasionam o desenvolvimento de mutações a favor da resistência e seleção de populações parasitárias cada vez mais resistentes no campo, tornando inviável a utilização de diversas drogas como tratamento antiparasitário (BASSETTO E AMARANTE, 2015; MOLENTO, 2009; ROOS et al., 1990; VERÍSSIMO et al., 2012).

Observa-se resistência do *H. contortus* principalmente à ivermectina, uma lactona macrocíclica, onde se tem a mutação no alelo codificante da subunidade  $\alpha$  da proteína de Canal de Glutamato mediado por Cloro (GluCl) presente em larvas resistentes ao tratamento (KOTZE E PRICHARD, 2016), assim como de outros genes.

Alternativas biotecnológicas como o RNAi vem sendo testadas e aplicadas como possíveis tratamentos alternativos para nematoides gastrintestinais em estudos que avaliam a eficácia da técnica em diferentes metodologias para diferentes parasitos (ARENAL et al., 2017; BRITTON et al., 2015; GILLAN et al., 2017; TIMMONS E FIRE, 1998).

## 2 JUSTIFICATIVA

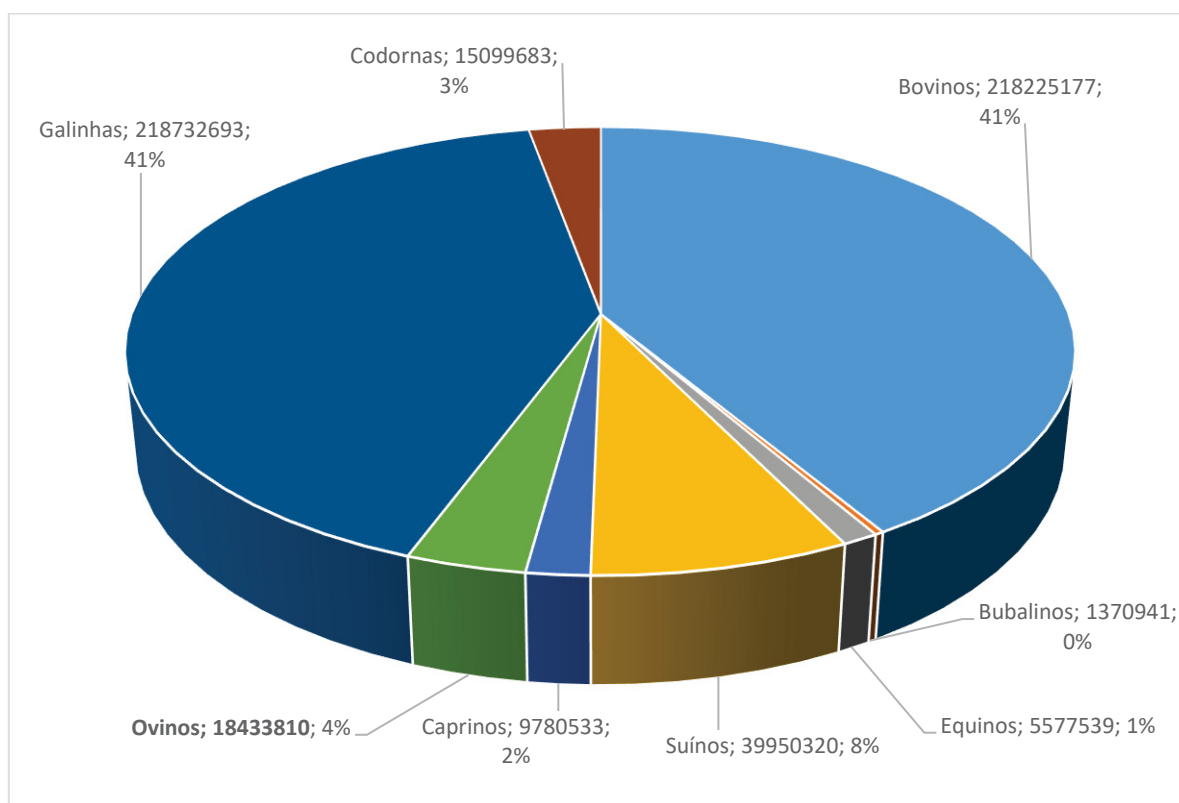
Esta pesquisa mostra-se relevante pelo fato de infecções por *H. contortus* serem comumente causas de mortes de ovinos, tanto pela gravidade das infecções como pela resistência aos tratamentos. Neste último caso, parasitos resistentes à ivermectina desenvolvem mutações na porção  $\alpha$  do Canal GluCl, causando gastos elevados aos criadores de ovinos e sofrimento animal. Tenta-se então com este trabalho, através do uso da técnica de silenciamento do RNA, desenvolver uma ferramenta de biotecnologia para eliminar parasitos com uma nova estratégia terapêutica. Esse fato será realizado com a comprovação do silenciamento de genes estruturais e/ou essenciais que quando silenciados terão o potencial de matar os parasitos.

### 3 REVISÃO LITERÁRIA

#### 3.1. Ovinocultura

A ovinocultura é um empreendimento que no ano de 2016 se apresentava como o 4º maior rebanho no Brasil, com mais de 18,4 milhões de cabeças, ficando atrás dos rebanhos de galinhas poedeiras (218,7 milhões de cabeças, 41%), bovinos (218,2 milhões de cabeças, 41%) e suínos (39,9 milhões de cabeças, 8%) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2016) conforme observado na Figura 1.

FIGURA 1 - REBANHOS DO BRASIL NO ANO DE 2016.



Total de Galinhas, Bovinos, Codornas, Bubalinos, Equinos, Suínos, Caprinos e Ovinos no Brasil no ano de 2016, com seus respectivos percentuais de representatividade. Fonte: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) (2016).

A população de ovinos apresentou crescimento nos últimos anos, vindo de 14,7 milhões de cabeças no ano de 2000, para 18,4 milhões de cabeças no ano de 2016 e tendo como principais criadores no ano de 2016, os estados da Bahia (3,4 milhões), Rio Grande do Sul (3,4 milhões), Pernambuco (2,4 milhões) e Ceará (2,3 milhões). O estado do Paraná encontra-se na sétima posição, com 598 mil cabeças no ano de 2016 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2016).



No ano de 2006, o rebanho de ovinos no Brasil apresentou um total de 16 milhões de cabeças, alocadas em 438.623 estabelecimentos agropecuários, divididos em: produção de corte, leite e lã. Sendo avaliado pelo INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), apenas a produção de lã, uma produção que não é realizada nas regiões Norte e Nordeste do Brasil por serem principais produtores de carne de ovinos. Tal produção se concentra na região Sul e que no ano de 2016, apresentou 3,2 milhões de ovinos tosquiados, representando 98% da tosquia brasileira (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2016).

Nesse montante de ovinos tosquiados, foi obtido um total de 9,7 milhões de quilos de lã no Brasil no ano de 2016, representando 87,1 milhões de reais para os produtores que receberam em média R\$8,87 por quilo de lã produzida. Como a região Sul é a região que mais apresenta produção de lã, a mesma contabilizou mais de 86 milhões de reais no ano de 2016. Dentro dessa região, o principal produtor e que mais renda obteve com a produção de lã, foi o estado do Rio Grande do Sul, com 8,9 milhões de quilos de lã e 84 milhões de reais, representando 1,33% do valor dos produtos provenientes do estado (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2016).

Entretanto tal produção se apresenta em risco devido aos endoparasitos dos ovinos, dentre os quais se destaca o *H. contortus* por realizar hematofagia. Quando em elevado grau parasitário, o hospedeiro apresenta alterações hematológicas independente de qual seja sua alimentação (CÉRIAC et al., 2017), além de diminuição de ganho de peso, menor produção de leite e lã (MAVROT, HERTZBERG E TORGERSON, 2015), afetando diretamente o produtor que terá perdas econômicas devido a infecção por este parasito.

### 3.2. Infecção por *Haemonchus contortus*

A presença de *H. contortus* em ovinos é prevalente em regiões tropicais e subtropicais, mas por fatores adaptativos e seu proveito de curtos períodos para o seu desenvolvimento, ele mostra-se presente em grande parte das criações de ovinos em todas as regiões, independente da zona climática. Observando maior desenvolvimento do parasito em criações onde há várias cabeças de ovinos,

dificultando o diagnóstico; e em situações de baixa nutrição do animal, a infecção acarreta a diminuição de peso, deficiência no crescimento de lã e posteriormente a morte (BESIER et al., 2016; MAVROT, HERTZBERG E TORGERSON, 2015). Devido ao fato de cada parasito adulto ingerir 30-50µL de sangue por dia, um animal com elevado número de parasitas pode fazê-lo perder grande volume sanguíneo diariamente, levando ao quadro de anemia profunda. Portanto, o principal sinal da infecção é o quadro anêmico, visto que as fezes se mantêm em sua aparência característica (apresentando-se diarreica apenas em casos de multiparasitismo), podendo apresentar melena devido à grande perda sanguínea intestinal (BESIER et al., 2016).

### 3.3. Os antiparasitários

Os compostos com potencial farmacológico seguem normativas em seu desenvolvimento para garantia do efeito clínico proposto, além de demonstrar potencial tóxico e impacto ambiental baixos. Para a classe de antiparasitários, o produto deve apresentar toxicidade no hospedeiro inferior à toxicidade no parasita, de maneira que a toxicidade para ambos não seja equivalente, porém sempre inclui risco ao hospedeiro (LYNN, 2006). A seguir, têm-se as classes de anti-helmínticos comumente utilizados para o tratamento de *H. contortus*.

Na classe dos benzimidazóis, temos para o tratamento de *H. contortus* em ovinos, as drogas: albendazol, fenbendazole e tiabendazole, sendo estas drogas de amplo espectro, com ação de inibição na divisão celular parasitária devido a sua ligação nas moléculas de tubulina, impedindo a formação de microtúbulos e ação de inibição da enzima fumarato-redutase, bloqueando a função mitocondrial, privando o parasito de energia (LANUSSE et al., 2018).

Quanto aos imidotiazóis, o primeiro dessa classe a ser desenvolvido foi o tetramisole, um composto racêmico de isômeros ópticos, onde apenas o levamisol (isômero L) apresenta potencial anti-helmíntico. O produto atua como agonista nicotínico do sistema neuromuscular, causando paralisia tônica e atuando também por interferência na enzima fumarato-redutase (LANUSSE et al., 2018).

Na classe das lactonas macrocíclicas, observam-se os antiparasitários mais eficazes e menos tóxicos desenvolvidos, produzidos por microrganismos

estreptomicetos e com ação nos canais de cloro glutamato-dependentes. Essa classe desencadeia o influxo de cloro, hiperpolarizando o neurônio do parasito, impedindo o desencadeamento e propagação dos impulsos, ocasionando em paralisia e morte dos parasitos. De todas as substâncias com potencial anti-helmíntico, caracterizadas como lactonas macrocíclicas (ou macrolactonas), as que apresentam efeito em *H. contortus* são a ivermectina, doramectina, abamectina e a moxidectina. Sendo a ivermectina a droga mais conhecida e utilizada na classe das macrolactonas (LANUSSE et al., 2018).

#### 3.4. A Ivermectina

Em seu histórico, a ivermectina foi a primeira macrolactona disponível comercialmente, que surgiu a partir de um isolado de *Streptomyces avermitilis*, com efeito tóxico em nematódeos e artrópodes. Utilizado na dose oral de 0,2 mg/kg em ovinos para o tratamento e controle de *Haemonchus* sp., *Teladorsagia* sp., *Cooperia* sp., *Oesophagostomum* sp., *Nematodirus* sp., *Dictyocaulus filaria* e *Oestrus ovis*. Descrita como alternativa para tratamento de populações de *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Ostertagia* com resistência aos benzimidazóis (LYNN, 2006; LANUSSE et al., 2018). Tal droga possui como sítio de ação o canal de Glutamato mediado por Cloro (GluCl), em que a mesma se liga no canal, realizando sua abertura e permitindo o influxo de íons de cloro. Estes por sua vez despolarizam a membrana celular impedindo a passagem do impulso nervoso (PORTILLO, JAGANNATHAN E WOLSTENHOLME, 2003).

#### 3.5. Resistência parasitária

Atualmente, o controle dos endoparasitos de pequenos ruminantes constitui um grande entrave aos sistemas produtivos. O panorama mundial é de resistência dos parasitas à maioria das classes de anti-helmínticos comercialmente disponíveis para o controle (BASSETTO E AMARANTE, 2015; ROOS et al., 1990; VERÍSSIMO et al., 2012). O uso inapropriado desses produtos, com curtos intervalos entre tratamentos, emprego de superdoses e mudanças constantes dos princípios ativos, são alguns dos fatores responsáveis por acelerar a seleção de populações parasitárias resistentes

(MOLENTO, 2009; NICIURA et al., 2012), gerando como resultado grandes perdas econômicas.

Isto demonstra a necessidade urgente de métodos alternativos para reduzir a carga parasitária dos animais e o número de larvas que contaminam o pasto. Recentemente, foram lançadas no mercado duas novas classes de anti-helmínticos – monepantel (KAMINSKY et al., 2008) e derquantel, este último em combinação com a abamectina (LITTLE et al., 2010), com novos mecanismos de ação. Porém apesar de serem drogas consideradas novas, já existem relatos de resistência e/ou diminuição de eficácia para ambas (BAGNALL et al., 2017; SALES E LOVE, 2016).

### 3.6. Mecanismos moleculares da resistência

Essa diminuição da eficácia dos tratamentos anti-helmínticos, se dá por mutações nos genes que codificam proteínas envolvidas no mecanismo de ação das drogas (HARDER, 2016; NICIURA, 2011). Como por exemplo a transversão T>A no códon 200 da sequência codificante de  $\beta$ -tubulina que impede a complexação dos benzimidazóis com as  $\beta$ -tubulinas, deixando-as livres para se dimerizarem com as  $\alpha$ -tubulinas e então formarem os microtúbulos, tornando os benzimidazóis ineficazes por não apresentarem o efeito esperado (HARDER, 2016).

Assim como polimorfismos na porção  $\alpha$  do canal GluCl, tornam o canal insensível à ivermectina, esta, por sua vez não realiza a abertura do canal de Glutamato mediado por Cloro. Permitindo a passagem do impulso nervoso pelas células do sistema nervoso do parasito que irá realizar suas contrações musculares normalmente (HARDER, 2016; NICIURA, 2011).

### 3.7. Seleção dos genes

Foram selecionados como alvos de silenciamento, genes conhecidamente codificantes de proteínas estruturais ( $\beta$ -tubulina e DIM-1), enzimas de vias bioquímicas de produção de energia (GDH e GAPDH) e porção do canal GluCl (*glc-5*). Conforme exploradas abaixo.

### 3.7.1. Canal GluCl

Em *H. contortus*, 4 subunidades foram encontradas nos canais GluCl, sendo elas HcGluCl $\alpha$ , HcGluCl $\beta$ , HcGluCl3A e HcGluCl3B. Todas as porções foram encontradas nas comissuras do sistema nervoso motor (HARDER, 2016; PORTILLO, JAGANNATHAN E WOLSTENHOLME, 2003). Dentre elas, a mutação na porção HcGluCl $\alpha$ , codificada pelo gene *glc-5* (BEECH et al., 2010), foi observada em isolados de *H. contortus* resistentes ao tratamento da IVM, enquanto substituições na porção HcGluCl3B também mostraram perda à sensibilidade ao tratamento, porém tais mutantes não foram até então encontrados no campo (KOTZE E PRICHARD, 2016).

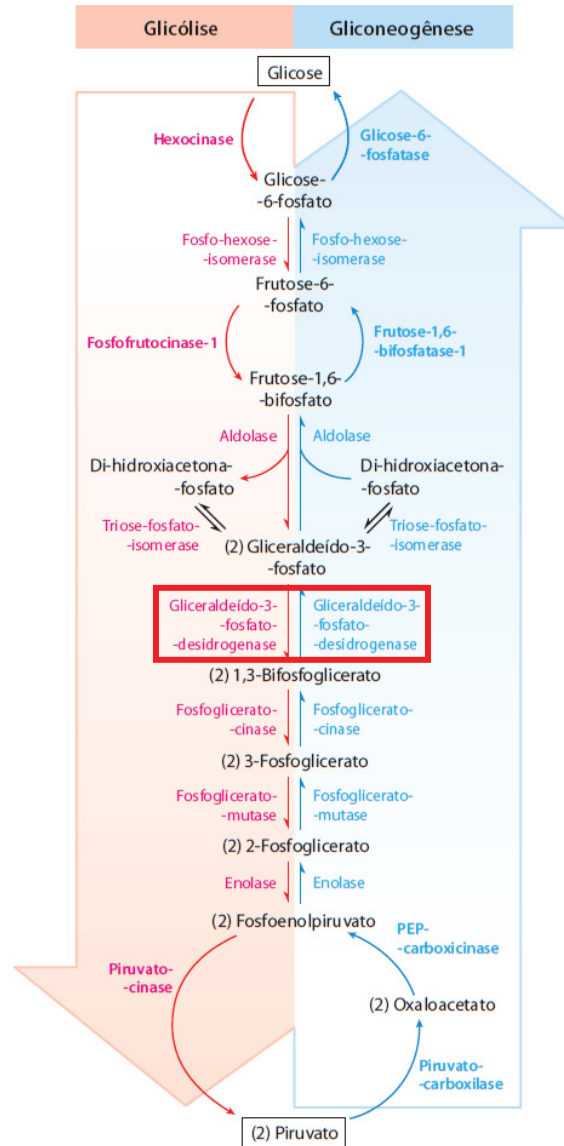
### 3.7.2. DIM-1

A proteína DIM-1, ou *Disorganized Muscle Protein*, é uma proteína pertencente a superfamília das imunoglobulinas, presente na membrana das células musculares e presente entre e ao redor dos corpos densos. A proteína realiza o ancoramento dos filamentos de actina na membrana celular e a estabilização dos componentes dos filamentos finos presentes no sarcômero da célula muscular. Sua ausência, ou seu *knockout* faz com que as células fiquem paralisadas e sem função, podendo inclusive causar seu rompimento (ROGALSKI et al., 2003). Esta característica tem sido explorada como alvo para novos tratamentos, como a produção de vacinas (YAN et al., 2013) e o silenciamento por RNAi (ARENAL et al., 2017).

### 3.7.3. GAPDH

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é de grande importância na via glicolítica, catalisando a fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato, na presença de fosfato inorgânico e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) (HAN et al., 2011; ZINSSER et al., 2014) (Figura 2). Apresentando-se, portanto, como um potencial alvo para o silenciamento, pois sua ausência impede o seguimento da via bioquímica. Que por sua vez não irá realizar a produção de piruvato ou glicose. A ausência de piruvato impedirá a produção de energia pelo Ciclo do Ácido Cítrico (Krebs).

FIGURA 2 - CICLOS DA GLICÓLISE E GLICONEOGÊNESE.



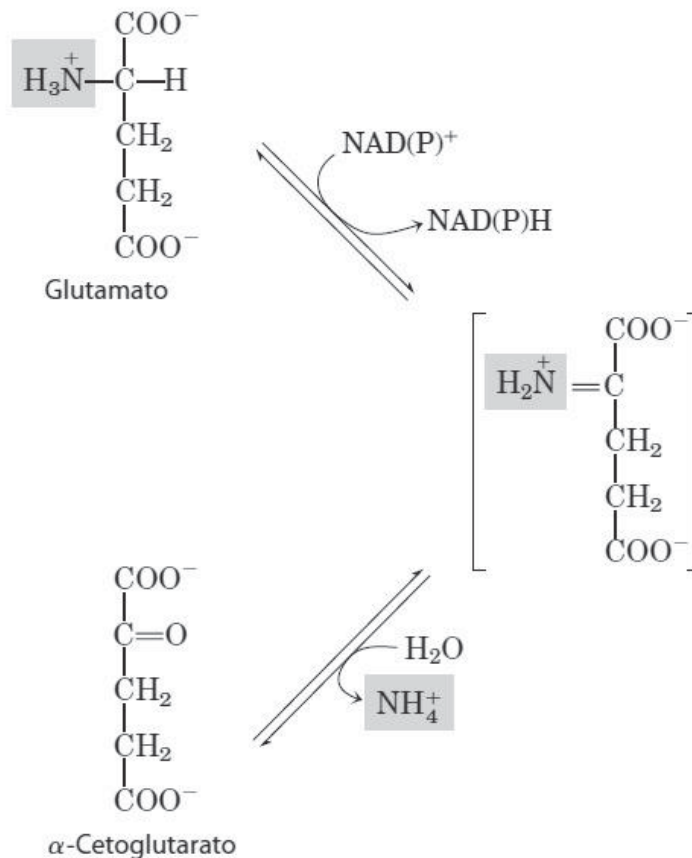
Fonte: NELSON; COX (2014).

### 3.7.4. GDH

A glutamato desidrogenase (GDH) é uma enzima de grande importância na via da desaminação oxidativa, em que ela realiza a conversão de glutamato na presença de  $\text{NAD}^+$  e  $\text{H}_2\text{O}$  em  $\alpha$ -cetogluturato,  $\text{NADH}$  e  $\text{NH}_4^+$ . Tendo o  $\alpha$ -cetogluturato, grande importância e participação no ciclo do Ácido Cítrico (Krebs) e na síntese de glicose.

Em meios com ausência de GDH, não se observa a produção de  $\text{NH}_4^+$ , podendo este ser um marcador da ação da GDH (MUHAMAD et al., 2011) (Figura 3).

FIGURA 3 - REAÇÃO CATALISADA PELA GLUTAMATO-DESIDROGENASE.



Fonte: NELSON; COX (2014).

### 3.7.5. $\beta$ -Tubulina

A  $\beta$ -tubulina é um dos componentes dos microtúbulos, estruturas celulares com diversas funções, e é também um dos alvos dos benzimidazóis. Entretanto, a  $\beta$ -tubulina possui resistência relatada, devido a mutação F200Y que impede a ligação do fármaco na estrutura, deixando-a livre para executar suas funções celulares (NICIURA et al., 2012).

### 3.8. Novas tecnologias para o controle parasitário

Diversos grupos ao redor do mundo trabalham com resistência parasitária e para isso diversas técnicas inovadoras são aplicadas para realizar o controle

parasitário e para contornar o fenômeno da resistência. Vários estudos já foram realizados com o objetivo de identificar proteínas imunogênicas de *H. contortus* e analisar seu potencial para induzir uma imunidade protetora (YAN et al., 2010).

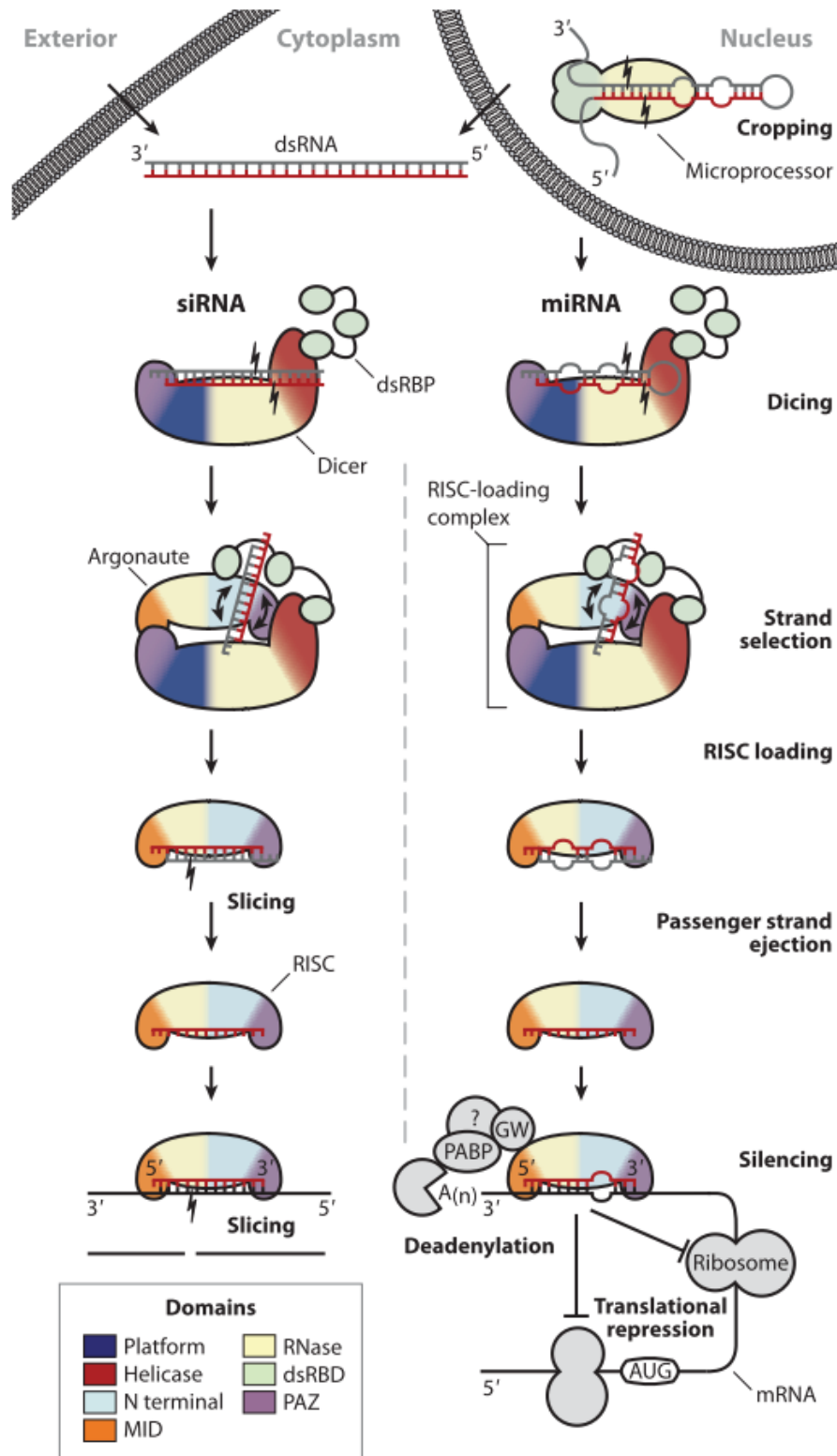
O silenciamento de genes com o emprego de RNAi é uma tecnologia com potencial uso no controle de *H. contortus*, tendo sua aplicabilidade já demonstrada *in vitro* em vários organismos como planárias (PINEDA et al., 2002), *Drosophila melanogaster* (CAPLEN et al., 2000), mamíferos (ELBASHIR et al., 2001), carcinoma de células escamosas orais de humanos (SUN et al., 2018) e diversos estudos em andamento relacionados ao HIV (SCARBOROUGH E GATIGNOL, 2018). Sua aplicação *in vitro* para *H. contortus* já foi testada para alguns genes (GELDHOF et al., 2006; SAMARASINGHE, KNOX E BRITTON, 2011; ZAWADZKI et al., 2012).

### 3.8.1. RNA de interferência (RNAi)

A tecnologia do RNAi é uma metodologia baseada no siRNA, moléculas de RNA de aproximadamente 20-25 pares de base que executam a regulação gênica para a expressão associada a proteínas (BRITTON et al., 2015). Através do processamento inicial pela enzima Dicer, que cliva as moléculas de dsRNA em fragmentos de aproximadamente 20-25 pares de base e então esses fragmentos passam para o complexo RISC, um complexo ribonucleoproteico composto por uma proteína Argonata. Complexo este que seleciona uma das fitas de RNA, com base no perfil termodinâmico da sequência, sendo a outra fita da dupla fita descartada. Ainda não se sabe se esta segunda fita possui alguma finalidade. O complexo RISC utiliza a fita de RNA selecionada como guia para localizar e clivar endonucleotidicamente os RNAm complementares à sequência, realizando o silenciamento da expressão da proteína codificada pelo RNAm (Figura 4) (BERNSTEIN et al., 2001; CARTHEW; SONTHEIMER, 2009; WILSON; DOUDNA, 2013).



FIGURA 4 - AS VIAS siRNA (ESQUERDA) E miRNA (DIREITA) DE INTERFERÊNCIA DE RNA.



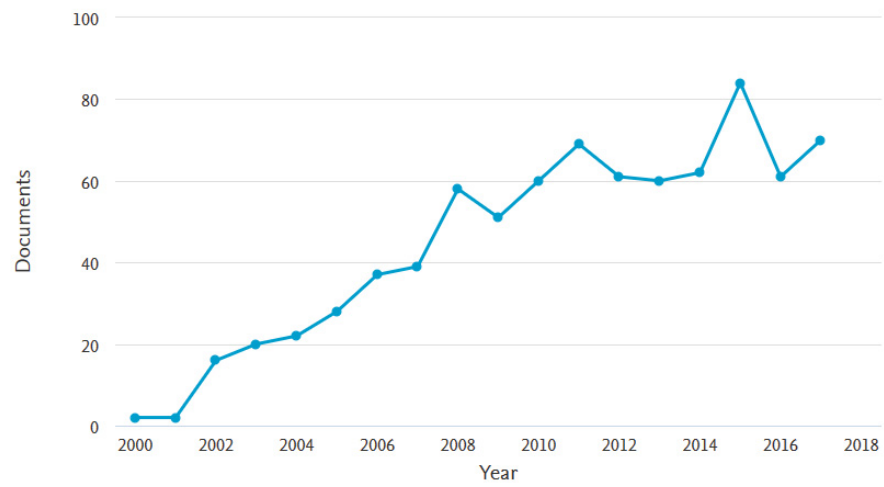
A arquitetura do domínio proteico é aproximada nas ilustrações aqui, e a coloração do domínio é mantida nas figuras subsequentes. Para maior clareza, um dsRBD foi omitido de cada uma das ilustrações do Dicer e do microprocessador. A via do siRNA (esquerda) começa com a clivagem de

dsRNA por Dicer de origem exógena ou nuclear. O siRNA duplex resultante é carregado em Argonata pelo complexo de carregamento RISC, que compreende Dicer, uma proteína dsRBP tal como TRBP, e uma proteína Argonata. A fita passageira (cinza) é clivada e ejetada. A fita guia (vermelho) permanece ligado ao Argonata, formando o RISC. O RISC se liga a sequências-alvo complementares (preto) e as silencia através da atividade de corte da Argonata. Na via do miRNA (direita), um transcrito primário de miRNA é cortado pelo complexo microprocessador, que consiste na endonuclease Drosha ligada a DGCR8. O pré-miRNA resultante é exportado para o citoplasma, onde o carregamento em cubos e RISC ocorre como na via do siRNA. A ejeção da fita passageira (cinza) pode ocorrer sem clivagem concomitante, e a fita guia (vermelho) impulsiona o silenciamento como parte do RISC maduro. Nos casos de um Argonata cataliticamente inativo ou complementaridade parcial com o alvo (preto), o silenciamento ocorre por meio de repressão traducional pré e pós-iniciação e de deanilação, seguida de degradação do RNAm. Fonte: WILSON e DOUDNA (2013).

TIMMONS & FIRE (1998) demonstraram pela primeira vez a aplicação de RNAi no nematódeo de vida livre *Caenorhabditis elegans* através do uso de cepa de *Escherichia coli*. Desde então, diversos estudos foram realizados empregando a técnica (ELBASHIR et al., 2001; PINEDA et al., 2002; SCARBOROUGH; GATIGNOL, 2018; SUN et al., 2018). Em nematoides, já foram descritas três metodologias de aplicação, sendo elas a (1) alimentação com *E. coli* (larvas alimentadas com cepas de *E. coli* expressando dsRNA em seu interior), (2) eletroporação (larvas em meio com dsRNA submetidos a choques elétricos para abertura de poros nas células do parasito e entrada das moléculas de dsRNA) e (3) *soaking* (larvas em meio com moléculas de dsRNA, tendo a entrada das moléculas nas células do parasito ocorrendo de modo espontâneo) (ZAWADZKI et al., 2012). Para *H. contortus* já foram realizados, por exemplo, estudos com identificação da presença de RNAi do parasito no tecido do hospedeiro (GU et al., 2017) e silenciamento de DIM-1 através da metodologia de *soaking* (ARENAL et al., 2017).

Entretanto, apesar de ser uma tecnologia promissora, o RNA de interferência ainda é pouco aplicado no meio acadêmico e científico da parasitologia. Tendo apenas 70 artigos publicados no ano de 2017 referente ao RNAi em parasitos, como se observa na Figura 5 (SCOPUS, 2018).

FIGURA 5 - ARTIGOS PUBLICADOS ENTRE OS ANOS DE 2000 E 2017 REFERENTES À RNAi E PARASITOS.



Dados de publicações internacionais referentes à parasitos e RNAi, entre os anos de 2000 e 2017. Dados de 2018 não foram apresentados por ainda ser o ano corrente. Fonte: SCOPUS, 2018.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo Geral

Utilizar a metodologia de interferência de RNA para o silenciamento dos genes *glc-5*, *DIM-1*, *GAPDH*, *GDH* e  $\beta$ -tubulina de *Haemonchus contortus*, resistente ao tratamento com ivermectina, em ensaios *in vitro*.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Produção e análise do DNAc dos genes.
- Verificar o potencial de silenciamento da proteína mutada (*glc-5*) através da exposição a ivermectina por 24 e 48 horas no teste de migração larvar.
- Verificar o potencial de silenciamento das proteínas estruturais e/ou essenciais através do teste de migração larvar em 24 e 48 horas.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas fezes de ovinos do Laboratório de Produção de Ovinos e Caprinos (LAPOC) – Fazenda Canguiri UFPR, para obtenção dos parasitos por meio de coprocultura, visto que o local apresenta histórico de resistência parasitária com 47% de eficácia em 2010, utilizando sua dose recomendada (CATELLI, et al. 2010). Além de *Haemonchus contortus* adultos gentilmente cedidos pelo LAPOC para obtenção de RNA. Os procedimentos de extração de RNA, RT-PCR e transformação de *E. coli* foram realizadas no Laboratório de Genômica Funcional de Parasitos, do Campus Politécnico, Setor de Ciências Biológicas do Departamento de Bioquímica, sob supervisão do Prof. Wanderson Duarte da Rocha; enquanto os processos de obtenção de larvas, alimentação dos parasitos e testes farmacológicos foram realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias, no Campus Agrárias, Setor de Ciências Agrárias do Departamento de Medicina Veterinária, sob supervisão do Prof. Marcelo Beltrão Molento. O projeto foi aprovado pelo CEUA-Agrárias sob protocolo número 086/2017 (Anexo I).

### 5.1. Extração de RNA total de *Haemonchus contortus*

O RNA total dos parasitos foi extraído utilizando TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, EUA) conforme instruções do fabricante. A extração foi realizada em triplicata, em que foi adicionado 200µL de TRIzol® em tubo Eppendorf de 0,5mL, juntamente com um parasito adulto, cedidos pelo Laboratório de Produção de Ovinos e Caprinos – LAPOC, em cada tubo. Os parasitos foram lisados com o auxílio de seringa de insulina com agulha, passando o conteúdo através da agulha e seringa por aproximadamente 35 vezes em cada replicata. Adicionou-se 50µL de clorofórmio e homogeneizou-se vigorosamente por 15 segundos. Os tubos foram incubados por 3 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugados por 15 minutos a 9520xG, a fase aquosa foi então passada para novo tubo e adicionou-se então 100µL de isopropanol 100%. Esse material foi incubado por 10 minutos a temperatura ambiente e então centrifugado por 20 minutos a 9520xG com temperatura igual a 4°C. O pellet obtido foi lavado duas vezes com 200µL de etanol 75% (em H<sub>2</sub>O DEPC) e centrifugado ainda com o etanol por 10 minutos a 3427xG com temperatura igual a 4°C. Os tubos

foram deixados no fluxo para a secagem e então o material foi ressuscitado em 40µL de H<sub>2</sub>O DEPC.

### 5.2. Quantificação de RNA

As amostras da extração de RNA foram quantificadas no NanoDrop One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, EUA), utilizando como branco, 1µL de H<sub>2</sub>O DEPC e considerando como válidas as amostras com A260/280 que apresentaram valores próximos a 2,00.

### 5.3. Desenho de oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos (*primers*) foram desenvolvidos com o *software* Vector NTI<sup>®</sup>, versão 7.01 com sequência de promotor T7. A sequência de bases dos genes *glc-5*, DIM-1, GAPDH, GDH e β-Tubulina de *H. contortus* foi obtida no GenBank, com os números de acesso AF076682.1, HQ444389.1, HM145749.2, GQ288402.1 e M76493.1 respectivamente. As sequências desenhadas são mostradas abaixo:

QUADRO 1 - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DOS *PRIMERS FOWARD* E *REVERSE* PARA CADA GENE TRABALHADO.

(continua)

Gene	Primer	Sequência	Fragmento (pb)
<i>glc-5</i>	<i>Foward</i>	5' – AAGCTAATACGACTCACTATAGGG ATGTTTCGCCTTGATTCTGCCATTTCTG – 3'	
	<i>Reverse1</i>	5' – AAGCTAATACGACTCACTATAGGG TTGACTGTAATGAATACTGGTTCACTATCG – 3'	207
	<i>Reverse2</i>	5' – AAGCTAATACGACTCACTATAGGG CGATGTCTTTCGTAGTATAGGCGTATG – 3'	577
DIM-1	<i>Foward</i>	5' – GGATCCTAATACGACTCACTATAGG AAGCAGGACTCTCGCTTCCAGTTCAAG – 3'	501
	<i>Reverse</i>	5' – GGATCCTAATACGACTCACTATAGG GGTTTTTCGTGTAATGTTCGGCGC – 3'	

QUADRO 1 - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DOS *PRIMERS FOWARD* E *REVERSE* PARA CADA GENE TRABALHADO.

(conclusão)

GAPDH	<i>Foward</i>	5' – GGATCCTAATACGACTCACTATAGGG CCACGAGACCTACAATGCAGCCAAC – 3'	322
	<i>Reverse</i>	5' – GGATCCTAATACGACTCACTATAGGG AACAGACACATCAGGCGTGGGTACA – 3'	
GDH	<i>Foward</i>	5' – GGATCCTAATACGACTCACTATAGGG TGAGCACAAAAGACAAGAAGAACCTC – 3'	402
	<i>Reverse</i>	5' – GGATCCTAATACGACTCACTATAGGG TGATATCAGGTGCTGGCACATCAACTC – 3'	
$\beta$ -Tubulina	<i>Foward</i>	5' – GGATCCTAATACGACTCACTATAGG AATGCTACCCTTTCCGTCCATC – 3'	262
	<i>Reverse</i>	5' – GGATCCTAATACGACTCACTATAGG CAAAACCGGGCATGAAGAAG – 3'	

Fonte: O Autor (2018).

O gene *glc-5* possui dois *primers* reverso, para que sejam produzidos dois fragmentos de tamanhos distintos e avaliar possível diferença de eficácia. Foi inserida sequência promotora de T7 RNA Polimerase, para que haja a síntese de RNAi pela enzima em cepas de *Escherichia coli* BL21.

#### 5.4. Síntese de DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado por meio de *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) com o emprego do *Kit SuperScriptIII OneStep RT-PCR System* com *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, EUA), em que foi adicionado em tubo Eppendorf de 0,2mL, contendo 25 $\mu$ L do mix de reação, 1 $\mu$ L de cada primer, 2 $\mu$ L de Platinum Taq Mix, 19 $\mu$ L de água Milli-Q DEPC, 2 $\mu$ L da amostra de extração de RNA e no controle negativo 2 $\mu$ L de água Milli-Q. Os tubos foram postos no termociclador com programação para 50°C por 20 minutos, 94°C por 2 minutos (1 ciclo); 94°C por 30 segundos, 60°C (*glc-5*) 62°C (DIM-1, GAPDH, GDH e  $\beta$ -Tubulina) por 30 segundos, 68°C por um minuto (40 ciclos); 68°C por 5 minutos e 10°C até a retirada.

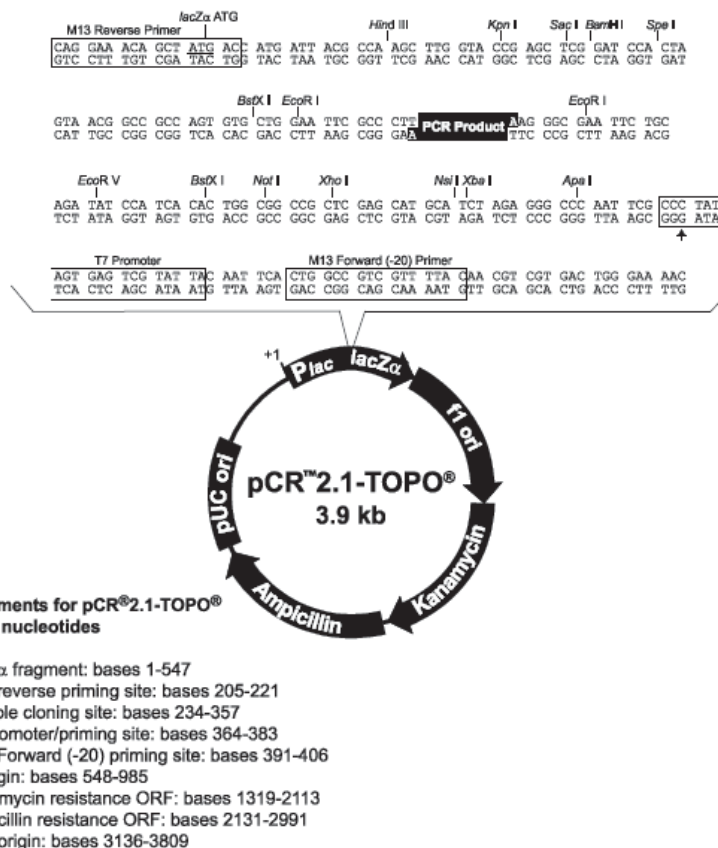
### 5.5. Amplificação do DNA in vitro

O DNA obtido 5.4. foi amplificado por PCR em que foi adicionado em tubo Eppendorf de 0,2mL; 47,1µL de SuperMix, 0,75µL de cada primer (10µM), 0,4µL de Taq, 1µL de amostra e no controle negativo 1µL de água Milli-Q. Os tubos foram então postos em termociclador seguindo programação de 94°C por 5 minutos (1 ciclo); 94°C por 1 minuto, 60°C (*glc-5*) 62°C (DIM-1, GAPDH, GDH e β-Tubulina) por 1 minuto, 72°C por 30 segundos (35 ciclos); 72°C por 10 minutos e 4°C até a retirada.

### 5.6. Clonagem do inserto

Foi utilizado o *Kit TOPO TA Cloning* (Invitrogen, Carlsbad, EUA) para inserção do produto de PCR no vetor plasmidial (Figura 6). Foi separado um tubo Eppendorf de 0,2mL para cada sequência trabalhada, sendo adicionado em cada tubo, 3µL do respectivo produto de PCR, 1µL de solução salina, 1,5µL de água e 0,5µL de vetor. Incubou-se por 30 minutos a 22°C.

FIGURA 6 - PLASMÍDEO DO KIT TOPO TA CLONING (INVITROGEN).





### 5.7. Produção de bactérias Quimiocompetentes

O volume de 10 $\mu$ L do concentrado de *E. coli* que estava armazenado a -20°C foi plaqueado em meio LA. A placa foi incubada por 12h (*overnight*) a 37°C. Posteriormente, uma das colônias foi selecionada e incubada *overnight* a 37°C em 5mL de meio LB (Anexo III). Após o crescimento, o material foi inoculado com 1mL da cultura líquida em Erlenmeyer com tampa contendo 100mL de meio LB. Este novo inóculo foi incubado a 37°C até apresentar D.O. a 600nm entre 0,4 e 0,6. A cultura foi centrifugada em tubos Falcon de 50mL, por 10 minutos a 4.000RPM. O pellet foi ressuscitado em 25 mL de CaCl<sub>2</sub> 100mM e incubado no gelo por 1h. Posteriormente, foi centrifugado por 10 minutos a 4.000RPM a 4°C. O pellet obtido foi ressuscitado em 2mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM em glicerol 15%. A suspensão foi aliqüotada em 100 $\mu$ L em tubos de 1,5mL e armazenada a -80°C até seu uso (SAMBROOK E RUSSEL, 2012).

### 5.8. Transformação em *E. coli* TOP10

Após a inserção do produto de PCR no vetor, foi realizada a transformação em *E. coli* TOP10 utilizando 4 $\mu$ L de plasmídeo e 100 $\mu$ L de concentrado de *E. coli*. Então, este material foi colocado em gelo por 30 minutos seguido de choque térmico de 42°C por 30 segundos e então posto novamente no gelo por 2 minutos. Foi então adicionado 250 $\mu$ L de meio LB ao produto da transformação para recuperação celular e então postas em agitador a 37°C por 1 hora. O produto foi plaqueado e então incubado *overnight* a 37°C (SAMBROOK E RUSSEL, 2012).

### 5.9. Preparação das placas

Foram preparadas placas de meio LA, sendo adicionado 20mL do meio LA, 16 $\mu$ L de X-gal (20mg/mL), 7 $\mu$ L de IPTG (0,8M), 30 $\mu$ L de estreptomicina (Sm) (80mg/mL) e 10 $\mu$ L de ampicilina (Amp) (200mg/mL) (Anexo IV) (SAMBROOK E RUSSEL, 2012).

### 5.10. Isolamento das colônias

Após o crescimento, as colônias brancas (Anexo V) foram divididas e metade da colônia foi isolada em outra placa de meio LA com X-gal, IPTG, Amp e Sm, e a outra metade foi posta em meio LB com Amp e Sm sob agitação constante (Anexo VI), para crescimento *overnight* (SAMBROOK E RUSSEL, 2012).

### 5.11. Miniprep

Após o crescimento, o meio LB foi centrifugado a 15000xG por 1 minuto e o pellet foi ressuscitado sutilmente com 200µL da solução P1 (Buffer de ressuspensão, TRIS, EDTA, RNase). Após essa ressuspensão, foi adicionado 200µL da solução P2 (NaOH 0,2M, SDS1%) e rapidamente adicionado 200µL da solução P3 (Acetato de Potássio 3M), sendo então centrifugado a 15000xG por 10 minutos. Após a centrifugação, o pellet foi descartado, e ao sobrenadante, foram adicionados 600µL de Clorofórmio-Álcool Isoamínico e então homogeneizado. Centrifugou-se a 15000xG por 10 minutos e descartou-se a fase inferior. Em novo tubo, foi adicionado 1mL de etanol absoluto a -20°C na fase superior, homogeneizando-se 10 vezes por inversão e centrifugou-se a 15000xG por 15 minutos. Após isso, o sobrenadante foi descartado e ao pellet foram adicionados 300µL de etanol 70%. Centrifugou-se a 15000xG por 3 minutos. Descartou-se o sobrenadante novamente, deixando-se o tubo invertido para a secagem por aproximadamente 10 minutos, adicionado 40µL de Água Milli-Q (SAMBROOK E RUSSEL, 2012).

### 5.12. PCR plasmidial

Foi realizada PCR com os plasmídeos utilizando o primer de cada gene, respeitando as temperaturas padronizadas previamente para a confirmação da presença do inserto nos vetores.

### 5.13. Quantificação de plasmídeos

As amostras de plasmídeo obtidas no item 5.11. foram quantificadas no NanoDrop One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific,

Waltham, EUA), utilizando como branco 1µL de H<sub>2</sub>O DEPC e considerando como válidas as amostras com A260/280 que apresentaram valores entre 1,80 e 2,20.

#### 5.14. Sequenciamento

Após a confirmação da presença dos insertos no item 5.12., foram selecionadas as amostras positivas e estas foram lavadas duas vezes com 300µL de etanol 70%, centrifugadas a 15.000xG por 10 minutos e ressuspendidas em 40µL de Água Milli-Q. As amostras foram então encaminhadas para a empresa WemSeq que realizou o sequenciamento 1x utilizando o par de *primer* M13, para eliminar as regiões iniciais e finais de baixa qualidade. Após o recebimento das sequências, elas foram analisadas no *software* MEGA<sup>®</sup> versão 7.0.18. e Vector NTI<sup>®</sup>, versão 7.01.

#### 5.15. Transformação em *E. coli* BL21 star (DE3)

A cepa de *E. coli* foi tornada competente conforme o item 5.7. e o DNA plasmidial obtido no item 5.11. foi submetido à transformação em *E. coli* BL21 para expressão do RNAs, seguindo os procedimentos descritos nos itens 5.8. a 5.12.

#### 5.16. Indução da Expressão Gênica

Foi utilizada a placa preparada no item 5.10 com cepas de *E. coli* BL21; desta placa foi retirada parte da colônia selecionada para cada fragmento e esta amostra foi posta em frasco Erlenmeyer de 150mL com 10mL de meio LB e 5µL de Amp, o frasco foi mantido em incubação *overnight* a 37°C, sob agitação constante (200RPM). O meio foi vertido em Erlenmeyer de 500mL, contendo 200mL de meio LB e 100µL de Amp (Anexo VII), mantido em agitação constante (200RPM) a 37°C até se observar D.O. igual a 0,4-0,6. Após atingir a densidade óptica recomendada, foi adicionado 200µL de IPTG a 1M. O produto foi mantido incubado a 30°C por pelo menos 5 horas sob agitação constante (200RPM). O caldo foi centrifugado em tubos Falcon de 50mL por 20 minutos a 3.000RPM. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em glicerol 30%, em água Milli-Q, e mantido a -20°C até seu uso no item 5.20. e 5.21. (SAMBROOK E RUSSEL, 2012).

### 5.17. Coleta de fezes

Foram coletadas amostras de fezes de cinco ovinos naturalmente infectados, diretamente da ampola retal, em brete de contenção, alocados no Laboratório de Produção de Ovinos e Caprinos (LAPOC), independente de sexo e idade. Local este com histórico de resistência parasitária. Preservando sempre o bem-estar animal, sendo a coleta realizada por Médico Veterinário.

### 5.18. Coprocultura e identificação de larvas L<sub>3</sub>

As amostras de fezes foram colocadas em frascos com vermiculite e borrifadas com água destilada por 10 dias para eclosão dos ovos. Foi então adicionada água morna ( $\pm 37^{\circ}\text{C}$ ) e feita a inversão dos frascos em placa de Petri para ocorrer a migração larvar das fezes para a água. A água coletada foi posta em copo de sedimentação para concentração das larvas. As larvas foram retiradas com pipeta Pasteur e armazenadas em  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  (Anexo II) (ROBERTS & O'SULLIVAN, 1950). Devido ao fato de ser comum o poliparasitismo nos ovinos, foi realizada a identificação larvar (Anexo IX e Anexo X) para determinação do percentual de prevalência de *H. contortus* (WYK, CABARET E MICHAEL, 2004). Esses dados foram compilados juntamente com os resultados do Teste de Migração Larvar para determinar a eficácia do silenciamento.

### 5.19. Desembainhamento

As larvas obtidas na coprocultura foram colocadas em hipoclorito de sódio 3% por 10 minutos e observadas a cada 60 segundos no microscópio óptico até que no mínimo 90% das larvas estivessem sem bainha (Anexo VIII). Elas foram então lavadas três vezes em água destilada (MOLENTO E PRICHARD, 2001).

### 5.20. Divisão de grupos para alimentação larvar

Para os testes com o gene *glc-5*, as larvas foram separadas em 4 grupos: *E. coli* com o fragmento 1 do GluCl em meio com IVM, *E. coli* com o fragmento 1 do GluCl em meio sem IVM, *E. coli* com o fragmento 2 do GluCl em meio com IVM, *E. coli* com o fragmento 2 do GluCl em meio sem IVM. Enquanto que para testes com os genes

DIM-1, GAPDH, GDH e  $\beta$ -tubulina, as larvas foram divididas em apenas um grupo para cada gene. Foram ainda criados os grupos de controle negativo, com apenas larvas; controle positivo, com larvas e nitroxinil 34% (Dovenix<sup>®</sup>) (Merial, Lyon, França); controle IVM, com larvas e ivermectina; controle *E. coli*, com larvas e cepas de *E. coli* BL21 sem qualquer inserto plasmidial; e também o grupo controle Tween, com apenas larvas (Tabela 1) (ZAWADZKI, et al. 2012).

### 5.21. Teste de migração larvar - TML

Após exposição de aproximadamente 200 larvas (quantificadas e padronizadas para o volume de 12  $\mu$ L) por aproximadamente 24 e 48h nos respectivos grupos de tratamento (Tabela 1) (Anexo XII), elas foram postas em aparato com malha de 25 $\mu$ m (Anexo XI) em poços de placas de 24 poços juntamente com mais 1mL de água destilada para auxílio na migração (Anexo XIII), foram então acondicionadas em estufa BOD, a 27°C por 24h. Após a passagem do tempo determinado, os aparatos da malha foram removidos dos poços e foi então realizada contagem das larvas migrantes (Anexo XIV) e realizou-se determinação dos percentuais de migração (DEMELEER et al., 2010).

TABELA 1 - DIVISÃO DOS GRUPOS DE TRATAMENTO E CONCENTRAÇÃO FINAL DAS SOLUÇÕES ADICIONADAS EM CADA POÇO PARA CADA GRUPO DISTINTO.

(continua)

Tratamento	Tween 80 (%)	Droga ( $\mu$ g/mL)	Bactérias (%)	Larvas (n aproximado)	Água q.s.p. (mL)
<i>Controle Negativo</i>	-	-	-	200	1
<i>Controle Nitroxinil</i>	2	6,80	-	200	1
<i>Controle IVM</i>	2	0,05	-	200	1
<i>Controle <u>E.</u> <u>coli</u></i>	-	-	0,50	200	1
<i>Controle Tween</i>	2	-	-	200	1
<i><math>\beta</math>-tubulina</i>	-	-	0,50	200	1
<i>DIM-1</i>	-	-	0,50	200	1

TABELA 1 - DIVISÃO DOS GRUPOS DE TRATAMENTO E CONCENTRAÇÃO FINAL DAS SOLUÇÕES ADICIONADAS EM CADA POÇO PARA CADA GRUPO DISTINTO.

						(conclusão)
<i>GAPDH</i>	-	-	0,50	200	1	
<i>GDH</i>	-	-	0,50	200	1	
<i>GluCIF1</i>	-	-	0,50	200	1	
<i>GluCIF1 + IVM</i>	2	0,05	0,50	200	1	
<i>GluCIF2</i>	-	-	0,50	200	1	
<i>GluCIF2 + IVM</i>	2	0,05	0,50	200	1	

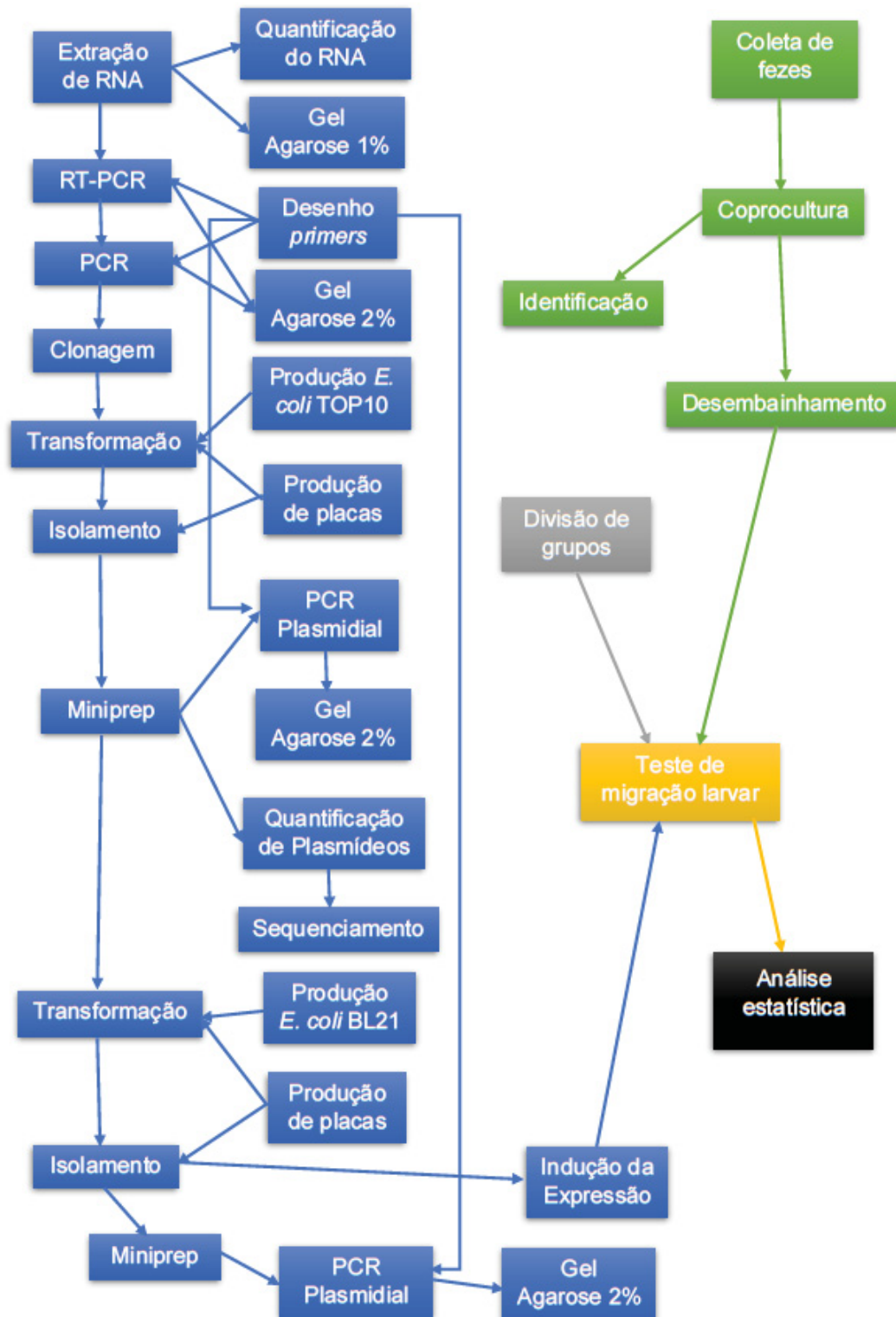
**C+**: controle positivo (Dovenix). **CIVM**: controle ivermectina. **CEco**: controle *E. coli*. **CTw**: controle Tween 80. **C-**: controle negativo. **GAPDH**: grupo teste com o fragmento do gene GAPDH.  **$\beta$ -Tub**: grupo teste com o fragmento do gene  $\beta$ -tubulina. **GDH**: grupo teste com o fragmento do gene GDH. **DIM-1**: grupo teste com o fragmento do gene DIM-1. **GluF1**: grupo teste com o fragmento 1 do gene *glc-5*. **GluF2**: grupo teste com o fragmento 2 do gene *glc-5*. **GluF1+IVM**: grupo teste com o fragmento 1 do gene *glc-5* e ivermectina. **GluF2+IVM**: grupo teste com o fragmento 2 do gene *glc-5* e ivermectina. Fonte: O Autor (2018).

## 5.2. Análise estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas através da média da quadriplicata de cada grupo, foram realizadas a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Essas análises foram realizadas pelo programa estatístico Statgraphics 4.2.

### 5.3. Desenho experimental

FIGURA 7 - DESENHO EXPERIMENTAL DAS ETAPAS DA METODOLOGIA.



Via azul representa a etapa de Biologia Molecular. Via verde representa a etapa de Produção de Parasitos. Fonte: O Autor (2018).

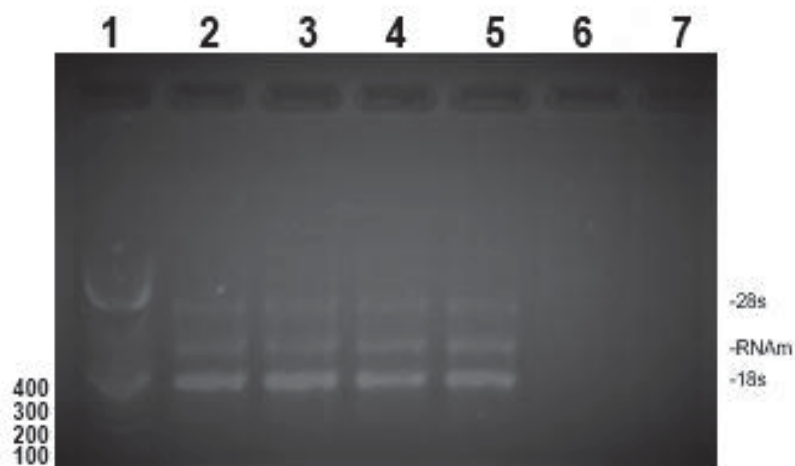
## 6. RESULTADOS

Antes de serem iniciados os experimentos, foi realizado BlastN e os amplicons gerados a partir dos genes GDH, GAPDH, DIM-1,  $\beta$ -tubulina e *glc-5* de *H. contortus* não apresentaram homologia significativa com as espécies *Homo sapiens*, *Ovis aries*, *Bos taurus*, *Sus spp.*, *Gallus gallus* e família Equidae. O BlastN foi realizado também para analisar os amplicons com as espécies de *Cooperia sp.*, *Chabertia sp.*, *Trichostrongylus sp.* e *Ostertagia sp.*, observando homologia significativa apenas para os genes  $\beta$ -tubulina e para o fragmento 2 do gene *glc-5* (Anexo XV). Foi realizado o alinhamento dos genes que apresentaram homologia com as sequências que eram de espécies diferentes e com melhores percentuais de semelhança. Utilizando o software MEGA<sup>®</sup> versão 7.0.18., ferramenta ClustalW (Anexos XVI e XVII).

### 6.1. Quantificação de RNA

As amostras da extração de RNA quantificadas no NanoDrop One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer, apresentaram valores de 85,0; 64,4 e 42,5 ng/ $\mu$ L, com A260/280 igual a  $1,97 \pm 0,02$  e seu gel é apresentado na Figura 8.

FIGURA 8 - GEL DE AGAROSE 1% DAS AMOSTRAS DE EXTRAÇÃO DE RNA.



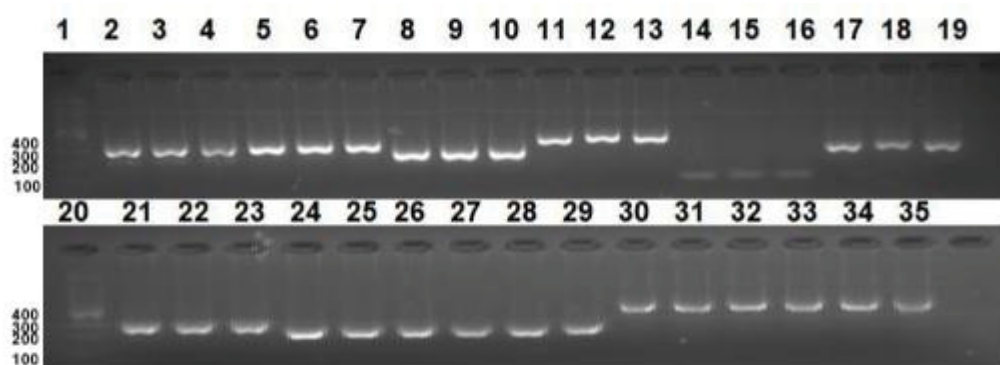
Tendo 3 amostras de extração, nomeadas A1 (poços 2 e 3), A2 (poços 4 e 5) e A3 (poços 6 e 7), aplicadas em dois poços diferentes no gel. Sendo observadas três bandas nas amostras A1 e A2, referentes ao RNA 28s, RNAm e 18s. A amostra A3 não apresentou bandas. Marcador de peso molecular: poço 1. Fonte: O Autor (2018).



### 6.2. Plasmídeos obtidos pela *E. coli* TOP10

Foram selecionadas e quantificadas no NanoDrop One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer as amostras GDH 2, GAPDH 2, DIM-1 1,  $\beta$ -tubulina 2, GluCIF1 2 e GluCIF2 1, obtendo os valores de 528,1; 1390,1; 536,6; 467,3; 1332,3 e 693,5 ng/ $\mu$ L, respectivamente. Todas apresentaram valor médio de A260/280 igual a  $2,00 \pm 0,10$  e seu gel pós PCR é visualizado na Figura 9. A amostra GAPDH 1 não está presente pois foi descartada por se apresentar azul (não possuía inserto no vetor, então houve produção de beta-galactosidase por alfa complementação) após o isolamento da colônia.

FIGURA 9 - GEL DE AGAROSE 2% DAS AMOSTRAS DE PLASMÍDEO OBTIDAS DAS CEPAS DE *E. coli* TOP10 E ENTÃO AMPLIFICADAS COM O PAR DE PRIMER ESPECÍFICO PARA CADA SEQUÊNCIA.



Cada três poços são referentes a uma colônia retirada da placa de meio LA, sendo nomeadas com o nome do respectivo gene e seguidas do número da colônia. **GDH** (poços 2, 3, 4, 5, 6 e 7): 450 pares de base. **GAPDH** (poços 8, 9 e 10): 372 pares de base. **DIM-1** (poços 11, 12, 13, 14, 15 e 16): 553 pares de base.  **$\beta$ -tubulina** (poços 17, 18, 19, 21, 22 e 23): 312 pares de base. **GluCIF1** (poços 24, 25, 26, 27, 28 e 29): 254 pares de base. **GluCIF2** (poços 30, 31, 32, 33, 34 e 35): 625 pares de base. Marcador de peso molecular: poços 1 e 20. Fonte: O Autor (2018).

### 6.3. Sequenciamento

Nos dados de sequenciamento 1x, o primer utilizado se apresenta em itálico, a região promotora do RNA T7 Polimerase está em itálico e sublinhada, os códons com mutação são marcados por sublinhado estando a base nitrogenada trocada em negrito.

### 6.3.1. GDH

A sequência obtida para o gene da GDH de *H. contortus* foi a seguinte:

5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGTGAGCACAAAAGACAAGAAGAACCTCG  
 TCAGCGGTATTCTGAAAGCGATCAAGCCCGTCAACAAGGTTCCGTACATCACTT  
 TCCCAATTCGACGTGATAATGGCGAATTTGAAGTGATTGAAGCATGGCGTGCTC  
 AGCACTCTGAGCACCGAACACCCACAAAAGGTGGTATCCGTTACTCAATGGATG  
ICTGTGAAGATGAGGTCAAAGCCTTGTCTGCTCTGATGACATACAAATGTGCTG  
CTGTTGATGTACCATTTGGTGGAGCTAAAGGAGGCGTCAAGATCGACCCCAAAC  
 AATATACTGACTATGAAATTGAGAAGATCACCCGTCGTATTGCTATCGAATTCGC  
 TAAGAAGGGATTCTTGGGCCCGGAGTTGATGTGCCAGCACCTGATATCCTATA  
GTGAGTCGTATTAGGATCC-3'

Nesta sequência foram encontradas quatro Transições Silenciosas (135, 154, 164 e 200), uma Transversão Silenciosa (152) e uma Transição Neutra (L95P). É observada na sequência um códon marcado sombreado em cinza, representando a transição neutra, ou transição onde há alteração do aminoácido codificado, sendo este do mesmo grupamento químico do aminoácido original. A sequência foi depositada no GenBank e possui código de acesso MK112678.

### 6.3.2. GAPDH

A sequência obtida para o gene da GAPDH de *H. contortus* foi a seguinte:

5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCCACGAGACCTACAATGCAGCCAACAA  
 CCATATTATCAGTAACGCTTCATGTACCACCAACTGTCTCGCTCCTTTGGCTAAG  
 GTCATTAATGACAACTTCGGAATCATCGAAGGACTGATGCAACCGTACATGCA  
 ACTACTGCTACACAGAAGACTGTCGATGGACCTTCTGGAAAAGTGTGGCGTGAT  
GGTCGTGGTGCTGCTCAGAATATCATTCCAGCTTCTACCGGTGCAGCTAAGGCT  
 GTCGGTAAGGTTATTCCCACCCTGAACGGCAAGCTCACTGGAATGGCTTTCCGT  
GTACCCACGCCTGATGTGTCTGTTCTATAGTGAGTCGTATTAGGATCC-3'

Nesta sequência foram encontradas duas Transversões Silenciosas (182, 205) e uma Transição Silenciosa (221). A sequência foi depositada no GenBank e possui código de acesso MK112679.

### 6.3.3. DIM-1

A sequência obtida para o gene da DIM-1 de *H. contortus* foi a seguinte:

5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAAGCAGGACTCTCGCTTCCAGTTCAAG  
 CTAGACTCCAAGGGAAATGATTCATACTCTGCGATTCTACAGATTAAGGATCTCG  
 CTGACAGTGATGCAGGAGGTTATCGCTGTGCCATTGTCAACCCTCATGGAAAAG  
 GAAATGCCAACTTCAATCTGAAGCTCACTGGTTTTTCTCTCCGACTTTCGTGGA  
 GAAGCCTCAAATATCATCACGAGATGACGGTCAGGTTATGGTTATGGAGTTCCG  
 AGCAAAGTCTATCTTGAAACCCACGTTTGTCTGGCACAAAGGAGACGAAATCGT  
 GGCGCAGTCCGACCGTGTGAATATCGTTCTAAGGGAGGAGGCTAACCAGATCT  
 ACTATGCTGCGCTGGAAATCAAGGAGCCTACGAAAGAAAAGGATGCTGGACAG  
 TTTATATGCACAGCTAAAAATGACTCTGGAAAGCTTACGGCTACATTTACCGTGA  
 AATTTGAAGTTCCTCAAGGTGCGCCGACATTTACACGAAAACCCCTATAGTGAG  
TCGTATTAGGATCC-3'

Nesta sequência foram encontradas duas Transições Silenciosas (58, 98). A sequência foi depositada no GenBank e possui código de acesso MK112680.

### 6.3.4. $\beta$ -Tubulina

A sequência obtida para o gene da  $\beta$ -Tubulina de *H. contortus* foi a seguinte:

5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAATGCTACCCTTTCGGTCCATCAATTGG  
 TAGAGAACACCGATGAAACATACTGTTATTGACAACGAAGCTCTGTATGATATCTG  
 CTTCCGCACTTTGAAACTCACAAATCCAACCTATGGAGATCTCAACCACCTTGTG  
 TCTGTACAATGTCTGGAGTCACGACCTGCCTCCGATTCCCTGGACAGCTGAAT  
 GCTGATCTTCGCAAGTTAGCCGTGAACATGGTTCCATTCCCTCGTCTTCACTTCT  
TCATGCCCGGTTTTGCCTATAGTGAGTCGTATTAGGATCC-3'

Nesta sequência foram encontradas duas Transições Silenciosas (192, 240), uma Transversão Silenciosa (235) e uma Transversão Neutra (F200Y). É observado um códon marcado em sombreado cinza na sequência, indicando a transversão neutra, ou transversão onde há alteração do aminoácido codificado, porém este pertence ao mesmo grupamento químico do aminoácido original. A sequência foi depositada no GenBank e possui código de acesso MK112681.

### 6.3.5. Canal de Glutamato Mediado por Cloro

As sequências obtidas para o gene *glc-5* de *H. contortus* foram as seguintes:

### 6.3.5.1. *GluCI F1*

5'-AAGCTAATACGACTCACTATAGGGATGTTCGCCTTGATTCTGCCATTTCTGTT  
 GCATTTACGCGGTCCGAAGGTTTTGGTTACGAGAAGCTATTGGATGAGCAGAA  
 AATTATCAAGCATCTATTGGAAAGTCCCTATAGCGATTACGATTGGCGGGTTCGT  
 CCCCGTGGTTCGTCTTGGTCCCGCTGACGACGACGATTACGATAGTGAACCAGT  
 ATTCATTACAGTCAACCCTATAGTGAGTCGTATTAGCTT-3'

Nesta sequência foram encontradas três Transições Silenciosas (25, 31, 51). A sequência foi depositada no GenBank e possui código de acesso MK112682.

### 6.3.5.2. *GluCI F2*

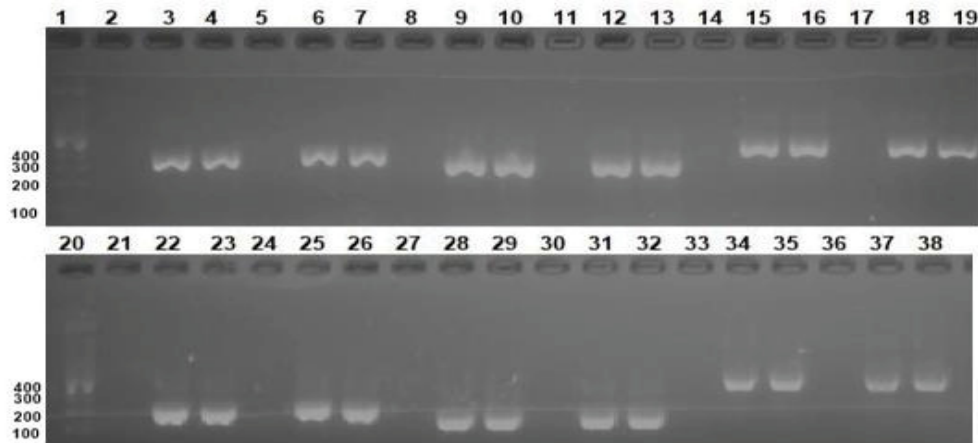
5'-AAGCTAATACGACTCACTATAGGGATGTTCGCCTTGATTCTGCCATTTCTGTT  
 GCATTTACGCGGTCCGAAGGTTCTAGTTACGAGAAGCTATTGGATGAGCAGAA  
 AATTATCAAGCATCTATTGGAAAGTCCCTATAGCGATTACGATTGGCGGGTTCGT  
 CCCCGTGGTTCGTCTTGGTCCCGCTGACGACGACGATTACGATAGTGAACCAGT  
 ATTCATTACAGTCAACATGTAAGGAGTATACTAAAGTCGATGATGTTAAT  
 ATGGAGTATCCGTTGCACTTCACATTTGAGAAAGAATGGATTGACGAAAGGCTG  
 TATTTCAATAGCCCGACGTTGAAACATATTGTGCTGTCACCTGGACAACGAATCT  
 GGGTGCCCGACACCTTCTCCAGAATGAGAAAGATGGCAAGAAACATGACATCG  
 AACTCCGAATATTCTAATTCGGATACATAATGGCACAGGAAAGATTCTTTATTCA  
 TGTCGGCTTACTTTGACCCTGAGCTGTCCAATGAGGTTGGCCGATTATCCGCTT  
 GATGTACAGACATGTGTAGTGGATTTGCTTCATACGCCTATACTACGAAAGACA  
 TCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAGCTT-3'

Nesta sequência foram encontradas cinco Transições Silenciosas (25, 31, 89, 98, 105), três Transversões Silenciosas (51, 75, 123) e três Transições Missense (F18S, G19S, S86A). É observada na sequência, três diferentes códons marcados em sombreado cinza, indicando as transições missense, ou transições onde há a alteração de aminoácido codificado, sendo este de grupamento químico distinto do aminoácido original. A sequência foi depositada no GenBank e possui código de acesso MK112683.

## 6.4. *Plasmídeos obtidos pela E. coli BL21*

Após realização da miniprep, as amostras de DNA plasmidial foram submetidas a PCR, respeitando as temperaturas previamente padronizadas para cada par de primer. O gel das amostras é visto na Figura 10.

FIGURA 10 - GEL DE AGAROSE 2% DAS AMOSTRAS DE PLASMÍDEO OBTIDAS DAS CEPAS DE *E. coli* BL21 E ENTÃO AMPLIFICADAS COM O PAR DE *PRIMER* ESPECÍFICO PARA CADA SEQUÊNCIA.

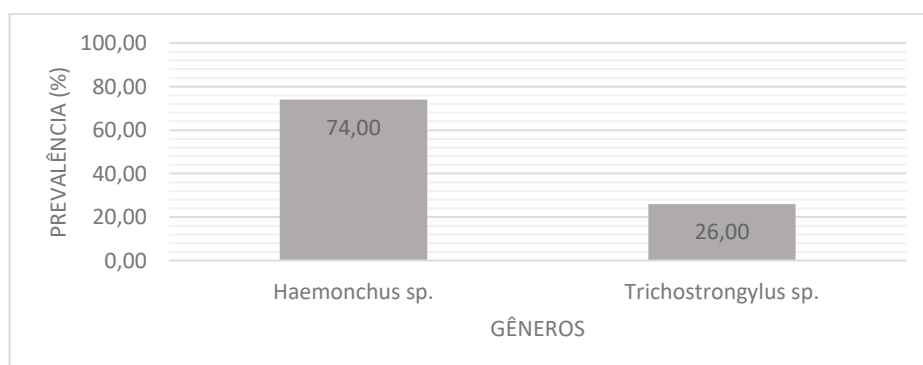


Cada dois poços são referentes a uma colônia retirada da placa de meio LA, sendo nomeadas com o nome do respectivo gene e seguidas do número da colônia. Antes de cada amostra é observado um poço “vazio” (poços 2, 5, 8, 11, 14, 17, 21, 24, 27, 30, 33 e 36), onde foi aplicado o controle negativo da reação de PCR. **GDH** (poços 3, 4, 6 e 7): 450 pares de base. **GAPDH** (poços 9, 10, 12 e 13): 372 pares de base. **DIM-1** (poços 15, 16, 18 e 19): 553 pares de base.  **$\beta$ -tubulina** (poços 22, 23, 25 e 26): 312 pares de base. **GluC1F1** (poços 28, 29, 31 e 32): 254 pares de base. **GluC1F2** (poços 34, 35, 37 e 38): 625 pares de base. Marcador de peso molecular: poços 1 e 20. Fonte: O Autor (2018).

### 6.5. Identificação larvar

Foram identificadas a partir da coprocultura, 300 larvas L<sub>3</sub>, observando em média 74,00% de presença de *Haemonchus* sp. e 26,00% de presença de *Trichostrongylus* sp., nenhum outro gênero foi identificado na cultura, conforme é possível observar na Figura 11.

FIGURA 11 - PERCENTUAL DE PREVALÊNCIA DOS GÊNEROS DE PARASITOS IDENTIFICADOS NA COPROCULTURA.



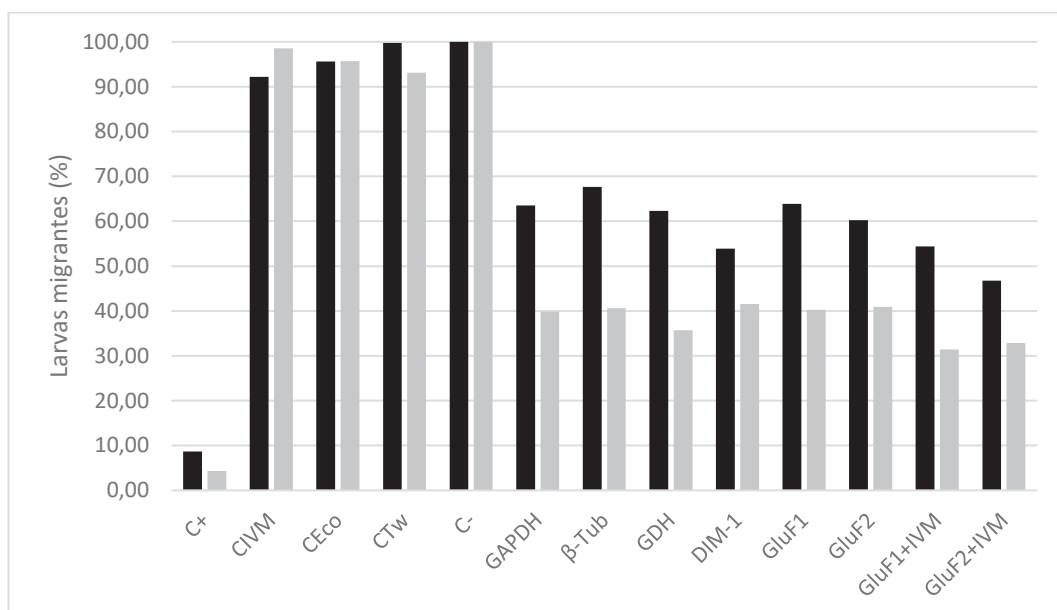
Fonte: O Autor (2018).

### 6.6. Teste de Migração Larvar - TML

Os resultados do TML são apresentados na Figura 12, em que se observa diminuição do percentual de larvas migrantes no tempo de 24h e diminuição ainda mais acentuada após 48h para todos os genes trabalhados. O grupo controle negativo apresentou elevado percentual de migração. O grupo controle positivo apresentou baixos índices de migração, conforme esperado.

Nos testes utilizando a ivermectina, a IVM sozinha apresentou eficácia de 8 e 5,1%, o grupo GluF1 apresentou 36,25 e 61,25%, o grupo GluF2 apresentou 39,87 e 60,62%, enquanto que o grupo GluF1+IVM apresentou 45,75 e 69,75% e o grupo GluF2+IVM apresentou 53,37 e 68,37%, nos tempos de 24 e 48 horas respectivamente.

FIGURA 12 - PERCENTUAL DE MIGRAÇÃO DAS LARVAS CONTADOS APÓS O TEMPO DE EXPOSIÇÃO DE 24 (COLUNAS PRETAS) E 48 H (COLUNAS CINZAS) PARA CADA GRUPO DE TRATAMENTO.



**C+**: controle positivo (Dovenix); **CIVM**: controle ivermectina; **CEco**: controle *E. coli*; **CTw**: controle Tween 80; **C-**: controle negativo; **GAPDH**: grupo com o fragmento do gene GAPDH;  **$\beta$ -Tub**: grupo com o fragmento do gene  $\beta$ -tubulina; **GDH**: grupo com o fragmento do gene GDH; **DIM-1**: grupo com o fragmento do gene DIM-1; **GluF1**: grupo com o fragmento 1 do gene *glc-5*; **GluF2**: grupo com o fragmento 2 do gene *glc-5*; **GluF1+IVM**: grupo com o fragmento 1 do gene *glc-5* e ivermectina; **GluF2+IVM**: grupo com o fragmento 2 do gene *glc-5* e ivermectina. Fonte: O Autor (2018).

Os resultados do TML foram avaliados quanto à sua homogeneidade e diferença significativa, sendo separados em grupos de letras minúsculas e maiúsculas, conforme se observa na Tabela 2. Os tratamentos apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparados com os valores obtidos nos grupos controle. O grupo GluF2+IVM apresentou diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado aos demais grupos testados. Na avaliação intragrupo, os grupos controle não apresentaram diferença significativa; enquanto que os grupos teste apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ), sugerindo então que o tempo de exposição interferiu positivamente na eficiência da técnica. Os valores de  $p$  estão tabulados no Anexo XVI.

TABELA 2 - VALORES DE MÉDIA DE MIGRAÇÃO DE LARVAS E DESVIO PADRÃO PARA CADA GRUPO TRATAMENTO NOS TEMPOS 24 E 48H, SEGUIDO DE COMPARAÇÃO DE DIFERENÇA ESTATÍSTICA EM SOBRESCRITO.

GRUPO	24h	48h
C+	17,25 ( $\pm 7,27$ ) <sup>aA</sup>	8,25 ( $\pm 4,99$ ) <sup>aA</sup>
C <sub>IVM</sub>	184,00 ( $\pm 10,95$ ) <sup>dA</sup>	189,75 ( $\pm 5,12$ ) <sup>cA</sup>
CEco	190,75 ( $\pm 16,11$ ) <sup>dA</sup>	184,25 ( $\pm 11,21$ ) <sup>cA</sup>
C <sub>Tw</sub>	199,00 ( $\pm 11,20$ ) <sup>dA</sup>	179,25 ( $\pm 6,18$ ) <sup>cB</sup>
C-	199,50 ( $\pm 4,12$ ) <sup>dA</sup>	192,50 ( $\pm 4,20$ ) <sup>cA</sup>
GAPDH	126,75 ( $\pm 7,14$ ) <sup>cA</sup>	76,75 ( $\pm 16,66$ ) <sup>bB</sup>
$\beta$ -Tub	135,00 ( $\pm 21,74$ ) <sup>cA</sup>	78,25 ( $\pm 14,91$ ) <sup>bB</sup>
GDH	124,25 ( $\pm 6,13$ ) <sup>cA</sup>	68,75 ( $\pm 11,44$ ) <sup>bB</sup>
DIM-1	107,50 ( $\pm 15,35$ ) <sup>bcA</sup>	80,00 ( $\pm 6,98$ ) <sup>bB</sup>
GluF1	127,50 ( $\pm 12,01$ ) <sup>cA</sup>	77,50 ( $\pm 19,36$ ) <sup>bB</sup>
GluF2	120,25 ( $\pm 2,06$ ) <sup>bcA</sup>	78,75 ( $\pm 23,04$ ) <sup>bB</sup>
GluF1+IVM	108,50 ( $\pm 13,40$ ) <sup>bcA</sup>	60,50 ( $\pm 8,81$ ) <sup>bB</sup>
GluF2+IVM	93,25 ( $\pm 10,24$ ) <sup>bA</sup>	63,25 ( $\pm 11,41$ ) <sup>bB</sup>

\*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste estatístico de Tukey. \*Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey. \*Grupos: **C+**: controle positivo (Dovenix). **CIVM**: controle ivermectina. **CEco**: controle *E. coli*. **CTw**: controle Tween 80. **C-**: controle negativo. **GAPDH**: grupo com o fragmento do gene GAPDH.  **$\beta$ -Tub**: grupo com o fragmento do gene  $\beta$ -tubulina. **GDH**: grupo com o fragmento do gene GDH. **DIM-1**: grupo com o fragmento do gene DIM-1. **GluF1**: grupo com o fragmento 1 do gene *glc-5*. **GluF2**: grupo com o fragmento 2 do gene *glc-5*. **GluF1+IVM**: grupo com o fragmento 1 do gene

*glc-5* e ivermectina. **GluF2+IVM**: grupo com o fragmento 2 do gene *glc-5* e ivermectina. Fonte: O autor (2018).

Ao analisar o tempo de 24h, se observa que o grupo GluF2+IVM teve diferença significativa em relação aos demais grupos, sugerindo um efeito sinérgico da ivermectina com o RNAi, porém tal efeito não foi observado no tempo de 48 h, em que houve um pareamento dos valores obtidos nos grupos teste. Este fato pode ter sido decorrente do efeito máximo (após 24h) nas larvas de *H. contortus*.

Ao se avaliar os grupos do gene *glc-5*, relacionado à ivermectina, tem-se que a IVM sozinha teve uma eficácia significativamente menor do que o GluF1 e GluF2 sozinhos e quando combinados com IVM. GluF1 não apresentou diferença contra GluF1+IVM e nem GluF2 teve diferença com GluF2+IVM nos mesmos tempos de incubação. Entretanto, houve um efeito aditivo positivo entre GluF1 e GluF1+IVM, assim como F2 e +IVM.

O tempo de incubação de 48h revelou aumento de aproximadamente 10 a 15% para F1 e F2, apresentando um efeito aditivo positivo. Embora o período de incubação de 24h tenha demonstrado menor efeito no tratamento isolado de F1 e F2, o efeito da associação foi superior ao período de 48h no TML.



## 7. DISCUSSÃO

Nosso estudo buscou através da aplicação da técnica de RNAi, encontrar uma alternativa biotecnológica para o controle parasitário de pequenos ruminantes. Com o intuito de futuramente realizar a produção de um pro-biótico com potencial anti-helmíntico. Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que a aplicação de silenciamento por RNAi via *E. coli* em *H. contortus* possui efeito positivo. Apresentando significativo percentual de redução no valor de migração de larvas.

A concentração de RNA total obtidos pela extração se apresentam semelhantes aos obtidos na extração de RNA do organismo *Paracentrotus lividus* realizada por RUOCCO et al. (2017), apesar de se tratar de organismos distintos, apresentaram concentrações finais de RNA e valores de A260/280 próximos após extração com TRIzol®.

A alteração F200Y no gene da  $\beta$ -tubulina de *H. contortus* já havia sido previamente descrita por NICIURA et al. (2012), que associaram tal alteração à resistência aos benzimidazóis, mostrando então que essa é uma mutação já espalhada pelas populações de *H. contortus* no Brasil. FORRESTER et al. (1999) descreveram diversas alterações no gene *glc-5* associando-as com a resistência à IVM. Entretanto, nós descrevemos as mutações F18S, G19S e S86A como novas mutações em populações de *H. contortus* resistente à IVM, e, possivelmente associadas a um maior nível de resistência, conforme constatado no TML. As mutações encontradas nos genes *glc-5*, DIM-1, GDH e GAPDH não foram até então descritas por outros autores, sendo este seu primeiro relato.

Nosso estudo utilizou 0,05 $\mu$ g/mL de IVM nos grupos com a droga. DOLINSKÁ et al. (2013) estabeleceram como DL50 da IVM em seu estudo com larvas de *H. contortus* susceptíveis ao tratamento, o valor de 0,002 $\mu$ g/mL e BELEW et al. (2012) em estudo com ovos de *H. contortus*, obtiveram uma DL50 da IVM igual a 0,03 $\mu$ g/mL. Isso demonstra a resistência estabelecida na população utilizada no teste do estudo aqui apresentado, em que a dose utilizada não apresentou efeito, enquanto que outros estudos obtiveram efeito de 50% com doses menores. O uso do Dovenix (6,8  $\mu$ g/mL) apresentou eficácia de aproximadamente 92%, sendo esta dose três vezes maior à obtida como DL50 (2,17 $\mu$ g/mL) por DOLENGA, C. J. R. (dados não publicados).

A identificação larvar indicou presença exclusiva dos gêneros *Haemonchus* e *Trichostrongylus*, sendo estes apresentados nos estudos de TRAMBOO et al. (2015) e FERREIRA et al. (2017) como os mais prevalentes em praticamente todas as épocas do ano, tendo o *H. contortus* prevalência de até 71,66% no estudo de FERREIRA et al. (2017) em região semiárida e 55% no estudo de TRAMBOO et al. (2015) na Índia. Observando-se também resistência do *Trichostrongylus* sp. à ivermectina, devido baixo nível de migração das larvas de cultura mista no grupo Controle IVM, que conforme SILVA, et al. (2018) já havia apresentado a resistência do *Trichostrongylus* sp. a esse anti-helmíntico.

Diversos estudos têm demonstrado alteração fenotípica em parasitos ao se utilizar do RNAi como alternativa para tratamento antiparasitário, como realizado por HE et al. (2018), que silenciaram genes relacionados ao desenvolvimento sexual de *Schistosoma japonicum*, com efeito observado a partir de três dias de exposição ao RNAi. ANANDANARAYANAN et al. (2017) também aplicaram a técnica em *Fasciola gigantica* que apresentou pouca diferença entre as concentrações de RNAi via *soaking*, apresentando efeito em 3 dias após a exposição.

GELDHOF et al. (2006) e ZAWADZKI et al. (2012) testaram a aplicabilidade do RNAi pelas três formas de administração das moléculas de RNAi em *H. contortus*, observando resultados positivos de silenciamento em 24 e 48h, assim como observado no corrente trabalho nos testes em 24 e 48h. Nós observamos diferentes níveis de silenciamento na exposição das larvas nos grupos tratamento nos diferentes tempos testados nos trabalhos supracitados, podendo ser resultado de diversas variáveis, conforme KOH, GHANBARINIAKI E MYONG (2017) que estabeleceram diferenças no padrão das moléculas de RNAi que podem alterar ou interferir no efeito das moléculas, como o tamanho do *loop* formado e o pareamento das bases.

O trabalho que mais se aproxima ao presente estudo, é o de ARENAL et al. (2017), que testaram via *soaking*, a aplicação do RNAi em nano cápsulas para o gene DIM-1 em cultura com 96% de *H. contortus*. Os autores observaram aproximadamente 88% de efeito após 48 h de exposição às moléculas de dsRNA, demonstrando que o percentual de efeito após 48 h se aproxima do percentual de presença do parasito na cultura. De forma semelhante, nosso trabalho obteve (após 48 h) aproximadamente 70% de eficiência máxima (GluF1+IVM), sendo esta uma cultura com 74% de *H. contortus*.

Embora nossos testes tenham sido realizados com a possibilidade de testar o efeito sinérgico do tratamento, quando foi associado o uso da terapia com RNAi com um medicamento anti-helmíntico comercial, observamos um aumento real na eficácia de aproximadamente 35%, testando GluF2 e GluF2+IVM, após 24h. Assim, sugerimos que existiu um efeito sinérgico ao utilizar a combinação terapêutica, conforme o efeito obtido por KATIKI et al. (2017) em seus testes com fitoterápicos. Em GluF1 e GluF1+IVM houve aumento de 25,2% (24h). Isto significa que a IVM pode ser utilizada em associação com a técnica de RNAi com a expectativa de obter melhor eficácia no tratamento anti-helmíntico.

## 8. CONCLUSÃO

Foi possível identificar as mutações relevantes na sequência codificante do alvo da IVM, além da mutação F200Y ( $\beta$ -tubulina) já relatada por outros pesquisadores. Descrevemos as novas mutações: F18S, G19S, S86A no gene *gIc-5* e isso é uma contribuição científica significativa para realizar modelos de monitoramento usando SNP.

O teste de migração das larvas apresentou efeito positivo nos grupos em que as cepas de *E. coli* expressando o dsRNA foram aplicadas, além de ser observado que o tempo de exposição agiu positivamente na eficácia do RNAi.

Foi possível determinar que a técnica de RNAi pode ser utilizada como nova terapia antiparasitária, contra população resistente à IVM, para isso é necessário uma nova série de experimentos *in vitro* e *in vivo*, como o teste de desenvolvimento larvar e o teste de inibição da alimentação larvar.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesta dissertação são encorajadores e incentivam a continuidade da pesquisa nessa promissora linha de estudo. Se pretende testar as cepas de *E. coli* expressando dsRNA em diferentes tempos de exposição, testar o efeito na evolução dos estágios larvares, testar a IVM em associação com outros genes e ainda realizar análise por PCR das larvas migrantes para confirmação do potencial espécie-específico da metodologia de silenciamento por RNAi. Um dos objetivos futuros será finalmente prosseguir para os testes *in vivo* com um pro-biótico e testar a eficiência do possível tratamento alternativo, tendo o efeito animal como interferente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE, A. F. T. Sustainable worm control practices in South America. **Small Ruminant Research**, v. 118, n. 1–3, p. 56–62, 2014.

ANANDANARAYANAN, A.; RAINA, O. K.; LALRINKIMA, H.; RIALCH, A.; SANKAR, M.; VARGHESE, A. RNA interference in *Fasciola gigantica*: Establishing and optimization of experimental RNAi in the newly excysted juveniles of the fluke. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1–20, 2017.

ARENAL, A.; DÍAZ, A.; SPRENGER, L. K.; BUZATTI, A.; FERNANDES, M. A. M.; SANTOS, J. N. DOS; MOLENTO, M. Gene silencing of Dim-1, a member of the disorganized muscle family, in *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 211, p. 71–74, 2017.

BAGNALL, N. H.; RUFFELL, A.; RAZA, A.; ELLIOTT, T. P.; LAMB, J.; HUNT, P. W.; KOTZE, A. C. Mutations in the Hco-mptl-1 gene in a field-derived monepantel-resistant isolate of *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 7, n. 2, p. 236–240, 2017.

BASSETTO, C. C.; AMARANTE, A. F. T. Vaccination of sheep and cattle against haemonchosis. **Journal of Helminthology**, v. 89, n. 5, p. 517–525, 2015.

BEECH, R.; LEVITT, N.; CAMBOS, M.; ZHOU, S.; FORRESTER, S. G. Association of ion-channel genotype and macrocyclic lactone sensitivity traits in *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 171, n. 2, p. 74–80, 2010.

BELEW, S.; HUSSIEN, J.; REGASSA, F.; BELAY, K.; TOLOSA, T. Susceptibility assay of *Haemonchus contortus* to commonly used anthelmintics in Jimma, southwest Ethiopia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 7, p. 1599–1603, 2012.

BERNSTEIN, E.; CAUDY, A. A.; HAMMOND, S. M.; HANNON, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 363–366, 2001.

BESIER, R. B.; KAHN, L. P.; SARGISON, N. D.; WYK, J. A. VAN. The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. *In: Advances in Parasitology*. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. v. 93p. 95–143.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 43, p. 1-49, 2015.

BRITTON, C.; WINTER, A. D.; MARKS, N. D.; GU, H.; MCNEILLY, T. N.; GILLAN, V.; DEVANEY, E. Application of small RNA technology for improved control of parasitic helminths. **Veterinary Parasitology**, v. 212, n. 1–2, p. 47–53, 2015.

CAPLEN, N. J.; FLEENOR, J.; FIRE, A.; MORGAN, R. A. dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. **Gene**, v. 252, n. 1–2, p. 95–105, 2000.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642–655, 2009.

CATELLI, Z.E.; BARROS, C.S.; MOLENTO, M.B.; MONTEIRO, A.L.G.; SCOLARI, A.P.R. Resistência anti-helmíntica múltipla em trichostrongilídeos de ovinos. Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Campo Grande, MS. CD-rom. Resumo 75, 2010.

CÉRIAC, S.; JAYLES, C.; ARQUET, R.; FEUILLET, D.; FÉLICITÉ, Y.; ARCHIMÈDE, H.; BAMBOU, J. The nutritional status affects the complete blood count of goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. p. 1–10, 2017.

DEMELER, J.; KÜTTLER, U.; EL-ABDELLATI, A.; STAFFORD, K.; RYDZIK, A.; VARADY, M.; KENYON, F.; COLES, G.; HÖGLUND, J.; JACKSON, F.; VERCRUYSSSE, J.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1–2, p. 58–64, 2010.

DOLINSKÁ, M.; KÖNIGOVÁ, A.; LETKOVÁ, V.; MOLNÁR, L.; VÁRADY, M. Detection of ivermectin resistance by a larval development test-Back to the past or a step forward? **Veterinary Parasitology**, v. 198, n. 1–2, p. 154–158, 2013.

- ELBASHIR, S. M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; YALCIN, A.; WEBER, K.; TUSCHL, T. Duplexes of 21 ± nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, n. 6836, p. 494–498, 2001.
- FERREIRA, J. B.; BEZERRA, A. C. D. S.; GUILHERMINO, M. M.; LEITE, J. H. G. M.; SILVA, W. E. DA; PAIVA, R. D. M.; BARBOSA, T. N.; SOUSA, J. E. R. DE; FAÇANHA, D. A. E. Performance, endoparasitary control and blood values of ewes locally adapted in semiarid region. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 52, n. December 2016, p. 23–29, 2017.
- FORRESTER, S. G.; HAMDAN, F. F.; PRICHARD, R. K.; BEECH, R. N. Cloning, sequencing, and developmental expression levels of a novel glutamate-gated chloride channel homologue in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 254, n. 3, p. 529–534, 1999.
- GELDHOF, P.; MURRAY, L.; COUTHIER, A.; GILLEARD, J. S.; MCLAUCHLAN, G.; KNOX, D. P.; BRITTON, C. Testing the efficacy of RNA interference in *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 7, p. 801–810, 2006.
- GILLAN, V.; MAITLAND, K.; LAING, R.; GU, H.; MARKS, N. D.; WINTER, A. D.; BARTLEY, D.; MORRISON, A.; SKUCE, P. J.; REZANSOFF, A. M.; GILLEARD, J. S.; MARTINELLI, A.; BRITTON, C.; DEVANEY, E. Increased Expression of a MicroRNA Correlates with Anthelmintic Resistance in Parasitic Nematodes. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. November, 2017.
- GU, H. Y.; MARKS, N. D.; WINTER, A. D.; WEIR, W.; TZELOS, T.; MCNEILLY, T. N.; BRITTON, C.; DEVANEY, E. Conservation of a microRNA cluster in parasitic nematodes and profiling of miRNAs in excretory-secretory products and microvesicles of *Haemonchus contortus*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1–23, 2017.
- HAN, K.; XU, L.; YAN, R.; SONG, X.; LI, X. Cloning , expression and characterization phosphate dehydrogenase of adult *Haemonchus contortus*. p. 421–429, 2011.
- HARDER, A. The Biochemistry of *Haemonchus contortus* and Other Parasitic Nematodes. *In: Advances in Parasitology*. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. v. 93p. 69–94.

HE, S.; HE, X.; LIM, L. P.; DE STANCHINA, E.; XUAN, Z.; LIANG, Y.; XUE, W.; ZENDER, L.; MAGNUS, J.; RIDZON, D.; JACKSON, A. L.; LINSLEY, P. S.; CHEN, C.; LOWE, S. W.; CLEARY, M. A.; HANNON, G. J. Functions of the Vasa gene in *Schistosoma japonicum* as assessed by RNA interference. **Gene**, v. 638, p. 13–19, 2018.

KAMINSKY, R.; GAUVRY, N.; SCHORDERET WEBER, S.; SKRIPSKY, T.; BOUVIER, J.; WENGER, A.; SCHROEDER, F.; DESAULES, Y.; HOTZ, R.; GOEBEL, T.; HOSKING, B. C.; PAUTRAT, F.; WIELAND-BERGHAUSEN, S.; DUCRAY, P. Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. **Parasitology Research**, v. 103, n. 4, p. 931–939, 2008.

KATIKI, L. M.; BARBIERI, A. M. E.; ARAUJO, R. C.; VERÍSSIMO, C. J.; LOUVANDINI, H.; FERREIRA, J. F. S. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* in vitro. **Veterinary Parasitology**, v. 243, p. 47–51, 2017.

KOH, H. R.; GHANBARINIAKI, A.; MYONG, S. RNA stem structure governs coupling of dicing and gene silencing in RNA interference. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2017.

KOTZE, A. C.; PRICHARD, R. K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*. History, Mechanisms and Diagnosis. *In: Advances in Parasitology*. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. v. 93p. 375–428.

LANUSSE, C.; CANTON, C.; VIRKEL, G.; ALVAREZ, L.; COSTA-JUNIOR, L.; LIFSCHITZ, A. Strategies to Optimize the Efficacy of Anthelmintic Drugs in Ruminants. **Trends in Parasitology**, v. xx, 2018.

LEUSCHNER, P. J. F.; AMERES, S. L.; KUENG, S.; MARTINEZ, J. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. **EMBO Reports**, v. 7, n. 3, p. 314–320, 2006.

LITTLE, P. R.; HODGE, A.; MAEDER, S. J.; WATSON, T. G.; SEED, J. A. Field efficacy and safety of an oral formulation of the novel combination anthelmintic, derquantel-abamectin, in sheep in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 58, n. 3, p. 121–129, 2010.



LYNN, R.C. Drogas Antiparasitárias. In: Bowman, D.D. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 8. ed. Barueri, SP: Manole, 2006. p. 244-286.

MAVROT, F.; HERTZBERG, H.; TORGERSON, P. Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance : a systematic review and meta-analysis. **Parasites & Vectors**, p. 1–11, 2015.

MOLENTO, M. B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 3, p. 229–234, 2009.

MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 117–121, 2001.

MUHAMAD, N.; SIMCOCK, D. C.; PEDLEY, K. C.; SIMPSON, H. V.; BROWN, S. The kinetic properties of the glutamate dehydrogenase of *Teladorsagia circumcincta* and their significance for the lifestyle of the parasite. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 159, n. 2, p. 71–77, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NICIURA, S. C. M. Metodologias genotípicas aplicadas à detecção de espécies de parasitas e ao diagnóstico de resistência parasitária. In: CHAGAS, A. C. S.; NICIURA, S. C. M.; MOLENTO, M. B. **Manual prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. p. 55-57.

NICIURA, S. C. M.; VERÍSSIMO, C. J.; GROMBONI, J. G. G.; ROCHA, M. I. P.; DE MELLO, S. S.; BARBOSA, C. M. P.; CHIEBAO, D. P.; CARDOSO, D.; SILVA, G. S.; OTSUK, I. P.; PEREIRA, J. R.; AMBROSIO, L. A.; NARDON, R. F.; UENO, T. E. H.; MOLENTO, M. B. F200Y polymorphism in the  $\beta$ -tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3–4, p. 608–612, 2012.

PINEDA, D.; ROSSI, L.; BATISTONI, R.; SALVETTI, A.; MARSAL, M.; GREMIGNI, V.; FALLENI, A.; GONZALEZ-LINARES, J.; DERI, P.; SALÓ, E. The genetic network of prototypic planarian eye regeneration is Pax6 independent. **Development (Cambridge, England)**, v. 129, n. 6, p. 1423–1434, 2002.

PORTILLO, V.; JAGANNATHAN, S.; WOLSTENHOLME, A. J. Distribution of glutamate-gated chloride channel subunits in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. **Journal of Comparative Neurology**, v. 462, n. 2, p. 213–222, 2003.

ROBERTS, F.H.S. & O'SULLIVAN, P.J. Methods for egg counts and larval cultures for Strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 1: p. 95-102, 1950.

ROGALSKI, T. M.; GILBERT, M. M.; DEVENPORT, D.; NORMAN, K. R.; MOERMAN, D. G. DIM-1, a novel immunoglobulin superfamily protein in *Caenorhabditis elegans*, is necessary for maintaining bodywall muscle integrity. **Genetics**, v. 163, n. 3, p. 905–915, 2003.

ROOS, M. H.; BOERSEMA, J. H.; BORGSTEEDE, F. H. M.; CORNELISSEN, J.; TAYLOR, M.; JOOST RUITENBERG, E. Molecular analysis of selection for benzimidazole resistance in the sheep parasite *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 43, n. 1, p. 77–88, 1990.

RUOCCO, N.; COSTANTINI, S.; ZUPO, V.; ROMANO, G.; IANORA, A.; FONTANA, A.; COSTANTINI, M. High-quality RNA extraction from the sea urchin *Paracentrotus lividus* embryos. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–11, 2017.

SALES, N.; LOVE, S. Resistance of *Haemonchus* sp. to monepantel and reduced efficacy of a derquantel / abamectin combination confirmed in sheep in NSW, Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 193–196, 2016.

SAMARASINGHE, B.; KNOX, D. P.; BRITTON, C. Factors affecting susceptibility to RNA interference in *Haemonchus contortus* and in vivo silencing of an H11 aminopeptidase gene. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 51–59, 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 4. ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

SCARBOROUGH, R. J.; GATIGNOL, A. RNA interference therapies for an HIV-1 functional cure. **Viruses**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2018.

SCOPUS. Document search. **Elsevier**. 2018. Disponível em <<https://www.scopus.com/search/form.uri?display=basic>>. Acesso em 26 nov. 2018.

SILVA, F. F. DA; BEZERRA, H. M. F. F.; FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L. R. Nematode resistance to five anthelmintic classes in naturally infected sheep herds in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2961, 2018.

SIMPSON, H. V. Pathophysiology of Abomasal Parasitism: Is the Host or Parasite Responsible? **Veterinary Journal**, v. 160, n. 3, p. 177–191, 2000.

SUN, L.; LIU, L.; YU, T.; WANG, Q.; FU, H. VCAM1-targeted RNA interference inhibits the proliferation of human oral squamous carcinoma HN12 cells. **Oncology Letters**, p. 5650–5654, 2018.

TIMMONS, L.; FIRE, A. Specific interference by ingested dsRNA. **Nature**, v. 395, n. 6705, p. 854, 1998.

TRAMBOO, S. R.; SHAHARDAR, R. A.; ALLAIE, I. M.; WANI, Z. A.; BUSHRA, M. S. Prevalence of gastrointestinal helminth infections in ovine population of Kashmir Valley. **Veterinary World**, v. 8, n. 10, p. 1199–1204, 2015.

VERÍSSIMO, C. J.; NICIURA, S. C. M.; ALBERTI, A. L. L.; RODRIGUES, C. F. C.; BARBOSA, C. M. P.; CHIEBAO, D. P.; CARDOSO, D.; DA SILVA, G. S.; PEREIRA, J. R.; MARGATHO, L. F. F.; DA COSTA, R. L. D.; NARDON, R. F.; UENO, T. E. H.; CURCI, V. C. L. M.; MOLENTO, M. B. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1–2, p. 209–216, 2012.

WILSON, R. C.; DOUDNA, J. A. Molecular Mechanisms of RNA Interference. **Annual Review of Biophysics**, v. 42, n. 1, p. 217–239, 2013.

WYK, J. A. V.; CABARET, J.; MICHAEL, L. M. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 4, p. 277–306, 2004.

YAN, F.; XU, L.; LIU, L.; YAN, R.; SONG, X.; LI, X. Immunoproteomic analysis of whole proteins from male and female adult *Haemonchus contortus*. **Veterinary Journal**, v. 185, n. 2, p. 174–179, 2010.

YAN, R.; SUN, W.; SONG, X.; XU, L.; LI, X. Research in Veterinary Science Vaccination of goats with DNA vaccine encoding Dim-1 induced partial protection against *Haemonchus contortus* : A preliminary experimental study. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 1, p. 189–199, 2013.

ZAWADZKI, J. L.; KOTZE, A. C.; FRITZ, J. A.; JOHNSON, N. M.; HEMSWORTH, J. E.; HINES, B. M.; BEHM, C. A. Silencing of essential genes by RNA interference in *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v. 139, n. 5, p. 613–629, 2012.

ZINSSER, V. L.; HOEY, E. M.; TRUDGETT, A.; TIMSON, D. J. Biochemical characterisation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from the liver fluke, *Fasciola hepatica*. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 4, p. 744–749, 2014.

## ANEXO I.

FIGURA 13 - CERTIFICADO EMITIDO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 086/2017, referente ao projeto “**Aplicação da técnica de RNA de interferência no silenciamento do gene codificante da proteína do canal de Glutamato mediado por Cloro em larvas do parasito *Haemonchus contortus***”, sob a responsabilidade de **Marcelo Beltrão Molento** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 1 de invasividade, em reunião de 02/10/2017.

Vigência do projeto	Dezembro/2017 até Dezembro/2018
Espécie/Linhagem	<i>Ovis aries</i> (ovino) / Suffolk
Número de animais	10
Peso/Idade	20 a 40 kg / 1 a 2 anos
Sexo	Ambos
Origem	Laboratório de Produção de Ovinos e Caprinos (LAPOC) na Fazenda Canguiri da Universidade Federal do Paraná

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 086/2017, regarding the project “**Application of interference RNA technique to silencing the gene encoding the Chloride-mediated Glutamate channel protein in the larvae of the nematode *Haemonchus contortus***” under **Marcelo Beltrão Molento** supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 1 of invasiveness, in session of 10/02/2017.

Duration of the project	December/2017 until December/2018
Specie/Line	<i>Ovis aries</i> (ovine) / Suffolk
Number of animals	10
Wheight/Age	20 to 40 kg / 1 to 2 years
Sex	Both
Origin	Sheep and Goat Production Laboratory at Canguiri Farm of the Federal University of Paraná

Curitiba, 2 de outubro de 2017.

*Chayane da Rocha*

Chayane da Rocha

**Coordenadora CEUA-SCA**

Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias - UFPR

## ANEXO II.

### Coprocultura para obtenção de larvas de terceiro estágio.

ROBERTS & O`SULLIVAN (1950).

#### Material:

- Recipiente de vidro (250 - 300ml);
- Serragem de pinho ou madeira similar lavada e esterilizada, fezes secas ou vermiculite,
- Frasco plástico ou Becker (500 ml).
- Tubo de ensaio, colher ou espátula.
- Placas de Petri e pipeta com pêra de borracha.

#### Técnica:

Coletar 20-30 g de fezes frescas, coletadas diretamente do reto. Misturar as fezes com a serragem, na proporção de mais ou menos duas partes de cada, dentro de um frasco com um pouco de água. A água deve ser de tal quantidade que se forme uma massa, até o ponto em que, quando exprimida na palma da mão, flua um pouco de líquido. Homogeneizar as fezes e a serragem manualmente ou com agitador mecânico. Encher o frasco com a mistura até mais ou menos 3/4 de sua capacidade. Limpar os bordos do frasco de cultivo e tampá-lo com a placa de Petri, tomando o cuidado de colocar o cordão entre a placa e o bordo do frasco para que haja aerização do cultivo. Isto se faz para proporcionar aerobiose, evitando o crescimento de fungos que influi adversamente na vida das larvas.

Levar à estufa ou deixar no meio ambiente, de acordo com o clima. Umedecer um pouco quando houver ressecamento do cultivo. Manter este cultivo por 7 dias, já que geralmente os ovos de nematódeos gastrintestinais evoluem em período de aproximado de 7 dias.

Recuperam-se as larvas infectantes, enchendo-se o frasco de cultivo com água corrente e tampando-o com uma placa de Petri e invertendo-o bruscamente sobre a placa; Coloca-se 5 a 10mL de água na parte externa da placa de Petri; Transcorridas 3 a 4 horas, transfere-se, com auxílio de uma pipeta, o conteúdo da placa de Petri para um tubo de ensaio; Deixar o tubo de ensaio repousar em geladeira por 2 a 3 horas ou por mais tempo em temperatura ambiente. Após desprezar o sobrenadante,

deixando um volume de 3 a 5mL; Proceder a identificação/contagem das larvas, examinando-as entre lâmina/lamínulas com adição de lugol, ao microscópio; As larvas devem ser contadas/identificadas até atingirem cem unidades.

### **ANEXO III.**

#### **Meio Luria-Bertani - Meio LB Líquido (100 mL):**

SAMBROOK E RUSSEL, (2012)

##### Material:

- Frasco de vidro (200mL);
- Proveta (100mL);
- Bastão de vidro;
- Triptona - 1g;
- Extrato de Levedura - 0,5g;
- NaCl - 1g.

##### Técnica:

- Adicionar 90 mL de água destilada e agitar até dissolver;
- Ajustar o volume da solução para 100 mL;
- Verter no frasco de vidro;
- Autoclavar.



**ANEXO IV.****Meio Luria-Bertani Agar - Meio LA Sólido (100 mL):**

SAMBROOK E RUSSEL, (2012)

**Material:**

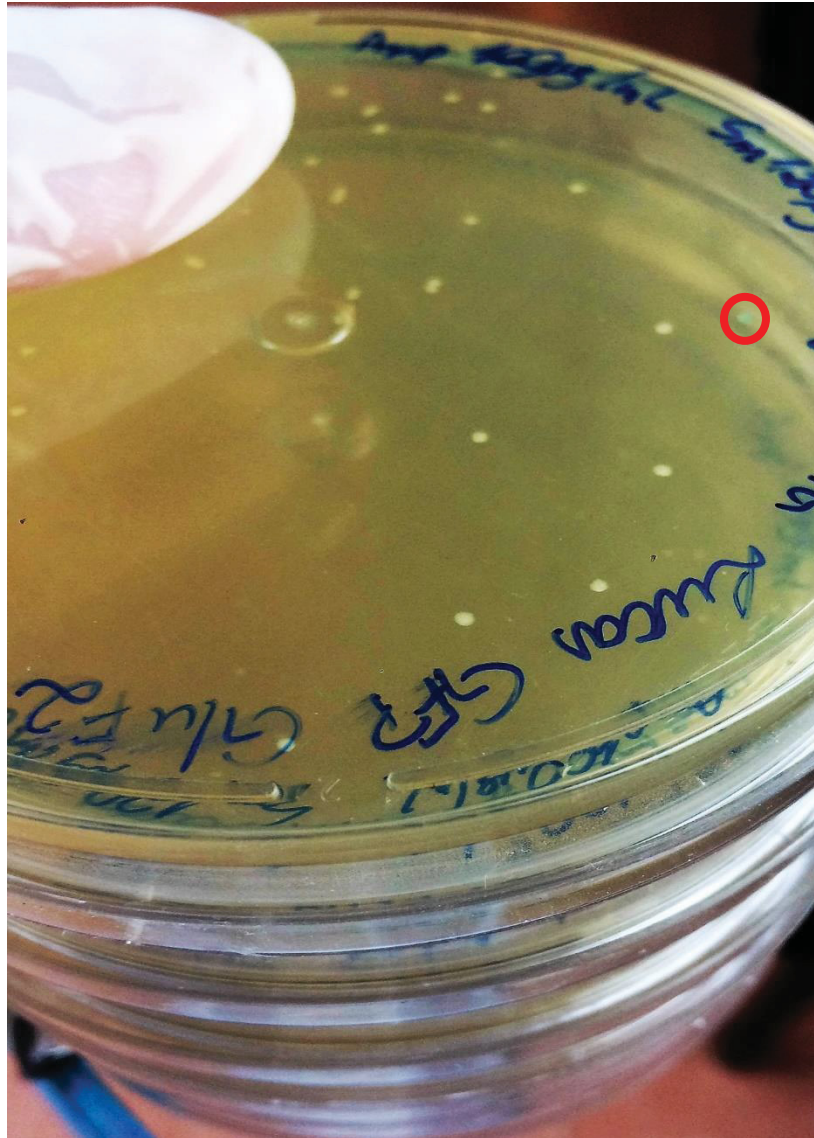
- Frasco de vidro (200mL);
- Proveta (100mL);
- Bastão de vidro;
- Placas de petri;
- Triptona - 1g;
- Extrato de Levedura - 0,5g;
- NaCl - 1g;
- Agar – 1,5g.

**Técnica:**

- Adicionar 90 mL de água destilada e agitar até dissolver;
- Ajustar o volume da solução para 100 mL;
- Verter no frasco de vidro;
- Autoclavar;
- Verter nas placas de petri e esperar polimerizar.

**ANEXO V.**

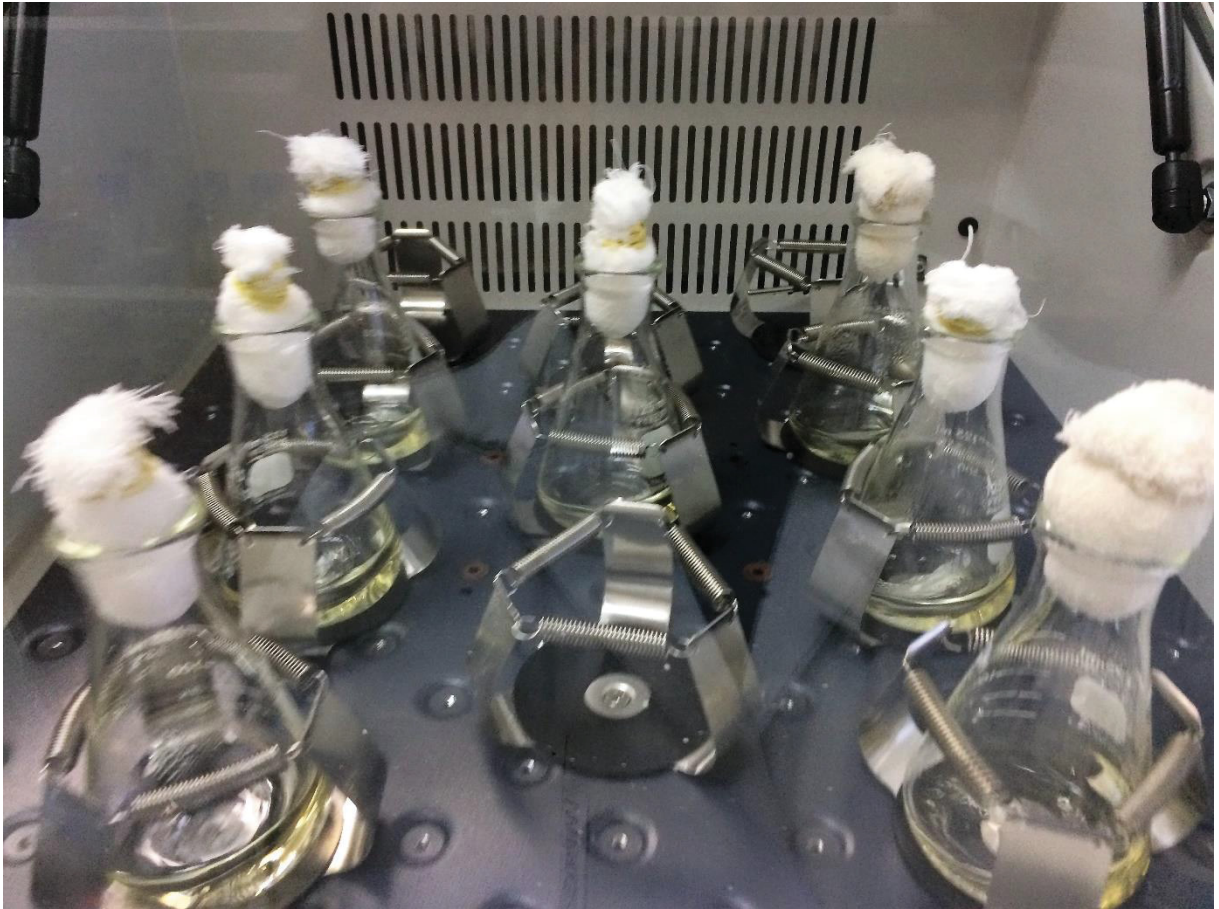
FIGURA 14 - PLACAS DE MEIO LA COM SM 120µg/mL, AMP 100µg/mL, X-GAL E IPTG APÓS INCUBAÇÃO A 37°C OVERNIGHT.



É observada uma colônia azul (marcada em vermelho) e diversas colônias brancas na placa. Colônias de *E. coli* TOP10. Fonte: O Autor (2018).

**ANEXO VI.****FIGURA 15 - PLACAS DE MEIO LA COM AMP 100µg/mL, FRASCOS COM MEIO LB E AMP 100µg/mL.**

Material preparado para realização do isolamento das colônias das diversas placas. Fonte: O Autor (2018).

**ANEXO VII.****FIGURA 16 - FRASCOS ERLLENMEYER PARA REALIZAÇÃO DA INDUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM *E. coli* BL21.**

(Superior) Frascos de 125mL sob agitação constante para crescimento das células. (Inferior) Frascos de 125mL após crescimento, prontos para serem vertidos nos frascos de 500mL com 200mL de meio LB. Fonte: O Autor (2018).

**ANEXO VIII.**

**FIGURA 17 - LARVAS L<sub>3</sub> OBTIDAS NA COPROCULTURA.**



(Inferior) Larvas desembainhadas prontas para início do teste em aumento de 10x. (Superior) Larvas ainda embainhadas em aumento de 10x. Fonte: O Autor (2018).

**ANEXO IX.**

FIGURA 18 - LARVAS L<sub>3</sub> IDENTIFICADAS EM AUMENTO DE 10X COM AUXÍLIO DE LUGOL.



Larva de *Haemonchus* sp. à esquerda e larva de *Trichostrongylus* sp. à direita. Fonte: O Autor (2018).

**ANEXO X.**QUADRO 2 - IDENTIFICAÇÃO POR GÊNERO DAS LARVAS L<sub>3</sub> OBTIDAS NA COPROCULTURA.

<b>IDENTIFICAÇÃO</b>	<b><i>Haemonchus sp.</i></b>	<b><i>Trichostrongylus sp.</i></b>
<b>1</b>	70	30
<b>2</b>	82	18
<b>3</b>	70	30
<b>Média</b>	74,00	26,00
<b>Desvio padrão</b>	6,93	6,93

Fonte: O Autor (2018).

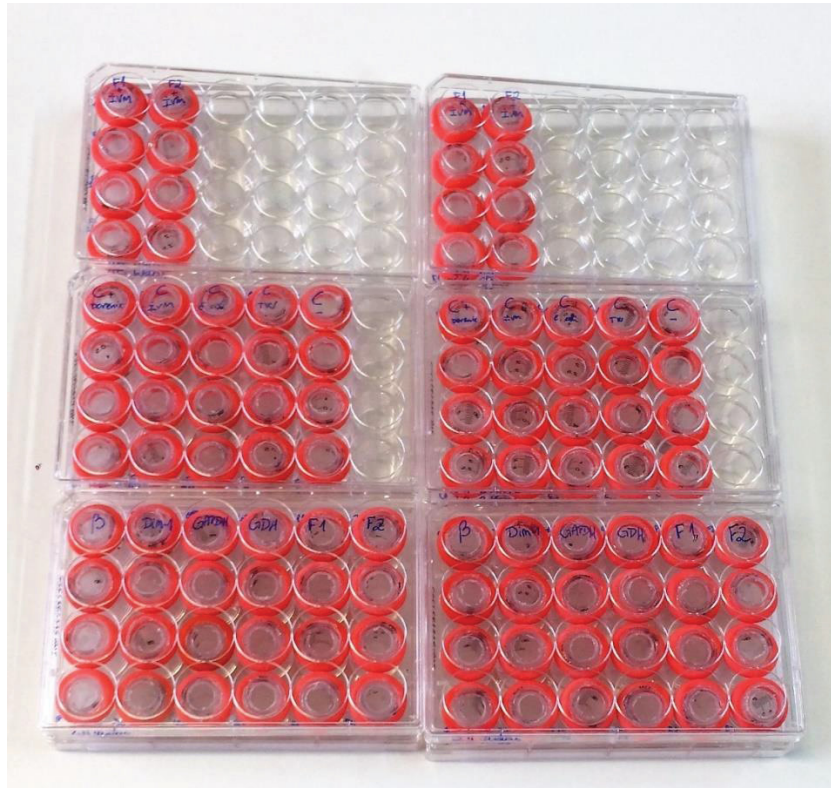
**ANEXO XI.**

FIGURA 19 - APARATO UTILIZADO NO TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAR (TML).



Seringa de 3mL cortada, encaixada em seringa de 5mL cortada, entre elas é encaixada a malha de 25 $\mu$ m e na seringa de 5mL é encaixado anel de borracha utilizado para caudectomia de ovinos, para facilitar o manuseio. Fonte: O Autor (2018).

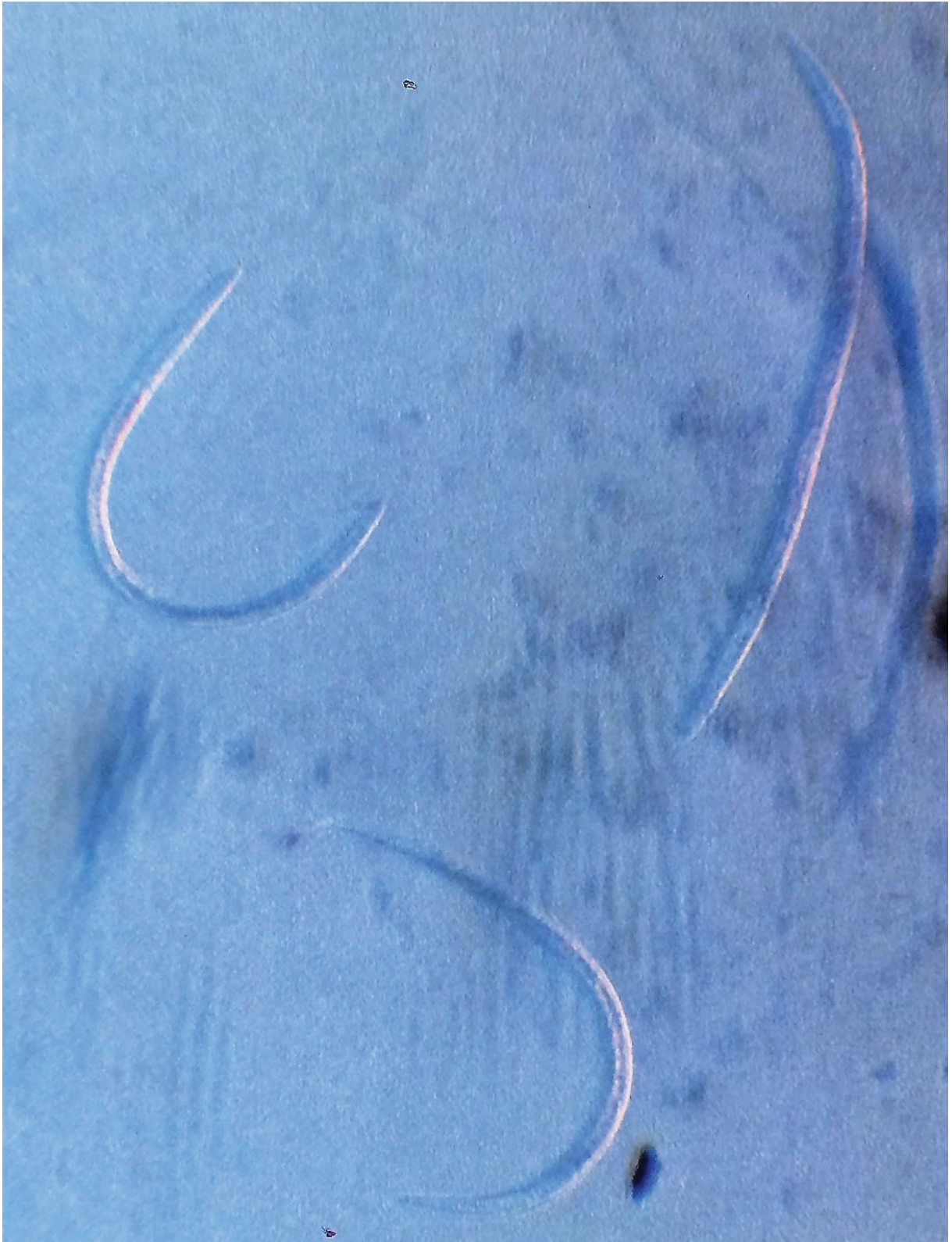


**ANEXO XII.****FIGURA 20 - PLACAS DE CULTURA DE 24 POÇOS PREPARADAS PARA O TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAR (TML).**

(Superior) Placas preparadas com os aparatos para a migração pós exposição aos tratamentos.  
(Inferior) Placas com os grupos tratamentos incubados em estufa BOD a 27°C para os tempos de 24 e 48 horas. Fonte: O Autor (2018).

**ANEXO XIII.**

**FIGURA 21 - LARVAS OBSERVADAS EM AUMENTO DE 10X NO POÇO DA PLACA APÓS A MIGRAÇÃO.**



Fonte: O Autor (2018).

## ANEXO XIV.

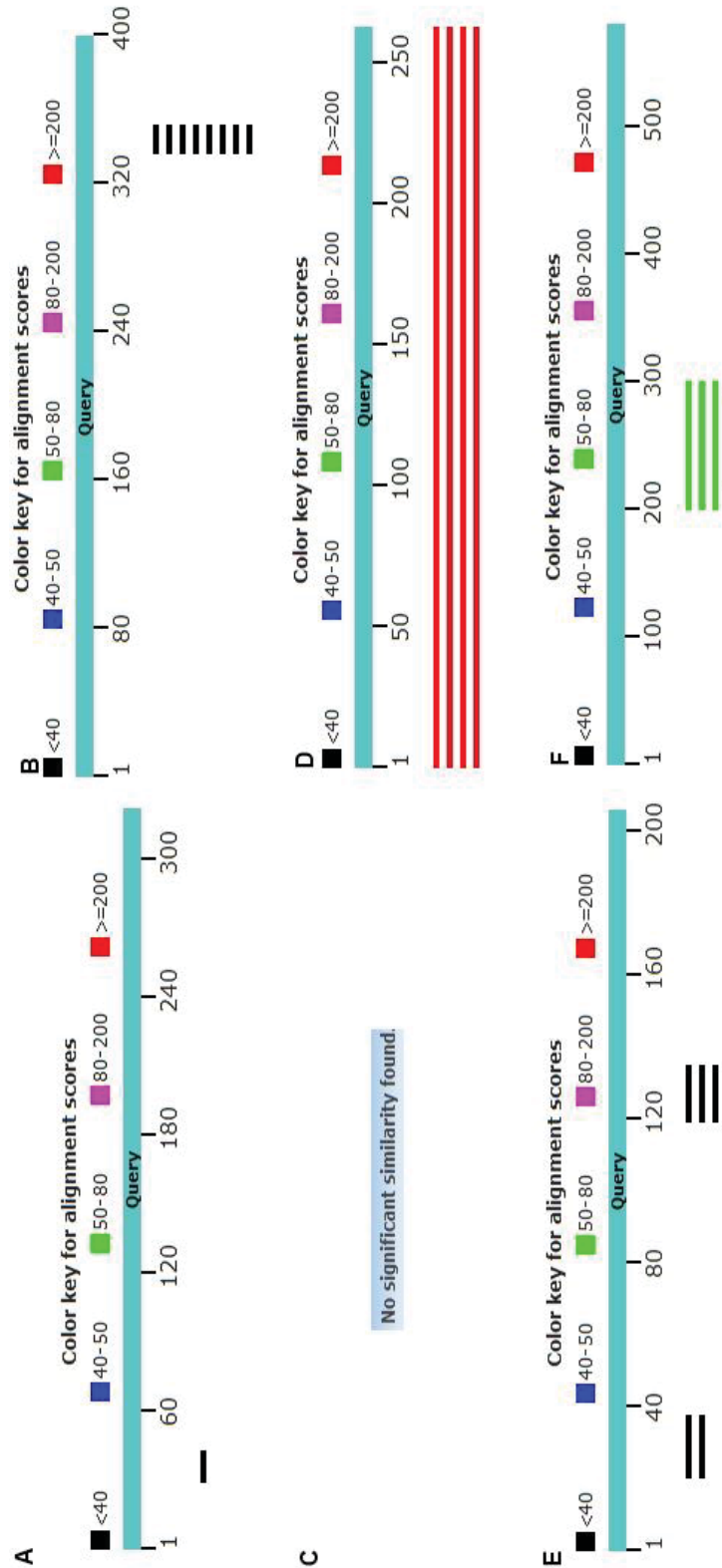
QUADRO 3 - CONTAGEM DE PARASITOS EM CADA POÇO PÓS MIGRAÇÃO NOS DIVERSOS GRUPOS DE TRATAMENTO.

POÇO	GRUPOS - Tratamento 24h												
	C+	CIVM	CEco	CTw	C-	GAPDH	$\beta$ -Tub	GDH	DIM-1	GluF1	GluF2	GluF1+IVM	GluF2+IVM
1	28	192	194	189	199	137	122	132	101	140	120	112	86
2	14	168	210	197	195	121	159	118	91	133	120	110	84
3	12	186	171	215	199	123	112	121	127	112	118	122	106
4	15	190	188	195	205	126	147	126	111	125	123	90	97
Média	17,25	184,00	190,75	199,00	199,50	126,75	135,00	124,25	107,50	127,50	120,25	108,50	93,25
Desvio padrão	7,27	10,95	16,11	11,20	4,12	7,14	21,74	6,13	15,35	12,01	2,06	13,40	10,24
POÇO	GRUPOS - Tratamento 48h												
	C+	CIVM	CEco	Ctw	C-	GAPDH	$\beta$ -Tub	GDH	DIM-1	GluF1	GluF2	GluF1+IVM	GluF2+IVM
1	5	188	186	180	190	93	82	71	81	84	86	64	52
2	12	189	186	187	195	87	95	77	83	78	87	71	57
3	13	185	196	172	197	56	59	52	70	97	45	51	66
4	3	197	169	178	188	71	77	75	86	51	97	56	78
Média	8,25	189,75	184,25	179,25	192,50	76,75	78,25	68,75	80,00	77,50	78,75	60,50	63,25
Desvio padrão	4,99	5,12	11,21	6,18	4,20	16,66	14,91	11,44	6,98	19,36	23,04	8,81	11,41

**C+**: controle positivo (Dovenix®). **CIVM**: controle ivermectina. **CEco**: controle *E. coli*. **CTw**: controle Tween 80. **C-**: controle negativo. **GAPDH**: grupo teste com o fragmento do gene GAPDH.  **$\beta$ -Tub**: grupo teste com o fragmento do gene  $\beta$ -tubulina. **GDH**: grupo teste com o fragmento do gene GDH. **DIM-1**: grupo teste com o fragmento do gene DIM-1. **GluF1**: grupo teste com o fragmento 1 do gene *g/c-5*. **GluF2**: grupo teste com o fragmento 2 do gene *g/c-5*. **GluF1+IVM**: grupo teste com o fragmento 1 do gene *g/c-5* e ivermectina. **GluF2+IVM**: grupo teste com o fragmento 2 do gene *g/c-5* e ivermectina.  
Fonte: O Autor (2018).

**ANEXO XV.**

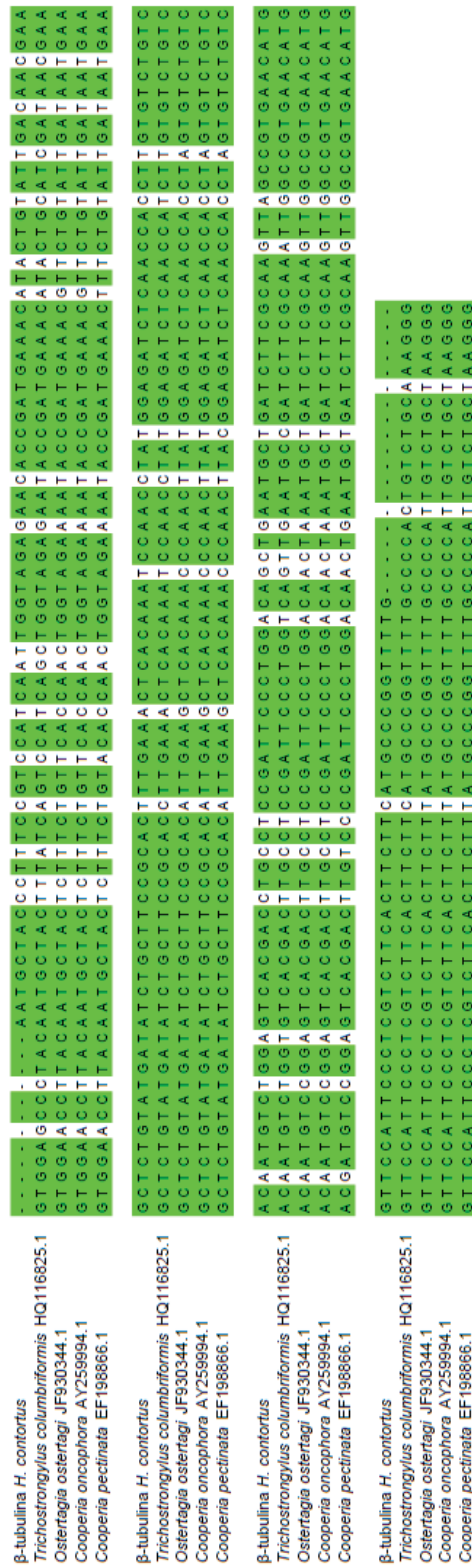
FIGURA 22 - BLASTN DOS AMPLICONS DOS GENES COM AS ESPÉCIES *COOPERIA SP.*, *CHABERTIA SP.*, *TRICHOSTRONGYLUS SP.* E *OSTERTAGIA SP.*



A: GAPDH. B: GDH. C: DIM-1. D:  $\beta$ -tubulina. E: GluCl F1. F: GluCl F2. Fonte: O Autor (2018).

ANEXO XVI.

FIGURA 23 - ALINHAMENTO DO GENE  $\beta$ -TUBULINA COM AS SEQUÊNCIAS MAIS SEMELHANTES.



Sequências de nucleotídeos de diferentes espécies para a  $\beta$ -tubulina. São apresentadas as espécies seguidas do número de acesso da sequência. Em verde são observadas regiões conservadas nas espécies alinhadas. Fonte: O Autor (2018).

ANEXO XVII.

FIGURA 24 - ALINHAMENTO DO FRAGMENTO 2 DO GENE *GLC-5* COM A SEQUÊNCIA MAIS SEMELHANTE.

```

GluCI F2 H. contortus
Cooperia oncophora EU006790.1 .....ATGTT CGCCTT GAT TCTGCCAT TCT GTTGCATTTCAAG
CGGTCCGAAAGGTTCTAGTTACGGAAGCTATTGGATTGAGCA GAAAT TATCARGCATCTATTGGAAAGTCCCTATAGC
Cooperia oncophora EU006790.1 A C A G T T S A G S G C ..... A A G A G G A A C T T A A G A G C A G G A G A T C A T T C A A C G T A T T C T C A C .....
G A T T A C G A T T G G C B G S T T C G T C C C G T G G T C G T C T T G G T C C C G C T G A C G A C G A C G A T T A C C G A T A G T G A A C C A G T A T T C
Cooperia oncophora EU006790.1 A A C T A C G A T T G G A S A S T C A G C C A A G G G A . . . T T G A A C G C T T C T T G G C C A G A T . . . . . A C T T G G T G G T D C A G T G C T G
G T T A C A G T C A A C A T C T A T T T G C G T T C G A T T C A A A A T T G A T G A C G T C A A T A T G G A A T A C A G T G C T G A A T T A C C T T T
Cooperia oncophora EU006790.1 C G A G A A G A A T G G A T T S A C G A A A G G C T G A T T C A A T . . . . . A G C C C G A C G T T G A A C A T A T T G T G S T A
C G A G A A G A A T G G T C G A T G C A A G G C T C G C C T A T G G T C G T T C G A G G A C G A A T C C A C A G A G T C C A G A G G T G C C C C C A T T T G T G S T A
Cooperia oncophora EU006790.1 C T G T A C C T . . . . . G G A C A C G A A T C T G G G T G C C C G A C A C C T T C T T C C A G A A T S A G A A A G A T G G C
G A G A A G A A T G C G G A A A T G C G G A C C A A T C G A A C A A A T T G G A T G C C T G A T A C C T T T T C C A G A A C B A G A A G S A G S C A
Cooperia oncophora EU006790.1 T T S G C G A C A G C G A A A T G C G G A C C A A T C G A A C A A A T T G G A T G C C T G A T A C C T T T T C C A G A A C B A G A A G S A G S C A
G A A A A C A T G A C A T C S A T A C T C C G A A T A T T C T A A T T C G G A T A C A T A A T G G C A C A G G A A A G A T T C T T A T T C A T G T C G G
Cooperia oncophora EU006790.1 C G A C G G C A T C T G A T C S A C A A C C G A A C G T G C T C A T T C G T A T T C A C A A A . . . . G A C S S C T C T A I I C T A T A G C G T A A S G
G T T A C T T T G A C C C T G A G C T G T C C A A T G A G T T G G C C G A T T A T C C G C T T G A T G T A C A G A C A T G T G A T G S B A T T T T G C T
Cooperia oncophora EU006790.1 T T A T C A C T G S T G T C T C T G C C G A T G T C G T T G G A A T T C A T C C A T T G G A T C G A C A A A A T T G C C T A T C B A T C T T G C A
GluCI F2 H. contortus
Cooperia oncophora EU006790.1 T C A T A C S C C T A T A C T A C G A A A G A C A T C . . . . .
T C A T A T S C C T A C T A C T C A A G A T A T C A A G T A T G A A T G G A A

```

Sequências de nucleotídeos de diferentes espécies para o gene *glc-5*. São apresentadas as espécies seguidas do número de acesso da sequência. Em verde são observadas regiões conservadas nas espécies alinhadas. Fonte: O Autor (2018).



QUADRO 4 - VALORES DE  $p$  PARA CADA CONFRONTO DE DADOS INTERGRUPOS POSSÍVEL NOS TEMPOS 24 E 48 HORAS E PARA CONFRONTO INTRAGRUPO 24/48 HORAS PARA DETERMINAR DIFERENÇA SIGNIFICATIVA OU NÃO CONSIDERANDO  $p \leq 0,05$ .

(continuação)

CTw	0,00001409	0,03117788	0,26427832										
C-	0,00000002	0,28907538	0,06380994	0,02188711									
GAPDH	0,00271317	0,00046228	0,00111202	0,00023138	0,00056915								
$\beta$ -Tub	0,00169814	0,00029036	0,00110804	0,00009153	0,00040751	0,37489379							
GDH	0,00186315	0,00005609	0,00079907	0,00003563	0,00021490	0,12012936	0,03360177						
DIM-1	0,00048586	0,00000725	0,00064400	0,00002037	0,00011232	0,33042963	0,38109317	0,01019933					
GluF1	0,00164246	0,00136952	0,00006635	0,00131895	0,00038330	0,47984030	0,48056318	0,29232469	0,42875916				
GluF2	0,00673378	0,00071136	0,00387060	0,00095406	0,00166347	0,41272700	0,47552066	0,10197605	0,44334257	0,47728000			
GluF1 +IVM	0,00091138	0,00006821	0,00022733	0,00000270	0,00005844	0,02284456	0,00724706	0,05968088	0,00715023	0,10888054	0,07795656		
GluF2 +IVM	0,00204251	0,00004640	0,00061793	0,00030726	0,00014713	0,18631742	0,13572837	0,27948435	0,03807138	0,19143479	0,15272573	0,39241454	
24h/48h	<b>C+</b>	<b>CIVM</b>	<b>Ceco</b>	<b>CTw</b>	<b>C-</b>	<b>GAPDH</b>	<b><math>\beta</math>-Tub</b>	<b>GDH</b>	<b>DIM-1</b>	<b>GluF1</b>	<b>GluF2</b>	<b>GluF1 +IVM</b>	<b>GluF2 +IVM</b>
C+	0,08740000												
CIVM		0,24300000											
CEco			0,53230000										
CTw				0,02140000									
C-					0,05490000								
GAPDH						0,00150000							
$\beta$ -Tub							0,00510000						
GDH								0,00010000					



QUADRO 4 - VALORES DE  $p$  PARA CADA CONFRONTO DE DADOS INTERGRUPOS POSSÍVEL NOS TEMPOS 24 E 48 HORAS E PARA CONFRONTO INTRAGRUPO 24/48 HORAS PARA DETERMINAR DIFERENÇA SIGNIFICATIVA OU NÃO CONSIDERANDO  $p \leq 0,05$ .

													(conclusão)	
DIM-1										0,01720000				
GluF1											0,00460000			
GluF2												0,01150000		
GluF1+IVM													0,00100000	
GluF2+IVM														0,00790000

**C+**: controle positivo (Dovenix®). **CIVM**: controle ivermectina. **CEco**: controle *E. coli*. **CTw**: controle Tween 80. **C-**: controle negativo. **GAPDH**: grupo teste com o fragmento do gene GAPDH.  **$\beta$ -Tub**: grupo teste com o fragmento do gene  $\beta$ -tubulina. **GDH**: grupo teste com o fragmento do gene GDH. **DIM-1**: grupo teste com o fragmento do gene DIM-1. **GluF1**: grupo teste com o fragmento 1 do gene *glc-5*. **GluF2**: grupo teste com o fragmento 2 do gene *glc-5*. **GluF1+IVM**: grupo teste com o fragmento 1 do gene *glc-5* e ivermectina. **GluF2+IVM**: grupo teste com o fragmento 2 do gene *glc-5* e ivermectina.  
 Fonte: O Autor (2018).

## VITA

Lucas Bochnia Bueno é Biomédico, graduado pelo Centro Universitário Autônomo do Brasil, UNIBRASIL em 2016. Em março de 2017, ingressou no mestrado, no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da UFPR e desenvolveu os seguintes projetos:

- Biotecnologia aplicada ao controle parasitário em ruminantes.
- Avaliação de genes funcionais do parasito *Haemonchus contortus* usando RNAi para o desenvolvimento de novas terapias.

Durante esse período participou da elaboração de 2 artigos (abaixo) como colaborador e 1 artigo como primeiro autor. Além disso, participou e ministrou palestras, participou de cursos, minicursos e organização de eventos.

SCHAFASCHEK, A.I.I., PORTUGAL, T.B., DE MORAES, A., **BUENO, L.B.**, GUARALDO, A.C., PRITSCH, I.C., MOLENTO, M.B., Occurrence of *Haematobia irritans* in cattle in different livestock production systems (**em processo de submissão**)

BUZATTI, A., CRUZ, A.A., CHICOY, Y., DE CASTRO, L.L.D., **BUENO, L.B.**, BORTOLUZZI, B.B., MOLENTO, M.B., Gene silencing of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Haemonchus contortus* (**em processo de submissão**)

**BUENO, L.B.**, BUZATTI, A., BORTOLUZZI, B.B., CINTRA, M.C.R., PRITSCH, I.C., PACHECO-LUGO, L., DAROCHA, W.D., MOLENTO, M.B., Silencing of the genes glc-5, DIM-1, GAPDH, GDH and  $\beta$ -tubulin in *Haemonchus contortus* (**submetido – Figura 25**)

FIGURA 25 - ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA *INTERNATIONAL JOURNAL FOR PARASITOLOGY*, COM FATOR DE IMPACTO IGUAL A 3,07 (B1).

### Submission Confirmation

Int J Parasitol <eesserver@eesmail.elsevier.com>

qui 25/10/2018 13:04

Para: lucas.buenoo@hotmail.com <lucas.buenoo@hotmail.com>

\*\*\* Automated email sent by the system \*\*\*

Dear Mr. Bueno,

Your submission entitled "Silencing of the genes glc-5, DIM-1, GAPDH, GDH and  $\beta$ -tubulin in *Haemonchus contortus*" has been received by the International Journal for Parasitology

