

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Campus UFRJ-Macaé Professor Aloísio Teixeira
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação

Josias Alves Machado

**UMA PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE (PDI) DO
CARRAPATO *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* ENVOLVIDA NA
INTERFACE DO CICLO CELULAR COM O CONTROLE
METABÓLICO**

Josias Alves Machado

**UMA PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE (PDI) DO CARRAPATO
RHIPICEPHALUS MICROPLUS ENVOLVIDA NA INTERFACE DO
CICLO CELULAR COM O CONTROLE METABÓLICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e
Conservação, Campus UFRJ-Macaé
Professor Aloísio Teixeira, da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do título de
Doutor em Ciências Ambientais e
Conservação

ORIENTADOR Dr. CARLOS JORGE LOGULLO DE OLIVEIRA

MACAÉ-RJ

2020

UMA PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE (PDI) DO CARRAPATO
RHIPICEPHALUS MICROPLUS ENVOLVIDA NA INTERFACE DO CICLO
CELULAR COM O CONTROLE METABÓLICO.

Josias Alves Machado

Orientador: Prof. Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, *Campus* UFRJ-Macaé Professor Aloísio Teixeira, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Ambientais e Conservação.

Aprovado por:

Prof. Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira

Prof. Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca

Prof. Dr. Mauricio Mussi Molisani

Prof. Dr. Edinildo Alcantara Machado

Prof. Dr. Jorge Luiz da Cunha Moraes

Macaé – RJ

Agosto de 2020

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho com amor e carinho a minha família:

aos meus pais, esposa, filhos, sogros, irmãos, cunhados e cunhadas e sobrinhos que tiveram que entender minhas ausências durante as reuniões em família. À minha igreja, que representa minha família espiritual, que esteve em todo momento incentivando e apoiando em oração nos momentos difíceis desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, autor e consumidor da minha fé, que me capacitou nos momentos mais difíceis, fortalecendo-me para suportar a nobre e dolorosa tarefa durante o crescimento intelectual.

À minha família que suportou meus estresses e minha ausência em reuniões, e ainda assim me apoiou incondicionalmente.

Ao meu orientador Dr. Carlos Logullo pela orientação, discussão e por me colocar sobre sua envergadura intelectual para que eu pudesse ampliar minha visão no horizonte científico.

Ao Prof. Albert Mulenga, que uma conversa me ajudou direcionar minha hipótese dentro da linha de pesquisa do Logullo's Lab.

Ao professor Itabajara Vaz pela ajuda em todos os experimentos desta tese e pelos conselhos acadêmicos;

À professora Nelilma Correa Romeiro, pela enoRme contribuição dentro do meu projeto e pelos conselhos nas horas mais difíceis do doutorado.

Ao professor Leonardo Abreu, que aceitou a tarefa de correção do documento final desta tese.

Aos meus colegas de doutorado Vitor Won-Held Rabelo e Ronald Sodre Martins, pela ajuda na área de BioinfoRmática.

Ao meu amigo e colega de doutorado, Christiano Calixto que estava sempre ao meu lado na bancada, discutindo, desenhando e executando os experimentos.

À minha amiga Dra Barbara Pitta Della Noce, por todo apoio e orientação nos experimentos com as células BME26.

Á minha amiga e colega de doutorado Marcelle Uhl Viana, que nunca negou ajuda nos experimentos, sua organização e critério experimental sempre fez a diferença nos resultados.

Aos meus amigos Dr Evenilton Pessoa Costa, Críscila de Sousa, Brenda Bairral, GuilheRme Augusto Machado pelas colaborações de bancada e pelas contribuições iniciais na pós graduação.

A todos do Laboratório LIBHM, Prof. Masuda, pelos conselhos acadêmicos

Professor Dr José Roberto (Beto), Porf. Dr José Nepomuceno (Prof. Zé)- sua memorização de protocolos, sempre ajudaram antes e durante os experimentos-, Prof. Dr. Petter Franco Entringer, Dr Jorge Moraes, Prof. Eldo Campos, Prof^a. Flavia Borges Mury, Dr^a Helga Gomes aos colegas do Laboratório que contribuíram, de diversas maneiras, seja nas discussões nos

seminários, seja no agradável convívio social: Adriana Salles (Drika) e Falcão, Dr^a Camila Waltero, MsC Jhenifer Nascimento, Dr. Newton Ruiz Sanches, Dr Renato Martins, MsC Danielle Santos, MsC Karina Godarth Gonçalves, MsC Ana Carima, MsC. João, MsC Renato Bernarbé, I.C. Sandy, I.C. Bianca, I.C. Carem, I.C. Natan, I.C. Joyce e I.C. Thainá, vocês foram fundamentais para meu crescimento intelectual e para estabilidade emocional.

As minhas amigas e técnicas do laboratório de imagem do Nupem Aline Karl Araújo e Simone Azevedo Gomes, pela presteza e paciência na confecção das imagens dos experimentos.

Aos meus amigos e colegas de doutorado (PPGCiAC), Hélio Kinast Cruz Secco, Mônica Pacheco de Araújo e Ocimar Ferreira de Andrade, pelo apoio e conselhos nos momentos de crises durante o doutorado.

Ao programa de pós graduação PPGCiAC em especial, Marla Granados BelaRmino, Prof Fábio Didário, Prof^a Ana Pettri, por toda ajuda prestada, desde apoio emocional até às orientações acadêmicas.

Aos professores do programa PPGCiAC, obrigado pelos ensinamentos, em sala de aula e extra classe.

À toda a comunidade do Nupem/UFRJ, sem o apoio deste centro acadêmico nada que foi feito nesta tese seria possível.

Aos professores Dr. Jorge Moraes, Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca, Dr. Edinildo Alcântara Machado e Dr Maurício Mussi, por aceitarem participar da minha banca de defesa de tese do doutorado e pela contribuição final desta tese.

*“Olhando para o passado exclamo
Eben-ha'ezer, olhando para o futuro
clamo Yhaweh-yir' eh.”*

Hudson Taylor (adaptado)

Macaé- RJ

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Ap Alves Machado, Josias
 Uma Proteína Dissulfeto Isomerase (PDI) do
 carrapato *Rhipicephalus microplus* envolvida na
 interface do ciclo celular com o controle metabólico
 / Josias Alves Machado. -- Rio de Janeiro, 2020.
 121 f.

 Orientador: Carlos Jorge Logullo de Oliveira.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
 de Janeiro, Instituto de Biodiversidade e
 Sustentabilidade, Programa de Pós-Graduação
 Profissional em Ambiente, Sociedade e
 Desenvolvimento, 2020.

 1. Proteína Dissulfeto Isomerase. 2. PDI. 3.
 Metabolismo Redox. 4. *Rhipicephalus microplus*. I.
 Jorge Logullo de Oliveira, Carlos, orient. II.
 Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

RESUMO

O controle do carrapato *Rhiphicephalus microplus* em criação de bovinos tornou-se essencial para a diminuição de importantes doenças emergentes transmitidas por vetores. Contudo, este controle tem sido realizado principalmente através de produtos químicos, que muitas vezes, não são degradados e podem ser bioacumulados no meio ambiente. Por esta razão, esforços contínuos têm sido realizados no desenvolvimento de novas drogas e/ou métodos mais eficientes. Uma das maneiras de controle mais segura atualmente é através de desenvolvimento de vacinas produzidas a partir de proteínas importantes do ciclo celular e no metabolismo do carrapato bovino. A proteína dissulfeto isomerase (PDI) é uma enzima multifuncional que participa de diversos eventos celulares, catalisa a isomerização, oxidação e redução do tiol nas membranas celulares e contribui em diversos aspectos do metabolismo redox em diferentes organismos. No entanto, as funções e a importância da PDI ainda precisam ser determinadas para os carrapatos *Rhiphicephalus microplus*. Três transcritos PDI foram localizados no banco de sequências do transcriptoma e posteriormente identificados por homologia de sequência, análises de filogenia como *RmPDI-1*, *RmPDI2* e *RmPDI3*. Diferenças estruturais significativas relacionadas à distribuição eletrostática e hidrofóbica de superfície foram observadas na construção de modelos tridimensionais computacionais para cada isoforma. Além disso, as isoformas *RmPDI* exibiram graus distintos de exposição à cisteína e acessibilidade a DTNB (um agente derivado de sulfidril), de acordo com estudos de “docking molecular”. A análise da dinâmica molecular com *RmPDI-1* e DTNB demonstrou uma interação altamente estável com Cis²⁶⁴ e sugere uma possível mudança na sua atividade. Por sua ação inibitória sobre a atividade de PDI, as células BME26 foram tratadas com DTNB em diferentes concentrações e tempos. Parâmetros celulares como viabilidade, atividade da lactato desidrogenase, glutatona reduzida (GSH) e glicogênio mostraram-se reduzidos após a exposição ao DTNB em dose concentração e tempo dependentes. Curiosamente, a diminuição do conteúdo de glicogênio também foi observada pela coloração PAS e foi correlacionada com o aumento da expressão de GSK3 β em ambos os níveis de proteína (imunomarcagem) e transcrição (RT-qPCR). Além disso, as células BME26 tratadas com DTNB exibiram alterações morfológicas, mas não alteraram o perfil transcricional para isoformas *RmPDI*. Abordagem de genômica funcional foi usada para projetar estratégias de silenciamento de gene RNAi para *RmPDI*s. O aumento da transcrição relativa de GSK3 β foi determinado para *RmPDI2* e células BME26 duplamente

silenciadas. Os anticorpos policlonais foram obtidos contra epítomos *RmPDI-1* específicos e usados para confirmar o silenciamento do gene após a imunocoloração. Adicionalmente, a detecção de β -catenina foi diminuída devido ao silenciamento do gene *RmPDI1*. Os dados aqui apresentados ampliam o conhecimento atual das vias de sinalização e processos fisiológicos de relevância para as células BME26 que podem contribuir para a proposição de novas estratégias de controle de carrapatos bovinos.

Palavras-chave: Proteína Dissulfeto Isomerase, DTNB, Metabolismo Redox, *Rhipicephalus microplus*.

ABSTRACT

The control of the tick *Rhipicephalus microplus* in cattle breeding has become essential for the reduction of important emerging diseases transmitted by vectors. However, this control has been carried out mainly through chemical products, which are often not degraded and can be bioaccumulated in the environment. For this reason, continuous efforts have been made to develop new drugs and / or more efficient methods. One of the safest ways of control today is through the development of vaccines produced from important proteins of the cell cycle and in the metabolism of bovine ticks. Protein disulfide isomerase (PDI) is a multifunctional enzyme that participates in several cellular events, catalyzes the isomerization, oxidation and reduction of thiol in cell membranes and contributes to several aspects of redox metabolism in different organisms. However, the functions and importance of the PDI have yet to be determined for *Rhipicephalus microplus* ticks. Three PDI transcripts were located in the sequence bank of the transcriptome and subsequently identified by sequence homology, phylogeny analyzes such as *RmPDI-1*, *RmPDI2* and *RmPDI3*. Significant structural differences related to electrostatic and hydrophobic surface distribution were observed in the construction of three-dimensional computational models for each isoform. In addition, the *RmPDI* isoforms exhibited different degrees of exposure to cysteine and accessibility to DTNB (a sulfhydryl-derived agent), according to molecular docking studies. The analysis of molecular dynamics with *RmPDI-1* and DTNB demonstrated a highly stable interaction with Cys264 and suggests a possible change in its activity. Due to their inhibitory action on PDI activity, BME26 cells were treated with DTNB at different concentrations and times. Cellular parameters such as viability, lactate dehydrogenase activity, reduced glutathione (GSH) and glycogen were shown to be reduced after exposure to DTNB in a dose-dependent concentration and time. Interestingly, the decrease in glycogen content was also observed by PAS staining and was correlated with increased expression of GSK3 β at both protein levels (immunostaining) and transcription (RT-qPCR). In addition, BMT26 cells treated with DTNB exhibited morphological changes, but did not change the transcriptional profile for *RmPDI* isoforms. Functional genomics approach was used to design RNAi gene silencing strategies for *RmPDI*s. The increase in the relative transcription of GSK3 β was determined for *RmPDI2* and BME26 cells doubly silenced. Polyclonal antibodies were obtained against specific *RmPDI-1* epitopes and used to confirm gene silencing after immunostaining. Additionally, the detection of β -catenin was decreased due to the silencing of the *RmPDI1* gene. The data presented here expand the current knowledge of the signaling

pathways and physiological processes of relevance to BME26 cells that may contribute to the proposal of new strategies for the control of bovine ticks.

Keywords: Protein Disulfide Isomerase, DTNB, Redox Metabolism, *Rhipicephalus microplus*.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Evolução da alimentação sanguínea em aracnídeos.....	20
Figura 2	O ciclo biológico do <i>Rhipicephalus microplus</i>	25
Figura 3	Desenvolvimento embrionário do carrapato <i>R. microplus</i> nas diferentes etapas do desenvolvimento da embriogênese.....	26
Figura 4	Características das células BME26.....	28
Figura 5	Múltiplas funções de PDI	31
Figura 6	Modelo tridimensional de PDI Humana.....	32
Figura 7	Alinhamento de sequências de aminoácidos <i>RmPDI-1</i>	53
Figura 8	Alinhamento de sequências de aminoácidos <i>RmPDI-2</i>	54
Figura 9	Alinhamento de sequências de aminoácidos <i>RmPDI-3</i>	50 55
Figura 10	Associações filogenéticas dos genes <i>RmPDI</i> s.....	57
Figura 11	Predições das estruturas de <i>RmPDI-1</i>	58
Figura 12	Predições das estruturas de <i>RmPDI-2</i>	59
Figura 13	Predições das estruturas de <i>RmPDI-3</i>	60
Figura 14	Análise do potencial eletrostático das <i>RmPDI</i> s.....	63
Figura 15	Análises de superfícies hidrofóbicas das <i>RmPDI</i> s.....	64
Figura 16	“Docking Molecular” da <i>RmPDI-1</i>	65
Figura 17	“Docking Molecular” da <i>RmPDI-2</i>	66
Figura 18	“Docking Molecular” da <i>RmPDI-3</i>	67
Figura 19	Distâncias entre os Domínios da <i>RmPDI-1</i>	68
Figura 20	Distâncias entre os domínios de <i>RmPDI-1</i> complexado com DTNB.....	69
Figura 21	Análises de estabilidade do complexo <i>RmPDI-1</i> -DTNB.....	70

Figura 22	Modo de ligação do DTNB em diferentes momentos.....	71
Figura 23	Mudanças conformacionais na <i>RmPDI-1</i>	72
Figura 24	Efeito do DTNB na viabilidade e proliferação celular.....	73
Figura 25	Efeito do DTNB na morfologia das células BME26.....	74
Figura 26	Perfil transcricional das <i>RmPDIs</i> durante o tratamento com DTNB.....	75
Figura 27	Atividade de LDH em células BME26 tratadas com DTNB.....	76
Figura 28	Marcação de Glutathiona reduzida (GSH) em células BME26 tratadas com DTNB.....	77
Figura 29	Imunomarcação para GSK3 em células BME26.....	78
Figura 30	Avaliação dos níveis de glicogênio durante o tratamento das células BME 26:.....	79
Figura 31	Perfil transcricional das células silenciadas para <i>RmPDIs</i>	80
Figura 32	Avaliação do anticorpo anti- <i>RmPDI-1</i>	81
Figura 33	Imununomarcação anti- <i>RmPDI-1</i>	82
Figura 34	Imununomarcação anti- <i>RmPDI-1</i>	83
Figura 35	Imununomarcação anti- β -catenina.....	84
Figura 36	Imununomarcação anti- β -catenina.....	85
Figura 37	Modelo esquemático PDI-AKT-GSK3 β - β catenina na viabilidade celular e metabolismo de glicogênio.....	86
Tabela 1	Caracteres da sequência da família PDI de <i>R. microplus</i>	56
Tabela 2	Área de acessibilidade (%) de resíduos de cisteína em <i>RmPDIs</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
DTNB	5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
ELF1a	Elongation factor 1-alpha
G6PDH	Glicose-6 fosfato desidrogenase
GP	Glicogênio Fosforilase
GPx	Glutaciona Peroxidase
GR	Glutaciona Redutase
GS	Glicogênio Sintase
GSH	Glutaciona Reduzida
GSS	Glutaciona Oxidada
GSK	Glicogênio Sintase Kinase
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HK	Hexoquinase
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleotideo Fosfato oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo Fosfato reduzida
PDI	Proteina Dissulfeto Isomerase
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PK	Piruvato Kinase
PRX	Peroxiredoxina
RNS	Espécie Reativa de Nitrogênio, do Inglês Reactive Nitrogen Species
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês Reactive Oxygen Species
RSS	Espécie Reativa de Enxofre, do inglês Reactive Sulfur Species
TR	Tioredoxina redutase
MDY-64	Marcador de membrana vacúolo de levedura
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
PBS	Tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1- Carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> e as Células Embrionárias BME26.....	25
2.2- Proteína Dissulfeto Isomerase.....	34
2.3- Estresse Oxidativo e o Código Redox.....	36
2.4- O Enxofre como sensor Redox.....	39
3.OBJETIVOS.....	39
3.1- Objetivo Geral.....	39
3.2- Objetivos específicos.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1- Identificação das sequências codificantes para PDI em <i>R. microplus</i>	40
4.2- Manutenção das células BME26.....	40
4.3- Extração de RNA e quantificação relativa de transcrição de genes por PCR em tempo real.....	41
4.4- Clonagens de PDIs e Análises da sequência de aminoácidos.....	41
4.5- Reação de ligação do inserto ao vetor de clonagem.....	42
4.6- Transformação das <i>E. coli</i> DH5 α quimicamente competentes.....	42
4.7- Checagem das colônias transformadas.....	42
4.8- Extração do DNA plasmidial.....	42

4.9- Análises Filogenética das <i>RmPDI</i> s.....	43
4.10- Tratamentos das células BME26 com DTNB.....	43
4.11- Viabilidade Celular.....	44
4.12- Análises morfológicas das células BME26.....	44
4.13 Análises de Viabilidade das Células BME26.....	45
4.14- Extração de RNA e quantificação relativa por qPCR	45
4.15- Quantificação de LDH.....	46
4.16-Quantificação de GSH.....	47
4.17- Determinação de Proteínas.....	47
4.18- Síntese e adição de RNA de cadeia dupla (dsRNA).....	48
4.19 Imunolocalização <i>RmPDI</i> -1, GSK3 β e β -catenina.....	48
4.20- Análises estatísticas.....	49
4.23- Modelagem estrutural das PDI's.....	49
4.24-Simulações de “ <i>docking</i> molecular”	50
4.25- Dinâmica Molecular do DTNB x <i>RmPDI</i> s.....	51
 5. RESULTADOS	
5.1- Análise de sequência e estrutura das <i>RmPDI</i> s.....	53
5.2- Modelos tridimensionais de <i>RmPDI</i> s.....	57
5.3- Docking Molecular.....	64
5.4- Dinâmica Molecular.....	67
5.4.1- Análises das distâncias entre os domínios.....	67

5.4.2- Análise da estabilidade do complexo <i>RmPDI-1</i> -DTNB.....	69
5.4.3- Mudanças conformacionais na <i>RmPDI-1</i>	69
5.5- Proliferação celular.....	72
5.6- Transcrição de <i>RmPDI</i> durante tratamento com DTNB.....	74
.	
5.7 Correlação Metabólica em Células BME26 tratadas com DTNB.....	75
5.7.1- Avaliação de LDH e GSH.....	75
5.7.2- Imunomarcção de GSK3- β	76
5.7.3- Avaliação do Glicogênio.....	78
5.8- Silenciamento gênico de PDIs.....	79
5.9- Avaliação do anticorpo anti- <i>RmPD-1</i>	80
5.10- Imunomarcção <i>RmPDI-1</i>	81
5.11 Imunomarcção β -catenina.....	83
6. DISCUSSÃO	87
7. CONCLUSÕES	102
8. REFERÊNCIAS	103

ANEXO 1: Preparo do meio L15.....	113
ANEXO 2: Lista de primers.....	115

1. INTRODUÇÃO

Carrapatos são ectoparasitas hematófagos obrigatórios pertencentes ao filo Arthropoda, classe Aracnida, ordem Acari e subordem Ixodida, que por sua vez compreende três famílias: os carrapatos moles - Argasidae (~200 espécies), carrapatos duros - Ixodidae (~700 espécies), e os Nuttalliellidae (monotípicos) - *Nuttalliella namaqua* (Barker & Murrell, 2004; De La Fuente & Kocan, 2006). Dados genéticos e morfológicos indicam que as famílias de carrapatos duros e moles são monofiléticas, com exclusão de todos os outros ácaros (Klompen, 2010). Isto sugere que a hematofagia evoluiu dentro de uma linhagem ancestral de carrapatos divergentemente. Outrossim, existem diferenças fisiológicas das glândulas salivares das principais famílias, sugerindo que muitos mecanismos de alimentação dos artrópodes que se alimentam de sangue evoluíram independentemente (figura 1) (Mans & Neitz, 2004; Mans, 2011).

Os Argasídeos (carrapatos moles) se alimentam rapidamente levando ao seu ingurgitamento, isso pode ocorrer em minutos ou horas, com a quantidade de sangue absorvida limitada pela capacidade de extensão de seus tegumentos. Isso geralmente resulta na captação de sangue duas a dez vezes o seu peso corporal inicial. Assim, os Argasídeos alimentam-se do sangue dos seus hospedeiros, repetidas vezes, abandonando-os após cada alimentação (Sonenshine & Roe, 2014). Após cada repasto sanguíneo as fêmeas efetuam várias posturas, alternando com a alimentação sanguínea. Cada postura não ultrapassa 150 ovos, um número pequeno quando comparada aos Ixodídeos (carrapatos duros).

Nos Ixodídeos, a alimentação é prolongada, ingerindo grandes quantidades de sangue, chegando a atingir 100 vezes a sua massa corporal inicial. Todo este sangue é utilizado como única fonte energética para o desenvolvimento destes carrapatos (Sonenshine & Roe, 2014).

Considerações recentes colocam os Nuttalliellidae dentro da família Ixodoidea, mas não resolvem as relações filogenéticas das três famílias, principalmente devido à ausência de dados moleculares para *N. namaqua* (Guglielmone *et al.*, 2010). Portanto, a posição filogenética deste último poderia ter implicações significativas para hipóteses sobre a evolução do estilo de vida dos carrapatos (figura 1). Assim sendo, estratégias de estilo de vida para carrapatos duros e moles sugerem que várias adaptações à alimentação sanguínea ocorreram após a divergência (Mans *et al.*, 2011).

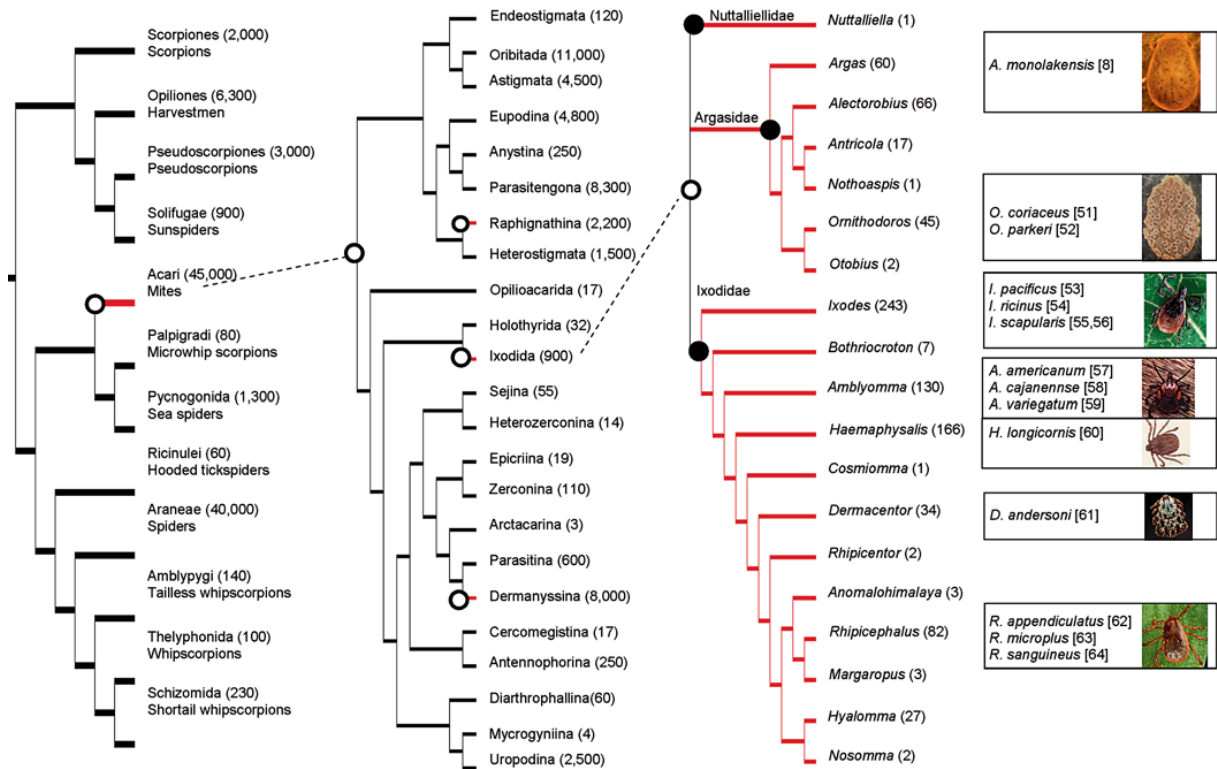


Figura 1 - Evolução da alimentação sanguínea em aracnídeos. As filogenias dos aracnídeos, ácaros, e carrapatos são indicados. Ramos veRmelhos indicam linhagens de alimentação de sangue. Os números entre parênteses indicam o número de espécies para aracnídeos, ácaros e carrapatos. Adaptado: Mans *et al* 2010.

Estima-se que a hematofagia tenha surgido no curso da evolução entre 145-65 milhões de anos atrás, entre as eras jurássica e cretácea. Neste período, surgiram diversas estratégias nutricionais entre os artrópodes (Mans *et al.*, 2002). O sangue dos hospedeiros é uma fonte rica de nutrientes como: proteínas, açúcares, sais, lipídeos, aminoácidos e hormônios, que suprem as necessidades nutricionais dos artrópodes e de seus embriões (Hocking, 1971). A degradação da hemoglobina, uma das proteínas mais abundante do sangue, libera grandes quantidades de heme (Horn *et al.*, 2009; Lara *et al.*, 2003). O heme, é uma molécula essencial para os organismos, devido ao seu grupo prostético das hemo enzimas (Mense & Zhang, 2006) que consiste basicamente em um átomo de ferro (Fe) ligado a quatro átomos de nitrogênio de um anel porfirínico. O Ferro (Fe) é classificado como metal de transição, que pode existir na forma ferrosa (Fe^{2+}) ou férrica (Fe^{3+}). Contudo, esse grupo prostético possui uma natureza potencialmente tóxica devido sua natureza lipofílica, que uma vez livre tende a interagir com membranas de células e organelas, desestabilizando o citoesqueleto e a permeabilidade das membranas (Schmitt *et al.*, 1993). Além disso, devido sua natureza reativa, o Fe livre pode reagir facilmente com as espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas durante processos metabólicos, desencadeando a reação de Fenton, uma reação em cadeia que leva à peroxidação lipídica e a formação de mais ROS (Kehrer, 2000), que podem interagir com estruturas celulares

danificando proteínas (Aft & Mueller, 1984), lipídeos (Tappel, 1955) e DNA (Aft & Mueller, 1983).

As espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre, denominadas ROS, RNS e RSS (do inglês Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species and Reactive Sulfur Species), respectivamente, são produzidas durante a função celular no *Rmal* e em resposta a vários estímulos. Um desequilíbrio no metabolismo desses intermediários reativos resulta no fenômeno conhecido como estresse oxidativo. Durante a evolução os artrópodes hematófagos desenvolveram estratégias bioquímicas e moleculares a fim de mitigar os efeitos deletérios causados pelo estresse oxidativo, apropriando-se de sistemas naturais para o controle de radicais livres. Um exemplo são os antioxidantes não enzimáticos que podem ser produzidos pelo próprio organismo ou adquiridos através da dieta, que controlam o estresse oxidativo em hematófagos. Estas moléculas podem atuar como cofatores enzimáticos ou como vitaminas, como é o caso da Glutathione (GSH, em sua forma reduzida) e do ácido ascórbico (Vitamina C), respectivamente (Dickinson & Forman, 2002). Tais propriedades antioxidantes se dão através da capacidade de doar elétrons a sistemas oxidativos, estabilizando espécies reativas e impedindo a continuidade dessas reações descontroladas.

Uma outra estratégia dos artrópodes para controlar o estresse oxidativo se dá por meio de reações enzimáticas, assim, as oxiredutases apresentam diferentes mecanismos de ação, estrategicamente localizadas em diferentes tecidos e microambientes celulares e degradam diversas espécies reativas. Destarte, enzimas oxiredutases são fundamentais no combate às espécies reativas e na homeostase redox de hematófagos (Sen, 2001).

A Proteína Disulfeto Isomerase (PDI) é uma chaperona e ditiol-dissulfeto oxidoreductase abundante no retículo endoplasmático (RE) essencial para a regulação da proteostase com função de enovelamento de proteínas. Embora PDI esteja presente principalmente no ER, também ela pode ser encontrada no citosol (Parakh & Atkin, 2015, Turano *et al.*, 2002, Wroblewski *et al.*, 1992), mitocôndrias (El Hindy *et al.*, 2014) e em superfície celular (Soares Moretti e Martins Laurindo, 2017). Em células vasculares, PDI interage e regula fisicamente NADPH oxidase (NOX) e no meio extracelular atua como um regulador redox essencial à atividade de proteínas de superfície celular, como integrinas (Laurindo *et al.*, 2012). Uma fração de PDI de superfície celular, denominada Pec/PDI, é apontada dentro de redes redox supracelulares que regulam a matriz extracelular de células (ECM) e a arquitetura de sistemas de órgãos com propriedades estruturais e funcionais (catalíticas ou alostéricas) das ligações

dissulfeto, durante a regeneração de vasos sanguíneos (Tanaka *et al.*, 2020). Além disso, PDI pode associar-se mecanicamente com a proteína de fissão mitocondrial Drp1, reduzindo seu status e atividade redox, durante a cicatrização de feridas e a angiogênese em pacientes diabéticos (Young-Mee *et al.*, 2018). Em *Caenorhabditis elegans*, PDI foi capaz de regular a migração neuronal através da regulação redox, durante a secreção de Wnt (Nanna Torpe *et al.*, 2019). Em células HeLa, a superexpressão ectópica de PDIA6, levou a um aumento da proliferação celular, acompanhado de progressão acelerada do ciclo celular através da inibição da fosforilação da β -catenina por GSK-3 β em Ser33, Ser37 e Thr41 evitando a ubiquitinação e degradação proteasomal da β -catenina por β -TrCP (Gao *et al.*, 2016). Finalmente, Liao e seus colaboradores identificaram três isoformas de PDI no carrapato *Haemaphysalis longicornis* (Liao *et al.*, 2007) e nas análises funcionais estas enzimas foram demonstradas como de grande importância na alimentação, formação dos ovários e no desenvolvimento deste carrapato (Liao *et al.*, 2008).

Na tentativa de controlar populações de carrapatos muitas drogas já foram estabelecidas, tais como acaricidas a base de organofosfatos (Patarroyo e Costa 1980), piretróides sintéticos (Nolan *et al.*, 1989), amitraz (Soberanes *et al.*, 2002), ivermectina (Martins e Furlong, 2001) e fipronil (Castro-Janer *et al.*, 2010). Entretanto, o principal problema no controle deste parasito é a resistência aos acaricidas, uma característica preocupante que já está bem documentada na literatura (Ortiz *et al.*, 1995; Benavides *et al.*, 2000; Fernandes-Salas *et al.*, 2012). Desta forma, o controle da carga parasitária tornou-se essencial para a diminuição de importantes doenças emergentes transmitidas por vetores. Por estas razões, os esforços contínuos têm sido feitos a fim de desenvolver novas drogas e/ou métodos mais seguros, eficazes e de fácil manipulação. O controle químico ainda é o mais utilizado e parece ser o mais eficiente até o presente momento, no entanto, a rotatividade de moléculas se faz necessária para evitar a pressão de seleção sobre populações resistentes. Neste sentido, o entendimento da fisiologia e mecanismos bioquímicos que regem o desenvolvimento deste artrópode se torna imperioso para a proposição de alternativas moleculares de controle (Mehlhorn *et al.*, 2012).

Dentre várias moléculas estudadas em nosso laboratório, com potencial função acaricida, está o 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). O DTNB é um agente derivatizante de cisteínas livres e reduzidas que reage equimolarmente com o grupamento sulfidril livre em cisteínas. O produto formado nesta reação é o ácido 2-nitro-1-benzóico (TNB) que tem coeficiente de absorvidade molar definido em 412 nm. Uma vez ligado aos resíduos de cisteínas, o DTNB pode promover uma desestabilização estrutural irreversível em

proteínas tióis (Moraes *et al.*, 2011). Em um estudo preliminar anterior, o DTNB foi investigado a fim de avaliar seus possíveis efeitos em coelhos (hospedeiro) e no carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Neste estudo, observou-se que o DTNB apresentava baixa citotoxicidade para os coelhos. No entanto, os carrapatos *R. sanguineus* que se alimentaram em coelhos tratados com DTNB, bem como os carrapatos que receberam alimentação (artificial) por meio de sangue adicionado de DTNB tiveram diminuição das taxas de ovoposição e eclosão (Machado, 2014). A molécula de DTNB também é conhecida como uma molécula impermeável à membrana celular (Lara *et al.*, 2011), e o seu papel funcional tem sido exaustivamente aplicado e estudado em modelos de interação de fusão celular de parasitos como vírus em superfície celular (Ryser *et al.*, 1994; Barbouche *et al.*, 2005; Golwthaman *et al.*, 2008; Lara *et al.*, 2011; Calderon *et al.*, 2012), bactérias (Conant *et al.*, 2007) e protozoários (Santos *et al.*, 2009). Nestes trabalhos, de forma unânime, o DTNB bloqueia eficientemente a fusão celular entre o patógeno e a célula hospedeira, num mecanismo mediado pela proteína dissulfeto isomerase (PDI), impedindo a reação de inter-troca tiol-dissulfeto na superfície da célula hospedeira entre a PDI e as proteínas extracelulares do patógeno (Ryser e Flückiger, 2005).

As constatações supracitadas suscitaram a hipótese do envolvimento redox da PDI durante a transdiferenciação, migração e proliferação em células BME26.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Carrapato *Rhipicephalus microplus* e as células embrionárias BME26

Rhipicephalus microplus é um carrapato monoxeno pertencente à família Ixodidae e considerado o principal e o mais importante ectoparasita que acomete os bovinos entre os paralelos 32° Norte e Sul. Uma característica importante do *R. microplus* é o rápido e único ingurgitamento das fêmeas, durante seu ciclo de vida, e que resulta na postura de um grande número de ovos, de 2000 a 4.000 ovos por fêmea, e que depois morrem (Flechtmann, 1977). O ciclo de vida do carrapato *R. microplus* apresenta duas fases distintas: a parasitária que dura um período médio de 22 dias sobre um único hospedeiro e outra fase de vida livre que ocorre no solo podendo durar de dois a três meses, dependendo principalmente das condições climáticas existentes (Figura 2) (Gonzales *et al.*, 1974).

O *R. microplus* é encontrado em quase todas as regiões do mundo, com predominância em áreas tropicais e subtropicais. A sua importância sanitária e econômica é ampla, haja vista que, diversos patógenos (vírus, bactérias e fungos) pode causar doenças em rebanhos bovinos e por desvalorizarem produtos de origem animal. Devido sua ação espoliativa, os carrapatos produzem em seus hospedeiros lesões cutâneas durante o repasto sanguíneo, levando a consideráveis perdas econômicas na produção animal, somando-se os gastos mundiais com programas de controle do carrapato, especialmente os químicos, os prejuízos são bastante elevados, estimando-se uma perda global anual em US\$ 8 bilhões. Segundo o setor agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), o prejuízo econômico anual, causado por *R. microplus*, está na ordem de US\$ 2 bilhões (Grisi *et al.*, 2002), incluídos os gastos com acaricidas químicos, crescimento retardado, redução no consumo de alimentos, queda na produção, baixa fertilidade e alta mortalidade.

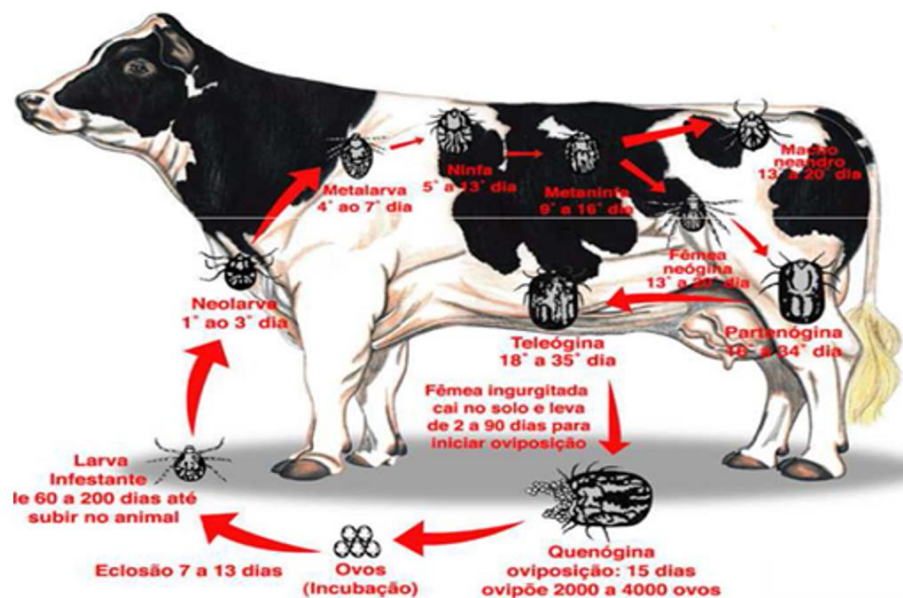


Figura 2 - O ciclo biológico do *Rhipicephalus microplus*. Desenvolvimento dividido em duas fases: fase de vida livre e fase parasitária, em seu hospedeiro bovino, adaptado de (Sonenshine e Roe, 2014).

Os ovos de *R. microplus* começam a eclodir em aproximadamente 21 dias após a postura. As larvas ainda não alimentadas passam por um período de maturação de aproximadamente uma semana para estarem aptas a fixarem-se no hospedeiro vertebrado (bovino) e continuarem o desenvolvimento (Gonzales *et al.*, 1974). A larva alimenta-se e inicia o processo de desenvolvimento e crescimento tegumentário. Em torno do sexto dia a larva torna-se nínfa adquirindo uma nova estrutura com mais um par de patas, ficando agora com 4 pares. Esta fase dura em média dois a quatro dias, até que ao final do processo surja o indivíduo adulto, sexualmente diferenciado, que acontece em torno do décimo segundo dia. Em torno do décimo sétimo dia os machos já estão aptos à cópula, podendo fecundar as fêmeas. Após a fecundação, as fêmeas, em um período de três dias, passam a partenógina (parcialmente ingurgitada), e em mais dois dias a teleógina (ingurgitamento máximo), quando ocorre uma grande ingestão de sangue, levando ao aumento de até 100 vezes do seu próprio peso inicial (Sonenshine e Roe, 2014).

O carrapato bovino suga, em média, 2 mL de sangue do seu hospedeiro (Gonzales *et al.*, 1974). As fêmeas apresentam tamanho cerca de 10 vezes superior ao dos machos. Aproximadamente aos 22 dias, a maioria das fêmeas cai ao solo. Os machos podem permanecer no bovino por mais de 38 dias fecundando inúmeras fêmeas (Gonzales *et al.*, 1974) (Figura 2). Dado o grande número de ovos posto pela fêmea de *R. microplus*, e a etapa de desenvolvimento embrionário dos ovos levarem a uma média de 90% de eclosão em larvas, a interferência na

proliferação de novos indivíduos pode representar uma ótima estratégia de controle a estes carrapatos.

O processo da embriogênese do carrapato *R. microplus* ocorre em média de 21 dias, desde a postura dos ovos até a eclosão, em condições controladas de temperatura e umidade. O desenvolvimento dos embriões do carrapato bovino se dá de forma semelhante ao da mosca *Drosophila melanogaster*, onde na fase inicial da embriogênese, ocorre a formação do blastodeRma sincicial, quando muitos núcleos estão presentes em um citoplasma comum (Figura 3) (Santos, *et.al.*, 2013).

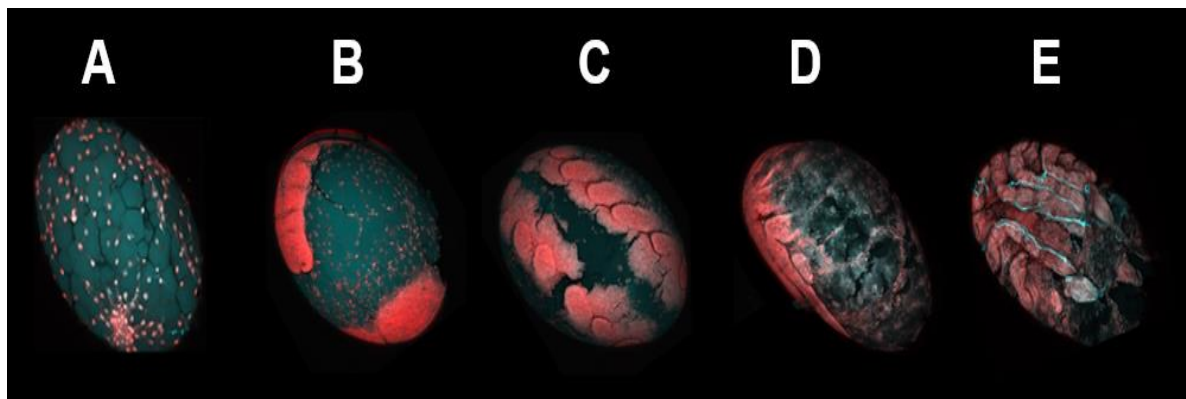


Figura 3 - Desenvolvimento embrionário do carrapato *R. microplus* nas diferentes etapas do desenvolvimento da embriogênese. Ovos permeabilizados em diferentes dias após a oviposição foram observadas por microscopia confocal de varredura a laser. (A) 5º dia após a oviposição (DAO). (B) 7º DAO. (C) 12º DAO - estágio sincicial. (D) 17º DAO - estágio de blastodeRma celular. (E) 20º DAO - estágio de fechamento dorsal (arquivo pessoal).

Em trabalhos anteriores, a caracterização bioquímica, funcional e molecular de enzimas participantes do desenvolvimento embrionário ampliou o conhecimento dos processos fisiológicos importantes para o carrapato bovino. Adicionalmente, essa abordagem pode também auxiliar na compreensão dos papéis fisiológicos e exploração desses novos alvos moleculares em futuras estratégias de controle (Santos *et al.*, 2013).

A primeira linhagem de células de carrapato foi estabelecida há mais de três décadas (Varma *et al.*, 1975) e, hoje, estas linhagens são valiosas ferramentas, para estudos bioquímicos e moleculares, embora apresentem ainda algumas limitações para o estudo comparativo com o sistema *in vivo*. Elas fornecem também modelos de estudo de interações carrapato-patógeno em nível celular e molecular (Bell-Sakyi *et al.*, 2007). Aproximadamente 50 linhagens foram estabelecidas nos últimos 30 anos, a partir de 13 espécies de carrapatos Ixodídeos, além de outras linhagens estabelecidas de Argasídeos (Mattila *et al.*, 2007, Bell-Sakyi *et al.*, 2007). A maioria das linhagens de células de carrapatos atualmente disponíveis foram estabelecidas a

partir de células embrionárias. Como resultado, as linhagens celulares de carrapatos geralmente compreendem dois ou mais tipos de células que podem estar presentes em proporções variáveis tanto em diferentes momentos dentro de uma única cultura, como em diferentes níveis de passagens, conforme previamente reportado (Bell-Sakyi *et al.*, 2007). Esta mistura de células parece ser essencial para a sobrevivência da cultura, pois as tentativas de selecionar e clonar estes diferentes formatos de células falharam (Munderloh, *et al.*, 1994). Segundo Bell-Sakyi e colaboradores (2007), as linhagens celulares de carrapatos compartilham várias características com os artrópodes dos quais foram derivadas. Conforme os parasitos hematófagos, eles crescem em meios de cultura suplementados com soro de mamífero (no caso, soro fetal bovino), as temperaturas de incubação são entre 28 °C e 34 °C, embora algumas linhagens também cresçam a 37 °C. Algumas linhagens celulares de carrapatos prosperam em condições ácidas (pH 6,5 - 6,8) semelhante ao ambiente de células proliferativas, no entanto, algumas culturas de células de carrapatos precisam ser propagadas em pH neutro a alcalino, possibilitando o crescimento de agentes patogênicos. As células de carrapato não exibem inibição por contato e a maioria crescerá prontamente em três dimensões, majoritariamente aderidas ao substrato e uma pequena parte em suspensão. Elas se dividem relativamente devagar, levando em torno de uma semana para duplicar, e podem ser mantidas em altas densidades celulares (10^6 - 10^7 células/ml). As culturas celulares de carrapatos podem ser extremamente duradouras, resistem naturalmente a pouco mais do que uma semana sem troca de meio, refletindo a capacidade dos carrapatos Ixodídeos para períodos extremamente longos entre as refeições de sangue na natureza (Bell-Sakyi *et al.* 2007).

A cultura primária da linhagem BME26 foi desenvolvida em 1981 usando uma massa de ovos de até 17 dias de desenvolvimento de uma única fêmea ingurgitada (Kurtti *et al.*, 1988). Como essa linhagem teve origem em fragmentos de tecidos embrionários, a origem tecidual e o nível de diferenciação dessa linhagem ainda não são conhecidos. O carrapato *R. microplus* é o principal vetor de *A. marginale*, o agente etiológico da borreliose em regiões tropicais e subtropicais (De La Fuente *et al.*, 2007). Assim como outras linhagens de células de carrapato, as células BME26 possuem um crescimento relativamente lento, o tempo de duplicação dessa linhagem é de 5 a 10 dias dependendo de fatores como temperatura de incubação, histórico de passagens e suplementação do meio (Munderloh e Kurtti, 1989). A linhagem BME26 se adere ao substrato de forma semelhante às outras linhagens de cultura de células de carrapatos sendo caracterizadas como semi-aderentes e é morfológicamente heterogênea, apresentando núcleos de diferentes tamanhos (Figura 4A, núcleo marcado com DAPI, setas amarelas). Culturas iniciais, pouco confluentes, possuem a aparência fusiforme com vários prolongamentos

celulares (setas rosas, indicando os prolongamentos). À medida que aumenta a confluência, as células vão se tornando arredondadas, maiores e com uma grande quantidade de vesículas dispersas no citoplasma e apresentam diferentes graus de acidificação (Figura 3B, vesículas marcadas com laranja de acridina, setas azuis). Essas vesículas, possuem alto teor lipídico, e variam de célula para célula com relação a quantidade e tamanhos. Além disso, apresentam numerosas mitocôndrias (Figura 4C, mitocôndria marcada com rodamina, seta veRmelha) e inclusões de glicogênio dispersas no citoplasma (Figura 4D, marcado por asterisco preto) (Esteves *et al.*, 2008).

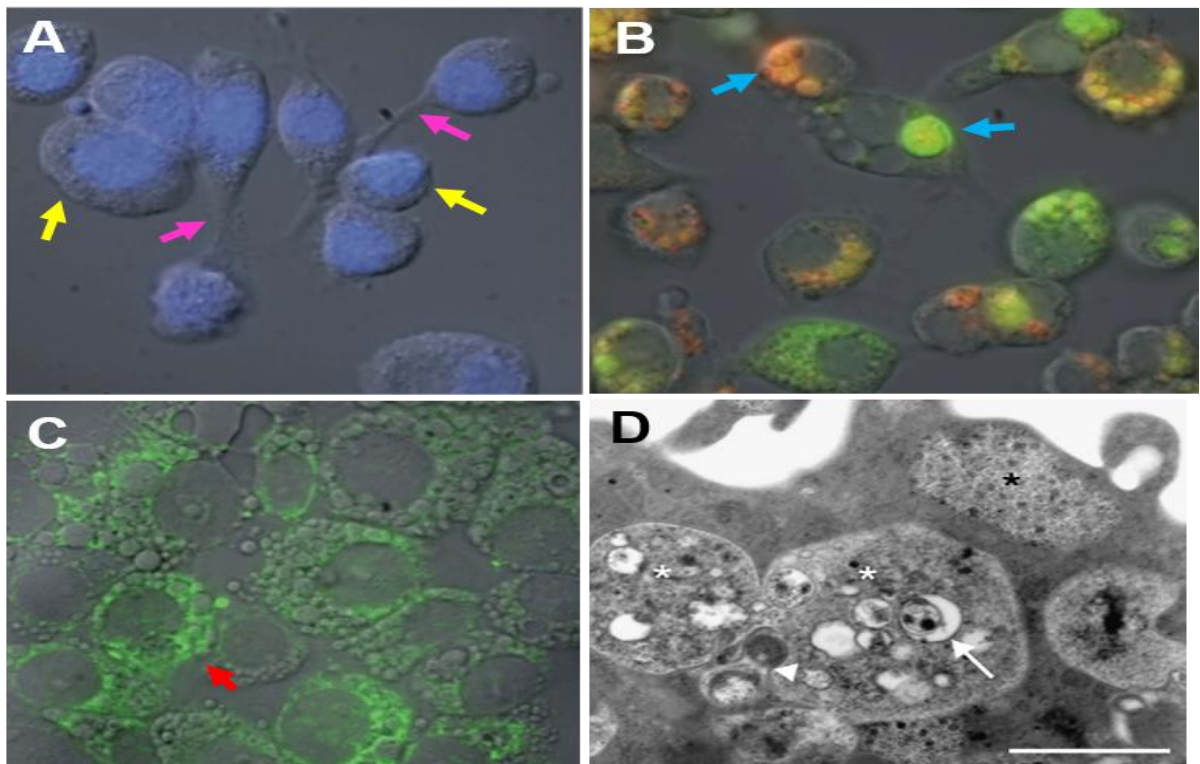


Figura 4 - Características das células BME26. Figuras A-C, mostram imagens de microscopia de fluorescência em sobreposição com DIC (contraste de interferência diferencial). Em A, mostra marcação de núcleos por DAPI (seta amarela). Em B, mostra as vesículas coradas com Laranja de Acridina (seta azul). Em C, observa-se marcação de mitocôndria por rodamina (seta veRmelha). A figura D, mostra inclusão de glicogênio marcada por um asterisco preto (*), imagem de microscopia eletrônica de transmissão (Modificado de Esteves *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, a linhagem BME26 tem sido utilizada nos estudos envolvendo a identificação e caracterização funcional de componentes das vias de sinalização: I) por insulina, em que o maquinário enzimático não apenas é capaz de promover um acúmulo de glicogênio em resposta à adição de insulina exógena (bovina) ao meio de cultivo (Abreu *et al.*, 2009), como apresenta características conservadas relativas à organização hierárquica de AKT e GSK3, bem como o papel desempenhado nos processos de viabilidade celular e no metabolismo de carboidratos (Abreu *et al.*, 2013); II) por TOR (Target of Rapamycin), mostrando a

importância dessa via não apenas na reprodução, como também na embriogênese de *R. microplus* (Waltero *et al.*, 2019); III) por CDK's (Cyclin-dependent kinases), associadas não apenas na integração de sinais intra e extracelulares que regulam o ciclo celular, como participantes também dos processos de ovogênese e embriogênese no *R. microplus* (Gomes *et al.*, 2013). De modo complementar, já foi identificada a importância do metabolismo energético nas células BME26, tanto pela inibição da Triose fosfato isomerase (Saramago *et al.*, 2012; Saramago *et al.*, 2018), como pela ação inibitória do 3-Bromo-Piruvato sobre o metabolismo de glicose e cadeia respiratória (Braz *et al.*, 2018). Essa ideia é reforçada ainda pela observação de que o metabolismo de carboidratos nas células BME26 confere a estas tolerâncias ao estresse oxidativo, especialmente pela maior disponibilidade de poder redutor na forma de NADPH intracelular (Noce *et al.*, 2019). Os perfis de transcrição e de atividade de enzimas relacionadas à via glicolítica (Hexoquinase- HK, Piruvato Quinase- PK) foram observados em células BME26 expostas a diferentes condições nutricionais relativas à disponibilidade de glicose e demonstraram uma correlação direta com a disponibilidade de carboidratos (da Silva *et al.*, 2015).

2.2 Proteína Dissulfeto Isomerase

A atividade de PDI foi publicada pela primeira vez de forma independente por dois grupos em 1963. O grupo de Brunó Straub (Dejeans *et al.*, 2012) em extratos do pâncreas de pombos e galinhas que foram capazes de estimular a reoxidação de ribonuclease. Paralelamente, Anfinsen e seus colaboradores (Hettinghouse *et al.*, 2018), como parte do trabalho sobre ribonuclease que concedeu a Anfinsen o Prêmio Nobel de Química de 1972 com Moore e Stein, realizou estudos detalhados, mostrando a aceleração da reativação da ribonuclease por um sistema microsomal de fígado de rato. O grupo de Anfinsen posteriormente purificou parcialmente a enzima responsável (Schulman & Furie, 2018) e mostrou que era capaz de catalisar reações de troca de tiol-dissulfeto. A Proteína Disulfeto Isomerase (PDI) é uma classe de enzima multifuncional encontrada principalmente no retículo endoplasmático (ER), podendo ainda ser encontradas em outros compartimentos celulares e no ambiente extracelular (Khan & Mutus, 2014).

A família das PDIs é identificada, até o momento, composta de 21 membros, todas possuem pelo menos um sítio catalítico com assinatura tioredoxina (tabela 1). A PDI e seus análogos são as únicas enzimas da família das Tiorredoxinas capazes de catalisarem a

isomerização de pontes dissulfeto por repetidos ciclos de redução e oxidação (Wilkison *et al.*, 2004). Tal capacidade se dá devido à uma função do estado redox do substrato proteico e do estado tiol redox do microambiente local. O sítio catalítico da PDI contém uma sequência CGHC encontrada em ambos domínios. A troca de dissulfeto envolve essencialmente transferência de pontes dissulfeto de proteína pelo intercâmbio tiol-dissulfeto envolvendo as duas cisteínas do sítio catalítico, levando a um acúmulo do conjunto de dissulfetos consistente com o estado conformacional mais estável para um polipeptídeo (Oliveira *et al.*, 2019). Todos os genes da família PDI fazem parte de uma superfamília conhecida como superfamília da tioredoxina (TRX), que também inclui as glutaredoxinas, TRXs, ferredoxinas e peroxidoxinas. As enzimas principais responsáveis por facilitar a troca tiol-dissulfeto são membros da família das PDIs. Embora esteja implícito que todos os membros da família PDI possuem a capacidade de reorganizar as ligações dissulfeto, apenas um subconjunto é considerado ortólogo e capaz de realizar essas reações (Galligan & Petersen, 2012)

Tabela I. Família da proteína dissulfeto isomerase humana, adaptado de Galligan & Petersen 2012

Nome do Gene	Outras denominações	Nome da proteína	Localização cromossômica	Número de aminoácidos
AGR2	XAG-2, HAG-2, AG2, PDIA17	Homólogo de proteína 2 de gradiente anterior	7p21.3	175
AGR3	HAG3, hAG-3, BCMP11, PDIA18	Homólogo de proteína 3 de gradiente anterior	7p21.1	166
<i>CASQ1</i>	PDIB1	Calsequestrin-1	1q21	396
<i>DNAJC10</i>	MTHr, ERdj5	Homólogo de DnaJ (Hsp40), subfamília C, membro 10	2q32.1	793

<i>ERP27</i>	FLJ32115, ERp27, PDIA8	Proteína residente do retículo endoplasmático 27	12p12.3	273
<i>ERP29</i>	ERp28, ERp31, ERp29, PDI-DB, PDIA9	Proteína residente do retículo endoplasmático 29	12q24.13	261
<i>ERP44</i>	KIAA0573, PDIA10	Proteína residente do retículo endoplasmático 44	9q22.33	406
<i>P4HB</i>	DIA1, PROHB, DSI, GIT, PDI, PO4HB, P4Hb, PDI-1	Proteína dissulfeto- isomerase	17q25	508
<i>PDIA2</i>	PDA2, PDIp	Proteína dissulfeto- isomerase A2	16p13.3	525
<i>PDIA3</i>	P58, ERp61, ERp57, ERp60, GRP57, PI-PLC, HsT17083	Proteína dissulfeto- isomerase A3	15q15	505
<i>PDIA4</i>	ERP70, ERP72	Proteína dissulfeto- isomerase A4	7q35	645
<i>PDIA5</i>	PDIR, FLJ30401	Proteína dissulfeto- isomerase A5	3q21.1	519
<i>PDIA6</i>	P5, ERp5	Proteína dissulfeto- isomerase A6	2p25.1	440
<i>PDILT</i>	PDIA7, ERp65	Proteína proteína semelhante a dissulfeto	16p12.3	584

		isomerase do testículo		
<i>TMX1</i>	TMX, PDIA11	Proteína transmembrana 1 relacionada à tiorredoxina	14q22.1	280
<i>TMX2</i>	PDIA12	Proteína transmembrana 2 relacionada à tiorredoxina	11cen-q22.3	296
<i>TMX3</i>	FLJ20793, KIAA1830, PDIA13	Proteína dissulfeto-isomerase TMX3	18q22	454
<i>TMX4</i>	DJ971N18.2, KIAA1162, PDIA14	Proteína transmembrana 4 relacionada à tiorredoxina	20p12	349
<i>TXNDC5</i>	MGC3178, FLJ21353, FLJ90810, EndoPDI, Hcc-2, ERp46, PDIA15	Proteína 5 contendo domínio de tiorredoxina	6p24.3	432
<i>TXNDC12</i>	TLP19, ERP18, ERP19, hAG-1, AGR1, PDIA16	Proteína 12 contendo domínio de tiorredoxina	1p32.3	<i>TXNDC12</i>

A PDI é uma proteína tiol abundante em várias células, em concentrações milimolares no retículo endoplasmático (Noiva, 1999), representando ainda cerca de 25% das proteínas tióis de superfície em várias células, sendo importante na sobrevivência celular. A superexpressão de PDI aumenta a resistência à apoptose após hipóxia de astrócitos e células endoteliais (Graven *et al.*, 2002; Sullivan *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2000).

No retículo endoplasmático a PDI exerce atividade isomerase/oxidase, enquanto fora do retículo a PDI atua geralmente como redutase, de acordo com as condições oxidante e redutora,

respectivamente (Fig.5) (Noiva 1999, Wilkerson *et al.*, 2004). Embora, classicamente a PDI apresente a função de promover o enovelamento oxidativo de proteínas no retículo endoplasmático, a fosforilação e ligação ao cálcio podem potencialmente modular a ligação da PDI a outras proteínas (Gruber *et al.*, 2006; Noiva, 1999; Wilkinson *et al.*, 2004). Apesar do papel da PDI no RE ser bem estabelecido, tem sido crescente novos conhecimentos de funções das PDIs em outros ambientes celulares. Recentemente PDIs foram encontradas em membranas plasmáticas de vários tipos de células (Tanaka *et al.*, 2018), incluindo megacariócitos e plaquetas (Tanaka *et al.*, 2020). Em alguns casos, é relatado que a PDI associada à superfície pode ser secretada para o ambiente extracelular, por exemplo, células pancreáticas exócrinas de rato transportam PDI para a membrana plasmática e secretam-na no lúmen acinar (Laurindo *et al.*, 2008). Além disso, foi relatado que as plaquetas ativadas liberam PDI para interagirem com integrinas de células endoteliais. Na superfície plaquetária, foi demonstrado que o PDI catalisa a isomerização de dissulfetos na trombospondina 1 associada à superfície, alterando subsequentemente sua ligação à catepsina neutrófila (Oliveira *et al.*, 2019).

Também foi demonstrado que PDI de superfície reduz as ligações dissulfeto estabelecidas entre um ligante e um receptor da superfície celular. Especificamente, Ryser e colaboradores (Ryser *et al.*, 2012) mostraram que a ativação e translocação da toxina da difteria ligada ao receptor, bem como a entrada do vírus da imunodeficiência humana ligada ao receptor, exigem a presença de PDI na superfície celular.

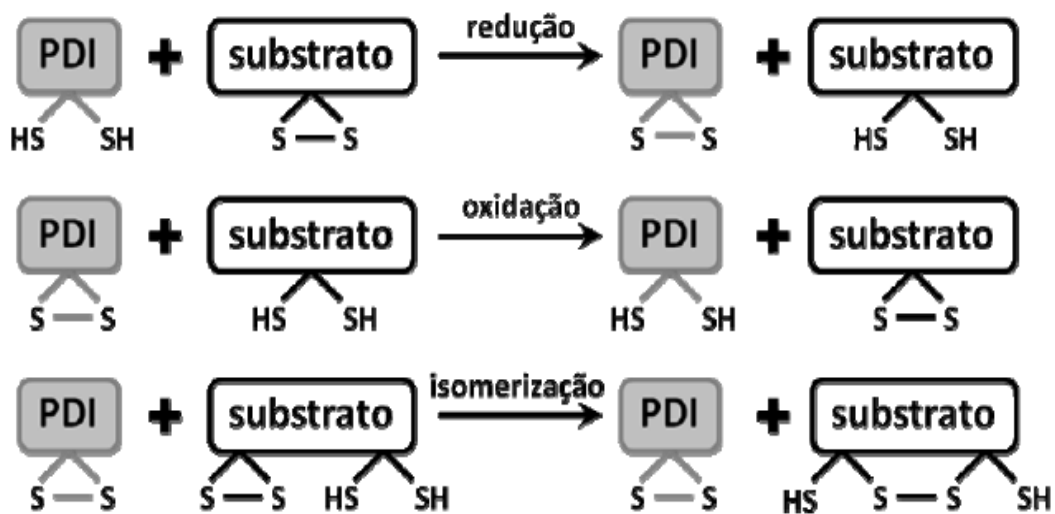


Figura 5 – Múltiplas Funções de PDI: A PDI pode desempenhar múltiplas funções dependendo o status redox do substrato. PDI apresenta função de redutase em substratos oxidados, oxidase em substratos reduzidos ou através de sucessivas atividades de oxidação e redução atuar como uma isomerase. Fonte: Ilustração adaptado de Laurindo *et al.*, 2008.

A PDI possui cinco domínios organizados na sequência a-b-b'-a'-c (Figura 6). Os domínios a e a' da PDI são homólogos à tioredoxina e apresentam sítios ativos independentes, enquanto os domínios b e b' não apresentam o motivo redox e estão relacionados como o reconhecimento ou interação da PDI com peptídeos (Gruber *et al.*, 2006; Noiva, 1999; Wilkinson *et al.*, 2004). Já o domínio c, tem sido sugerido como sítio de ligação de cálcio, e parece ser menos crítico em mamíferos quando comparado a leveduras (Tian *et al.*, 2006).

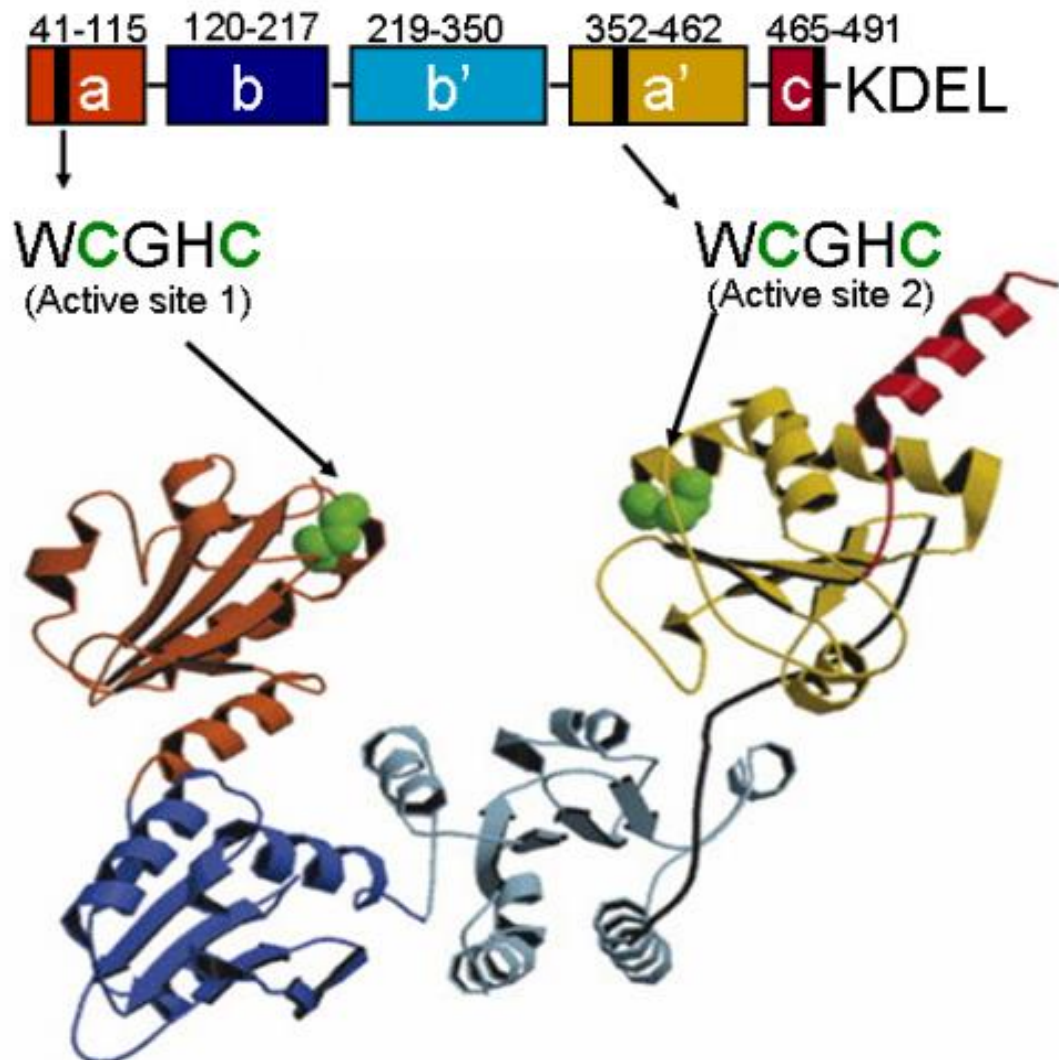


Figura 6- Modelo tridimensional de PDI Humana: Em destaque com diferentes cores dos domínios a, b, b', a' e região c teRminal com código de retenção do RE adaptado de (Laurindo, 2008).

Apesar de a PDI conter a sequência KDEL (lys-asp-glu-leu) (Harter *et al.*, 1996) de retenção no RE (presente na região C-terminal da proteína), evidências crescentes indicam possibilidade de localização fora do RE, podendo ser secretada para o ambiente extracelular. Neste contexto, a PDI pode se associar à membrana plasmática por interação eletrostática

(Terada, 1995) e de fato tem sido detectada na superfície de uma variedade de células. Os mecanismos pelos quais a PDI deixa de reconhecer o código de retenção do receptor KDEL, apesar de manter esta sequência de retenção, e migra para região extracelular ainda não estão claros (Terada *et al.*, 1995, Wilkison *et al.*, 2004).

Na superfície celular, a PDI exerce predominantemente atividade redutase (Turano *et al.*, 2002) e pode catalisar reações de transnitrosação, responsáveis pela internalização de óxido nítrico a partir de S-nitrotióis extracelulares (Ramachandran *et al.*, 2001). Nesse local, a PDI está ainda envolvida na modificação de cisteínas de proteínas de membrana, podendo modular fortemente a adesão celular mediada por receptores de integrinas (I-Hua Chen *et al.*, 2015). O modelo mais estudado neste sentido é a adesão/agregação plaquetária. A agregação plaquetária é inibida por antagonistas da PDI, incluindo o anticorpo monoclonal neutralizante RL90 (Essex *et al.*, 1995; Essex *et al.*, 2001; Lahav *et al.*, 2000; Lahav *et al.*, 2002). De fato, é conhecido que a troca tiol-dissulfeto enzimática estabiliza a agregação plaquetária mediada pela integrina $\alpha_2\beta_1$ (Lahav *et al.*, 2003). Adicionalmente, foi demonstrado que subunidades betas de integrinas interagem fisicamente com a PDI (Burgess *et al.*, 2000).

A PDI de superfície tem ainda a propriedade de se ligar à galectina-9 na superfície de linfócitos T e, por mecanismos redox, dar suporte à migração celular e à infecção por HIV (BI *et al.*, 2011). Em células endoteliais, a função oxidoreductase da PDI de superfície celular contribui para manter a assimetria de fosfolipídios de membrana, prevenindo a exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática, via inibição de translocases de aminofosfolipídios (responsáveis pela atividade flipase e/ou flopase trans-membrana) (Popescu *et al.*, 2010). Mais ainda, além de seus efeitos na superfície celular, a PDI tem importantes funções no tráfego e secreção de proteínas, como na ligação e exportação da tireoglobulina (Delom *et al.*, 2001). É reportado que a PDI desempenha um papel crítico na internalização desses patógenos pela célula hospedeira. Interessantemente, o DTNB bloqueia eficientemente a fusão celular entre o patógeno e a célula hospedeira mediada pela PDI (Lara *et al.*, 2011). Tal inibição impede a reação de intertroca tiol-dissulfeto na superfície da célula hospedeira entre a PDI e as proteínas extracelulares do patógeno (Ryser e Flückiger, 2005).

Em macrófagos, a transfecção com plasmídeo PDI-senso aumenta fagocitose de *Leishmania*, enquanto o plasmídeo PDI-antisense, siRNA contra PDI ou catalase reduzem a infecção (Santos, *et al.* 2009). Em neutrófilos humanos, a PDI associa-se a várias subunidades do complexo NADPH oxidase, particularmente p47phox, e modula funcionalmente a ativação (de A Paes *et al.*, 2010). A superfície hidrofóbica e a flexibilidade estrutural da PDI permitem a ligação desta proteína a substratos de diferentes tamanhos e com grupos dissulfeto em

diferentes localizações (Gruber *et al.*, 2006, Tian *et al.*, 2006, Wilkinson *et al.*, 2004). De fato, inúmeros estudos sugerem que o sítio de ligação da PDI a substratos é independente dos sítios catalíticos (Noiva *et al.*, 1993), contudo, os motivos redox são necessários para a posterior estabilização desta ligação (Klappa *et al.*, 1997; Noiva *et al.*, 1993). Mais ainda, a fosforilação e ligação ao Ca^{2+} podem potencialmente modular a ligação da PDI à proteínas (Guthapfel *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 1993; Wilkinson *et al.*, 2004). Em sintonia com estes aspectos estruturais, a PDI possui ainda função chaperona, a qual parece ser independente dos domínios redox ativos (Tian *et al.*, 2006).

2.3- O Estresse Oxidativo e o Código Redox

Ao longo da evolução o processo metabólico aeróbico como a respiração e fotossíntese, teve como consequência a produção de ROS nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos. Este processo metabólico leva à produção de diferentes tipos de ROS na célula. Além disso, a literatura demonstra que ROS em altas concentrações, e produzidos de modo descontrolado, possuem capacidade de causar dano oxidativo em proteínas, DNA e lipídeos (Apel & Hirt, 2004; Forman & Torres, 2002).

O oxigênio intracelular pode ser convertido a várias formas reativas por transferência de energia ou por transferência de elétrons, levando à formação de oxigênio parcialmente reduzido, resultando em redução sequencial de superóxido para peróxido de hidrogênio e então radical hidroxil (Apel & Hirt, 2004). O estresse oxidativo ocorre por meio de um desequilíbrio no metabolismo de espécies redox ativas, que culmina com a formação de agentes oxidantes (Gregory *et al.*, 2001). As espécies reativas têm sua origem na síntese enzimática, indução ambiental ou pela reação química adicional de uma espécie ativa com outras moléculas endógenas para gerar uma espécie reativa de segunda geração (Jones & Sies.,2015). Essas espécies de segunda geração possuem um espectro de atividade diferente das espécies progenitoras, com diferentes reações redox alvos biológicos (Oronsky *et al.*,2014). Assim, o estresse oxidativo é caracterizado pela presença de concentrações altas de espécies reativas tóxicas, principalmente ROS.

O Código Redox é definido como o conjunto de princípios que indicam posicionamentos de NAD/NADP, de tiois/dissulfeto e de outros sensores redox capazes de suportar o equilíbrio redox em condições moderadas de oxidação (Jones & Sies.,2015). Em sistemas biológicos, se aplica à organização redox de células, tecidos e organismos e se estende a todos organismos vivos (Paulsen & Carroll,2013). O Código Redox é dependente de ciclos

de ativação e desativação que se dão por meio de O_2 e H_2O_2 , respectivamente, e este processo contribui para a organização de desenvolvimento e adaptação ao ambiente. A partir da ruptura, ou desestabilização, dessas estruturas organizacionais instala-se o estresse oxidativo, levando à desestruturação de moléculas e tecidos (Oronsky *et al.*, 2014).

O código redox consiste em quatro princípios pelos quais os sistemas biológicos são organizados. O primeiro princípio é o uso das propriedades reversíveis de aceitação e doação de elétrons da nicotinamida no NAD e NADP para fornecer organização do metabolismo, operando em equilíbrio próximo. Isso é observado nas oxidações do substrato que estão ligadas à redução de NAD^+ e $NADP^+$, que por sua vez estão relacionadas à produção de ATP, catabolismo e anabolismo, respectivamente. Em segundo lugar o metabolismo está ligado à estrutura da proteína através de interruptores redox (*redox switch*), cineticamente controlados no proteoma, que determinam a estrutura terciária, interações macromoleculares e tráfego, atividade e função. Destaca-se neste caso a abundância de proteínas e a reatividade dos interruptores de enxofre com oxidantes, variando em muitas ordens de grandeza, para determinar a especificidade nos processos biológicos. Em terceiro, a detecção redox, em que os ciclos de ativação/desativação do metabolismo redox, envolvendo especialmente o H_2O_2 , apoiam a organização de sequências espaço-temporais na diferenciação e nos ciclos de vida de células e organismos. E em quarto e último destaque são as redes redox que formam um sistema adaptativo para responder ao meio ambiente desde micro compartimentos através de sistemas subcelulares até os níveis de organização celular e tecidual (Jones & Sies, 2015).

A localização específica de uma atividade enzimática em estruturas subcelulares ou em órgãos distintos são ambientes peculiares com potencial cinético específicos, influenciando o estado de redução-oxidação de uma determinada dupla redox, definido por seu potencial termodinâmico redox (Prigogine 1978). Isso permite que múltiplos processos físicos e químicos associados ocorram simultaneamente numa mesma célula ou órgão, obedecendo às mesmas forças termodinâmicas, levando a características distintas de resposta espacial e temporal, e suportando funções diferenciadas. A estrutura de rede redox adaptável é necessária para manter a saúde em um ambiente em mudança e, se estiver funcionalmente comprometida, contribui para a falha de doenças e organismos dependendo necessariamente da compartimentalização celular. A forma reduzida (ditiol) da proteína dissulfeto-isomerase é capaz de catalisar a redução de uma ponte dissulfeto malformada de um substrato, através da sua atividade redutase ou da atividade isomerase. Para o método da redutase, uma ligação dissulfeto de substrato dobrada incorretamente é convertida em um par de resíduos de cisteína reduzidos pela transferência de elétrons da glutatona e NADPH. Posteriormente, o dobramento

no *R*mal ocorre com a formação da ligação dissulfeto oxidativa entre os pares corretos de resíduos de cisteína do substrato, levando a uma proteína dobrada adequadamente (Fig.5). Para o método da isomerase, o rearranjo intramolecular dos grupos funcionais do substrato é catalisado próximo ao *terminal N* de cada sítio ativo. Portanto, a PDI é capaz de catalisar a troca de dissulfeto de modificação pós-tradução (Passam *et al.*,2018)

2.4- O enxofre como um sensor Redox

O enxofre ocupa uma posição única na biologia devido à sua capacidade de adotar uma ampla gama de estados de oxidação (-2 a +6) e formas quimicamente únicas ou "quimiotipos" (3a), cada um com vias distintas de formação, propriedades físicas e de reatividade. Sendo o 10º elemento mais comum no universo, o 15º mais comum na crosta terrestre e o 7º elemento mais comum em animais (Jones & Sies.,2015). Essa concentração biológica é indicativa da considerável utilidade e versatilidade do enxofre nos sistemas vivos (Lau & Pluth2019).

As espécies reativas de enxofres podem desempenhar um papel importante na biologia redox, pois o enxofre têm seis elétrons de valência e exerce grande parte de sua sinalização por meio da interação com o enxofre de cisteína (Cys-SH) nas proteínas reguladoras, ou seja, a peroxidação por Cys-SH produz sulfenilos (Cys-SOH) enquanto a persulfidação (sulfidração) produz cisteína persulfetos, Cys-S-SH (Giles *et al.*,2017).

Grupos tióis servem como tampões redox celulares, reduzindo ROS e, assim, mantendo o estado redox geral da célula em algumas situações (Gruhlke & Slusarenko, 2012). Sabe-se que os tióis atuam como agentes redutores e, uma vez oxidados, os dissulfetos correspondentes são apenas levemente oxidantes. Assim as modificações de oxidação e redução, poderiam estar funcionando como verdadeiros tampões redox, mediando reações biológicas importantes para a homeostase nos organismos (Giles *et al.*,2017).

Moléculas de ocorrência natural contendo enxofre em estados de oxidação mais elevados, como os ácidos sulfínico e sulfônico, são incapazes de participar de transformações redox espontâneas em condições fisiológicas. A possibilidade de estados de oxidação redox-ativos do enxofre serem gerados sob condições de estresse oxidativo (Kawahara *et al.*,2007). Os ácidos sulfênicos já foram identificados em várias enzimas contendo cisteína redox-ativa e a oxidação da cisteína em ácido cisteína-sulfênico pode fazer parte da sinalização celular (Pei *et al.*, 2019). Um exemplo é o componente alicina do alho (dialildissulfeto-S-monóxido), que contém uma ligação dissulfeto oxidada, estudado por vários anos (Giles *et al.*,2017). A mudança no estado de oxidação de um dos átomos de enxofre da ligação dissulfeto ativa a

ligação SS, aumentando a reatividade do composto em relação aos tióis por meio de uma reação de troca de enxofre e enxofre, e acredita-se que essa reatividade aprimorada seja responsável pelas propriedades antimicrobianas da alicina (Lawal *et al.*, 2016).

A possibilidade de estados de oxidação redox-ativos do enxofre serem gerados sob condições de estresse oxidativo, é uma possibilidade pouca explorada até o momento. Nos sistemas biológicos destaca-se necessariamente o aminoácido cisteína, uma estrutura ímpar capaz de promover o enovelamento proteico, através de formação de pontes dissulfetos, e funcionar como o mais importante sensor redox das superfícies proteicas (Giles *et al.*, 2017). As reações redox de resíduos de cisteína podem levar a uma série de modificações pós-traducionais que são um mecanismo importante para a regulação de proteínas de todas as principais categorias funcionais, como por exemplo: enzimas, proteínas contráteis, estruturais, de armazenamento e de transporte. Entre essas modificações estão dissulfetos reguladores reversíveis, tiosulfatos, S-glutationilação, ácidos sulfênicos, sulfenamidas, sulfinamidas, S-nitrosilação e persulfetos em conjunto com espécies amplamente irreversíveis, como ácidos sulfínicos, ácidos sulfônicos e sulfonamidas que são frequentemente vistas como características do estresse oxidativo (Brigelius-Flohé & R, Flohé L, 2011).

A química da formação da ligação dissulfeto é a química das reações redox e dos tiolatos. As reações redox, ou reações de redução-oxidação, são, como o nome sugere, reações nas quais uma espécie química atinge um estado de oxidação mais alto através da perda de elétrons ou ganho de oxigênio, enquanto outra é reduzida, ou seja, atinge um estado de oxidação mais baixo, através do ganho de elétrons ou da perda de oxigênio. Para a formação de ligações dissulfeto, a espécie inicial é o grupo tiol encontrado na cadeia lateral dos resíduos de cisteína nas proteínas. O grupo tiol representa o estado de oxidação -2 do átomo de enxofre. Quando dois grupos tiol são oxidados para formar um dissulfeto, ambos os átomos de enxofre envolvidos atingem o estado de oxidação -1, e dois elétrons e dois prótons devem ser transferidos para o oxidante. O oxidante mais simples que pode ser usado para formar uma ligação dissulfeto é o oxigênio molecular, que, no processo de formação do dissulfeto, é ele próprio reduzido ao peróxido de hidrogênio (Giles *et al.*, 2017). A formação de ligações dissulfeto usando oxigênio molecular como oxidante é um processo termodinamicamente favorável, e ocorre espontaneamente, desde que os dois grupos tióis possam ser justapostos. No entanto, esse processo de oxidação é cineticamente lento, mas é usado, em combinação com a catálise de íons metálicos, *in vitro* para a redobragem de proteínas produzidas como corpos de inclusão insolúveis (Giles *et al.*, 2017). Essa reação também reflete o que acontece, pelo menos

em parte, *in vivo*. No entanto, em sistemas biológicos, a reação é catalisada por enzimas conhecidas como sulfidril oxidases, incluindo a proteína Ero1 residente no ER

As ligações dissulfeto são ligações covalentes formadas entre as cadeias laterais dos resíduos de cisteína. Sua função usual é estabilizar estruturas proteicas, embora elas também possam desempenhar outros papéis, incluindo a regulação redox da atividade enzimática. A formação de ligações dissulfeto está provavelmente envolvida na biogênese de aproximadamente um terço das proteínas humanas. Um ator central nesse processo essencial é a PDI.

3. OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Identificar o papel funcional da proteína dissulfeto isomerase no controle da divisão celular em células embrionárias do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* (BME26)

3.2- Objetivos Específicos

I. Caracterização “*in silico*” da Proteína Dissulfeto Isomerase (*RmPDI*)

- a. Clonagem e sequenciamento de fragmentos referentes aos transcritos de *RmPDI*
- b. Análise por homologia de sequências de aminoácidos
- c. Construção de Modelos 3D Comparativos das 3 isoformas da Proteína Dissulfeto Isomerase (PDI);
- d. Análise das Superfícies de Potencial Eletrostático das 3 isoformas da PDI;
- e. Docking molecular da PDI com o ligante DTNB;
- f. Dinâmica molecular dos complexos formados entre a enzima e o ligante DTNB;

II. Avaliação do efeito do DTNB em células BME26

- a. Análise da viabilidade celular e capacidade proliferativa
- b. Avaliação morfológica das células tratadas com DTNB
- c. Avaliação do perfil transcricional de *RmPDI* e GSK3 β
- d. Determinação do conteúdo de glicogênio, Glutathiona reduzida e Atividade de Lactato Desidrogenase

III. Correlação Metabólica das células BME26 silenciadas para *RmPDI*

- a. Estabelecimento de uma estratégia de silenciamento gênico simples e duplo para os transcritos de *RmPDI*
- b. Avaliação de enzimas do metabolismo de insulina
- c. Avaliação de enzimas da via Wnt
- d. Caracterização imunológica da *RmPDI*-1

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Identificação das sequências codificantes para PDI em *R. microplus*

As sequências foram obtidas a partir de um banco de dados de sequências de transcriptoma de *R. microplus* (*RmINCT-EM*), e a partir das sequências do carrapato *Hemaphysalis longicornis* denominado com *RmPDI-1*, *RmPDI-2* e *RmPDI-3*.

4.2 Manutenção das células da linhagem BME26.

As células BME26 foram cultivadas na presença do meio Leibovitz L-15 (Sigma-Aldrich, #L4386) suplementado com aminoácidos, glicose, sais minerais e vitaminas, detalhados no ANEXO 1, de acordo com (Munderloh e Kurti, 1989). O meio foi diluído em água estéril (3:1) e depois adicionados 10% de caldo triptose fosfato (Sigma-Aldrich, #T8782), 10% de soro fetal bovino (Nutricell®, inativado por aquecimento) e Penicilina/ Estreptomicina a 100 U/mL e 100 µg/mL, respectivamente (Gibco, #15140122). As células foram mantidas a 34 °C, com meio de cultura substituído semanalmente. Confo*Rme* descrito por Esteves e colaboradores (2008) A linhagem BME26 é mantida. As garrafas de cultura de célula confluentes (25 cm²) foram ressuspensas em 5 mL de meio completo usando uma agulha de calibre 22 (0,70 x 25mm) anexada a uma seringa de plástico de 5 mL. A densidade da cultura foi determinada utilizando hemocitometro Neubauer, e a viabilidade celular foi determinada usando a técnica de exclusão de células mortas marcadas pelo corante Azul de Tripán (Trypan Blue 0,04% - Sigma-Aldrich). Para realizar todos os experimentos desta tese a densidade de célula em garrafas de cultura (25 cm²) foi no*R*malizada em uma alíquota inicial de 10⁷ células por garrafa em 5 mL de meio (2x10⁶ células/mL), para ser usada 14 dias depois, com uma concentração celular esperada de aproximadamente 2x10⁷ células por garrafa (~ 4x10⁶ células/ml), para manter características homogêneas entre as garrafas de cultivo celular utilizada em todos os experimentos (Abreu *et al.*, 2013).

4.3 Extração de RNA e quantificação relativa de transcrição de genes por PCR em tempo real

Após os tratamentos o RNA total foi extraído de células BME26 a partir de placas de 24 poços utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Um micrograma de RNA total foi transcrito reversamente usando o kit Transcription reverso-M-MLV de alta capacidade cDNA (Takara Biotechnology, Shiga, Japão). A transcrição relativa foi analisada com molde de cDNA em uma PCR quantitativa usando a plataforma LightCycler 480 II (Roche, Mannheim, Alemanha) e os *primers* descritos no ANEXO 2 (Forward: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGCCACGTCAAGCACCACCACC -3'/Reverse: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGCGTAGTTTTTCCTTATCGCG -3'). Diluições em série do cDNA foram utilizadas para construir uma curva de calibração. As eficiências de reação entre 85% e 100% foram determinadas a partir de curvas de calibração para cada conjunto de primers em reações de 10 µL. O gene de *R. microplus* elongation factor-alpha (Elf1A) foi utilizado como gene de referência (Nijhof *et al.*, 2009) para normalizar as reações. O cDNA controle foi obtido de células BME26 não tratadas, e utilizado como um calibrador para os ensaios. Para a expressão relativa dos calibradores foi atribuído o valor de 1 unidade. As análises estatísticas (média e erro padrão) foram realizadas em dados obtidos de três experimentos independentes. A expressão relativa foi determinada usando valores de Cp de cada corrida na tabela no *software* Relative Expression Software Tool (Pfaffl, 2001).

4.4 Clonagens de *Rm*PDIs e Análises da sequência de aminoácidos.

Foram usados primers desenhados para PDIs, para amplificação a partir de células BME26. Os fragmentos amplificados foram ligados ao vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega-USA) produzindo as construções plasmidiais pGEM-CASP. Os plasmídios recombinantes foram propagados em *E. coli* Top10 através de choque térmico e em seguida selecionados em meio de cultivo Luria-Bertani (LB) com ágar e o agente selecionador Ampicilina (100 µg/mL). Todas as construções obtidas foram confirmadas por PCR e análise das sequências *in silico*. Os clones positivos da construção foram sequenciados em ambas as direções pelo menos 3 vezes usando o Genetic Analyzer 3500 (Life Technologies).

4.5 Reação de ligação do inserto ao vetor de clonagem

Este procedimento foi realizado seguindo as recomendações do fabricante do kit de clonagem pGEM-T Easy Vector System (Promega, cat # A1360).

4.6 Transformação das *E. coli* DH5 α quimicamente competentes

Alíquotas contendo 100 μ L de células de *E. coli* DH5 α , quimicamente competentes, armazenadas em freezers -80°C foram utilizadas para a transformação por choque térmico para todas as construções produzidas nesta tese. O procedimento foi realizado da seguinte maneira: foram adicionadas 10 μ L da reação de ligação na alíquota de células competentes. Esta mistura foi mantida em gelo por 20 min e então submetida a choque térmico (banho seco) a 42 °C por 45 seg e retornando ao gelo por 2 min. Em seguida foram adicionados 500 μ L do meio de cultura SOC e estes foram colocados em agitação orbital por 1h30min a 37 °C. Ao fim desta incubação, foram transferidos entre 100-150 μ L desta suspensão para placas de petri com meio de cultura LB-Agar suplementado com ampicilina a 100 μ g/mL.

4.7 Reação de PCR para a checagem das colônias transformadas

Após a transformação das *E.coli* DH5 α , pelo menos 10 clones brancos foram transferidos para uma segunda placa contendo o meio de cultura LB-Agar suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina. Os primers (ANEXO 2) utilizados para a obtenção dos insertos para clonagem das PDIs foram utilizados para esta reação de checagem do inserto.

4.8 Extração do DNA plasmidial

Este procedimento foi realizado seguindo as recomendações do fabricante do QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, cat # 27106).

4.9 Análises Filogenética das *Rm*PDIIs

A relação filogenética de *Rm*PDIIs, foi realizada através de alinhamentos usando sequências deduzidas a partir de bancos de dados de sequências de PDI-1 de *Rhipicephalus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* GenBank sob o número de acesso AB289618 - (*HIP*PDI-1) e *Ixodes scapularis* GenBank sob o número de acesso XM_002408931.2 (*IS*PDI-1). Sequências de PDI-2 de *Rhipicephalus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* GenBank sob o número de acesso AB289617 - (*HIP*PDI-2) e *Ixodes scapularis* GenBank sob o número de acesso XM_002405788.2 (*IS*PDI-2). Sequências de PDI-3 de *Rhipicephalus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* GenBank sob o número de acesso AB289619 - (*HIP*PDI-3), e *Ixodes scapularis* GenBank sob o número de acesso XM_002406398.2 (*IS*PDI-3) foi construída uma tabela descrevendo as características principais de cada *Rm*PDIIs. Em seguida foi construído uma árvore filogenética baseada nas PDIs de vários eucariotos usando o programa MEGA 5.

4.10 Desafio do DTNB em células BME26

As células foram inicialmente *noR*malizadas durante 14 dias para contagem com a quantidade de 1×10^7 células por garrafas. Posteriormente, as células ressuspensas da garrafa *noR*malizada de cultura de células foram contadas e plaqueadas em 5×10^5 células por poço em uma placa de 24 poços em 500 μ L de meio, incubadas a 34 °C num período de 12-16 horas para adesão celular. Com exceção dos experimentos, para microscopia com células fixadas, quando $2,5 \times 10^5$ células foram colocadas sobre lamínulas redondas por poço em uma placa de 24 poços com 500 μ L de meio. Após 12 horas foram realizados os tratamentos com DTNB, as células foram observadas morfológica e numericamente em microscópio óptico em aumento de 400 vezes. Os resultados representados nesta tese foram feitos com no mínimo três experimentos independentes.

4.11 Ensaio da Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada utilizando hemocitômetro (câmara de Neubauer) pela técnica de exclusão de células mortas marcadas pelo corante Azul de Tripán (Trypan Blue 0,04% - Sigma-Aldrich) por método manual (Cadena-Herrera *et al.*, 2015). Após o tratamento com DTNB, as placas de 24 poços com células foram cuidadosamente lavadas com 0,5 mL de PBS pH 7,0. E descoladas em 1 ml solução de tripsina com azul de tripan, na proporção de 3,5 mL de PBS pH 7,0, para 1 mL de tripsina (2,5%, sem fenol red, #15090046) e 0,5 mL de azul de tripan 0,4% (Sigma-Aldrich). E então, 10 µL da mistura foram adicionados em cada câmara do hemocitometro. O procedimento experimental e o cálculo foram realizados de acordo com a metodologia padrão (John M. Walker, 2013), focando nas regiões de grade de 1×1mm de dimensão usando a objetiva de 10x foi feita imagens usando a câmera AxioCam 503 color acoplada no microscópio Axio Imager 2 (zeiss). E as células foram contadas pelo ImageJ no *plugin cell counter* para contagem manual (Ferreira e Rasband, 2012).

4.12 Análises morfológicas das células BME26

Após o tratamento as células plaqueadas em placa 24 poços sobre lamínula redonda no fundo de cada poço foram lavados 1x com PBS pH 7,0. A coloração por panótico foi feita de acordo com o fabricante (Laborclin, #620529), um kit para rápida coloração de células. As células foram incubadas por 1 minuto na solução-1 (triarilmetano a 0,1%) e 1 minuto na solução-2 (xantenos a 0,1%). Após 2 lavagens com água destilada as células foram incubadas por 3 minutos na solução-3 (tiazinas a 0,1%) e lavadas 3 vezes em água destilada. As lâminas foram preparadas em glicerol para serem observadas. As imagens de microscopia foram capturadas em campo claro usando o microscópio de luz polarizada Axio Scope.A1, Zeiss através do software Blue Zeiss.

4.13 Análises de Viabilidade das Células BME26

Após os tratamentos em placas de 24 poços, as células BME26 foram lavadas com PBS (pH 7,2). As células foram mecanicamente descoladas da superfície da placa utilizando 500µL de uma solução 1x de tripsina diluída em PBS com azul de tripan a 0,04% em cada poço. Utilizando uma pipeta, aplicaram-se 10 µL de suspensão celular a cada lado do hemocitômetro e contou as células vivas, utilizando um contador de contagem manual (as células vivas não marcadas com azul de tripan). Como as células contadas foram diluídas em um volume de 500µl, para o cálculo final do número de células por 1 ml = ((média de células contadas x 10⁴)/2). Os resultados foram analisados usando um pacote de software estatístico (GraphPad Prism 5).

4.14 Avaliação da Atividade de LDH

Após o tratamento com DTNB as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS 1x pH 7.2, em seguida as células foram descoladas dos poços com Tampão de lise (Tris10mMpH7.4, Triton X-100 0,1%, contendo coquetel de inibidores para proteases Sigma). As amostras foram transferidas para um tubo tipo empendorff® e vortexadas durante 15 segundos e centrifugado por 5 minutos a 6.000x g. O sobrenadante do lisado celular foi utilizado para o ensaio de quantificação usando o Kit de LDH Labtest® utilizando protocolo do fabricante.

4.15 Avaliação da GSH reduzida

O conteúdo da forma reduzida da Glutathiona (GSH) foi medido seguindo orientação da bula do fabricante usando o corante, 7-amino-4-clorometilcoumarina (CellTracker™ Blue CMAC) (Molecular Probes, Oregon, EUA) (Tauskela et al., 2000). Basicamente, foi utilizado a concentração de 10µL/mL (nos poços de 500 µL foi adicionado 5 µL da sonda) e incubado em temperatura ambiente ao abrigo de luz. Após incubação as lamínulas foram retiradas dos poços lavadas 3 vezes com PBS 1x pH7,0 e levado ao microscópio de fluorescência Nikon e observado em aumento de 400 vezes.

4.16 Quantificação de glicogênio

Para marcar glicídios foi desenvolvida a técnica histoquímica do ácido periódico-Schiff (periodic acid-Schiff), abreviadamente PAS. Estruturas ricas em açúcares assumem uma coloração magenta (violeta/avermelhada) após serem submetidas ao PAS. Após o tratamento as células plaqueadas em placa 24 poços sobre lamínula redonda no fundo de cada poço foram lavados 2 vezes com PBS pH 7,0 e fixadas em 4% de solução paraformaldeído (em PBS pH 7,0) por 25 minutos a temperatura ambiente, em seguida lavadas 5 vezes com PBS pH 7,0. Os carboidratos das células fixadas foram oxidados na solução de ácido periódico por 5 minutos, em seguida lavado em água corrente 2 vezes com água destilada. Seguido da incubação com 300 μ L do reagente Schiff por 5 minutos. E então lavado em água corrente por 10 minutos. Para localização do núcleo algumas lâminas foram escolhidas para marcação com solução de hematoxilina de Harris por 6 minutos. E novamente lavado com água de corrente por 5 minutos. Para montagem as lâminas foram desidratadas e clarificadas através de etanol 95%, etanol absoluto, e xileno; 2 trocas de 2 minutos em cada, e montadas em resina (Entelan). As imagens de microscopia foram capturadas em campo claro usando o microscópio de luz polarizada Axio Scope.A1, Zeiss através do software Blue Zeiss.

Para a quantificação enzimática de glicogênio, após o tratamento, as células foram lavadas 1x com PBS, e ressuspensa em 1000 μ L de PBS. E então foi separado 20 μ L para contagem celular, 10 μ L foi adicionado em cada lado da câmara Neubauer, o procedimento experimental e o cálculo foram realizados de acordo com a metodologia padrão (JOHN M. WALKER, 2013). Após a contagem de cada poço, os 980 μ L restantes, foram centrifugados em ependorfs, por 15 minutos de centrifugação (centrifuga hettich-universal320) a 6000 rpm 15 °C, o sobrenadante foi descartado. O pelete de células (em triplicatas) foram lisados em 250 μ L do tampão de lise (preparado com 980 μ L de tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,8; 10 μ L de Triton-X100, concentração final de 0,1%; 10 μ L de coquetel de inibidores de proteases - Sigma aldrich #P8340). E então o homogenato foi para o vórtex por 10 segundos, depois passado 20 vezes pela seringa de 1ml com agulha de 26G, para lise mecânica das células. Em triplicatas para cada condição nos tubos de ensaio, 40 μ L do homogenato foi incubado com 1 unidade de α -amiloglucosidase (e triplicatas sem α -amiloglucosidase, condições de controle, para determinar nível basal de glicose e subtraído das condições de teste), em tampão acetato (200 mM, pH 4,8) no volume final de 200 μ L, durante 4 h a 40 °C. A reação foi parada com 300 μ L de PBS gelado (pH 7,4). A glicose liberada foi detectada com um kit comercial para concentração de glicose (Glucox®, Doles) a 510 nm. Conteúdo de glicogênio foi determinado usando uma curva padrão

de glicogênio submetida às mesmas condições, e no *R*malizado pelo número de células (Moraes *et al.*, 2006).

4.17 Determinação de Proteínas

A concentração de proteína total foi determinada de acordo com o protocolo do fabricante do Kit de Bicinchoninic Acid (Sigma-aldrich Produto # BCA-1), utilizando albumina bovina como padrão.

4.18 Síntese e adição de RNA de cadeia dupla (dsRNA) em células BME26 (Silenciamento gênico por RNAi)

Após obter os produtos de PCR para síntese de dsRNA com a utilização de primers para PDI contendo a região promotora T7. O produto de PCR do gene não relacionado (β -galactosidase de *E. coli*) e amplificado por um primer que reconhecia sua porção T7. Ao final da reação o produto será purificado a partir do gel de agarose com o auxílio do kit Gene Cleaner (Bio Agency). A síntese da dsRNA foi realizada com o kit T7 RiboMAX Express RNAi System (Promega) utilizando 1 μ g de template. Para verificação da integridade da dsRNA foi realizado uma eletroforese com gel de agarose 1,5% e quantificado em espectrofotômetro (Shimadzu UV-visível-1240) à 260nm e 280nm. Para confirmação do silenciamento nas células, as células incubadas com dsRNA foram realizada a extração de RNA e síntese de cDNA, e análise da transcrição de PDI.

4.19 Imunolocalização *Rm*PDI-1, GSK3 β e β -catenina

As células foram plaqueadas em placa 24 poços sobre lamínula redonda no fundo de cada poço. Após 12 horas foram adicionados os tratamentos e após a incubação as lamínulas foram lavadas 2 vezes com PBS pH 7,0 e fixadas em 4% de solução paraformaldeído (em PBS pH 7,0) por 25 minutos a temperatura ambiente, em seguida lavadas 2 vezes com PBS pH 7,0. A permeabilização foi feita em acetona absoluta a ≤ -20 °C, durante 5 minutos, e lavadas com PBS por 5x. As células foram incubadas durante 1 hora com 1% de BSA (diluída em PBS, solução de bloqueio) seguido por uma incubação de 16 horas (*over night*) com os respectivos seguintes anticorpos: anti-*Rm*PDI-1 diluído 1:1000 em solução de bloqueio; Anti- β -catenina (Sigma C2206) diluído 1:200, em solução de bloqueio; anticorpo anti-Glicogênio-Sintase (Cell

signaling, #3893) diluído 1:200, em solução de bloqueio. Depois disso, as células foram lavadas 3 vezes, incubadas com o anticorpo secundário IgG anti-coelho conjugado-Alexa Fluor 555, Ex: 555nm, Em: 565nm (Cell Signaling, #4413), diluído 1:1000 em solução de bloqueio, durante 2 horas, seguido da incubação com DAPI (1 μg / mL) por 15 min. As lâminas foram preparadas em glicerol, após 2 lavagens, e observados por microscopia. A aquisição das fotos foi feita utilizando-se o microscópio confocal Zeiss LSM710, objetiva no aumento de 40x (Water Plan-Apochromat 40x/1.0 DIC), através do programa ZEN 2.3 (black edition). Os núcleos das células foram corados com DAPI.

4.20 Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, para obter a média. Todos os valores são expressos como média \pm S.D. Os dados foram verificados para distribuição *noRmal*, usando o teste de Shapiro-Wilk. Quando a *noRmal*idade foi confiRmada, a significância estatística foi avaliada por ANOVA unidirecional e bidirecional para deteRminar diferenças significativas entre os grupos. O teste de Tukey foi usado para comparar dados entre grupos. A significância foi estabelecida em * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$. n.s., não significativo (Comparado com controle); e # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.0001$ (Comparado dentro da mesma concentração, entre os diferentes tempos 2 e 24 horas)

A análise das imagens foi feita com base em três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais (lamínulas). Três ou mais imagens de cada repetição foram gravadas por microscópio confocal de varredura laser LSM 710, Zeiss. Para análises de imagens, a média de intensidade de fluorescência (IF) por área celular em mm^2 foi calculada usando o software ZEN 2.3 (edição blue) da Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011, ou para a contagem de células e núcleos foi realizada usando o plugin Cell Counter no software ImageJ. Os cálculos de porcentagem, bem como as análises estatísticas e gráficas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 6.

4.21 Modelagem estrutural das *RmPDI*'s

Uma das premissas mais fundamentais das ciências biológicas é a relação entre a função de uma proteína e sua estrutura tridimensional. Portanto, com o intuito de obter uma melhor compreensão dos mecanismos das diferentes isoforma da PDI e a importância das cisteínas

presentes, foram adotadas técnicas de bioinformática estrutural. Dentro desta temática, foi realizada uma etapa de construção dos modelos estruturais utilizando as sequências de aminoácidos como referências.

Durante a construção dos modelos estruturais, foi adotado o servidor I-TASSER (*Iterative Threading ASSEmby Refinement*), que tem como objetivo prever a estrutura de proteínas a partir de múltiplos alinhamentos de estruturas oriundas do banco de dados PDB (*Protein Data Bank*). As sequências das três PDI's foram inseridas no servidor I-TASSER no formato FASTA. Após a construção dos modelos, foi utilizada uma etapa de minimização de energia, que visa aproximar os modelos aos seus estados nativos, utilizando cálculos físico-químicos; para esta tarefa, o servidor locPREFMD foi escolhido.

Após o processo de otimização estrutural, as estruturas das três PDI's foram submetidas ao servidor ModLoop, que realiza previsões da conformação dos *loops* por restrição da conformação espacial. Esta etapa foi auxiliada pelo servidor ERRAT para observar as regiões de resíduos onde existia a maior probabilidade de ocorrer incorreta disposição estrutural, através de uma taxa de erro (acima de 95%).

Em cada etapa de otimização, as estruturas foram analisadas pelos servidores PROCHECK e ProSA-web. O servidor PROCHECK avalia a qualidade estereoquímica das estruturas proteicas, analisando a geometria das interações entre resíduos e da proteína como um todo; este servidor reporta o famoso gráfico de Ramachandran. O servidor ProSA-web tem como finalidade reconhecer erros das estruturas tridimensionais das proteínas.

Após as etapas de otimização, foram obtidos os perfis de hidrofobicidade dos modelos por meio do visualizador PyMOL (v.2.3), em conjunto com o *script* disponível no PyMOLWiki. O grau de hidrofobicidade é associado com a escala da cor vermelha. Posteriormente, as superfícies de potencial eletrostático dos modelos foram calculadas pelo PyMOL em conjunto com plugin APBS e o servidor PDB2PQR (com o campo de força AMBER).

4.22 Simulações de “*docking* molecular”

Com o objetivo de compreender a importância das cisteínas presentes nas PDIs e sua relação com os mecanismos destas proteínas, foram realizadas simulações *docking* molecular dos modelos otimizados das três PDIs com o ligante DTNB (*5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)*). A estrutura do DTNB foi obtida pelo banco de dados PubChem, sob o código PubChem

CID 6254. Primeiramente, foram obtidos o grau de exposição das cisteínas para cada estrutura construída. A área de superfície de acessibilidade ao solvente de cada cisteína foi calculada pelo programa PyMOL. As simulações de *docking* molecular foram realizadas no servidor SwissDock¹³. Este servidor é fortemente indicado em situações onde não se sabe a localização do sítio de ligação; exatamente onde nos encontramos. Foram inseridas as estruturas dos modelos construídos e do ligante (DTNB). Os resultados das simulações de *docking* molecular foram analisados pelo servidor PLIP, em conjunto com o visualizador PyMOL (v.2.3). O servidor PLIP oferece um perfil de fácil compreensão de interações não covalente entre os resíduos da estrutura da proteína e seus ligantes. Os resultados das simulações de *docking* molecular foram comparados com o grau de exposição de cisteína, com o intuito de observar se havia uma correlação clara.

4.23 Dinâmica Molecular do DTNB

Para melhor compreender a dinâmica estrutural e de interação da ligação do DTNB nas isoformas de PDI, simulações de dinâmica molecular dos complexos DTNB-PDI obtidas por estudos de docking foram realizadas usando AMBER12 e os programas disponíveis no pacote AmberTools 13 (Case *et al.*, 2012). Primeiro, os sistemas foram neutralizados por adição de Na⁺ e explicitamente solvatados com modelos de água TIP3P (Jorgensen *et al.*, 1983) em uma caixa cúbica na qual as proteínas foram mantidas a 8 Å das bordas da caixa, usando campo de força FF99SB (Hornak *et al.*, 2006). Adotamos um protocolo de minimização de energia com nove etapas. Inicialmente, os sistemas foram submetidos a 2000 ciclos de minimização de energia utilizando o método de descida Steepest, um corte de 10 Å para interações não ligadas e uma constante de força de restrição de 5,0 Kcal/mol, mantendo um volume constante. O segundo passo consistiu em uma simulação de 100.000 passos com tempo de integração de 1 fs em um sistema NPT sob condições de contorno periódicas de 1.0 atm e 298.15 K usando o *teRmostato* Berendsen (BERENDSEN *et al.*, 1984). Um corte de 10 Å para interações não ligadas, algoritmo de SHAKE (Ryckaert *et al.*, 1977) e constante de força de restrição de 0,5 Kcal/mol.Å² foram aplicados nesta etapa. Em seguida, foram realizadas três etapas de minimização de energia utilizando os parâmetros iniciais, porém com redução gradual da força de contenção constante (2,0, 0,1 e 0,05 Kcal/mol.Å², respectivamente). Em seguida, quatro etapas consecutivas da dinâmica molecular foram realizadas com os mesmos parâmetros utilizados para o segundo estágio, mas com uma diminuição gradual da força de contenção constante (1,0, 0,5, 0,1 e 0,05 Kcal/mol.Å², respectivamente). Durante os passos 8 e 9, apenas os átomos C α , C e N foram restringidas para aumentar o grau de liberdade dos sistemas.

Finalmente, a etapa de produção foi realizada para 100 ns. O software Grace (<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>) foi usado para geração de gráficos e o software Visual Molecular Dynamics v. 1.9.1 (Humphrey *et al.*, 1996) foi usado para a estrutura tridimensional. visualização e análise de interações inteRmoleculares.

5. RESULTADOS

5.1 Análise de sequência e estrutura das PDIs de *Rhipicephalus microplus*

As PDIs são tipicamente compostas na maioria das vezes por cinco domínios **a**, **b**, **b'**, **a'-c**, com sítios ativos redox localizados nos domínios **a** e **a'**. De acordo com a classificação das classes PDI, o *RmPDI-2* e o *RmPDI-3* pertencem à classe I com 224 a 247 aa resíduos entre dois sítios ativos, enquanto o *RmPDI-1* pertence a uma classe desconhecida com 124 resíduos de aminoácidos entre dois sítios ativos (Figura 7).

Embora todos os três *RmPDI*s possuam caracteres típicos de PDI, as identidades dos aminoácidos entre as três sequências são bastante diferentes, quando comparadas em conjunto. Os resultados do alinhamento múltiplo de aminoácidos apresentam baixas identidades de 15%, 17% e 29% podem ser observadas entre as sequências *RmPDI-1* e *RmPDI-2*, *RmPDI-1* e *RmPDI-3*, *RmPDI-2* e *RmPDI-3*, respectivamente.

Três genes PDI foram identificados e designados nesta tese como *RmPDI-1*, *RmPDI-2* e *RmPDI-3*. As análises das sequências de aminoácidos indicam que todas as três PDIs têm um peptídeo sinal N-terminal clivável de 16 a 18 aminoácidos, sugerindo que, semelhante à uma molécula PDI típica, as *RmPDI*s são direcionadas para a via secretória. Ademais, todos as três *RmPDI*s possuem duas regiões com os domínios catalíticos tioredoxina (CGHC), que são considerados sítios ativos clássicos de PDIs e um código de retenção de ER na região C-terminal como VEL (*RmPDI-1*), DEL (*RmPDI-2*) e EEL (*RmPDI-3*) (Figura 7, Figura 8, Figura 9 e Tabela 2).

O alinhamento de aminoácidos comparativo para a *RmPDI-1* (Fig.7) apresenta ~97% de identidade com os genes de *Hemaphysalis longicornis* (*HlPDI-1*) e ~85% com genes de *Ixodes escapularis* (*IsPDI-1*). Reforçando a sua identidade com outras PDIs de carrapatos, foram identificados domínios conservados e posicionamento de cisteínas específicas nas regiões dos aminoácidos 54 e 180 nos domínios **a** e **a'**, respectivamente.

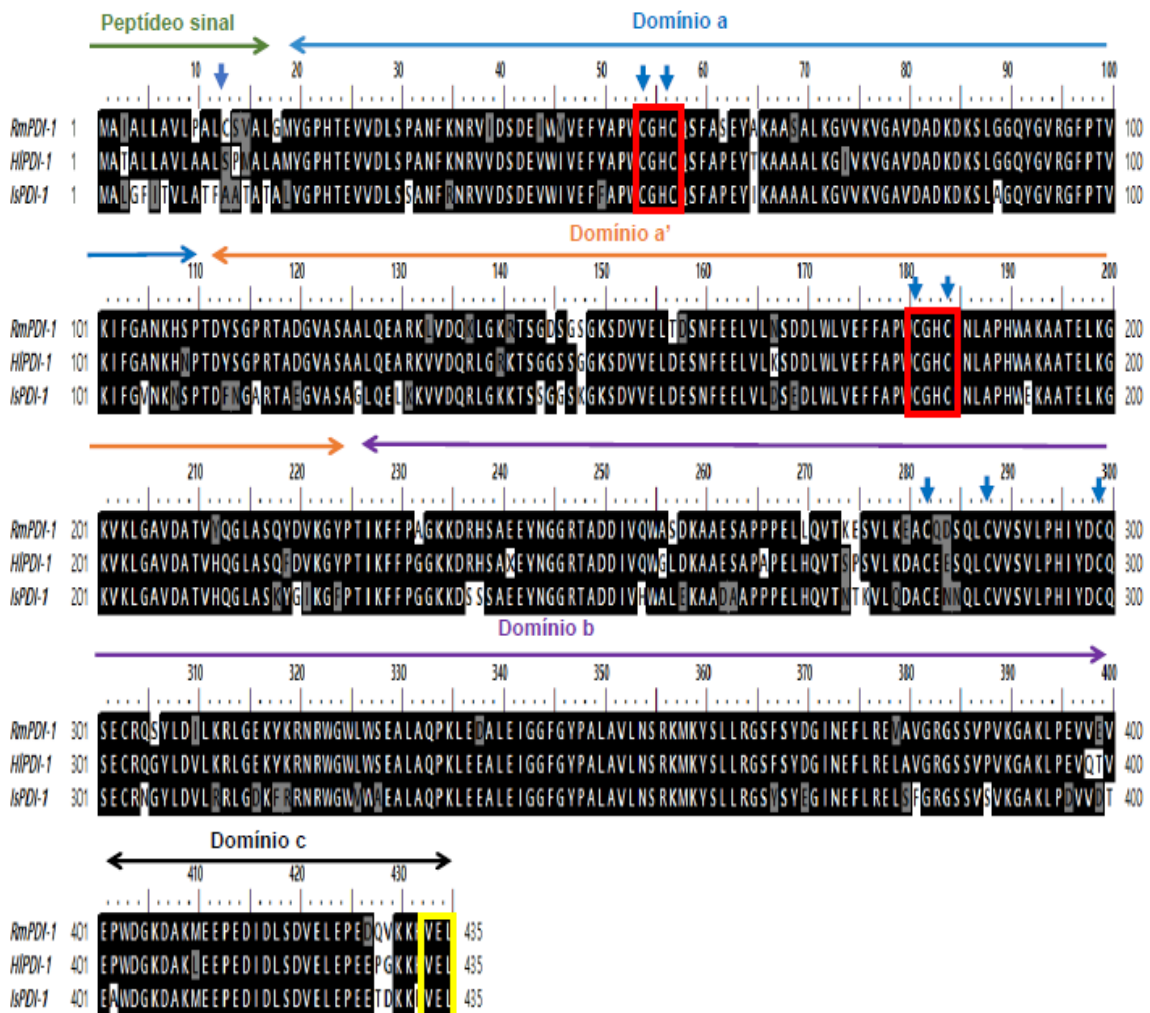


Figura 07- Alinhamento de seqüências de aminoácidos RmPDI-1: seqüências de PDI-1 de *Rhipicephalus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* GenBank sob o número de acesso AB289618 - (*HIPDI-1*) e *Ixodes scapularis* GenBank sob o número de acesso XM_002408931.2 (*IsPDI-1*). As caixas vermelhas indicam Regiões do sítio catalítico Tioredoxina (CXXC), a caixa amarela indica região C-terminal VEL (código de retenção do Retículo Endoplasmático). As setas azuis indicam os resíduos de cisteínas de cada seqüência. As seqüências mostram alto grau de conservação entre as espécies de carrapatos.

Alinhamento comparativo para o gene de *RmPDI-2* (Fig.8) apresenta alta identidade com os genes de *Hemaphysalis longicornis* (*HIPDI-2*) e *Ixodes scapularis* (*IsPDI-2*). Foi

possível identificar o sítio catalítico, o código de retenção do Retículo Endoplasmático e os resíduos de cisteínas específicos que mostram um alto grau de conservação entre as espécies de carrapatos analisados.

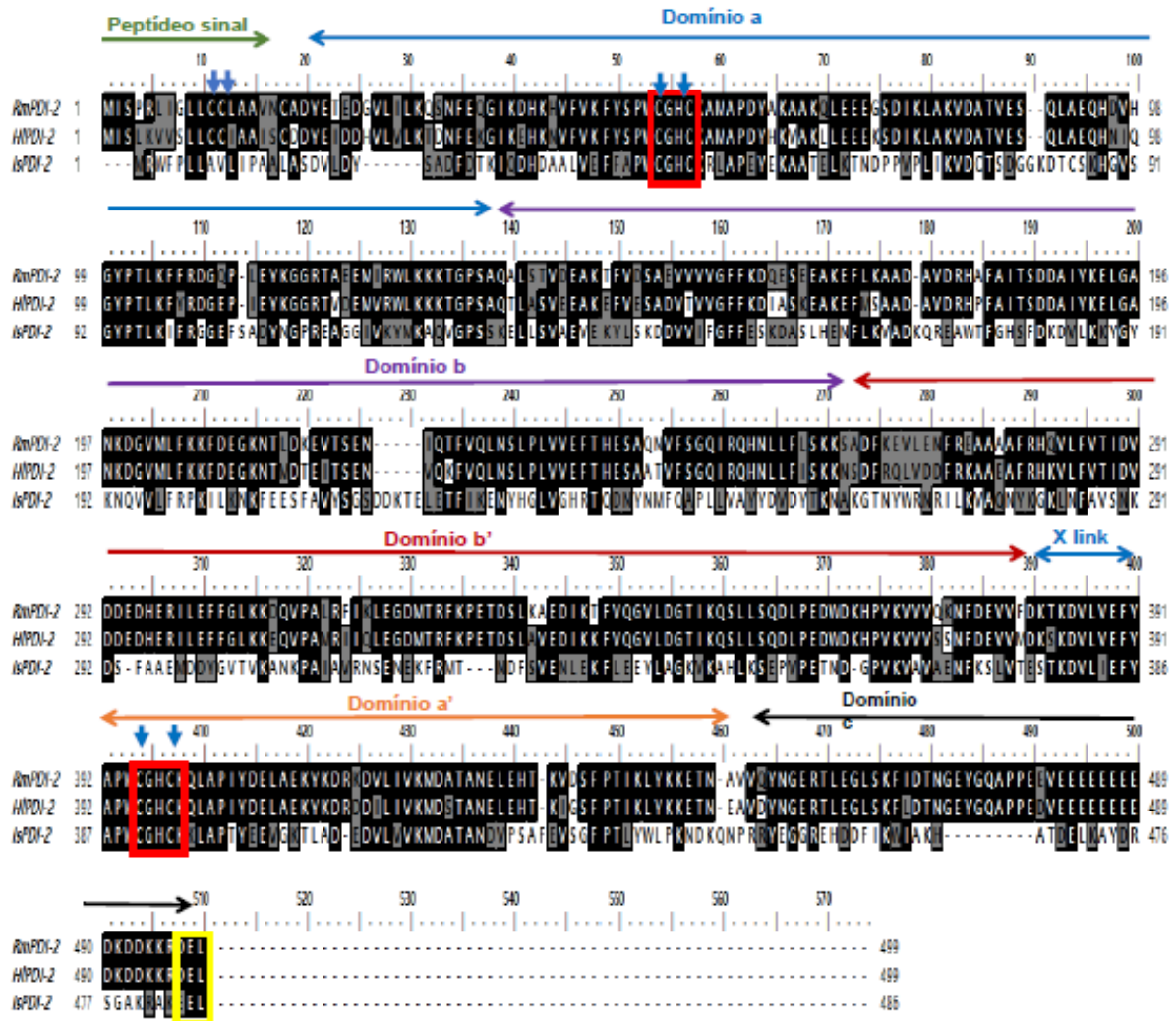


Figura 08- Alinhamento de seqüências de aminoácidos RmPDI-2: seqüências de PDI-2 de *Rhipicephalus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* GenBank sob o número de acesso AB289617 - (*HIPDI-2*) e *Ixodes scapularis* GenBank sob o número de acesso XM_002405788.2 (*IsPDI-2*). As caixas vermelhas indicam Regiões do sítio catalítico Tioredoxina (CXXC), a caixa amarela indica região C-terminal VEL (código de retenção do Retículo Endoplasmático). As setas azuis indicam os resíduos de cisteínas de cada seqüência. As seqüências mostram alto grau de conservação entre as espécies de carrapatos.

O Alinhamento comparativo para o gene de *RmPDI-3* (Fig.9) apresenta alta identidade com os genes de *Hemaphysalis longicornis* (*HIPDI-3*) e *Ixodes scapularis* (*IsPDI-3*). Observou-se alto grau de conservação entre as espécies analisadas onde foram identificados a

regiões do sítio catalítico, o código de retenção do Retículo Endoplasmático e novamente os resíduos de cisteínas conservadas de cada sequência.

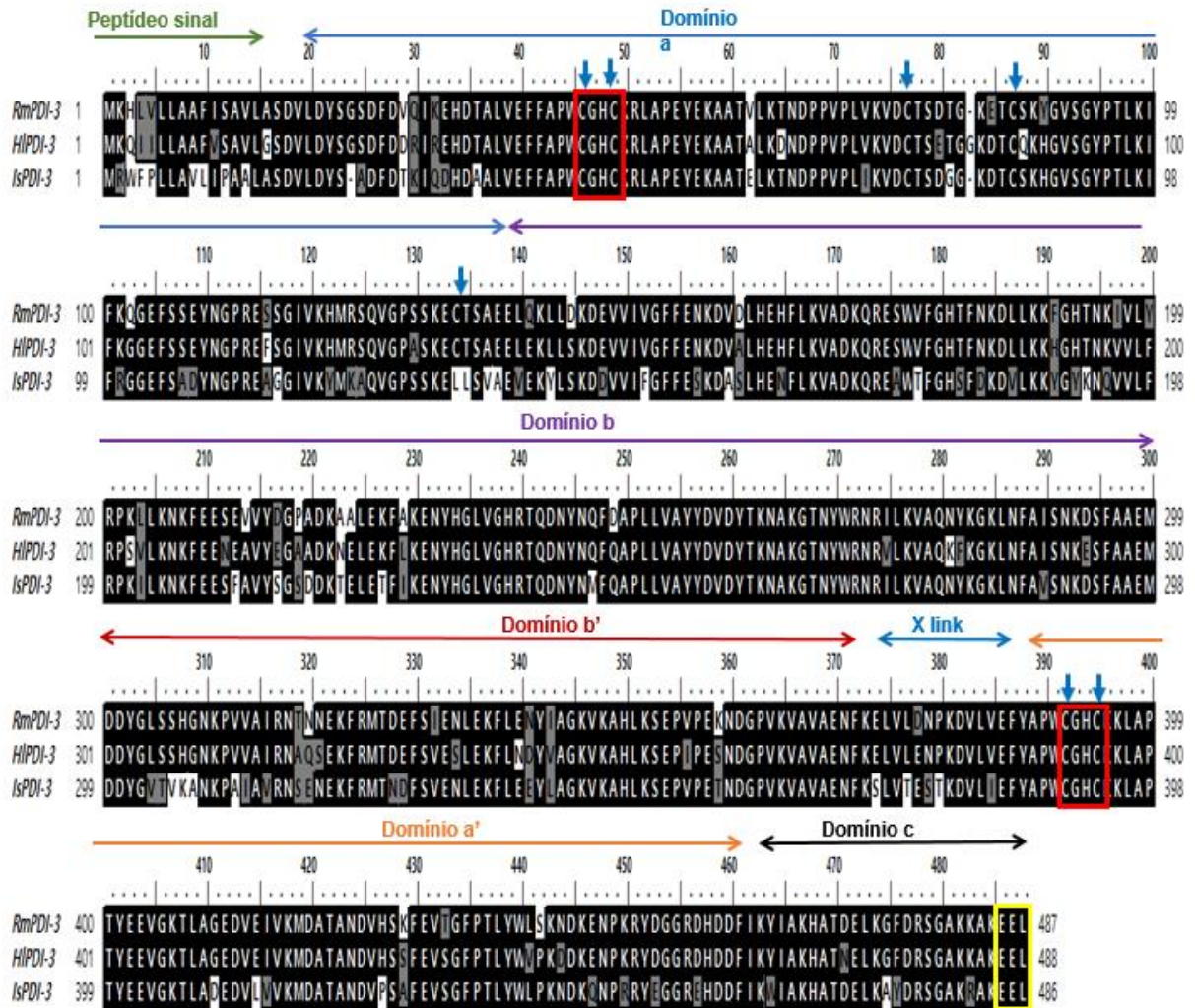


Figura 09. Alinhamento de seqüências de aminoácidos *RmPDI-3*: seqüências de PDI-3 de *Rhipicephalus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* GenBank sob o número de acesso AB289619 - (*HIPDI-3*), e *Ixodes scapularis* GenBank sob o número de acesso XM_002406398.2 (*IsPDI-3*). As caixas vermelhas indicam Regiões do sítio catalítico Tioredoxina (CXXC), a caixa amarela indica região C-terminal VEL (código de retenção do Retículo Endoplasmático). As setas azuis indicam os resíduos de cisteínas de cada seqüência. As seqüências mostram alto grau de conservação entre as espécies de carrapatos.

As características das seqüências das três PDIs estão resumidas na Tabela I. O comprimento total do quadro de leitura aberto (ORF) dos genes *RmPDI-1*, *RmPDI-2* e *RmPDI-3* é de 1308, 1500 e 1464 pb, que codificam 435, 499 e 488 aminoácidos, com massas moleculares preditas aproximadamente de 48, 55 e 54 kDa, respectivamente.

Tabela II. Caracteres da sequência da família PDI de *R. microplus*

Gene	ORF (pb)	Número de aminoácidos	Massa molecular (kD)	Peptídeo Sinal	Sítio Ativo	Sinal de Retenção R.E.
<i>RmPDI-1</i>	1308	435	47,85	18	CGHC	VEL
<i>RmPDI-2</i>	1500	499	54,89	18	CGHC	DEL
<i>RmPDI-3</i>	1464	488	53,68	16	CGHC	EEL

Durante a análise de identidade e similaridade dos genes para as PDIs demonstrou que o gene *RmPDI-1* UNIPROT (cod.NP005733.1) 440 aa apresentou Identidade de 56%, Similaridade de 72% com cobertura de 97% 15084 ID 55,8 SIM 73%. O gene *RmPDI2*, apresentou, segundo UNIPROT (cod. NPp07237), Identidade de 53% com Similaridade de 74,2% cobertura de 99% da isoforma de *PDIA2* de *C. elegans*. Já a *RmPDIA3* UNIPROT (Cod.NP_0053043) Identidade de 49,7, Similaridade de 67,9% *PDIA3* humanos com 93% de cobertura.

Para evidenciar a diferença entre as isoformas de PDIs foi construída uma árvore filogenética com vários organismos diferentes com sequências de aminoácidos que codificadas por genes de PDI. As informações contidas na árvore filogenética abaixo estão referenciadas com os seguintes códigos: *PDIA6 Bos taurus* (NP_001193274.1), *PDIA6 Homo sapiens* (NP_005733.1), *PDI1 Haemaphysalis longicornis* (BAF 63672.1), *PDIA6 Ixodes scapularis* (XP_002408975.1; *PDI-2 Bos taurus* (XP_027383655.1), *PDIA2 Homo sapiens* (NM_006849), *PDI-2 Ixodes scapularis* (XP_002405832.2), *PDI-2 Haemaphysalis longicornis* (BAF63671.1); *PDIA3 Homo_sapiens* (6ENY), *PDI-3 Bos taurus* (XP_027376484.1), *PDI-3 Haemaphysalis longicornis* (BAF63673.1), *PDI-3 Ixodes scapularis* (EEC01613.1),

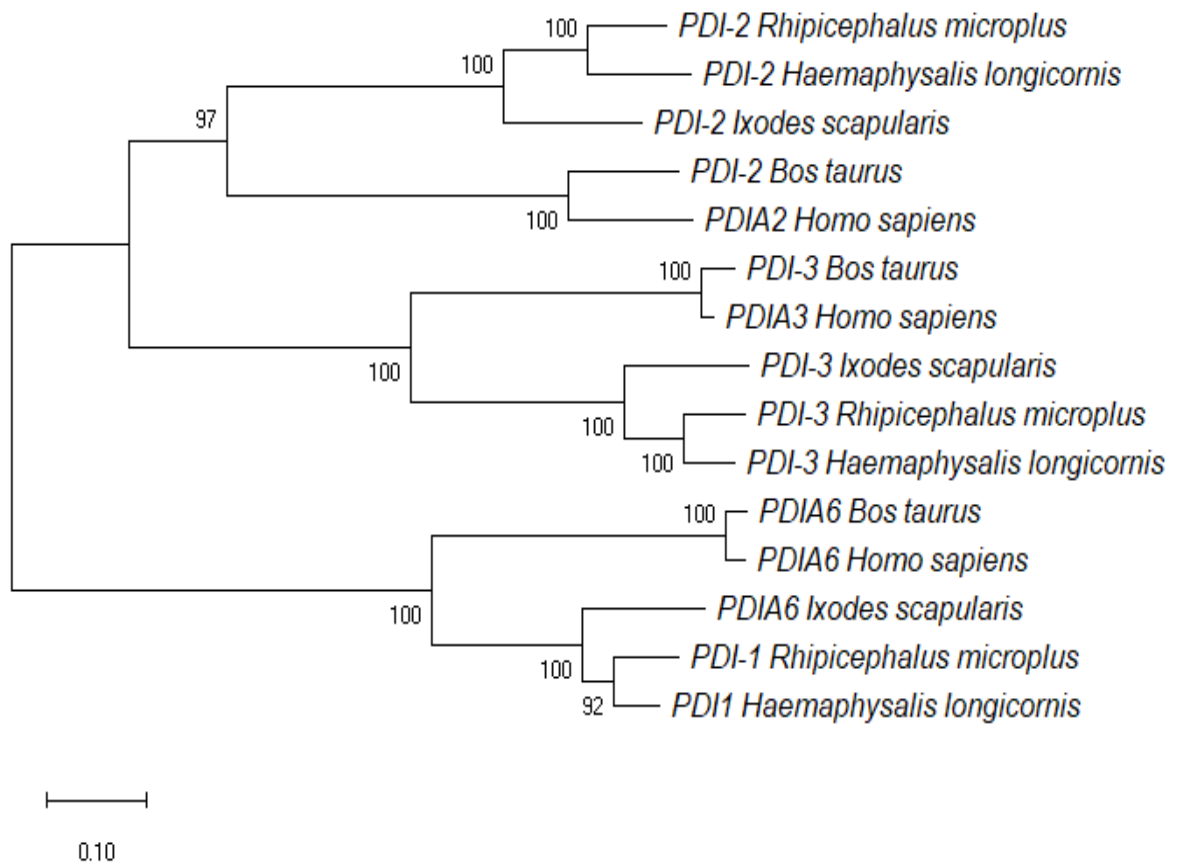


Figura 10- Associações filogenéticas dos genes *RmPDI*. A árvore evolutiva foi obtida pelo método de junção de vizinhos, baseado no alinhamento de aminoácidos das seqüências de aminoácidos *RmPDI* e comparada com as seqüências de outros organismos. A construção foi realizada com uso do programa MEGA6.

5.2 Modelos tridimensionais das *RmPDI*s

Para analisar as estruturas das *RmPDI*s, foram construídos modelos tridimensionais para *RmPDI*-1 (Fig.11), *RmPDI*-2 (Fig.12) e *RmPDI*-3 (Fig.13), usando o programa I-Tasser e analisou-se a disponibilidade de resíduos de superfície acessível por solvente e exposição do aminoácido cisteína na superfície das isoformas do PDI (Tabela 2). Os modelos apresentam resíduos de cisteínas destacadas e numeradas de acordo com as seqüências de aminoácidos. As três isoformas de PDIs apresentam diferenças tanto em quantidades quanto em graus de exposições dentro dos modelos tridimensionais analisados.

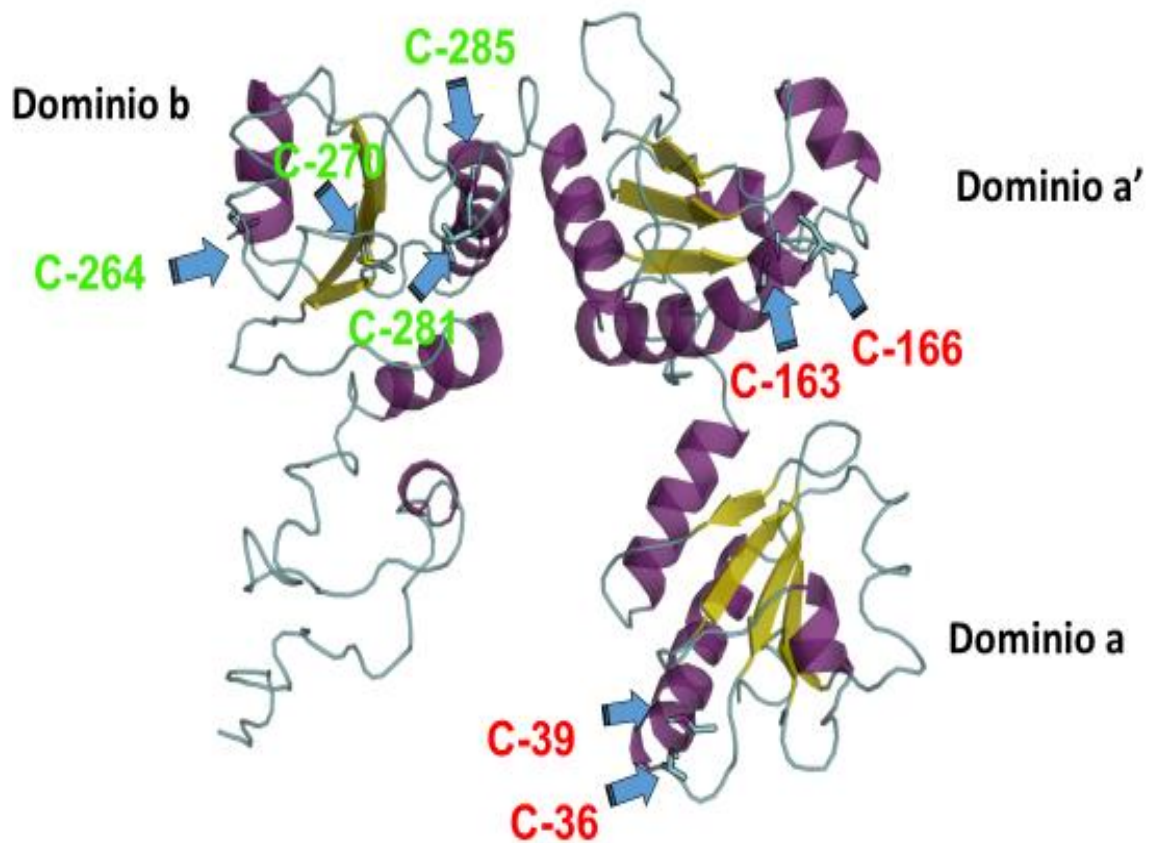


Figura 11- Predições das estruturas de *RmPDI1*: os modelos tridimensionais, foram construídos usando o servidor I-TASSER. A sequência da PDI-1 foi inserida no servidor I-TASSER no formato FASTA. existia a maior probabilidade de ocorrer incorreta disposição estrutural, através de uma taxa de erro (acima de 95%). folha β em roxo; α -Helix em amarelo; loops em ciano. Foi utilizado o programa PyMol (Schrödinger LLC, 2015). Destaque em diferentes cores nas numerações das cisteínas: em vermelho (C-36; C39; C163; C166) regiões dos sítios ativos nos **domínios a e a'**, em verde (C-264; C-270; C-281 e C-285) cisteínas fora do sítio catalítico na região do domínio **b**.

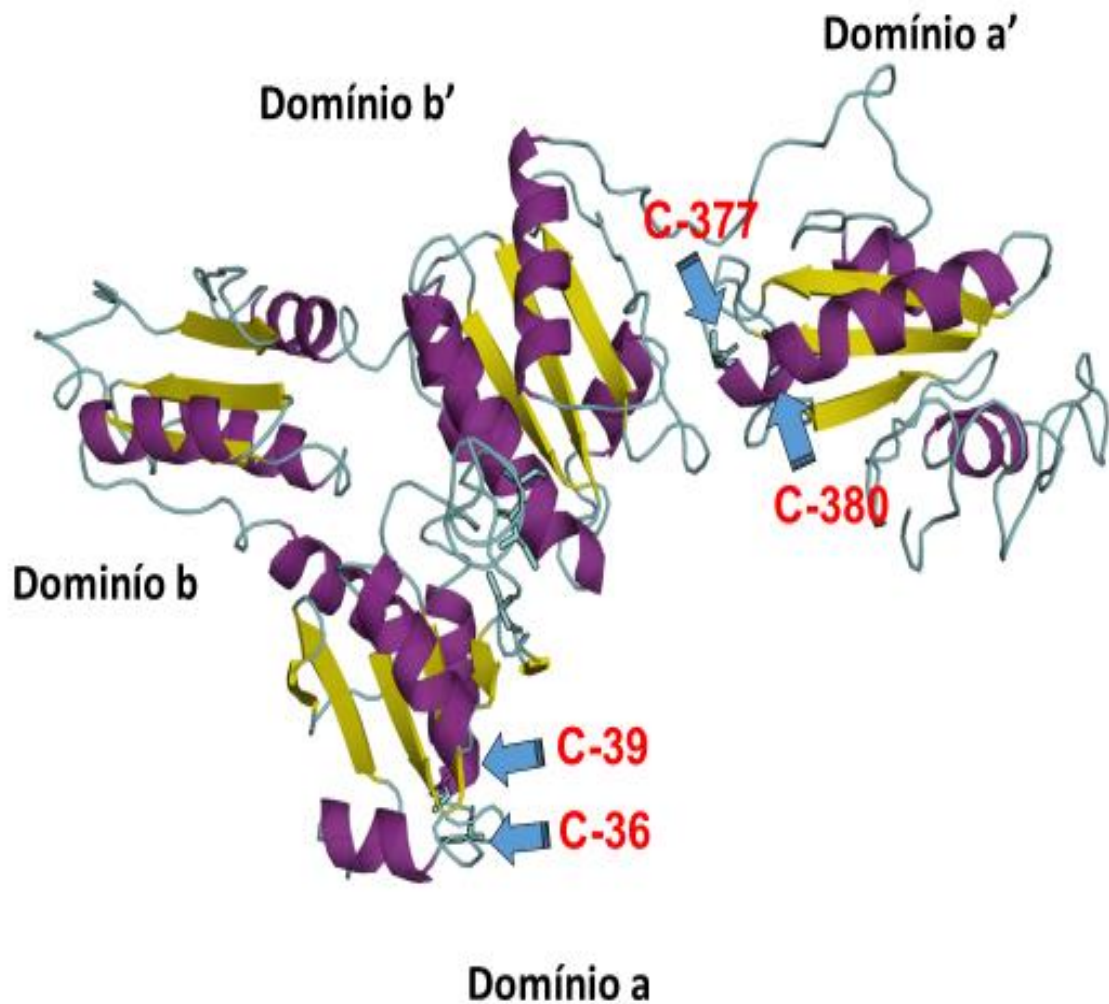


Figura 12- Predições das estruturas de *RmPDI-2*: os modelos tridimensionais, foram construídos usando o servidor I-TASSER. A sequência da PDI-2 foi inserida no servidor I-TASSER no formato FASTA. existia a maior probabilidade de ocorrer incorreta disposição estrutural, através de uma taxa de erro (acima de 95%). folha β em roxo; α -Helix em amarelo; loops em ciano. Destaque em diferentes cores nas numerações das cisteínas: em vermelho (C-36; C-39; C-377; C-380) regiões dos sítios ativos nos domínios **a** e **a'**,

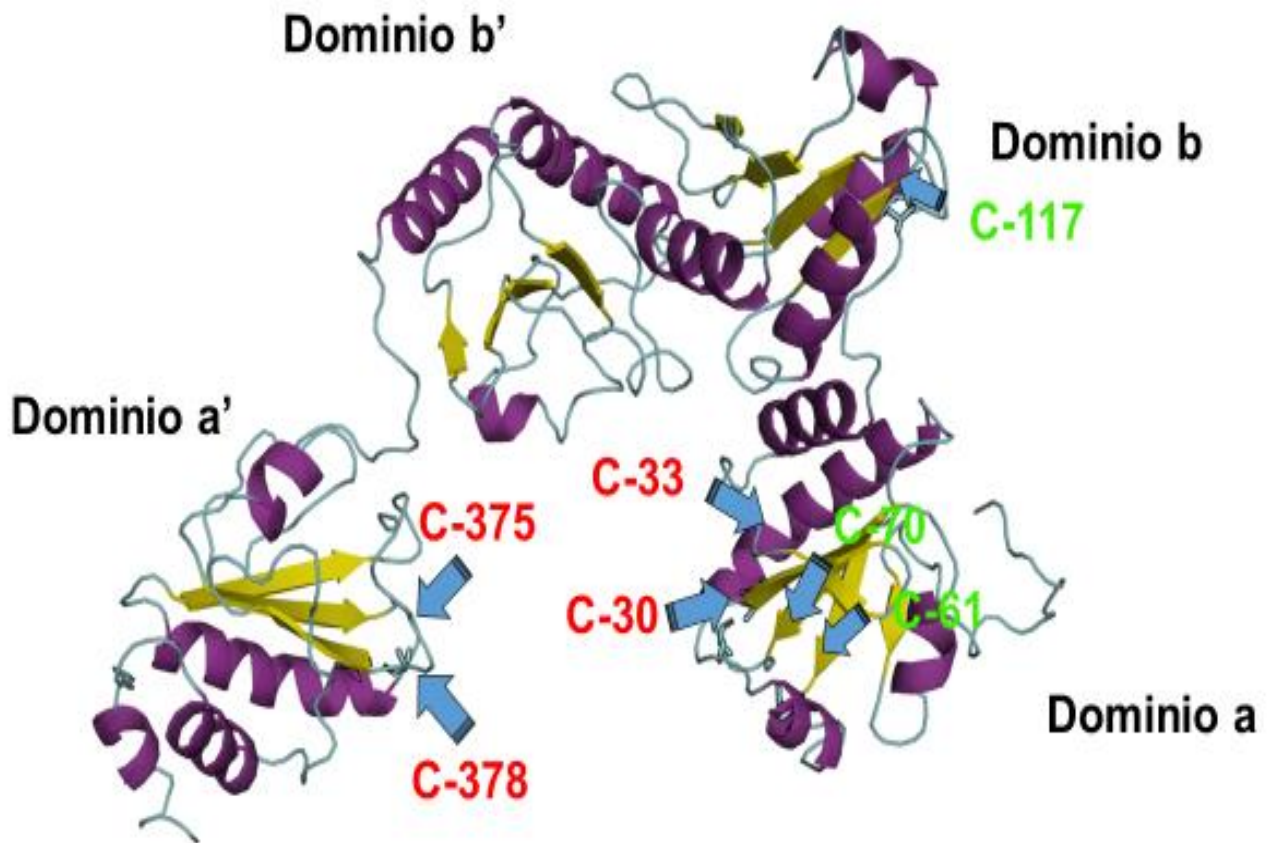


Figura 13- Predições das estruturas de *RmPDI3*: os modelos tridimensionais, foram construídos usando o servidor I-TASSER. A sequência da PDI-3 foi inserida no servidor I-TASSER no formato FASTA. existia a maior probabilidade de ocorrer incorreta disposição estrutural, através de uma taxa de erro (acima de 95%). folha β em roxo; α -Helix em amarelo; loops em ciano. Destaque em diferentes cores nas numerações das cisteínas: em vermelho (C-30; C-33; C-375; C-378) regiões dos sítios ativos nos **domínios a e a'**, em verde (C-61; C-70; e C-117) cisteínas fora do sítio catalítico na região do domínio **b**.

Tabela II. I Área de acessibilidade (%) de resíduos de cisteína selecionados das isoformas PDI 1-3

	Area (Å ²)	% Acessibilidade
PDI-1		
Cys36	37.1	26.1
Cys39	2.0	1.4
Cys163	46.4	32.7
Cys166	4.5	3.2
Cys264	85.4	60.2
Cys270	30.81	21.7
Cys281	28.3	19.9
Cys285	33.1	23.3
PDI-2		
Cys36	20.0	14.1
Cys39	7.2	5.1
Cys377	19.3	13.6
Cys380	9.7	6.8
PDI-3		
Cys30	13.9	9.8
Cys33	8.5	6.0
Cys61	6.4	4.5
Cys70	10.9	7.7
Cys117	1.8	1.3
Cys375	7.7	5.4
Cys378	8.7	6.1

Considerando a PDI-1, domínios a e a', foi observado que a Cis³⁶ (Domínio a) e a Cis¹⁶³ (Domínio a') são mais expostos a solventes do que os outros resíduos de cisteínas (Tabela 2, Figura 11). No entanto, Cis²⁶⁴, que não faz parte dos domínios redox, tem a área mais alta e acessibilidade de 60,2%. A análise adicional dos *RmPDI*s 2-3 revelou que seus resíduos de cisteína são, em geral, menos expostos do que os do *RmPDI*-1, o que é suportado pelas áreas menores calculadas em porcentagem de acessibilidade. Cis³⁶ em *RmPDI*-2 e Cis³⁰ em *RmPDI*-3, pertencentes ao domínio a, respectivamente, são os resíduos de cisteína mais expostos a solventes. Vale a pena notar, no entanto, que a *RmPDI*-1 apresenta um domínio a menos (a, a' e b) (Fig.11) em relação a *RmPDI*-2 (a,b, b' e a'') (Fig.12) e *RmPDI*-3 (a,b, b' e a'') (Fig.13). Além disso, suas cadeias laterais podem adotar diferentes conformações *in vivo* que são susceptíveis de alterar a acessibilidade do solvente, a fim de ligar substratos ou inibidores de entrada.

Em uma outra abordagem estrutural analisou-se o mapeamento de características físico-químicas na superfície das PDIs. Esta análise de uma proteína pode fornecer informações cruciais sobre sua função e evolução. Tais informações podem ser usadas ainda mais na caracterização e identificação de semelhanças na superfície de regiões da proteína. Na figura 14 observam-se superfícies proteicas em que estão evidenciados os potenciais eletrostáticos calculados para *RmPDI*s 1-3, destacando-se diferenças relacionadas, necessariamente, com o comportamento de cada PDI, que provavelmente está relacionado com a especificidade de inibição, ou mesmo de ativação de cada uma de forma peculiar.

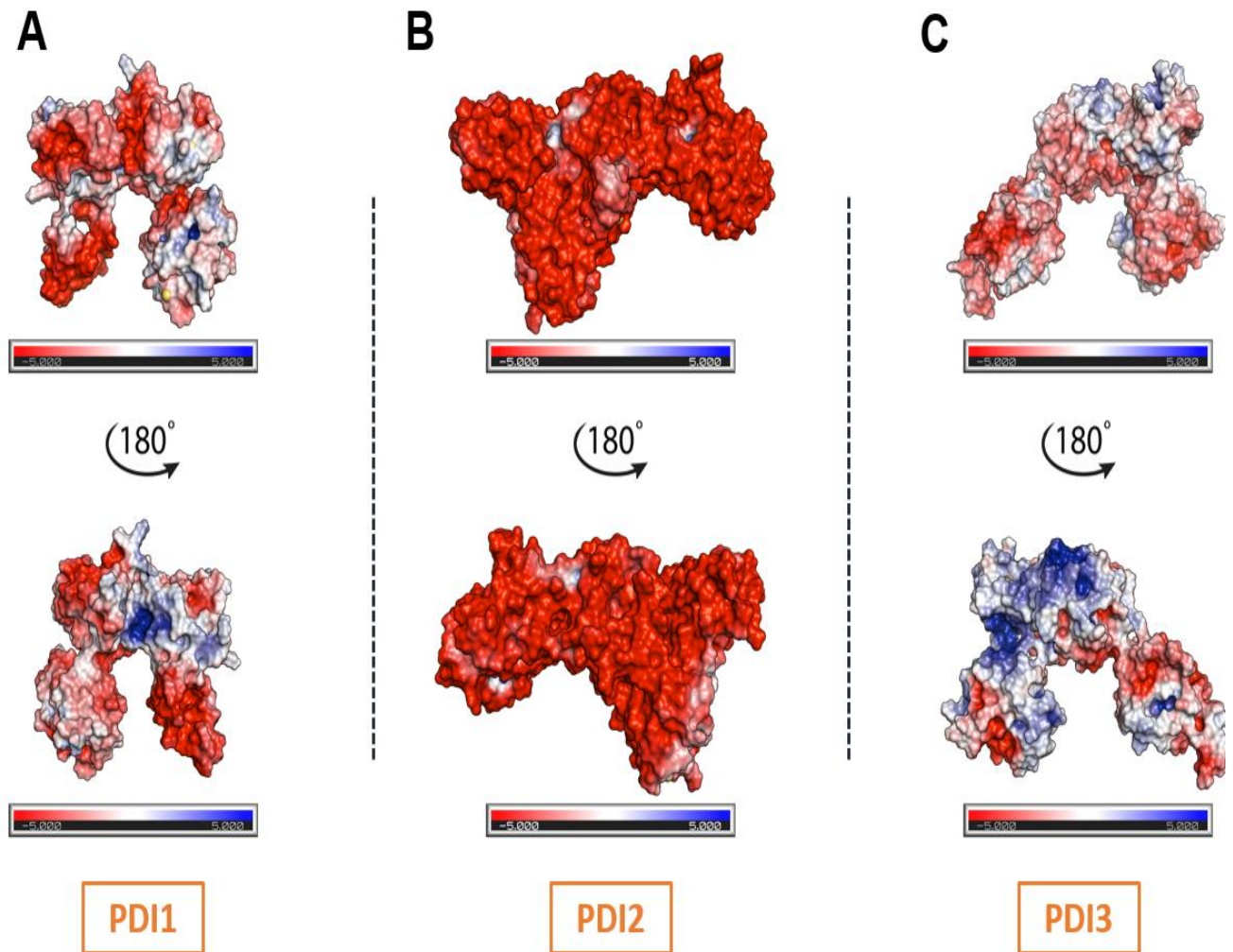


Figura 14- Superfícies de potencial eletrostático das *RmPDIs*:(A), (B) e (C), respectivamente *RmPDI-1*, *RmPDI-2* e *RmPDI-3*. Em destaque em cores: quanto mais vermelho, mais eletronegativo, e quanto mais azul, menos eletronegativos.

Outra análise de superfícies foi a de áreas de hidrofobicidades das *Rm*PDI 1-3. Surpreendentemente, neste caso, não se observou diferenças marcantes em relação aos domínios redox (Figura 15).

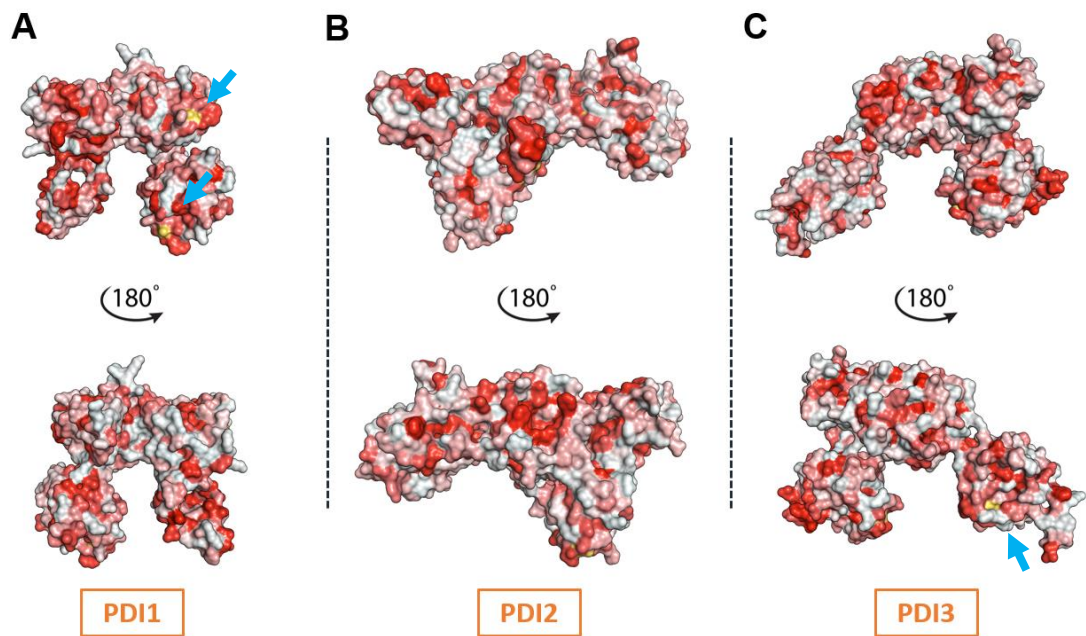


Figura 15- Superfícies hidrofóbicas das PDIs 1-3 (A), (B) e (C), respectivamente: Os resíduos de cisteína pertencentes aos domínios a e a' são representados como esferas amarelas (setas azuis). Cores vermelhas representam maior hidrofobicidade.

Em geral, PDI-1 e o PDI-3 parecem ter maior semelhança de carga em torno dos domínios redox **a** e **a'**, estando localizados em uma vizinhança mais carregada positivamente, enquanto os mesmos domínios no *Rm*PDI-3, bem como sua superfície estrutural geral, mostram uma carga negativa predominante (Figura 15). A inspeção visual revela que o *Rm*PDI-3 possui muitos resíduos de aminoácidos do grupo carboxilato expostos a solvente, que é responsável por suas características ricas em elétrons e pode influenciar o reconhecimento molecular de contatos de substrato e proteína-proteína.

5.3 Docking Molecular das PDIs com o DTNB

O mecanismo de ação do DTNB foi avaliado realizando *Docking* molecular e avaliando possíveis interações com modelos de homologia das três isoformas de PDIs do carrapato *R. microplus* (*RmPDI-1*, *RmPDI-2* e *RmPDI-3*).

Para a *RmPDI-1* destacam-se 3 regiões de preferência do ligante. Um deles possui duas cisteínas (Cis²⁸⁵ e Cis²⁸¹) e está destacado com o círculo veRmelho na Figura 16. Focando a análise nestes resíduos, se pode observar como o ligante se comporta, realizando 3 ligações de hidrogênio e o enxofre do DTNB está bem próximo do enxofre das cisteínas.

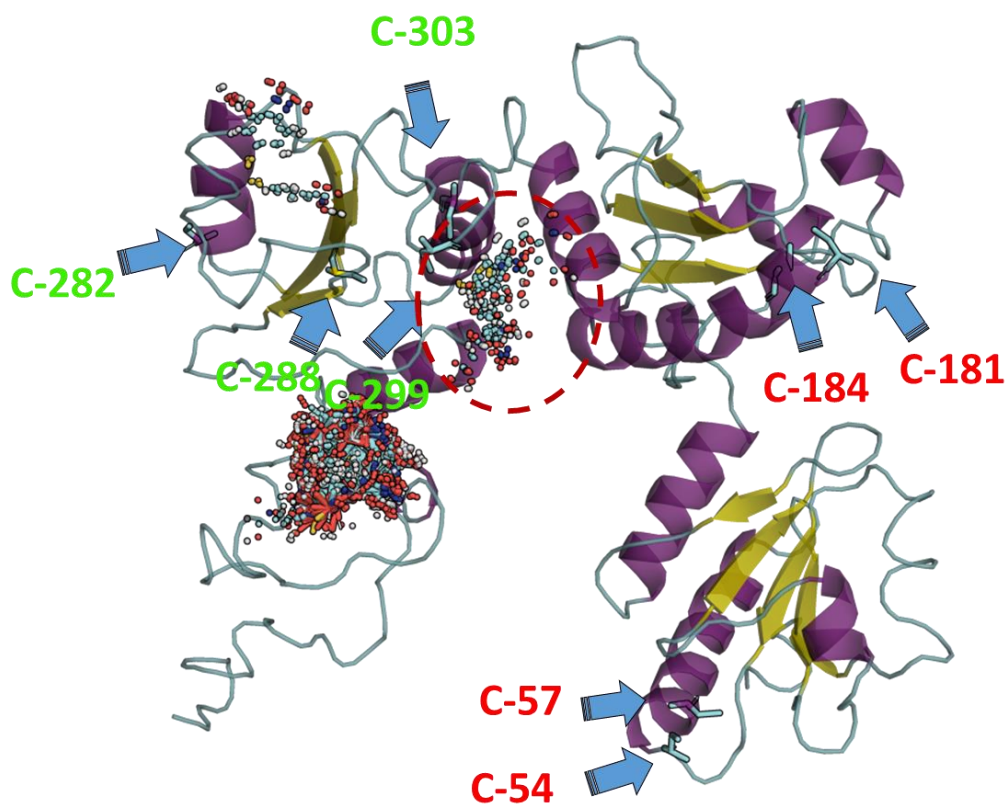


Figura 16- Representação modelo *RmPDI-1*. Foi utilizado o programa PyMol (Schrödinger LLC, 2015). Destaque em diferentes cores nas numerações das cisteínas: em veRmelho (C-36; C39; C163; C166) regiões dos sítios ativos nos domínios **a** e **a'**, em verde (C-264; C-270; C-281 e C-285) cisteínas fora do sítio catalítico na região do domínio **b**.

Na análise da *RmPDI-2* mostra-se que o ligante tem 4 regiões de preferência (Figura 17). Porém, nenhuma delas possui resíduos de cisteínas próximas a esta região, o que

provavelmente não representa uma região de potencial para um ataque nucleofílico do enxofre do DTNB.

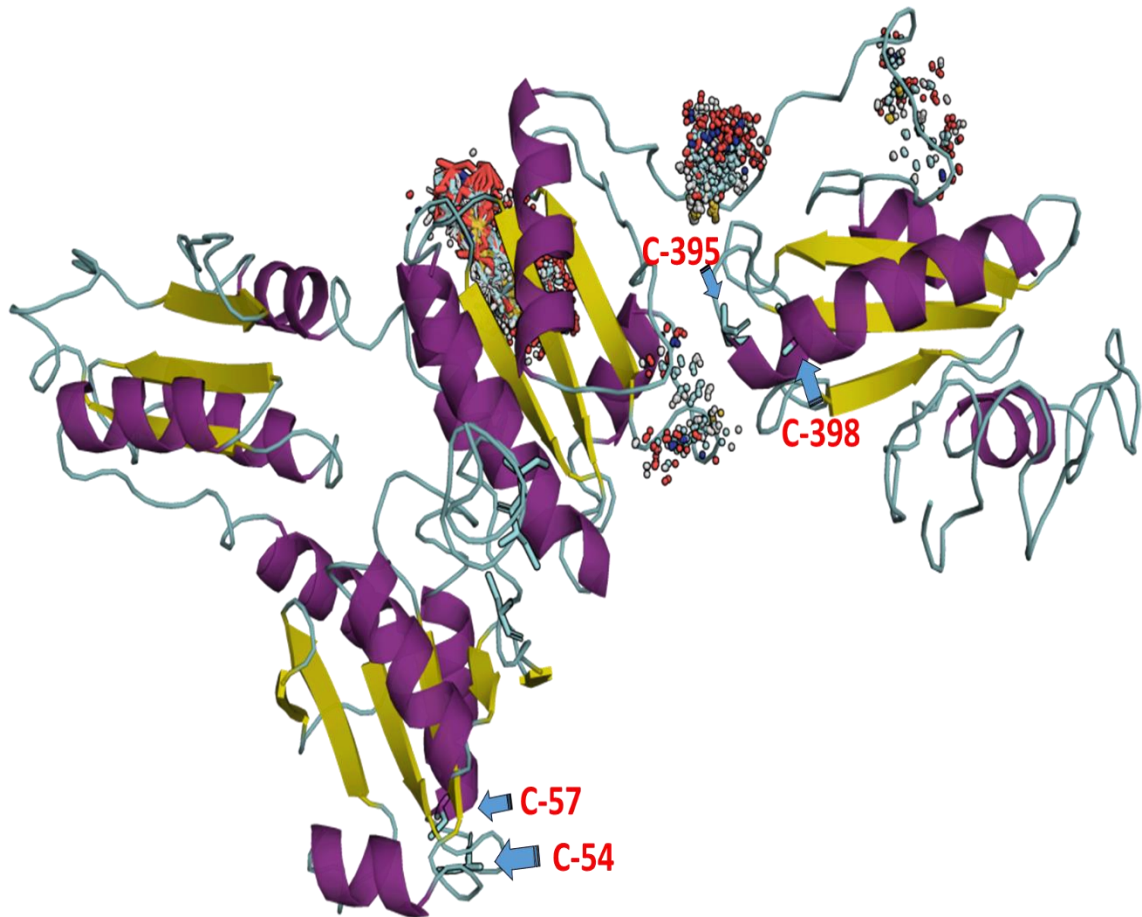


Figura 17- Representação modelo *RmPDI-2*. Foi utilizado o programa PyMol (Schrödinger LLC, 2015). A cadeia azul corresponde à subunidade $\gamma 2$ e a cadeias verde corresponde à subunidade $\alpha 1$. A região do sítio dos benzodiazepínicos está destacada no círculo tracejado. As setas indicam a região das α -hélices transmembranares que foram removidas.

Para as análises de docking da *RmPDI-3* (Figura 18), mostra-se que o ligante tem 4 regiões de preferência. Em uma delas (região circundada) existem algumas cisteínas ao redor.

Podemos observar que a Valina 91 está ancorando este ligante com uma ligação de hidrogênio, e ao mesmo tempo duas cisteínas estão com seus enxofres apontados para o enxofre do DTNB.

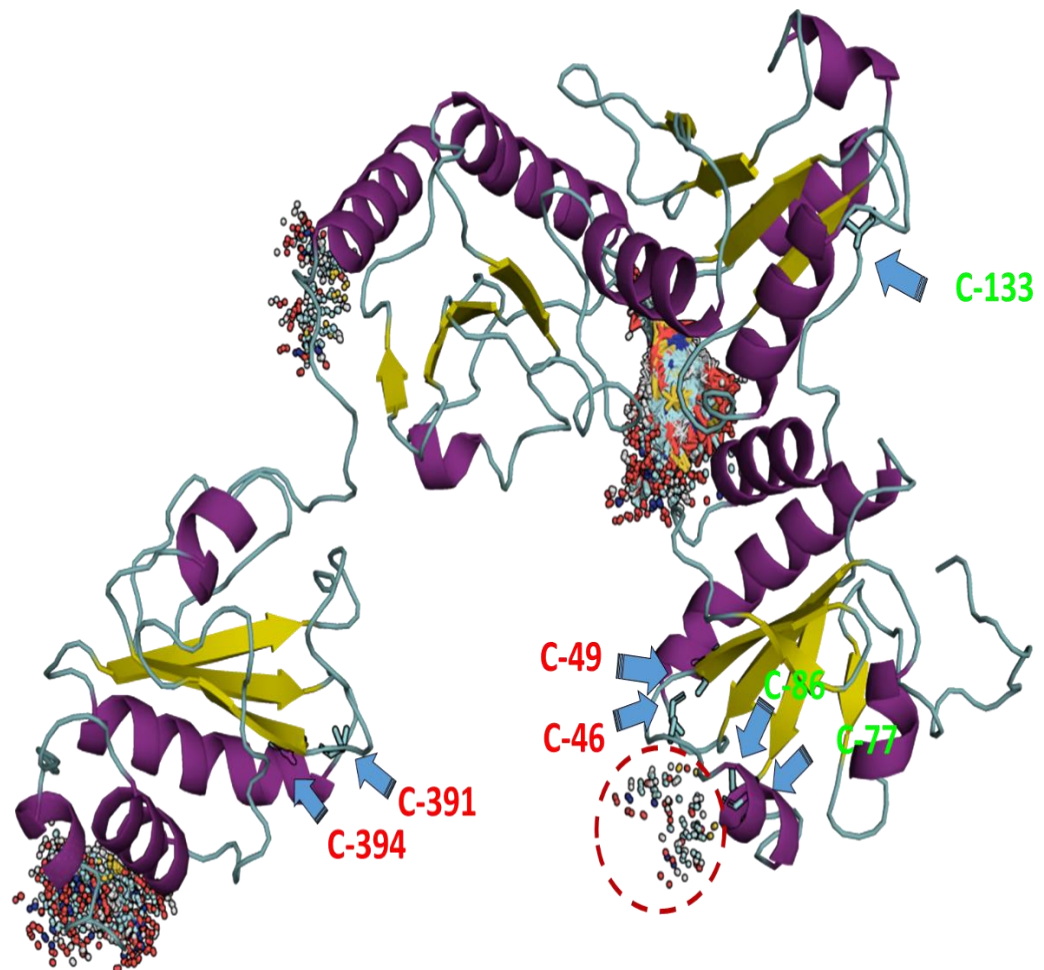


Figura 18- Representação modelo *RmPDI-3*. Foi utilizado o programa PyMol (Schrödinger LLC, 2015). A cadeia azul corresponde à subunidade $\gamma 2$ e a cadeias verde corresponde à subunidade $\alpha 1$. A região do sítio dos benzodiazepínicos está destacada no círculo tracejado. As setas indicam a região das α -hélices transmembranares que foram removidas.

5.4 Dinâmica Molecular da PDI1

Os dados fornecidos pelos estudos de *docking* molecular indicaram maiores possibilidades de um ataque nucleofílico ocorrer entre DTNB e a *RmPDI-1*. Para investigar

melhor as interações predominantes no complexo DTNB-*RmPDI-1*, foram realizadas simulações de dinâmica molecular (DM) durante 100ns a fim de investigar o comportamento dinâmico do sistema, usando o modo de ligação predito pelo *docking* como estrutura de partida.

5.4.1 Análise das distâncias entre os domínios da *RmPDI-1* e alterações conformacionais

Para verificar as possíveis mudanças conformacionais, foram determinadas as distâncias entre os domínios da proteína, utilizando alguns aminoácidos como referência durante a DM (Figuras 19 e 20).

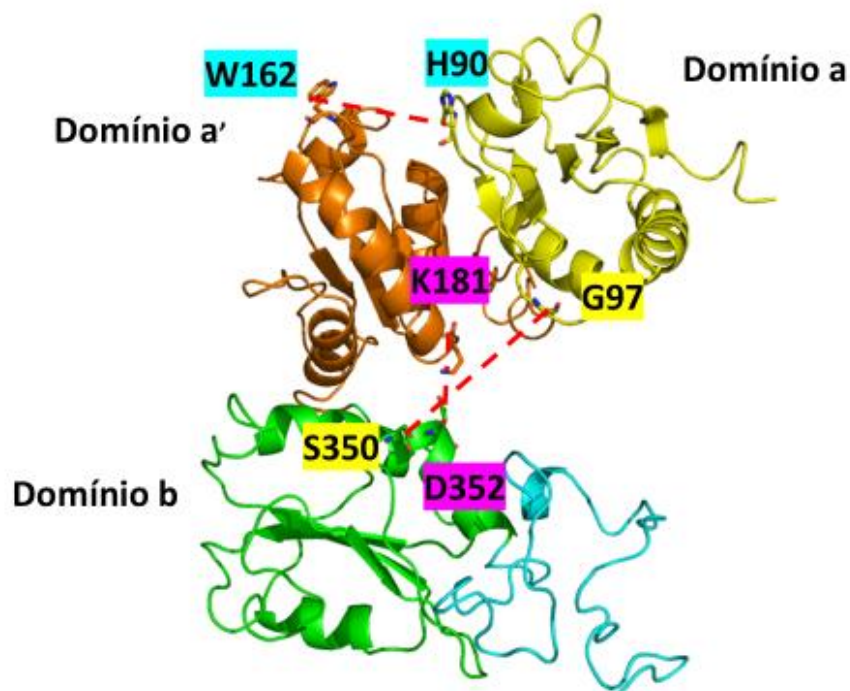
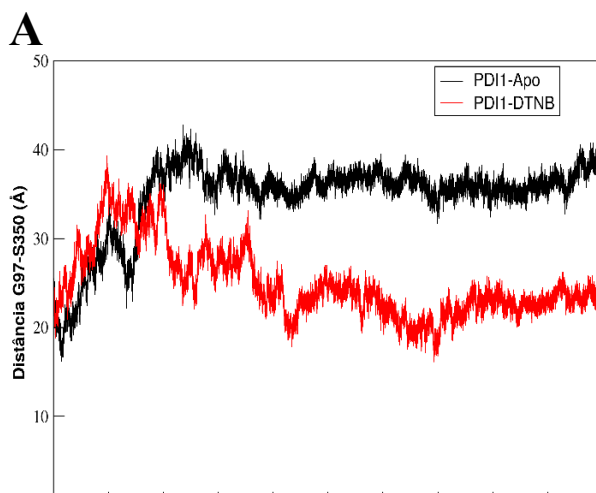


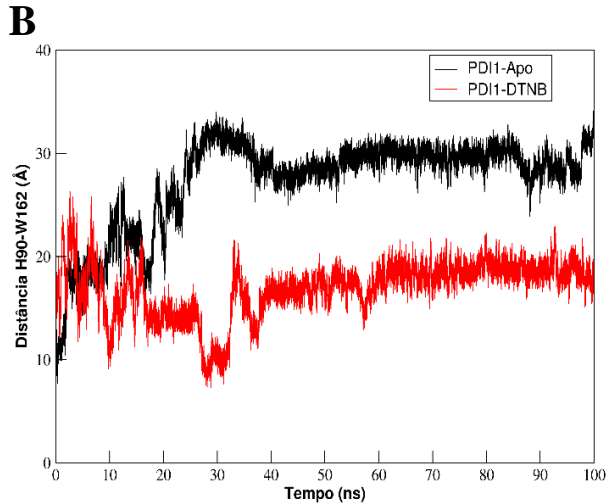
Figura 19- Distâncias entre os Domínios da *RmPDI-1*: Resíduos de aminoácidos utilizados como referência para a medida das distâncias entre os domínios da *RmPDI-1* ao longo da simulação de DM. Linhas tracejadas mostram as distâncias entre os aminoácidos que foram destacados para cada domínio da proteína: Domínio a e a' (H90-W162); Domínio a' e b (K181-D352); Domínio a e b (G97-S350).



Domínios a-b

A partir de:	PDI1-Apo		PDI1-DTNB	
	Média (Å)	DP (Å)	Média (Å)	DP (Å)
0 ns	34,69	4,38	24,97	3,96
40 ns	36,16	1,20	22,58	1,70
60 ns	36,12	1,26	22,18	1,62

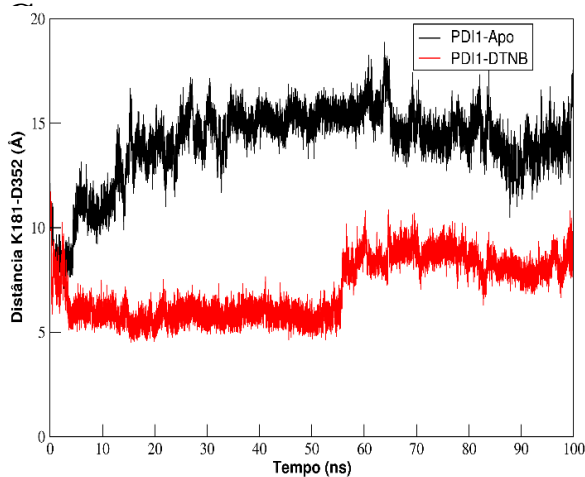
B



Domínios a-a'

A partir de:	PDI1-Apo		PDI1-DTNB	
	Média (Å)	DP (Å)	Média (Å)	DP (Å)
0 ns	27,34	4,49	16,85	2,67
40 ns	29,28	1,19	18,04	1,28
60 ns	29,56	1,14	18,59	1,00

C



Domínios a'-b

A partir de:	PDI1-Apo		PDI1-DTNB	
	Média (Å)	DP (Å)	Média (Å)	DP (Å)
0 ns	14,05	1,82	7,05	1,40
40 ns	14,76	1,02	7,76	1,28
60 ns	14,49	1,11	8,47	0,60

Figura 20- Distâncias entre os domínios de *RmPDI-1* complexado com DTNB: Os tres domínios estão destacados nas tabelas correspondentes, com as comparações respectivas das distancias entre os domínios **a**, **a'** e **b** da *RmPDI-1*. Observa-se menores distâncias entre os domínios durante toda a dinâmica molecular quando formado o complexo *RmPDI-1/DTNB*. (A) distancias entre os domínios a-a'(H90-W162); (B)domínio **a'** e **b** (K181-D352); (C) domínio **a** e **b** (G97-S350).

5.4.2 Análise da estabilidade do complexo *RmPDI-1-DTNB*

Os valores de *RMSD* foram obtidos na simulação de DM para a *RmPDI-1* Apo (PDI1-Apo) e complexada com o DTNB (*DTNB-RmPDI-1*). Ao complexar com o DTNB, a *RmPDI-1* apresenta menor variação conformacional, indicado pela menor variação do desvio dos átomos em comparação à proteína livre.

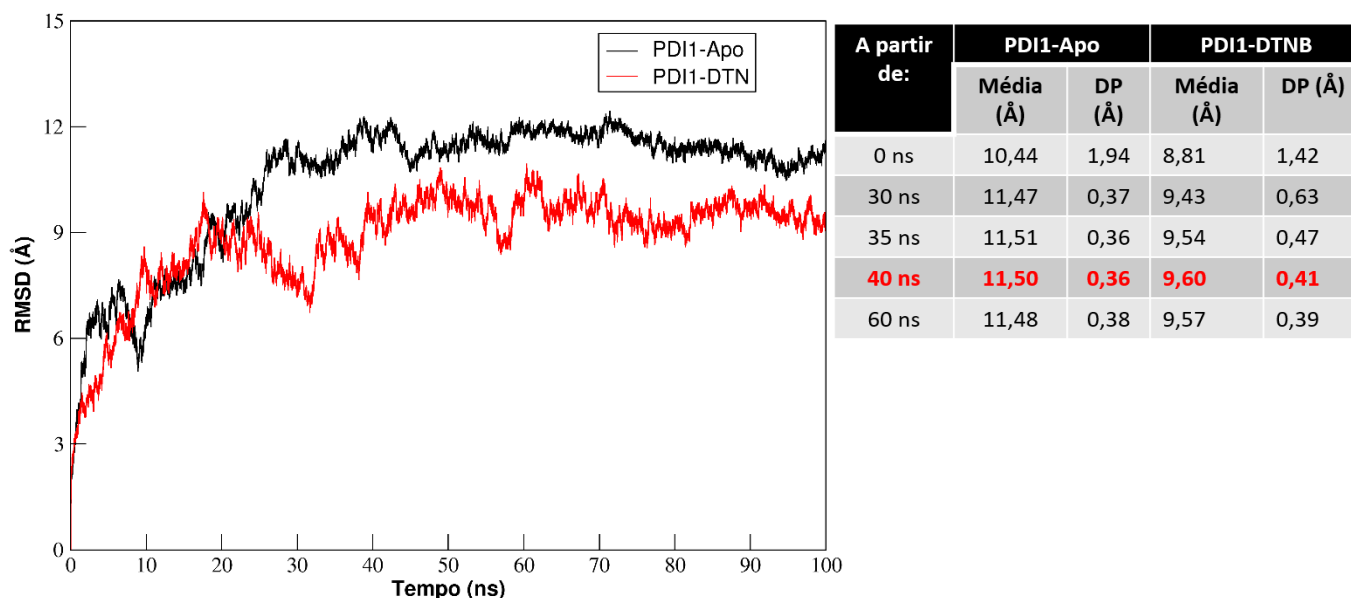


Figura 21- Análises de estabilidade do complexo *RmPDI1*-DTNB: Valores de *RMSD* obtidos na simulação de DM para a *RmPDI1* Apo (PDI1-Apo) e complexada com o DTNB (DTNB-*RmPDI1*). Valores de *RMSD*, Média e Desvio Padrão (DP) obtidos na simulação de DM para a *RmPDI1* Apo (PDI1-Apo) e complexada com o DTNB (DTNB-*RmPDI1*):

5.4.3 Mudanças conformacionais na *RmPDI1*

A investigação das variações conformacionais da *RmPDI1* na forma Apo e complexada com DTNB (Figura 22) mostra que a ligação do DTNB parece manter a estrutura da PDI1 mais organizada e compactada, especialmente o domínio a', onde se observa a menor variação, indicativo de estabilidade conformacional. Dada a natureza flexível das PDIs, é interessante observar que a presença de um inibidor diminui tal flexibilidade, muito provavelmente influenciando no reconhecimento de substratos e bloqueando, ao menos parcialmente, a sua atividade biológica.



100 ns

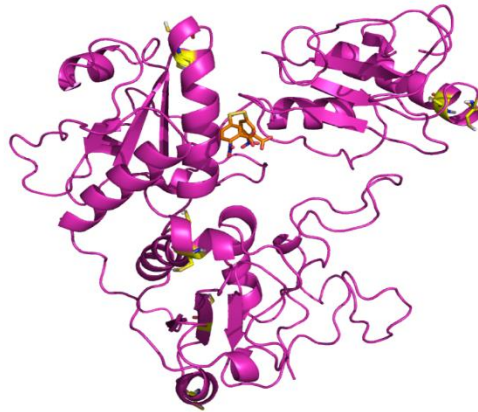
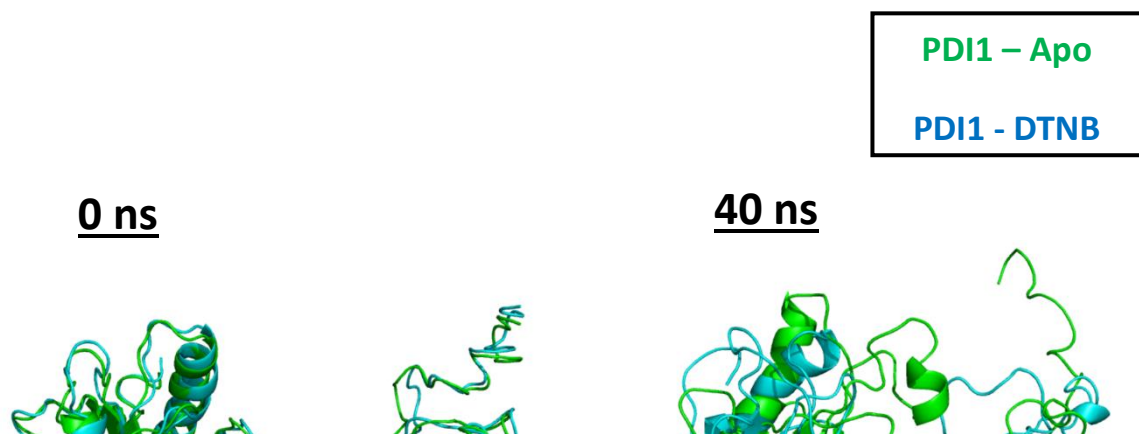


Figura 22- Modo de ligação do DTNB em diferentes momentos: Assim como observado no *docking*, inicialmente o DTNB (laranja) estava ligado próximo às C-163 e C-166 (domínio **a'**), Entretanto, observou-se uma variação conformacional significativa do ligante ao longo da simulação, a partir de 40 ns, distanciando-se das cisteínas (em amarelo) e explorando sítios distintos da *RmPDI1*.

A Figura 23 mostra os valores das distâncias entre os domínios **a'** e **b** obtidos na simulação de DM para a *RmPDI-1* Apo (PDI1-Apo) e complexada com o DTNB (DTNB-*RmPDI-1*). Mais uma vez nas figuras 22 e 23, não deixam dúvidas de que os domínios **a**, **a'** e **b**, se encontram consideravelmente mais próximos quando se compara a *RmPDI-1* Apo e complexada com o DTNB (DTNB-*RmPDI-1*).



100 ns

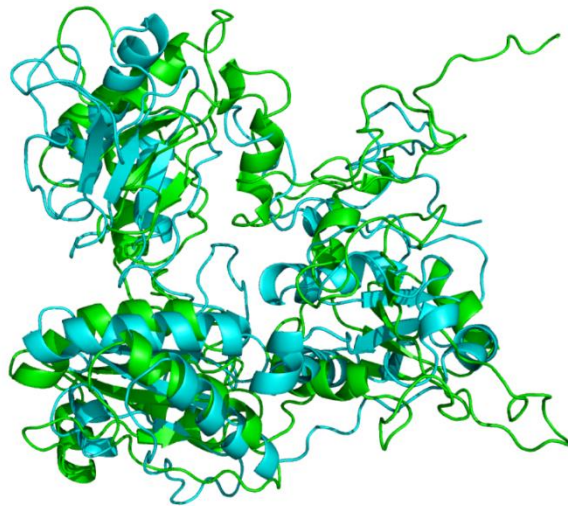


Figura 23. Mudanças conformacionais na *RmPDI-1* – sobreposição: A ligação do DTNB parece manter a estrutura da *RmPDI1* mais organizada e compactada, especialmente o domínio a'. Cores verdes proteína sem complexo com o ligante (*RmPDI1-Apo*); Cores azuis proteína complexada com o ligante (DTNB-*RmPDI-1*). MD durante 100 ns em destaque para mudanças conformacionais a partir de 40 ns.

5.5- DTNB inibe a proliferação das células BME26 e não altera a expressão gênica de *RmPDI*s

Para a avaliação dos efeitos do DTNB sobre a viabilidade, morfologia e proliferação das células BME26, estas foram tratadas com DTNB 1, 2 e 4 mM, respectivamente. Além disso, foi avaliado também o tempo (2, 4 e 6 horas) de exposição para cada tratamento. Conforme ilustrado na Figura 24 o tratamento com DTNB 2 mM durante 4 e 6 horas diminuiu o número de células BME26 em cerca de 21 e 22%, respectivamente. Para o tratamento DTNB 4 mM durante 4 e 6 horas, observa-se uma diminuição mais acentuada no número de células BME26 (39 e 40%, respectivamente). Após 12 horas da remoção do DTNB, no tratamento de 6 horas de incubação, observou-se que as células BME26 tratadas com DTNB 2 e 4 mM recuperaram o seu crescimento em 19 e 34%, respectivamente, em comparação com o controle de 6 horas. Além disso, os resultados mostram que o tratamento com DTNB 2 e 4 mM promoveu uma proliferação celular de 41% e 74% de morte celular após a troca do meio.

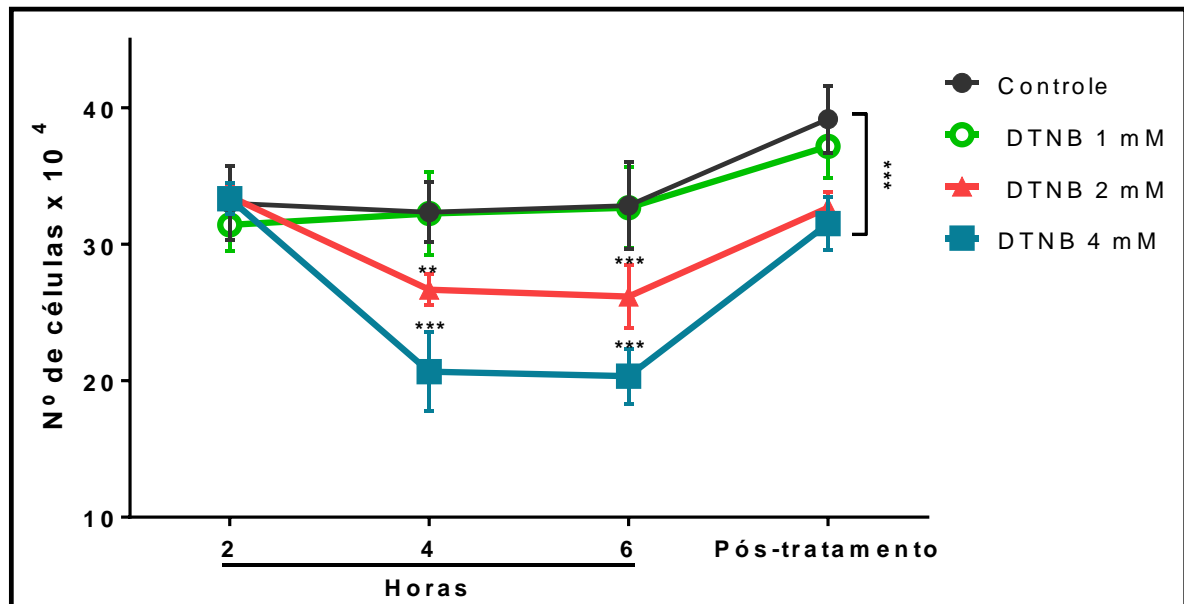


Figura 24. Efeito do DTNB na viabilidade e proliferação celular: Diminuição do número de células nos tratamentos em que as concentrações foram 2 mM e 4 mM de DTNB. Os resultados foram analisados usando um pacote de software estatístico (GraphPad Prism-8). Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$, comparado ao controle; no teste de comparações múltiplas de Tukey.

Outro dado significativo sobre o efeito do DTNB nas células BME26 pode ser observado na Figura 25, onde as alterações na morfologia celular estão diretamente relacionadas aos tratamentos com esta droga. De fato, observamos que as células apresentaram sua morfologia alterada de um tipo fusiforme para uma forma esférica. Assim, os nossos

resultados indicam fortemente que os graus de alteração morfológica são dose-dependentes. No pós-tratamento com novo meio fresco, as células BME26, que sobreviveram ao tratamento com DTNB, recuperaram a sua morfologia original, de forma geral as células BME26 apresentam uma importante plasticidade celular.

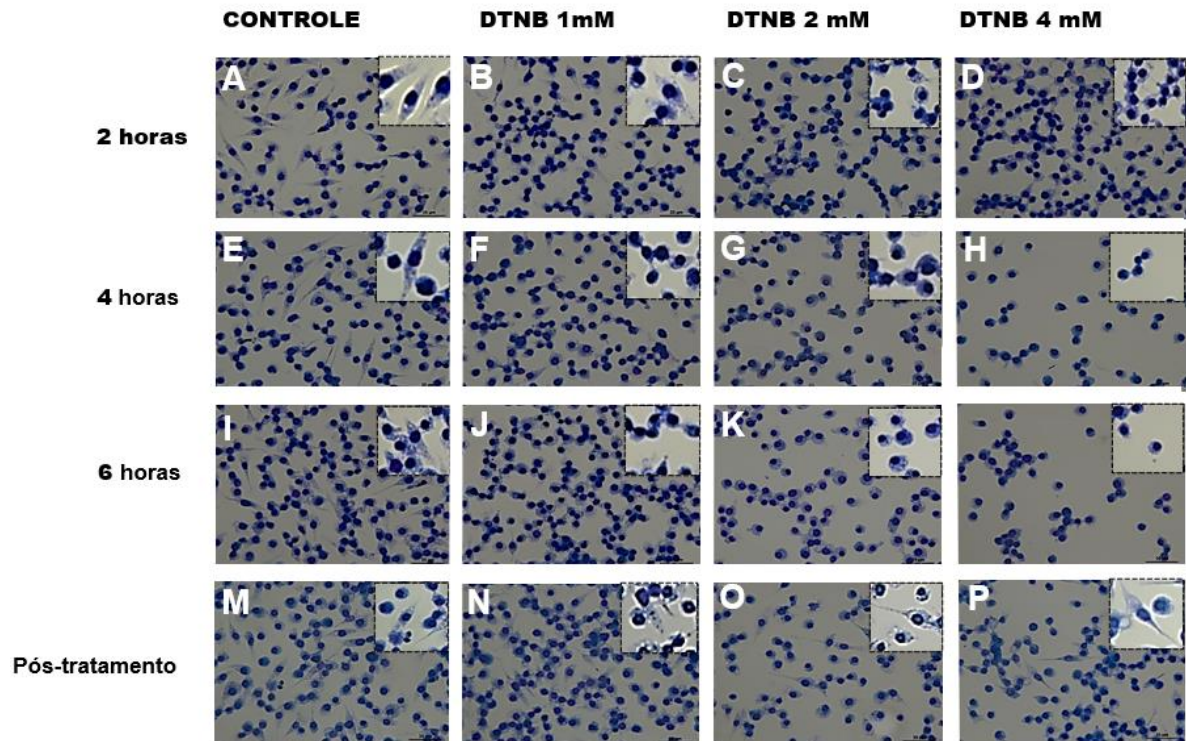


Figura 25: Efeito DTNB em células BME26: as células foram tratadas em três diferentes concentrações (1 mM, 2 mM e 4 mM) e em diferentes períodos de tempo (2h, 4h, 6h e 12h pós-tratamento). A-D: tratamento por duas horas em crescentes concentrações; E-H: tratamento de 4 horas em crescentes concentrações; I-L: tratamento por 6 horas em crescentes concentrações; M- Q: Após retirada do DTNB as células forma incubadas por 12 horas com novo meio L15 B300. Durante o tratamento com DTNB, as células alteram sua morfologia e viabilidade, 24 horas após a retirada do DTNB as células retornam à sua morfologia original. Os tratamentos com DTNB interferem na viabilidade, morfologia e ciclo celular na linhagem de células BME26. Aumento de 400x, microscópio Zeins.

Além disso, durante os desafios das células BME26 com DTNB, observou-se que algumas células que apresentavam um formato fusiforme tiveram mudanças significativas logo após o tratamento em dose e tempo dependentes. Os tratamentos nas concentrações de 2 mM e 4 mM foram os mais pronunciados, apresentando diminuições significativas no número de células viáveis e mudanças drásticas do padrão fusiforme para formatos mais arredondados. No entanto, as células que resistiram aos tratamentos mais severos, quando retirado o DTNB e adicionado novo meio LB15-300, tiveram maiores transdiferenciações celulares e as taxas de crescimento foram mais significativas. O tratamento com DTNB 2 mM durante 4 e 6 horas diminuiu o número de células viáveis BME26 em cerca de 21 e 22%. Para o tratamento com

DTNB 4 mM durante 4 e 6 horas, observa-se uma diminuição mais acentuada no número de células BME26 (39 e 40%, respectivamente). Após a remoção de todos os DTNB nos grupos 6 horas de incubação, observou-se que as células BME26 tratadas com DTNB 2 e 4 mM recuperaram o seu crescimento em 19 e 34%, respectivamente, em comparação com o controle de 6 horas. Além disso, nossos resultados mostram que o tratamento com DTNB 2 e 4 mM promoveu uma flutuação geral de 41% e 74% de morte celular (Figuras 24 e 25), sugerindo grande capacidade de resiliência celular. A capacidade de migração pela matriz extracelular é mediada por moléculas da superfamília das integrinas, glicoproteínas de membrana que integram os meios intra e extracelulares (Passam *et al.*, 2018).

5.6 Transcrição de *RmPDI* durante tratamento com DTNB

Para determinar os perfis de expressão dos três genes de *RmPDI* sob influência de DTNB, amostras totais de RNA de células BME26 foram tratadas em diferentes tempos e concentrações. A quantidade relativa de RNA de *RmPDI* por unidade de *Elf1A* está apresentada na Figura 26, onde observa-se que as taxas de expressões relativas (%) mostram

que os três genes *RmPDI* não se alteraram, nem em dose resposta e nem em tempo de resposta, durante os tratamentos. Este experimento foi conduzido nos mesmos intervalos onde observou-se as mudanças morfológicas das células BME26 tratadas com DTNB.

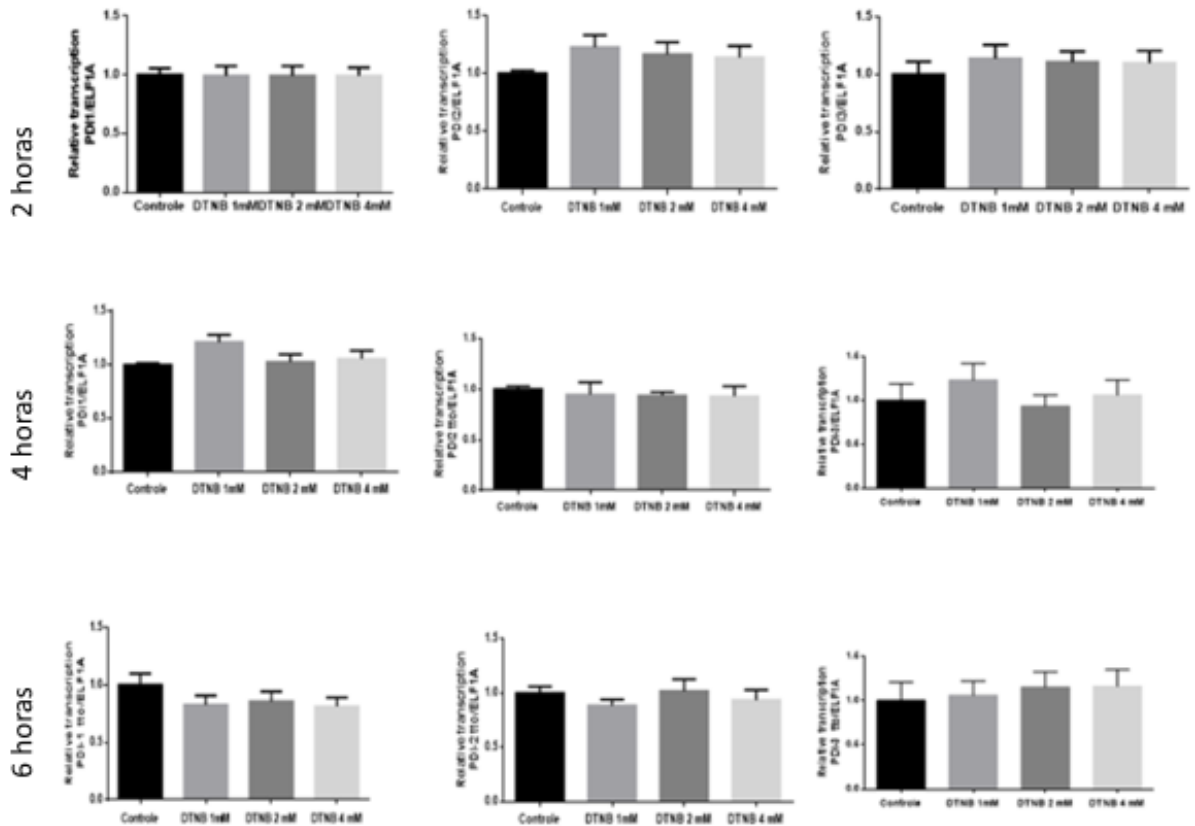


Figura 26 – Perfil transcricional das *RmPDIs* durante o tratamento com DTNB: As células foram tratadas com DTNB nas concentrações de 1mM, 2mM e 4mM no período de 2 horas, 4 horas e 6 horas. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$, comparado ao controle; no teste de comparações múltiplas de Tukey.

5.7- Correlações metabólicas em células BME26 tratadas com DTNB.

Para investigar as respostas metabólicas das células BME26 frente ao tratamento com DTNB, foram avaliadas diferentes enzimas envolvidas no metabolismo e ciclo celular.

5.7.1 Atividade de Lactato Desidrogenase (LDH) e avaliação do conteúdo de Glutathiona Reduzida (GSH)

O lactato representa uma importante fonte de energia para a respiração mitocondrial: é o principal precursor gliconeogênico, além de se apresentar como uma molécula de sinalização.

Para avaliar a rota metabólica das células BME26 desafiadas com DTNB, inicialmente mensurou-se a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) e quantificou-se os níveis de glutathiona reduzida (GSH). Observou-se que o tratamento com DTNB, em diferentes concentrações, foi capaz de induzir um aumento da atividade de LDH – no sentido piruvato/lactato – indicando um significativo desvio metabólico (Figura 27). Com relação aos níveis de GSH foi possível perceber uma diminuição do sinal e aumento dos vacúolos durante o tratamento com DTNB de modo dose dependente inversamente proporcional ao pós-tratamento (Figura 28).

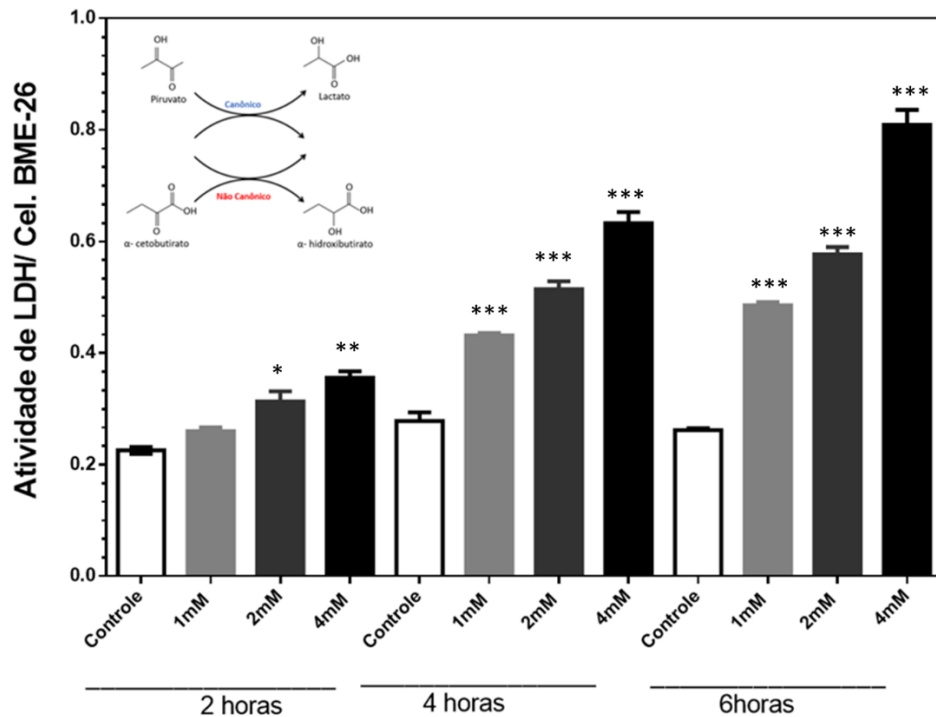


Figura 27 - DTNB aumenta a atividade de LDH em células BME26: As células foram tratadas com DTNB nas concentrações de 1mM, 2mM e 4mM no período de 2 horas, 4 horas e 6 horas. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,0001, comparado ao controle; no teste de comparações múltiplas de Tukey.

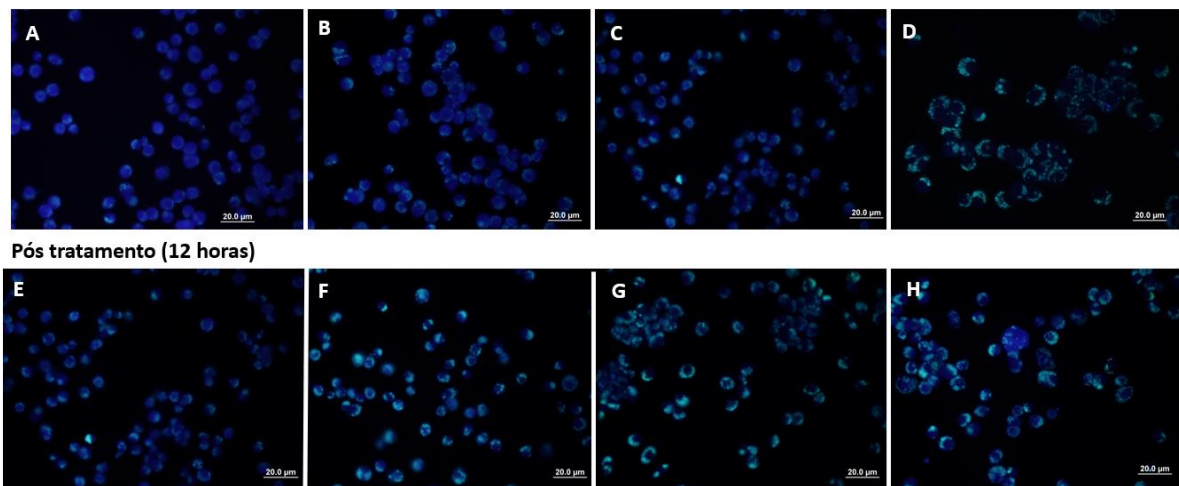


Figura 28 - Marcação de Glutathiona reduzida (GSH) em células BME26 tratadas com DTNB: As células foram tratadas com DTNB em diferentes concentrações (A) controle, (B) 1 mM, (C) 2 mM e (D) 4 mM e incubado por 4 horas. Após o tratamento foi retirado o DTNB e adicionado novo meio L15 B300 respectivamente aos tratamentos e incubado por 12 horas. Marcação Azul escuro CMAC (GSH), marcação Azul claro MDY-64. As amostras foram avaliadas triplicatas biológicas, em Microscópio Olympus com aumento de 400 vezes.

Os resultados indicam um desvio metabólico devido a indução de formação de lactato, via ativação de lactato desidrogenase, e modificação do potencial redox pela dosagem de GSH nas células BME26.

5.6.1 Imuno marcação de GSK3 β total em células BME26 tratadas com DTNB

Uma das enzimas chaves na regulação do glicogênio e metabolismo celular das células é a GSK3 β . Devido ao aumento da atividade de LDH no sentido piruvato lactato e diminuição GSH das células BME26 tratadas com DTNB, verificou-se a imunolocalização *RmGSK-3 β* (Figura 29) e o conteúdo de glicogênio (Figura 30) nessas condições. Interessantemente, as marcações mais intensas e difusas, ocorrem durante o tratamento dose dependente, indicando que as modificações do pode estar acontecendo através do controle por atividade de GSK3 β .

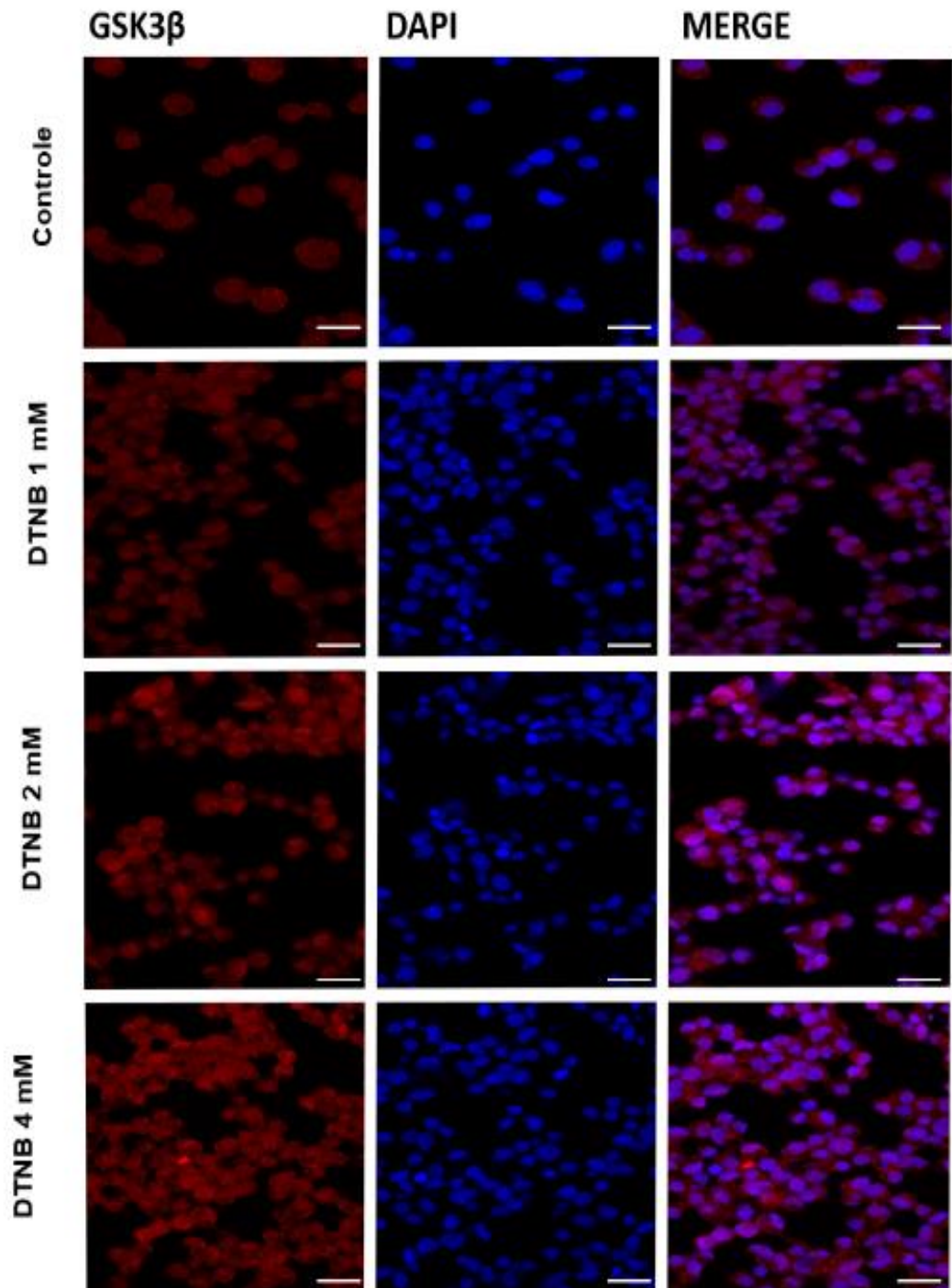


Figura 29 - Imunomarcção para GSK3 em células BME26: as células foram tratadas com DTNB nas concentrações de 1mM, 2mM e 4mM durante 4 horas, em seguida foram marcadas com anticorpo anti-GSK3 β . A marcação aumentou dose dependente, marcação em vermelho GSK3 β e azul Dapi com aumento de 400x microscópio Nikon. Amostras representativas de três experimentos independentes.

Para verificar melhor os efeitos do DTNB sobre a GSK3, foi avaliado a síntese de glicogênio. Para isso as células BME26 foram tratadas com DTNB e foram determinados os níveis de glicogênio durante o tratamento. As análises espectrofotométricas, pelo método

enzimático, e avaliação microscópica pelo método de PAS, mostraram que há diminuição no conteúdo de glicogênio durante a exposição das células BME26 ao DTNB de modo dose e tempo dependentes. Nos tratamentos de 2 horas mostraram quedas de: 5,02% (1mM), 10,86% (2mM) e 20,01% (4mM). No tratamento de 4 horas mostraram quedas de: 13,42% (1mM), 39,09% (2mM) e 51,49% (4mM). Finalmente nos tratamentos de 6 horas observou-se quedas de: 14,80% (1mM), 22,07% (2mM) e 55,75% (4mM) (Fig.30A). Os resultados foram ilustrados com a marcação pela técnica de PAS em tratamentos iguais durante 4 horas (Fig. 30B).

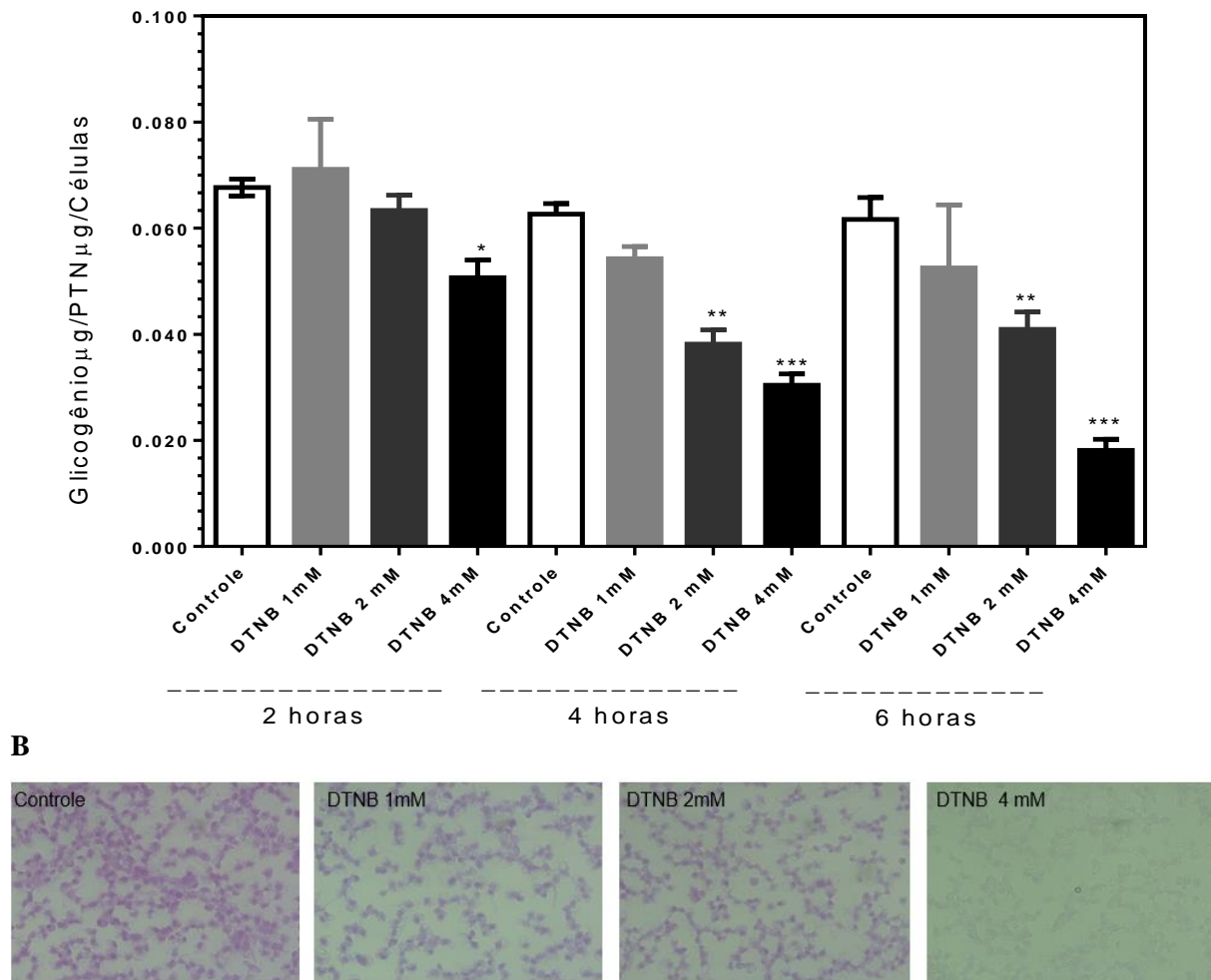


Figura 30 - O DTNB induz e altera os níveis de glicogênio durante o tratamento das células BME 26: (A) as células BME 26 foram tratadas com DTNB por 2h, 4h e 6h nas seguintes concentrações: 1mM, 2mM e 4mM. Observa-se diminuição nas concentrações de glicogênio dose e tempo dependente nos tratamentos das células com DTNB. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$, comparado ao controle; no teste de comparações múltiplas de Tukey. (B) As células BME 26 foram tratadas com DTNB durante 6 horas, em seguida foram fixadas e coradas com PAS.

As células BME26 tratadas com DTNB mostraram uma queda significativa, no conteúdo de glicogênio em dose e tempo dependentes. Nos tratamentos de 2 horas mostraram quedas de:

5,02% (1mM), 10,86% (2mM) e 20,01% (4mM). No tratamento de 4 horas mostraram quedas de: 13,42% (1mM), 39,09% (2mM) e 51,49 (4mM). Finalmente nos tratamentos de 6 horas observou-se quedas de: 14,80% (1mM), 22,07% (2mM) e 55,75% (4mM). Os resultados foram ilustrados com a marcação pela técnica de PAS em tratamentos iguais durante 4 horas. Estes resultados demonstram o papel do glicogênio no metabolismo das células BME26 e estão em acordo com os resultados de embriogênese do carrapato *R.microplus* (Abreu *et al.*, 2013). Foi avaliada ainda a transcrição relativa de GSK3 β em células BME26 silenciadas para *RmpDIs*.

5.6.3 Silenciamento Gênico para *RmPDI*'s

Para entender melhor as correlações metabólicas entre PDI e GSK3 β , verificou-se o efeito do silenciamento gênico de PDI e seu efeito sobre a transcrição de GSK3 β . Na figura 31 demonstra que as células BME26 que foram silenciadas para os genes de *RmPDI*-1, *RmPDI*-2 e *RmPDI*-3 apresentaram diferentes níveis de transcrições para GSK3 β . O silenciamento de *RmPDI*-1 não modificou os perfis transcricionais de GSK3 β , já para a *RmPDI*-2 aumentou discretamente. Para o silenciamento da *RmPDI*-3, além de diminuir a transcrição da *RmPDI*-2 também reduziu o número de transcritos de GSK-3 β . Interessantemente, os níveis transcricionais de GSK-3 β foram aumentados em todos os duplos silenciamentos, especialmente, durante o silenciamentos duplos dos genes de *RmPDI*-1 e *RmPDI*-3 em células silenciadas por 48 horas.

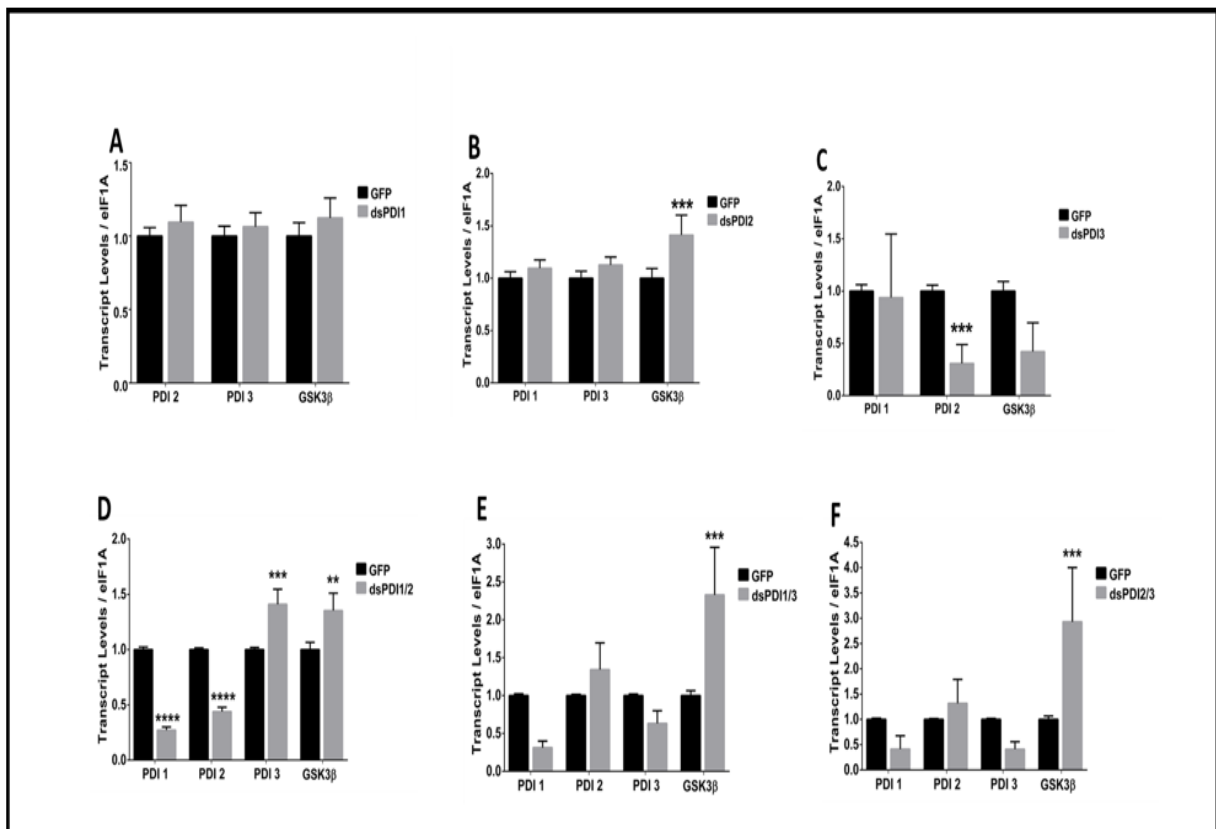


Figura 31 - Efeito do silenciamento gênico: as células BME26 foram tratadas com PDI *dsRNA* por 48 horas. (A), (B) e (C) silenciamento simples. (D), (E) e (F) silenciamento duplo. Os tratamentos mostram diferenças nos números de transcrição para as diferentes isoformas *RmPDI* e GSK-3 β . Maior efeito transcricional em *RmGSK-3 β* em grupos de duplos silenciamentos. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$; comparado ao controle; no teste de comparações múltiplas de Tukey.

5.9 Avaliação do anticorpo anti-*RmPDI*-1

Para verificar a importância da *RmPDI1*, para o ciclo das células BME26 foi sintetizado anticorpo específico para esta proteína (Figura 32A). Inicialmente testamos a eficiência do anticorpo por *dot blotting* (Figura 32B), em seguida as células foram desafiadas em diversas concentrações (1:2000, 1:1000 e 1:500) durante 12 horas (Figura 32C). Finalmente, estabeleceu-se a concentração de 1:1000 para posteriores experimentos (Figura 32D). Os resultados mostram que células BME26 que foram incubadas com o soro *Anti-RmPDI1* durante 12 horas tiveram diminuição (~20 %) nos números de células, de modo dose dependência.

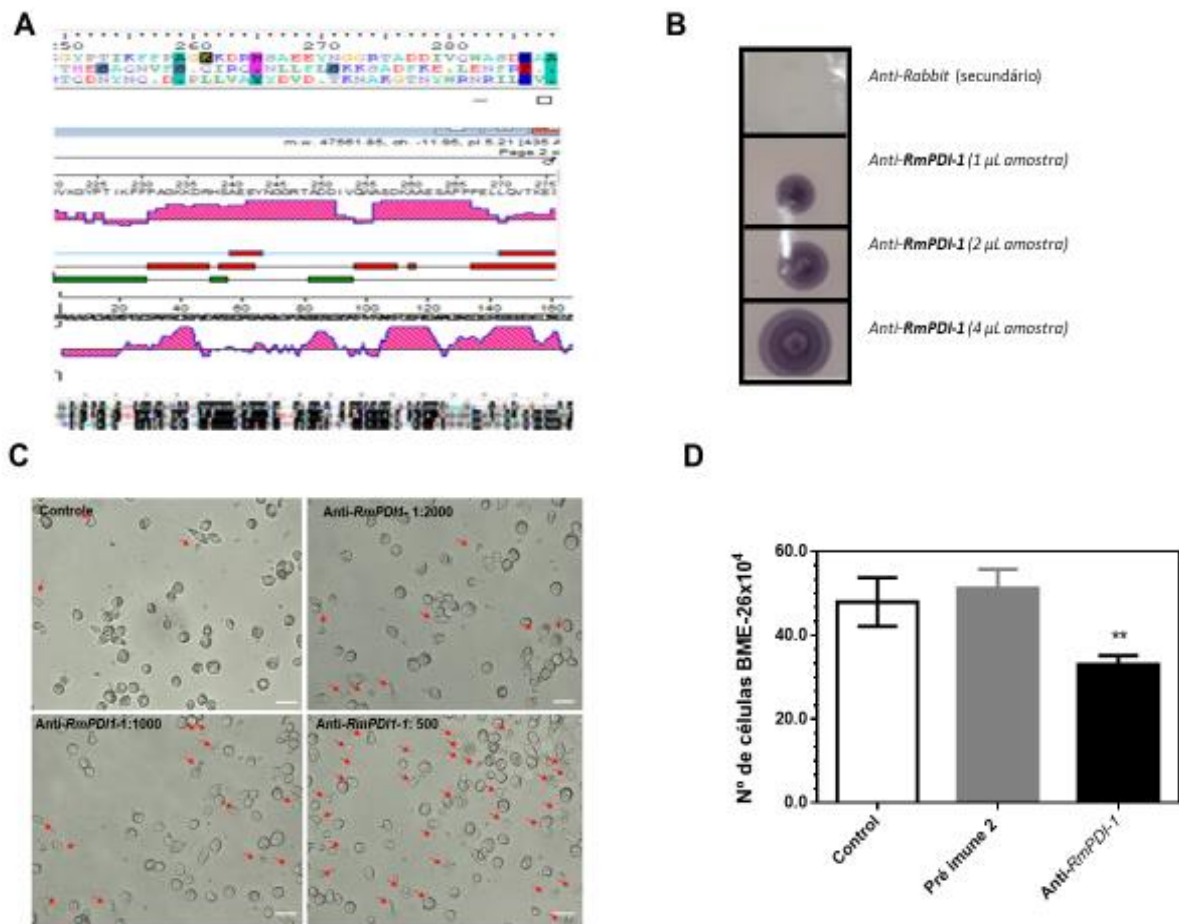


Figura 32- Imunomarcção específica de anti- *RmPDI1* em células BME26: (A) Região de construção do epítipo para *Anti-RmPDI-1*, apresenta baixa similaridade e alta imunogenicidade, (B) Teste do soro *Anti-RmPDI-1* em homogenato de células em diferentes quantidade de amostras, (C) Teste de sobrevivencia celular quando exposto a diferentes concentração do soro *Anti-RmPDI1*, (D) Teste de sobrevivencia celular quando exposto na concentração de 1:1000 durante 12 horas do soro *Anti-RmPDI1*. Os experimentos foram realizados com três amostras biológicas independentes em três repetições experimentais cada, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$, comparado ao controle; no teste de comparações múltiplas de Tukey.

5.10 Imunomarcção para *RmPDI-1* em células BME26 silenciadas

Para entender melhor os mecanismos bioquímicos e moleculares, que regem proliferação em células BME26, primeiramente o anticorpo específico para anti-*RmPDI-1*. β -catenina foram testados em células BME26 silenciadas para *RmPDI*s.

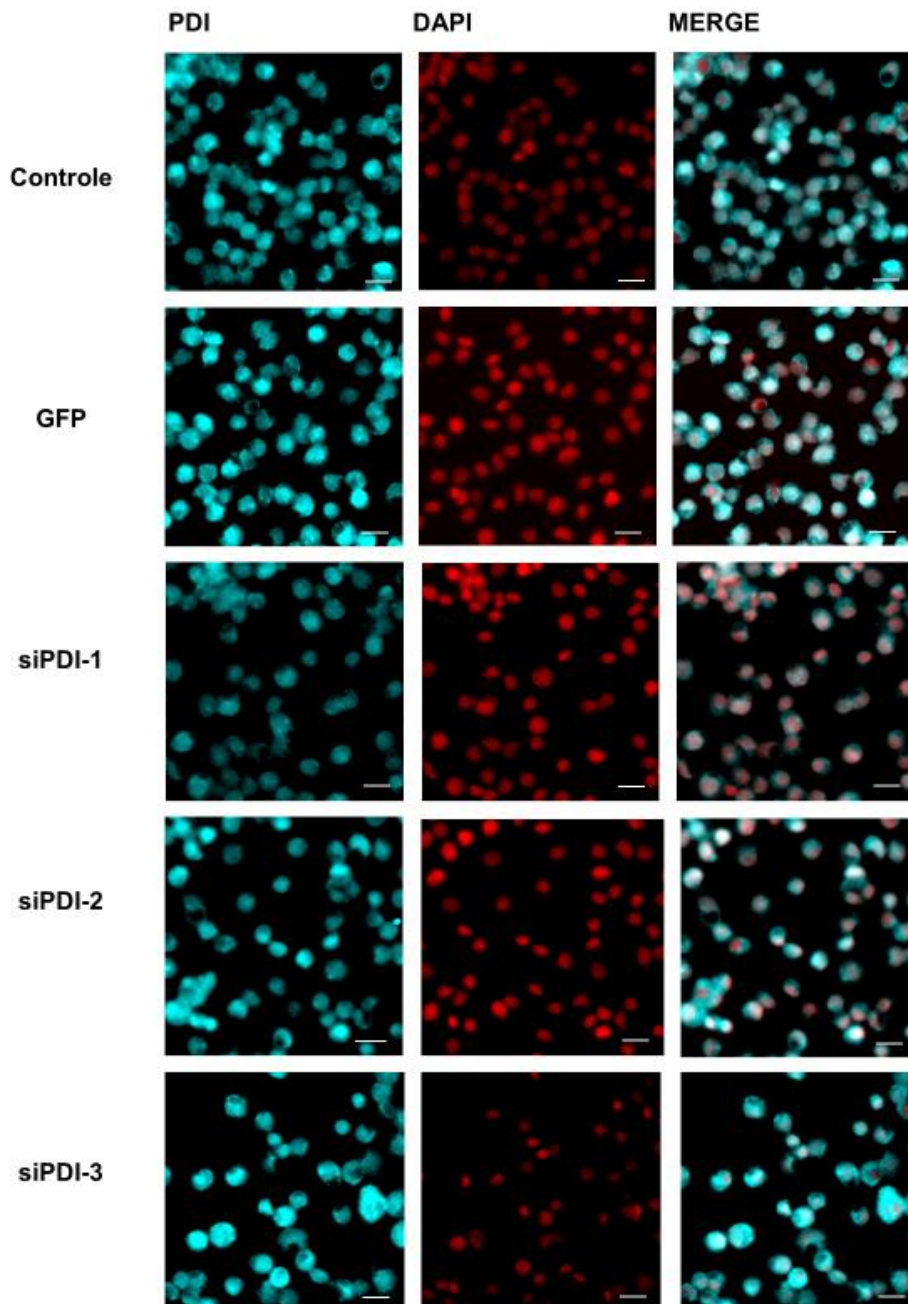


Figura 33- Efeito silenciamento gênico para *RmPDI-1*: As células foram silenciadas com dsPDI-1, dsPDI-2 e dsPDI-3 e marcada com anti-PDI-1. Observa-se diminuição apenas onde as células foram silenciadas para *siPDI-1*.

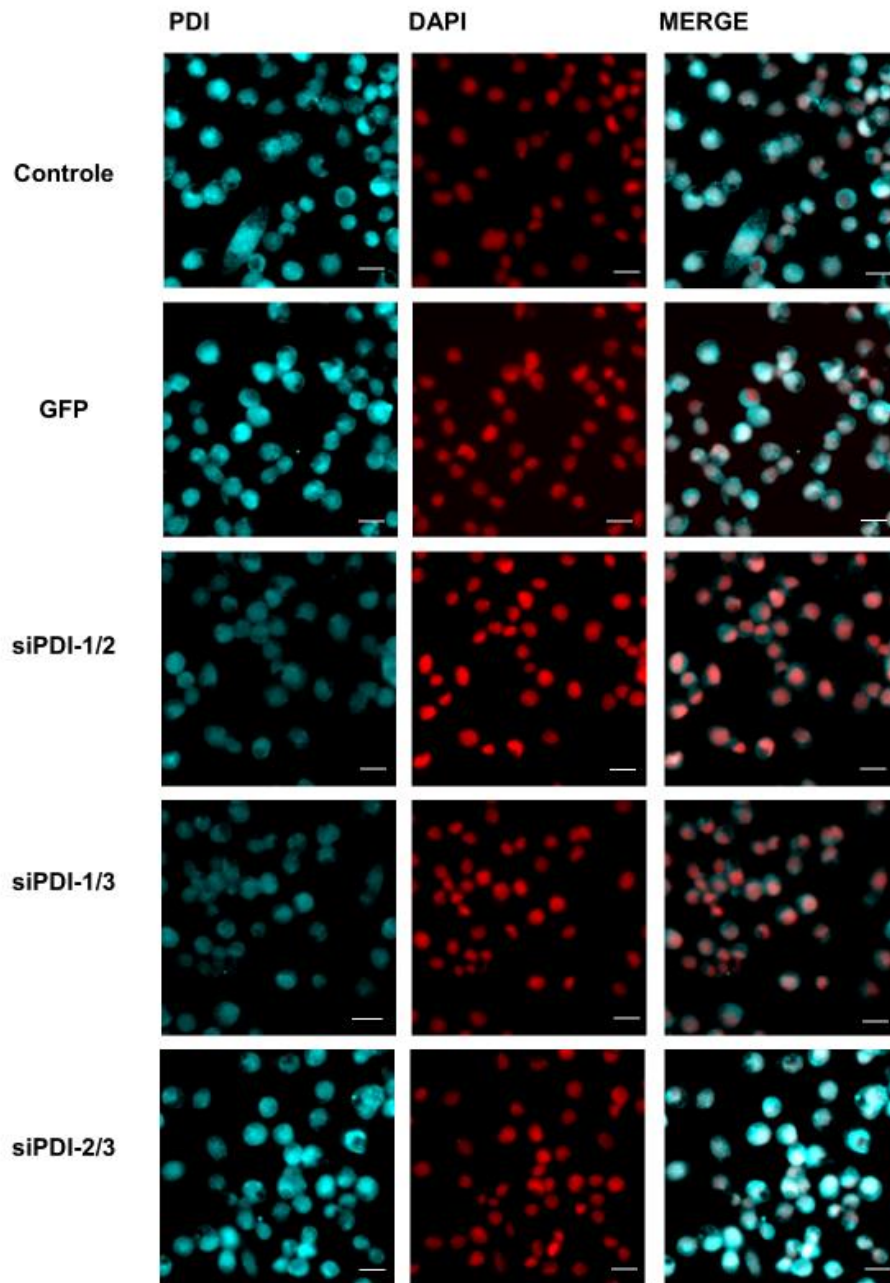


Figura 34- Efeito silenciamento gênico para *RmPDI-1*: As células foram silenciadas com dsPDI-1/2, dsPDI-1/3 e dsPDI-2/3 e marcada com anti-PDI-1. Observa-se diminuição apenas onde as células foram silenciadas para siPDI-1e 2 e siPDI-1e 3

5.11 Imunono marcação para β -catenina

Interessantemente, as figuras 33 e 34 demonstra que a marcação do anticorpo foi específica para *RmPDI-1*, tanto no silenciamento simples quanto nos silenciamentos duplos, onde *RmPDI-1* foi silenciada. Nas figuras 35 e 36 mostras que as marcações para β -catenina foram diminuídas, onde *RmPDI-1* foi silenciada

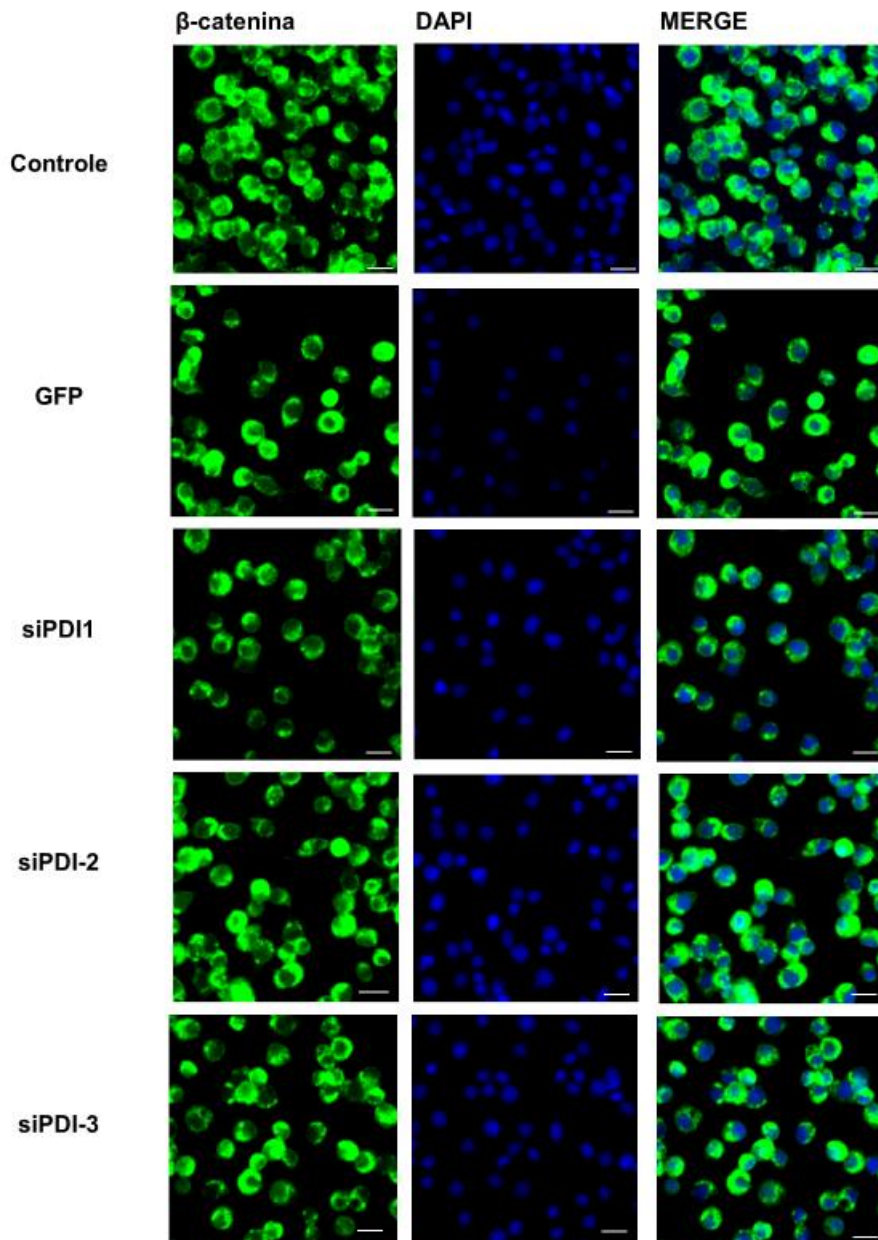


Figura 35- Efeito silenciamento gênico para *RmPDI-1* sobre β catenina: As células foram silenciadas com dsPDI-1, dsPDI-2 e dsPDI-3 e marcada com anti- β catenina. Observa-se diminuição de β catenina apenas onde as células foram silenciadas para siPDI-1.

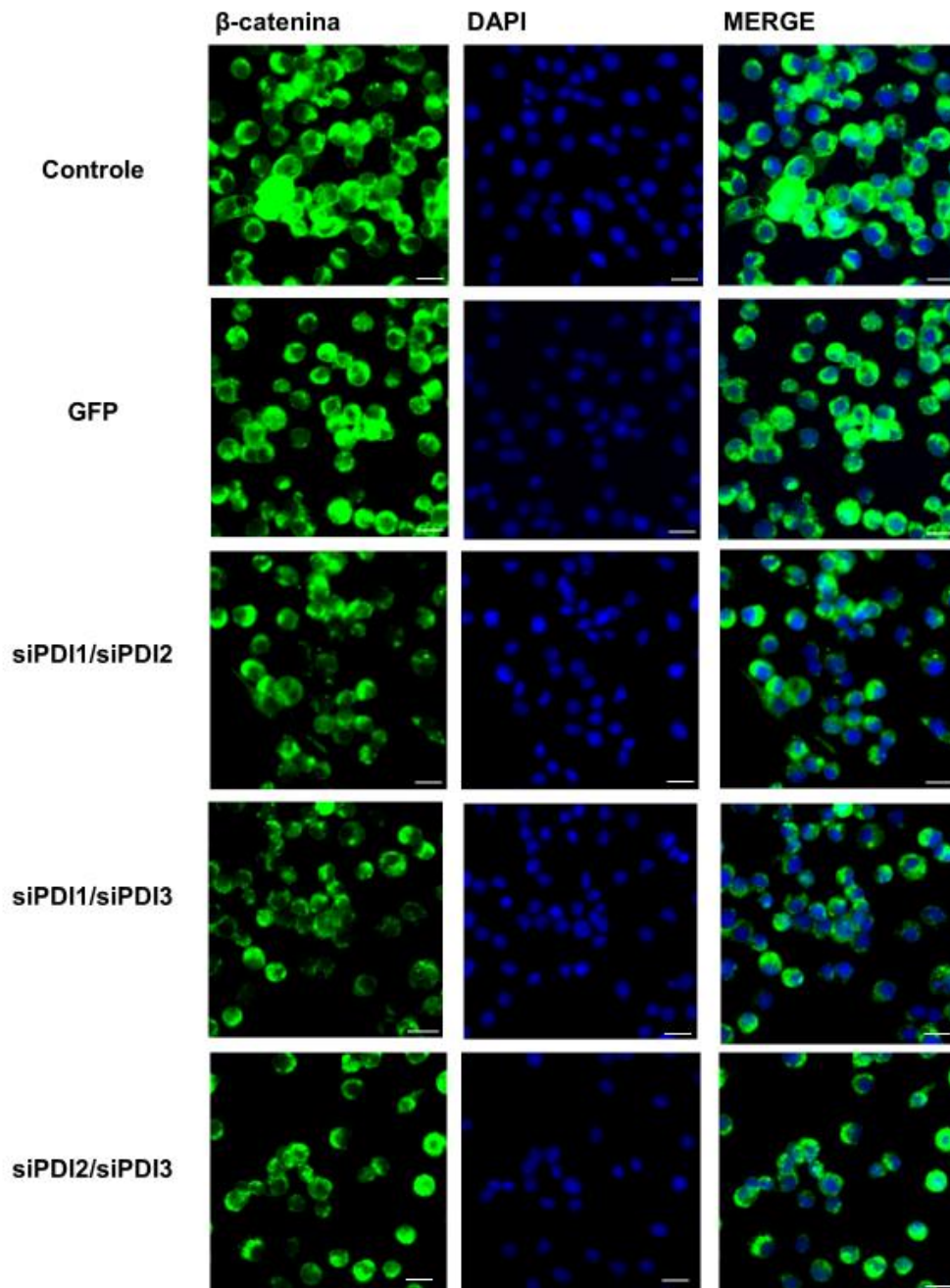


Figura 36- Efeito silenciamento gênico para *RmpDI* sobre β catenina: As células foram silenciadas com dsPDI-1/2, dsPDI-1/3 e dsPDI-2/3 e marcada com anti- β catenina. Observa-se diminuição de β catenina apenas onde as células foram silenciadas para siPDI-1e 2 e siPDI-1e 3.

Finalmente, a figura 37 mostra um resumo gráfico de uma via PDI/GSK3- β e β -catenina, propondo assim, um novo modelo de regulação do crescimento celular e no metabolismo redox, envolvendo a participação sinérgica de componentes da cascata de insulina em células BME26.

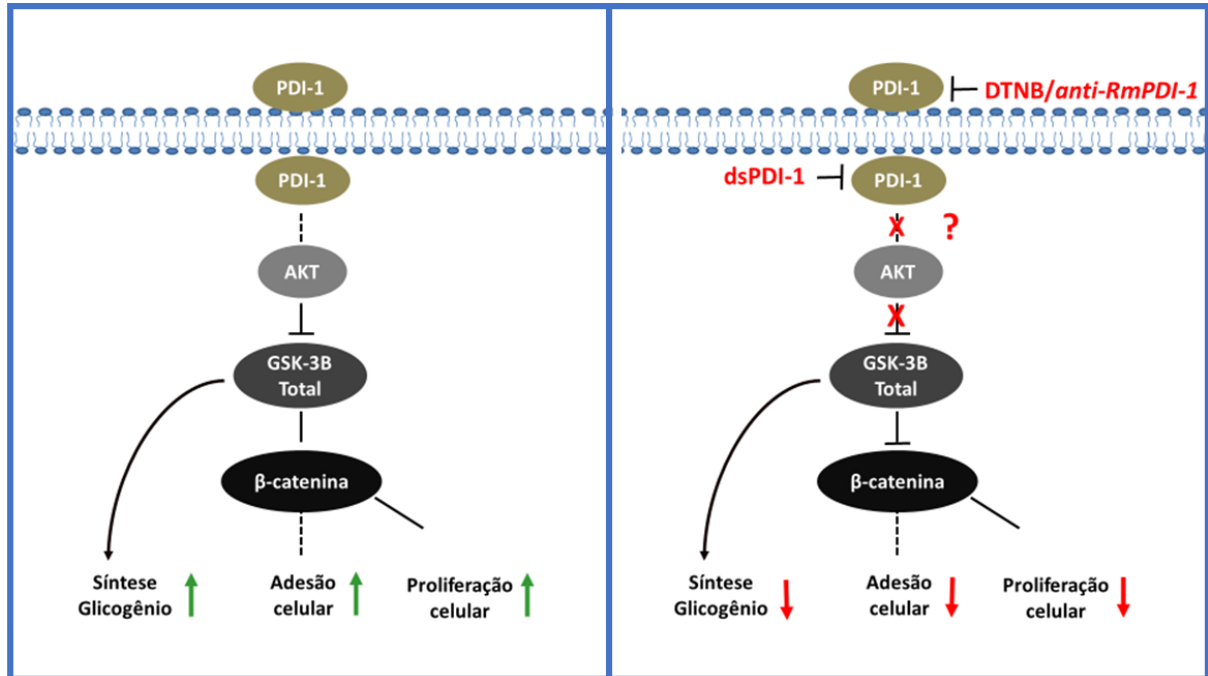


Figura 37. Modelo esquemático ilustrando o papel do eixo conservado PDI-1-AKT-GSK3- β -catenina na viabilidade celular e metabolismo de glicogênio em células BME26. (A) modelo descrito em células de mamíferos (Gao *et al.*, 2016). (B) modelo proposto para as células de carrapatos. As células BME26 foram silenciadas com dsRNA, tratadas com DTNB e Anticorpo anti-PDI a fim de bloquear a atividade da cascata de insulina. Os efeitos na viabilidade celular e no conteúdo de glicogênio são indicados por setas verde (aumento), seta vermelhas (diminuição). PDI-1 interfere na cascata de insulina em células BME26.

6. DISCUSSÃO

Nesta tese foi estudada, em células embrionárias de carrapato BME26, as funções relacionadas ao envolvimento no controle do ciclo celular e metabólico de Proteínas Dissulfeto Isomerases (*RmPDIs*): proteínas tióis multifuncionais extremamente conservadas em diversos os organismos. As proteínas tióis têm sido estudadas como interruptores redox capazes de promover regulação de alvos moleculares específicos, exercendo múltiplas funções celulares (Oliveira *et al.*, 2019). Tais proteínas atuam potencialmente regulando a formação de espécies reativas de oxigênio, e seus intermediários, como sinais redox à homeostase celular (Laurindo *et al.*, 2006). Dentre as várias proteínas tióis mais estudadas atualmente, estão as proteínas da família das PDIs. Em humanos, já foram identificados mais de 20 membros desta família com pelo menos algumas ações aparentemente complementares. A proteína PDI possui função de oxidoreductase, isomerase e chaperona, sendo o último não diretamente dependente de seus tióis, em seus sítios ativos (Pescatore *et al.*, 2012). Para entender melhor o papel das *RmPDIs* na proliferação das células BME26, os níveis de β -catenina foram avaliados após silenciamento gênico para *RmPDI-1*, *RmPDI-2*, *RmPDI-3* (Fig.35). Com o mesmo objetivo, também foi realizado um duplo silenciamento com a combinação de *dsRNA RmPDI-1/RmPDI-2*, *RmPDI-1/RmPDI-3* e *RmPDI-2/RmPDI-3* (Fig.36). Além disso, um anticorpo para *RmPDI-1*, foi sintetizado e testado na tentativa de avaliar o silenciamento gênico para *RmPDIs* (Fig.32). Interessantemente, os níveis de β -catenina estavam diminuídos, tanto no silenciamentos único para *RmPDI-1*, quanto para o silenciamento duplo para *RmPDI-1/RmPDI-2*, *RmPDI-1/RmPDI-3* (Figuras 35 e 36). Assim, acredita-se que PDIs seriam alvos funcionais importantes para serem usados no controle de carrapato.

Na busca de alvos moleculares para o controle biológico de carrapatos, identificou-se uma PDI em banco transcriptômico de *Amblyomma variegatum* e com base na estrutura primária e homologia da família das PDI (PDI; EC 5.3.4.1). Este gene foi denominado *AvPDI* e as expressas de PDIs de *Rhipicephalus appendiculatus* e *Rhipicephalus microplus* foram localizadas no banco de dados TIGR (Knizetova *et al.*, 2006). Ainda neste contexto, em 2007 três genes que codificam PDIs foram identificados em outro carrapato, o *Haemaphysalis longicornis* e foram denominados como *HIPDI-1*, *HIPDI-2* e *HIPDI-3*. As análises das sequências dos três genes que codificam proteínas de 435, 499 e 488 aminoácidos, respectivamente, e cada uma apresenta dois sítios ativos CXXC, típicos de PDI (Liao *et al.*, 2007). A fim de entender a importância desta proteína para carrapato, foi conduzido um estudo de caracterização funcional destas 3 isoformas. As análises de *Western blot* e RT-qPCR

revelaram que as três *HIPDIs* estavam presentes em todos os estágios de desenvolvimento do carrapato, intestino médio, glândulas salivares, ovário, hemolinfa e corpo gorduroso, de fêmeas do carrapato *H. longicornis*, sendo os níveis de expressão mais altos no estágio do ovo. *HIPDI-1* estava mais expresso no ovário e em glândulas salivares. O *HIPDI-2* e o *HIPDI-3* estavam expressos principalmente na glândula salivar. A alimentação sanguínea induziu aumento significativo da expressão de *HIPDI-1* e *HIPDI-3* em ninfas parcialmente alimentadas e adultos. As larvas de carrapatos infectadas com *Babésia gibsoni* expressaram *HIPDI-1* e *HIPDI-3* 2,0 e 4,0 vezes maior que os carrapatos larvais não infectados, respectivamente. Estes dados sugerem que os genes de PDIs são importantes para a biologia do carrapato, e que desempenham papéis distintos em diferentes tecidos, especialmente para o desenvolvimento dos ovos (Liao *et al.*, 2007). Nesta tese, a partir de sequências de aminoácidos retiradas do banco de dados de sequências de transcriptoma de *R. microplus* (*RmINCT-EM* - dados não publicados). Foram identificados 3 transcritos denominados de *RmPDI-1* (Fig. 7), *RmPDI-2* (Fig. 8) e *RmPDI-3* (Fig. 9) as análises comparativas de sequências com outros carrapatos ixodídeos. Além disso, o alinhamento de aminoácidos comparativo para as *RmPDIs* apresenta alta identidade com os produtos dos genes de *H. longicornis* (*HIPDIs*) e *I. scapularis* (*IsPDIs*). As análises das sequências de aminoácidos indicam que todas as três *RmPDIs* apresentam elevado grau de conservação entre cada isoforma dos diferentes carrapatos, contudo, elas apresentam baixas similaridade quando comparadas umas às outras. Quanto às características estruturais, as *RmPDIs* apresentam peptídeo sinal N-terminal clivável de 16 a 18 aminoácidos, possuem duas regiões com os domínios catalíticos tioredoxina (CGHC), que são considerados sítios ativos clássicos de PDIs, e um código de retenção de ER na região C-terminal como VEL (*BmPDI-1*), DEL (*BmPDI-2*) e EEL (*BmPDI-3*) sugerem a assinatura de uma PDI típica (Figuras 7 a 9 e Tabela I). Diante deste panorama, se decidiu aprofundar a caracterização das PDIs de *R. microplus*.

Desta forma, observou-se que o anticorpo *AntiPDI-1* foi capaz de diminuir em ~20% do número de células viáveis, sugerindo que a ação do anticorpo na superfície celular pode estar interferindo na sobrevivência e proliferação de células BME26 (Fig.32). Estes resultados apontam um papel fundamental da *RmPDI-1* na proliferação das células BME26 e, provavelmente, que isso seja coordenado pela fosforilação de β -catenina por GSK-3 β (Fig.37), o que poderia estar levando a ubiquitinação e degradação proteasomal da β -catenina por β -TrCP (Gao *et al.*,2016). Contudo, esta hipótese ainda precisa ser testada em células BME-26. Ademais, a figura 31 demonstra que as células BME26 que foram silenciadas para os genes de

RmPDI-1, *RmPDI-2* e *RmPDI-3* apresentaram diferentes níveis de transcrições para GSK3 β . O silenciamento de *RmPDI-1* não modificou os perfis transcricionais de GSK3 β , já para a *RmPDI-2* aumentou discretamente. Para o silenciamento da *RmPDI-3*, além de diminuir a transcrição da *RmPDI-2* também reduziu o número de transcritos de GSK-3 β . Interessantemente, os níveis transcricionais de GSK-3 β foram aumentados em todos os duplos silenciamentos, especialmente, durante o silenciamentos duplos dos genes de *RmPDI-1* e *RmPDI-3* em células silenciadas por 48 horas. Isso pode indicar uma atuação sinérgica entre os genes de *RmPDIs* no controle transcricional da GSK-3 β em cultura de células BME26. Interessantemente, as figuras 35 e 36 mostraram que as marcações para β -catenina estavam diminuídas principalmente em células silenciadas para *RmPDI-1*. Sabendo que um substrato clássico de fosforilação da GSK3 é a enzima β -catenina e Wnt é substrato de PDI (Ref.37), estes resultados sugerem envolvimento da *RmPDI-1* da via Wnt, através do eixo PDI, GSK3 β e β -catenina.

As PDIs estão presentes, predominantemente, no retículo endoplasmático, mas podem ser encontradas, em menor quantidade, em outros compartimentos celulares como núcleo, citosol, superfície de membrana plasmática e no ambiente extracelular (Tanaka *et al.*, 2020). No Retículo endoplasmático, classicamente, a PDI é caracterizada por catalisar a inserção de pontes dissulfeto, garantindo assim o enovelamento correto em proteínas recém-sintetizadas, sendo esta função essencial à homeostase celular. As pontes dissulfetos, resultantes da oxidação de dois grupos tiol, tem papel fundamental na estabilização de proteínas. Assim, considera-se que a PDI seja um centro convergente para vias de introdução de ligações dissulfeto em proteínas processadas, por meio de mecanismos geradores de peróxido de hidrogênio, envolvendo a oxidase Ero1 alfa a, bem como reações consumidoras de peróxido de hidrogênio envolvendo peroxiredoxina IV e as novas peroxidases Gpx7/8 (Laurindo *et al.*, 2019). Outras funções de PDI fora do retículo endoplasmático, sugerem uma confluência entre PDI e NADPH oxidases da família Nox na produção de oxidantes, já que esta última é uma enzima que catalisa a redução do oxigênio molecular gerando o ânion radical superóxido, que, por sua vez, participa da geração de outras espécies oxidantes. O silenciamento de PDI em células de mamífero evita respostas de Nox à angiotensina II e inibe a fosforilação de Akt em células vasculares e fagocitose de parasitas em macrófagos. Já a superexpressão de PDI aumenta espontaneamente a ativação e expressão de Nox. Em neutrófilos, PDI se associa ao p47phox de maneira redox dependente (Pescatore *et al.*, 2012). A PDI está envolvida na ativação da Nox, particulaRmente o subtipo Nox1, em células

vasculares. Em câncer colorretal, no qual a Nox 1 tem um papel importante com efeito dual da PDIA1 dependente de distintos graus de ativação do oncogene KRas. O KRas é o gene mais mutado no câncer colorretal, sendo um alvo terapêutico. Uma das características da célula com mutação ativadora da KRas é que ela ativa uma série de vias que geram oxidantes, incluindo a NADPH oxidase (De Bessa *et al.*, 2019). Em células com níveis no *R* mais ou moderados de atividade da KRas, PDI parece sustentar a ativação da Nox1 por uma via dependente de uma interação com Rac1. No entanto, ao mesmo tempo em que ativa a Nox1, este evento pode ser limitado e parece estar associado ao grau de ativação da Rac1. Uma vez que Rac1 é ativada em excesso por um mecanismo via ativação direta pela KRas, o controle imposto pela PDI é desativado e Nox1 continua ativa, de modo que PDI passa a suprimir este processo (Pescatore *et al.*, 2012; Carnesecchi *et al.*, 2014). De Bessa e seus colaboradores mostraram associação com as proteínas Stat3 e GSK3- β (Carnesecchi *et al.*, 2014; De Bessa *et al.*, 2019). Um substrato clássico de fosforilação da GSK3 é a enzima β -catenina. A via de sinalização Wnt/ β -catenina desempenha papéis importantes na regulação da embriogênese, homeostase, regeneração e pluripotência das células-tronco. Na ausência de ativação da via Wnt, um complexo de destruição composto por Axina-APC-CK1-GSK-3 β é formado no citosol, levando à fosforilação da β -catenina em seus resíduos Ser/Thr na região N teRminal por CK1 e GSK3 β , com posterior ubiquitinação e degradação via proteossoma. Na presença do ligante do receptor da via Wnt, um sinal extracelular libera β -catenina pela dissociação do complexo GSK-3, APC e Axin (Wang & Wynshaw-Boris, 2004). A β -catenina liberada é transloucada para o núcleo onde ativa fatores de transcrição, que regulam os genes de padronização de segmentos (Frame & Cohen, 2001). A via Wnt é altamente conservada entre *Drosophila*, *Xenopus* e vertebrados (Wang & Wynshaw-Boris, 2004). Em embriões do carrapato *R. microplus* a expressão de β -catenina foi observada especificamente em regiões de adesão em um padrão semelhante a uma roseta em células grandes localizadas lateralmente à banda geRminativa. Além disso, a β -catenina foi detectada nas células do *cumulus* à medida que essas células foram submetidas à migração (Santos *et al.*, 2013). Em células HeLa, a superexpressão ectópica de PDIA6, um ortólogo da *RmPDI-1*, levou a um aumento da proliferação celular, acompanhado de progressão acelerada do ciclo celular através da inibição da fosforilação da β -catenina por GSK-3 β em Ser33, Ser37 e Thr41 evitando a ubiquitinação e degradação proteasomal da β -catenina por β -TrCP (Gao *et al.*, 2016). Evidências mostram que a PDI está envolvida na formação de casca de ovo em *C. elegans* (Riihimaa *et al.*, 2002). Além da função de formação de ligações dissulfeto e isomerização, a PDI é uma enzima subunitária β colágeno prolil 4-hidroxilase (P4H-C) que catalisa a síntese de colágeno em organismos multicelulares

(Myllyharju, 2003). Nos vertebrados, C-P4H é um tetrâmero de subunidades idênticas com $\alpha\beta 2p$ -PDI mantém as subunidades cataliticamente ativas no ER (Myllyharju *et al.*, 2002). Em nematóides, a formação de colágeno na matriz extracelular ajuda a manter a morfologia do corpo pós-embrionário e protege-os de fatores ambientais adversos sendo essencial para a viabilidade dos embriões (Myllyharju, 2003).

Alguns estudos relatam que o DTNB é comumente usado como um inibidor da atividade de PDI, impedindo a geração de dois grupos tiol livres em seu motivo CXXC nas proteínas (Ryser *et al.*, 1994; Gallina *et al.*, 2002; Lara *et al.*, 2011). O modo de ligação exato entre PDI e o DTNB ainda não está muito esclarecido, portanto, a proposição do modo de ligação de inibidores racionalmente projetados para PDI usando ferramentas computacionais, como *docking* molecular e dinâmica molecular, ajudaria a entender como DTNB interage, e encontrar a orientação que maximiza essa interação. Além disso, prever a interação de proteínas com DTNB e outras moléculas ajudaria na dedução da função da proteína e aumentaria a futura descoberta de drogas neste campo. O mecanismo de ação do DTNB, foi avaliado em suas possíveis interações com modelos de homologia de três isoformas de PDI do carrapato *R. microplus* (*RmPDI-1*, *RmPDI-2* e *RmPDI-3*) (Fig11, Fig12 e Fig.13). Dados da literatura apontam que este composto foi capaz de inibir PDI na superfície da célula hospedeira durante a internalização de vírus bactérias e protozoários (Ryser e Flückiger, 2005). Inicialmente, os resultados de *docking* para *RmPDI-1* mostraram que na presença do DTNB ocorre uma conformação mais fechada, e este entra em contato com a maioria dos resíduos do motivo redox ($C^{36}GHC^{39}$), interagindo com Gly37 e Trp35 via interações de van der Waals. Além disso, His38 forma ligação de hidrogênio ao grupo nitro de DTNB, enquanto um dos anéis de nitrobenzeno está envolvido em uma interação de empilhamento π em forma de T com Phe79. Em contraste, este composto adotou uma conformação estendida ligada às isoformas *RmPDI-2* e *RmPDI-3*, conservando os contatos com pelo menos metade dos resíduos compreendendo o motivo redox. Também, nestes casos, o grupo ácido carboxílico foi ligado por hidrogênio com Arg100 e Gly77 nas isoformas 2 e 3, respectivamente, e foi também observada uma interação de empilhamento π com o resíduo His do motivo redox. Considerando que o DTNB atua bloqueando o grupo tiol livre de cisteínas exposto ao solvente do motivo redox (Wilkinson e Gilbert, 2004; Couët *et al.*, 1996; Ryser *et al.*, 1994), nossos resultados mostraram que a distância entre o grupo tiol do resíduo de cisteínas e do átomo de enxofre da ligação dissulfeto (distância SH-S) variou de 3,3 Å com o complexo *RmPDI-1* a 3,72 Å com o complexo *RmPDI-2*, o que pode estar relacionado a um perfil de inibição diferente das isoformas estudadas devido

à sua variabilidade estrutural na vizinhança do motivo redox. Portanto, essa proximidade *peRmitiria* o ataque nucleofílico pela cisteína catalítica, apontando, assim, para a inibição da PDI como mecanismo putativo de ação de DTNB em células de *R. microplus*.

Diferentemente do observado para o complexo *RmPDI-2*, o DTNB afastou-se do motivo redox da *RmPDI-3* desde o início da simulação (Figura 13). Na maioria das vezes, o fá R maco foi ligado em uma pequena cavidade composta pelos resíduos His32 e Arg97, que estavam envolvidos na interação com hidrogênios, também Arg35 que interagiram com o grupo nitro do fá R maco. Uma vez que este resíduo de arginina é substituído por uma alanina na isoforma de *RmPDI-2*, esta interação iônica pode ser evitada, favorecendo assim uma eventual aproximação da ligação dissulfeto a Cys36 nesta isoforma da proteína. Além disso, avaliou-se a flexibilidade dos resíduos do motivo redox realizando uma análise de *RMSF*. No geral, o motivo redox da *RmPDI2* (C³⁶GHC³⁹) exibiu flutuações menores, provavelmente como resultado de interações com a droga. Curiosamente, nossos resultados revelaram que o resíduo de histidina do motivo redox de *RmPDI3* (C³⁰GHC³³) apresentou uma flutuação 2 vezes maior em comparação com o resíduo equivalente em *RmPDI-2* (*RMSF* = 1,14 Å e 0,54 Å para *RmPDI-3* e *RmPDI-2*, respectivamente (dados não mostrados). Juntamente com Arg35, este resíduo de histidina desempenhou um papel importante na orientação da droga para longe do motivo redox através de interações. Ademais, a *RmPDI-1* parece ter uma região hidrofóbica adicional que pode estar relacionada a um motivo de reconhecimento especial com o papel de ancorar as moléculas recebidas durante eventos fisiológicos (Fig.16).

Análises de Dinâmica Molecular (DM) são aplicadas no estudo dos movimentos de sistemas macromoleculares de alta complexidade, dentre os quais as biomoléculas são de grande interesse (Phillips *et al.*,2005). Assim, a análise da mobilidade estrutural na dinâmica molecular apresenta-se como função fundamental na interpretação dos dados, particula R mente na simulação de biomoléculas. Essas mobilidades são comumente calculadas através de simulações do Desvio Quadrático Médio da Raiz (*RMSD*) que mede é o deslocamento médio dos átomos em um instante da simulação em relação à uma estrutura de referência, e das Flutuações Quadradas Médias da Raiz (*RMSF*) que mede as flutuações quadráticas médias das estruturas tridimensionais (Humphrey & Schulten). Assim, o *RMSD* mede o deslocamento médio dos átomos em um instante da simulação em relação a uma estrutura de referência, enquanto o *RMSF* mede o deslocamento de um átomo em particular, ou grupo de átomos, em relação à estrutura de referência, em média sobre o número de átomos (Martínez, 2015). Inicialmente, monitorou-se o desvio médio quadrático (*RMSD*) para investigar a estabilidade das estruturas. Nos resultados da DM em *RmPDI1-Apo*, considerando os domínios **a** e **a'**

(H108-W180), não se observou alterações significativas ao longo da simulação na *RmPDI-1* sozinha. Já em relação aos domínios **a'** e **b** (K199-D370), observou-se uma aproximação leve em torno de 65 ns. No entanto, para o complexo *RmPDI-1/DTNB*, considerando os domínios **a** e **b** (H108-W180), observou-se uma leve aproximação dos domínios em torno de 55 ns, seguida por um afastamento que se manteve até o final da simulação. Já em relação aos domínios **a'** e **b** (K199-D370), observou-se um afastamento leve em torno de 55 ns, o qual se manteve até o final da simulação. Esses efeitos podem ser reflexos das mudanças conformacionais do DTNB.

Na Comparação da *RmPDI1-Apo* e *RmPDI-1/DTNB*, observou-se que a ligação do DTNB promoveu aproximação de todos os domínios, uma vez que as distâncias médias calculadas foram significativamente menores. Além disso, observamos uma estrutura mais organizada e compactada como resultado da ligação do DTNB. A estabilização e a compactação da proteína, podem sugerir um efeito biológico, haja vista, que as mudanças conformacionais indicam mudanças no status redox de *RmPDI-1*. Ademais, a investigação das variações conformacionais da *RmPDI-1* na forma Apo e complexada com DTNB (Fig. 23) mostra que a ligação do DTNB parece manter a estrutura da *RmPDI1* mais organizada e compactada, especialmente o domínio **a**, onde se observa a menor variação, um indicativo de estabilidade conformacional. Dada a natureza flexível da PDI, é interessante observar que a presença de um inibidor, sugere que a diminuição de sua flexibilidade, muito provavelmente pode influenciar no reconhecimento de substratos, ao menos parcialmente, e modificar a sua atividade biológica. A Figura 20 mostra os valores das distâncias entre os domínios **a'** e **b** obtidos na simulação de DM para a *RmPDI-1 Apo* (*PDI1-Apo*) e complexada com o DTNB (*RmPDI-1/DTNB*). Mais uma vez nas figuras 22 e 23, não deixam dúvidas de que os domínios **a**, **a'** e **b**, se encontram consideravelmente mais próximos quando se compara a *RmPDI-1 Apo* e complexada com o DTNB (*RmPDI-1/DTNB*). Devido à alteração na conformação em “U” da proteína, estreitando consideravelmente o canal de ligação a substratos, esse dado é mais um indicativo da possível diminuição da capacidade da *RmPDI-1* em reconhecer substratos proteicos por conta de alterações conformacionais.

Sabendo que o DTNB é descrito como um eficiente inibidor de PDI em superfície de membrana celular, hipotetizou-se nesta tese que a inibição de PDI poderia interferir na proliferação e na sobrevivência de células BME26. Para comprovar esta hipótese incubou-se as células BME26 em diferentes concentrações de DTNB 1mM, 2mM e 4 mM nos períodos de 2 horas, 4 horas e 6 horas, e avaliou-se a transcrição destes tratamentos (Fig.26). Interessantemente não foram observadas respostas transcricionais das células BME26 durante

o tratamento com DTNB, independente da dose ou do tempo de tratamento, quando comparadas às condições controle. O fato de o DTNB ser uma agente impermeável à membrana plasmática (Calderon *et al.*, 2012), pode sugerir que as ações do DTNB só se restringiriam aos grupos tióis de superfície celular. Isto pode sugerir que, os mesmos fenômenos de internalização de patógenos, observados mediante o tratamento com DTNB na internalização de patógenos, podem estar sendo regulados por proteínas maduras de superfície celular, inibindo a proliferação de células BME26 uma vez que a presença de DTNB na superfície das membranas não parece ter modificado a resposta transcricional das *RmPDIs* (Figura 26). Os efeitos observados na cultura de células BME26, tanto na viabilidade (Figura 24) quanto na morfologia celular (Fig. 25), sugerem que o DTNB pode se tornar um candidato a inibidor da proliferação celular das células BME26.

Embora não tenham sido observadas grandes alterações na transcrição relativa de *RmPDIs* nas células tratadas com DTNB (Figura 26), os fenótipos de transdiferenciação, morte e proliferação celular foram visíveis durante o tratamento. O processo de adesão celular é um fenômeno fundamental para a manutenção da homeostasia do tecido. Esta adesão ocorre por diferentes complexos celulares: junções aderentes, desmossomas, zônula oclusiva e junção comunicante, cada uma delas com funções distintas. As células epiteliais apresentam características morfológicas arredondadas com intensa polarização basolateral-apical, que é decorrente da distribuição organizada de caderinas e algumas integrinas (Junqueira e Carneiro 1997; Schock e Perrimon 2002). Já as células mesenquimais, apresentam características morfológicas fusiformes, e o fibroblasto é a célula prototípica. Este último tipo celular, foi o primeiro tipo de célula a ser cultivado em cultura, e ainda assim é um dos menos compreendidos ao nível bioquímico e molecular (Kalluri 2009).

A transição epitélio-mesenquimal (EMT) é um processo biológico que permite que uma célula epitelial polarizada, sofra modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas, que resultam na aquisição de um fenótipo de célula mesenquimal, cuja capacidades de migração, invasão, e resistência à apoptose aumentam. Durante a embriogênese, o epitélio é bastante versátil, sendo capaz de se modificar para mesênquima e vice-versa. Mesmo após a sua completa diferenciação o epitélio retém a capacidade de modificar seu fenótipo sob a influência de estresse patológico ou associado ao reparo tecidual. Durante a embriogênese a transição epitélio-mesenquimal ocorre a fim de promover mudança estrutural no tecido embrionário. Este mesmo fenômeno é observado em processos de reparo, cicatrização e regeneração tecidual envolvendo processos inflamatórios e ainda são largamente estudados em células epiteliais cancerosas, diferenciadas geneticamente (mutação) e epigeneticamente (Ting *et al.*, 2006;

Zeisberg e Neilson 2009). Essas alterações ocorrem, principalmente, em genes protooncogênicos supressores de tumor. Assim as células transdiferenciadas em EMT tornam-se mais invasivas e mais metastáticas em diversos tipos de cânceres (Kalluri e Weinberg 2009). Em cultivo das células embrionárias BME26, observa-se diversas modificações do citoesqueleto, durante o crescimento das colônias de células (Della Noce *et al.*, 2019). Estas modificações podem estar associadas ao processo de transição epitélio-mesênquimal, um fenômeno controlado por fatores peptídicos que interagem com receptores específicos, muitos deles com atividade tirosino-quinase. Esses diferentes fatores peptídicos envolvidos nesta transição de fenótipos também podem atuar como fatores de crescimento, tais como o HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) e EGF (*Epidermal Growth Factor*). Estas moléculas parecem controlar diretamente os efetores da resposta de migração celular, sendo responsáveis pela sinalização de dispersão ou desagregação de células de um tecido (Kazuyuki *et al.*, 2002). Em aranhas, a migração de células mesênquimais do *cumulus* é coordenada por proteínas responsáveis pelo movimento essencial para a determinação do eixo dorso-ventral (Akiyama-Oda e Oda, 2003, 2006). Em carrapatos *R. microplus*, a formação de *cumulus*, ocorre no início do desenvolvimento do embrião (Figura 3) e as principais diferenças entre os estágios iniciais são causadas por intensa proliferação celular (Santos *et al.*, 2010).

Trabalhos anteriores reportam que a via gliconeogênica é ativada durante o desenvolvimento do embrião do carrapato após o estágio da formação do blastodermo celular, levando à ressíntese e aumento progressivo do conteúdo de glicogênio (Moraes *et al.*, 2007). Neste contexto, a GSK-3 β foi descrita originalmente como reguladora do metabolismo de glicogênio, uma proteína quinase que fosforila e inativa a Glicogênio Sintase (GS) (Embi *et al.*, 1980). Outrossim, a GSK3 β é uma serina/treonina quinase multifuncional e desempenha papéis versáteis em várias vias de sinalização celular que controla migração, adesão e proliferação celular (Beurel *et al.*, 2014). Sendo a GSK-3 β uma enzima chave da regulação da síntese de glicogênio (MacAulay *et al.*, 2005), regulando negativamente a Glicogênio Sintase (Embi *et al.*, 1980), foram realizadas a determinação do conteúdo de glicogênio por espectrofotometria e por marcação de PAS, frente ao tratamento com DTNB (Fig.30). As células BME26 tratadas com DTNB mostraram uma queda significativa, no conteúdo de glicogênio em dose e tempo dependentes. Nos tratamentos de 2 horas mostraram quedas de: 5,02% (1mM), 10,86% (2mM) e 20,01% (4mM). No tratamento de 4 horas mostraram quedas de: 13,42% (1mM), 39,09% (2mM) e 51,49 (4mM). Finalmente nos tratamentos de 6 horas observou-se quedas de: 14,80% (1mM), 22,07% (2mM) e 55,75% (4mM). Os resultados foram ilustrados com a marcação pela técnica de PAS em tratamentos iguais durante 4 horas. Estes resultados demonstram o papel do

glicogênio no metabolismo das células BME26 e estão em acordo com os resultados de embriogênese do carrapato *R. microplus* (Abreu *et al.*, 2013). Foi avaliada ainda a transcrição relativa de GSK3 β em células BME26 silenciadas para *RmPDI*s. Observou-se aumentos significativos nos níveis de transcritos de GSK3 quando as células BME26 foram silenciadas para *BmPDI-2*, e nos duplos silenciamentos para *RmPDI-1/RmPDI-2*, *RmPDI-1/RmPDI3* e *RmPDI2/RmPDI3* (Fig. 31). Estes resultados mostram que GSK3 β pode estar sendo regulada via PDI, uma vez que, tanto a inibição química, com DTNB, quanto os silenciamentos duplos com *RmPDI*s, foram capazes de aumentar a imunomarcação de GSK3 β total e o nível de transcritos para este gene (Figs. 29 e 31, respectivamente).

Para entender melhor os mecanismos bioquímicos e moleculares que promoveram mudanças na viabilidade celular (Fig.24) e na morfologia (Fig. 25) das células BME26 durante o tratamento com DTNB, uma correlação metabólica foi realizada através da imunomarcação para GSK3 β total, atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) e glutatona reduzida (GSH). Observou-se um aumento dose dependente na imunomarcação para GSK3 β (Fig.26) e LDH (Fig.27) e uma diminuição significativa durante o tratamento das células BME26 com DTNB, além disso, foi possível observar que a distribuição das marcações para GSK3 β parecem estar mais difusa onde os tratamentos foram mais altos (Figura 29). Ao contrário destes resultados Moraes e colaboradores observou um aumento do nível de glicogênio acompanhado da fosforilação da GSK3 β serina 9 (Moraes *et al.*,2006) e Costa e colaboradores que observou um aumento progressivo da GSH durante o desenvolvimento do embrião do carrapato *R. microplus* (Costa *et al.*,2016). Estes resultados sugerem uma correlação metabólica entre GSK3 β , GSH e LDH durante o desenvolvimento do embrião do carrapato *R. microplus*. A expressão da LDH é necessária para manter a gliconeogênese e o metabolismo redox em células cancerosas e isso tem sido associado à evolução de alguns cânceres agressivos e metastáticos (Brook 2020). Interessantemente, LDH pode ser translocada para o núcleo em resposta ao estresse oxidativo, e ganha uma atividade enzimática não-canônica para produzir um metabólito antioxidante, α -hidroxibutirato (α -HB). O acúmulo de α -HB ativa ainda a resposta antioxidante e a sinalização pela via Wnt através de modificações epigenéticas. Desse modo, o α -HB, é capaz de interferir entre o metabolismo celular e as redes de sinalização epigenética. Outrossim, o lactato cumpre pelo menos três finalidades em sistemas biológicos: I) é uma importante fonte de energia para a respiração mitocondrial; II) o principal precursor gliconeogênico; e III) é uma molécula de sinalização. Assim, a dinâmica do lactato tem efeitos rápidos e importantes de curto e longo prazo no equilíbrio redox celular, e em outros sistemas de controle (Brook 2020). A exposição repetida ao lactato resulta em efeitos importantes na expressão de enzimas

reguladoras da glicólise e da respiração mitocondrial onde lactato apresenta um ponto de apoio da regulação metabólica *in vivo* (Brooks, 2020). As BME26 submetidas ao tratamento com DTNB, apresentaram elevação da atividade da Lactato Desidrogenase (LDH), no sentido piruvato lactato, em resposta dose e tempo dependentes (Figura 27). Curiosamente, observou-se uma diminuição dose dependente no conteúdo de GSH durante o período de 4 horas de tratamento com DTNB. As imagens sugerem uma modulação metabólica ao nível da GSH (Figura 28), onde esta seria utilizada inicialmente como um tampão biológico, contribuindo para controle homeostático do estresse oxidativo (King *et al.*, 2004). Embora estes resultados não tenham sido totalmente explorados nesta tese, estes sugerem uma modulação no metabolismo redox durante o tratamento com DTNB.

No entanto, o estresse oxidativo tolerável leva à proteção celular, melhor metabolismo e resistência ao dano oxidativo (Higdon *et al.*, 2012). Os aminoácidos mais comumente estudados e sujeitos a modificações por espécies reativas são tirosina e cisteína (Beckmann *et al.*, 1994), sendo a cisteína o resíduo mais bem caracterizado na sinalização redox. A cisteína é responsável por cerca de 1,9% dos resíduos nas proteínas, e sabe-se que um pequeno número dessas cisteínas participa na sinalização redox (Go *et al.*, 2011). O grupo tiol (-SH) na cadeia lateral da cisteína pode atuar como uma chave para sinalização redox e homeostase. Como o átomo de enxofre possui múltiplos estados de oxidação, a cadeia lateral da cisteína é facilmente oxidada em vários produtos, alguns dos quais com funções especializadas (Jacob *et al.*, 2003). A forma protonada do grupo tiol (-SH) não é particularmente reativa, mas a forma desprotonada (-S⁻), ou ânion tiolato, possui caráter nucleofílico, pois é rica em elétrons disponíveis (LoPachin *et al.*, 2007). Por esse motivo, nem todas as cisteínas possuem tióis que são iguais e intrinsecamente reativos. Esta reatividade inerente é ditada por vários fatores, incluindo acessibilidade e constante de dissociação ácida (pK_a) do grupo tiol. O pK_a de um tiol é definido como o valor de pH em que 50% dos grupos tiol estão no estado desprotonado. Assim, tióis que possuem um pK_a relativamente baixo tendem a existir na forma tiolato aniônica desprotonado, e, assim, mais provável de ser modificado por uma espécie reativa (Beckmann *et al.*, 1994).

Nos artrópodes hematófagos, a ovogênese está diretamente ligada ao metabolismo dos aminoácidos, que ocorre no momento da digestão da porção proteica (Logullo *et al.*, 1998; Logullo *et al.*, 2006). A principal proteína de reserva de ovos de artrópodes é a vitelina, adquirida por oócitos e acumulada em estruturas chamadas grânulos de vitelo (Sappington & Raikhel, 1998). Uma das funções da vitelina é suplementar o desenvolvimento do embrião com aminoácidos, e sua mobilização está relacionada à ação de proteases específicas que

possibilitam seu uso por células de embriões em desenvolvimento dentro dos ovos (Fagotto, 1990; Yamamoto & Takahashi, 1993; Logullo *et al.*, 1998). Liao e colaboradores em 2008 mostraram que com a diminuição na transcrição de *HIPDI-1* houve redução na expressão de Vg, e os oócitos não conseguiram captar Vg para o seu desenvolvimento. No entanto, outros fatores, como a formação da casca do ovo, que é sintetizada durante a ovogênese, também podem afetar a maturação dos oócitos em carrapatos injetados com dsRNA.

Finalmente, nesta tese propõem-se um novo modelo de regulação do metabolismo e da proliferação celular que sugere a participação sinérgica dos componentes da via Wnt através da interação de *RmPDI*, GSK3- β e β -catenina durante a proliferação celular. Assim, o conjunto de dados aqui apresentados ampliam o conhecimento atual das vias de sinalização e processos fisiológicos de relevância para as células BME26 que podem contribuir para a proposição de novas estratégias de controle de carrapatos bovinos.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados a apresentados e discutidos nesta tese conclui-se que:

- ✓ A análises das estrutura das sequências de aminoácidos, aqui designadas como *RmPDI-1*, *RmPDI-2* e *RmPDI-3*, apresentam grande homologia quando comparada com bancos transcriptomicos de outros carrapatos.
- ✓ As análises estruturais dos modelos tridimensionais e das sequências de aminoácidos , mostraram que *RmPDI-1*, *RmPDI-2* e *RmPDI-3*, apresentam baixa similaridade entre si.
- ✓ A simulação de acoplamento molecular *RmPDI/DTNB* mostraram que as conformações inibitórias redox foram favorecidas energeticamente e estatisticamente e suportaram a evidência de experimentos laboratoriais úmidos relatados na literatura.
- ✓ Os resultados de DTNB apresentados na cultura de células embrionárias BME26 mostraram uma mudança no conteúdo de glicogênio, na viabilidade e morfologia celular durante o tratamento.
- ✓ A inibição química da PDI por DTNB e, silenciamentos por RNAi das células BME26 apontam PDI, GSK3 β , β -catenina como novos alvos bioquímicos e moleculares que regem a proliferação de células BME-26.

8- REFERÊNCIAS

Abreu, Leonardo Araujo de ; Fabres, Arianne ; Esteves, Eliane ; Masuda, Aoi ; da Silva Vaz Jr., Itabajara ; Daffre, Sirlei ; Logullo, Carlos . Exogenous insulin stimulates glycogen accumulation in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo cell line BME26 via PI3K/AKT pathway. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Biochemistry & Molecular Biology*, v. 153, p. 185-190, 2009.

Abromaitis, S., Stephens, R.S. 2009. Attachment and Entry of Chlamydia Have Distinct Requirements for Host Protein Disulfide Isomerase. *PLoS Pathog.* 5, e1000357.

Barbouche, R., Lortat-Jacob, H., Jones, I.M., Fenouillet, E. 2005. Glycosaminoglycans and Protein Disulfide Isomerase-Mediated Reduction of HIV Env. *Mol Pharm* 67, 1111-1118.

Barbouche, R., Lortat-Jacob, H., Jones, I.M., Fenouillet, E. 2005. Glycosaminoglycans and Protein Disulfide Isomerase-Mediated Reduction of HIV Env. *Mol Pharm* 67, 1111-1118.

Baker & Murrell (2004). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species. *Parasitology*, 129 (S1), S15-S36. doi: 10.1017 / S0031182004005207.

Bellato, V., Daemon, E. 1997. Influence of the maintenance temperature of the non-parasitic phase on the parasitic phase of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 6, 15-19.

Benenson, A.S. 1992. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre, Organización Mundial de Salud, Washington, DC, pp. 115-117.

Bergquist, N.R. 1995. Schistosomiasis vaccine development: approaches and prospects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 90, 221-227.

Beurel E, Grieco SF, Jope RS (2015) Glicogênio sintase quinase-3 (GSK3): regulação, ações e doenças. *Pharmacol Ther* 148: 114–131.

Broadwater, S.T., Harvey, A.S., LaPointe, E.A., Woelkerling, W.M.J. 2002. Conceptacle structure of the parasitic coralline red alga *Choreonema thuretii* (Corallinales) and its taxonomic implications. *J. Phycol.* 38, 1157-68.

Burgdorfer, W. The possible role of ticks as vectors of leptospirae. 1956. Transmission of *Leptospira pomona* by the argasid tick, *Ornithodoros turicata*, and the persistence of this organism in its tissues. *Experimental Parasitology*. n. 5, p. 571-579, [S.l.].

Carneseccchi, S. et al. NOX1 is responsible for cell death through STAT3 activation in hyperoxia and is associated with the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 537–551 (2014).

Castro-Janer, E., Martins, J.R., Mendes, M.C., Namindome, A., Klafke, G.M., Schumaker, T.T.S. 2010. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* using in vitro larval bioassays. *Vet. Parasitol.* 173, 300-306. Chabaud, A.G. Sur la nutrition artificielle des tiques. 1950. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, v.25, n.1-2, p. 424-47.

Chabaud, A.G. Sur la nutrition artificielle des tiques. 1950. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, v.25, n.1-2, p. 424-47.

.

Clark, K.L., Wills, W., Tedders, S.H., Williams, D.C. 1996. Ticks Removed from Dogs and Animal Care Personnel in Orangeburg County, South Carolina. *Journal of Agromedicine*. 3, 45-55.

Conant, C.G., Stephens, R.S., 2007. Chlamydia attachment to mammalian cells requires protein disulfide isomerase. *Cellular Microbiology*. 9, 222-232.

Costa, Evenilton P. ; Façanha, Arnaldo R. ; Cruz, Criscila S. ; Silva, Jhenifer N. ; Machado, Josias A. ; Carvalho, Gabriel M. ; Fernandes, Mariana R. ; Martins, Renato ; Campos, Eldo ; Romeiro, Nelilma C. ; Githaka, Naftaly W. ; Konnai, Satoru ; Ohashi, Kazuhiko ; Vaz, Itabajara S. ; Logullo, Carlos . A novel mechanism of functional cooperativity regulation by thiol redox status in a dimeric inorganic pyrophosphatase. *Biochimica e Biophysica Acta-General Subjects*, v. 1861, p. 2922-2933, 2016.

Da Cunha, N.C., Rangel, C.P., Piranda, E.M., de Rezende, J., Teixeira, R.C., da Fonseca, A.H. 2010. Assessment of weight gain and biological parameters of *Rhipicephalus sanguineus* females fed artificially via capillary tubes. *Ciência Rural*. 40, 928-933.

Dantas-Torres, F., Figueredo, L.A., Brandão-Filho, S.P. 2006. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39, 64-67.

De Bessa, TC, Pagano, A., Moretti, AIS et al. Regulação subvertida da geração de oxidante dependente de NADPH oxidase Nox1 pela dissulfeto de proteína isomerase A1 em células de carcinoma do cólon com KRas superativados. *Morte celular Dis* 10, 143 (2019).

De La Fuente, J. and Kocan, K.M. (2006), Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunology*, 28: 275-283.

De La Vega, R., Diaz, G., Finlay, L. 2000. Artificial feeding of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) through micropipettes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 916, 315-319.
Ellgaard L, Ruddock LW. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep*. 2005 Jan;6(1):28-32. doi: 10.1038/sj.embor.7400311. PMID: 15643448; PMCID: PMC1299221.

Embi, N., Rylatt, D. B., Cohea, P. (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur. J. Biochem*, 107: 519-527.

Fabres, A., de Andrade, C.P., Guizzo, M., Sorgine, M.H.F., de O. Paiva-Silva, G., Masuda, A., da Silva Vaz, I., Logullo, C. 2010. Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi on tick oviposition and egg hatching.

Fabres, Arianne; De Andrade, Caroline Pinto; Guizzo, Melina; Sorgine, Marcos Henrique F; De O. Paiva-Silva, Gabriela ; Masuda, Aoi ; da silva Vaz, Itabajara ; Logullo, Carlos . Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi on tick oviposition and egg hatching. *Parasitology (London. Print)*, v. 26, p. 1-10, 2010.

FAO/WHO. 1987. Guidelines for the preparation of Toxicological Working papers for the Joint FAO/WHO Expert Committee on food Additives, Geneva. July (Documnet ICS/89.41).

Felz, M.W., Durden, L.A., Oliver, J.H. 1996. Ticks Parasitizing Humans in Georgia and South Carolina. *The Journal of Parasitology*. 82, 505.

Fernández-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R.I., Alonso-Díaz, M.A. 2012. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Vet. Parasitol.* 183, 338-342.

Galligan JJ, Petersen DR. The human protein disulfide isomerase gene family. *Hum Genomics*. 2012 Jul 5;6(1):6. doi: 10.1186/1479-7364-6-6. PMID: 23245351; PMCID: PMC3500226.

Gao H, Sun B, Fu H, et al. PDIA6 promotes the proliferation of HeLa cells through activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncotarget*. 2016;7(33):53289-53298. doi:10.18632/oncotarget.

Gao, X.-G., Maldonado, E., Pérez-Montfort, R., Garza-Ramos, G., de Gómez-Puyou, M.T., Gómez-Puyou, A., Rodríguez-Romero, A. 1999. Crystal structure of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in hexane. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96, 10062-10067.

Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., Rojo-Domínguez, A., de Gómez-Puyou, M.T., Gómez-Puyou, A. 1996. Species-Specific Inhibition of Homologous Enzymes by Modification of Non-conserved Amino Acids Residues. *European Journal of Biochemistry*. 241, 114-120.

Giles GI, Nasim MJ, Ali W, Jacob C. The Reactive Sulfur Species Concept: 15 Years On. *Antioxidants (Basel)*. 2017;6(2):38. Published 2017 May 23. doi:10.3390/antiox6020038.

Gómez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R.A., Rojo-Domínguez, A., Pérez-Montfort, R. 1995. Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action: studies with triosephosphate isomerase. *Chem. Biol.* 2, 847-855.

Gowthaman, U., Jayakanthan, M., Sundar, D. 2008. Molecular docking studies of dithionitrobenzoic acid and its related compounds to protein disulfide isomerase: computational screening of inhibitors to HIV-1 entry. *BMC Bioinformatics*. 9, S14.

Gregory I. Giles, Karen M. Tasker, Claus Jacob, Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 31, Issue 10, 2001, Pages 1279-1283, ISSN 0891-5849.

Gruhlke MC, Slusarenko AJ. The biology of reactive sulfur species (RSS). *Plant Physiol Biochem*. 2012;59:98-107. doi:10.1016/j.plaphy.2012.03.016.

Guglielmone, A., Beati, L., Barros-Battesti, D., Labruna, M., Nava, S., Venzal, J., Mangold, A., Szabó, M., Martins, J., González-Acuña, D., Estrada-Peña, A. 2006. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Experimental and Applied Acarology*. 40, 83-100.

Guimarães, J.H., Tucci, E.C., Barros-Battesti, D.M. 2001. *Ectoparasitos de importância veterinária*. São Paulo, Brasil, Editora Plêiade. 213 pp.

Hernández-Alcántara, G., Garza-Ramos, G., Hernández, G.M., Gómez-Puyou, A., Pérez-Montfort, R., 2002. Catalysis and stability of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with different residues at position 14 of the dimer interface. Characterization of a catalytically competent monomeric enzyme. *Biochemistry*. 41, 4230-4238.

Hoskyns, J.D. 1991. Tick transmitted diseases. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 21, 99-10.

Jiménez, L., Vibanco-Pérez, N., Navarro, L., Landa, A. 2000. Cloning, expression and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium*. *International Journal for Parasitology*. 30, 1007-1012.

Johnston, L.A.Y., Kemp, D.H., Pearson, R.D. 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Effects of induced immunity on tick populations. *International Journal for Parasitology*. 16, 27-34.

Jones DP, Sies H. The Redox Code. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(9):734-746. doi:10.1089/ars.2015.6247.

Jope, R. S., Johnson, G. V. G. (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3, Trends in Biochemical Sciences 29, 95-102.

King N, Korolchuk S, McGivan JD, Suleiman MS. A new method of quantifying glutathione levels in freshly isolated single superfused rat cardiomyocytes. J Pharmacol Toxicol Methods. 2004;50(3):215-222. doi:10.1016/j.vascn.2004.05.003

Kocan, K.M., Yoshioka, J., Sonenshine, D.E., de la Fuente, J., Ceraul, S.M., Blouin, E.F., Almazán, C. 2005. Capillary tube feeding system for studying tick-pathogen interactions of *DeRmacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). J Med Entomol. 42, 864-874.

Labruna, M.B., Camargo, L.M.A., Terrassini, F.A., Ferreira, F., Schumaker, T.T.S., Camargo, E.P. 2005. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. Systematic and Applied Acarology. 10, 17-32.

Lara, H.H., Ixtapan-Turrent, L., Garza-Treviño, E.N., Flores-Teviño, S.M., Borkow, G., Rodriguez-Padilla, C. 2011. Antiviral properties of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid and bacitracin against T-tropic human immunodeficiency virus type 1. Virology Journal. 8, 137.

Lau N, Pluth MD. Reactive sulfur species (RSS): persulfides, polysulfides, potential, and problems. Curr Opin Chem Biol. 2019;49:1-8. doi:10.1016/j.cbpa.2018.08.012.

Laurindo FR, Pescatore LA, Fernandes Dde C. Dissulfeto isomerase de proteínas na sinalização de células redox e homeostase. Radical Free Bio Med. 2012; 52: 1954-1969», sem data.

LAWAL, Bashir et al. Antimicrobial evaluation, acute and sub-acute toxicity studies of *Allium sativum*. Journal Of Acute Disease, [s.l.], v. 5, n. 4, p. 296-301, jul. 2016. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine Press.

Logullo, C.; VAZ JR, Itabajara ; SORGINE, Marcos ; SILVA, Gabriela Paiva ; FARIA, Flávio ; ZINGALE, R. ; LIMA, M. F. R. ; ABREU, Leonardo ; FIALHO, Eliane ; GONZALES, J. C. ; MASUDA, Hatisaburo ; MASUDA, Aoi ; OLIVEIRA, Pedro L de . Purification and

characterization of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick *Boophilus microplus*. *Parasitology* (London. Print), v. 116, p. 525-532, 1998.

Logullo, Carlos; Witola, William H.; Andrade, Caroline; ABREU, Leonardo; GOMES, Josiana; da Silva Vaz Jr., Itabajara; Imamura, Saiki; Konnai, Satoru; Ohashi, Kazuhiko; Onuma, Misao. Expression and activity of glycogen synthase kinase during vitellogenesis and embryogenesis of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Veterinary Parasitology* (Print), v. 161, p. 261-269, 2009.

Louly, C.C.B., Fonseca, I.N., Oliveira, V.F. de, Borges, L.M.F. 2006. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis no município de Goiânia, GO. *Ciência Animal Brasileira*. 7, 103-106.

Machado, J.A. EFEITO DO 5,5 Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) EM *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,1806) ALIMENTADOS EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)-UENF. PPG Ciencia animal-2004- Campos dos Goytacazes RJ.

Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., Perez-Montfort, R. 1998. Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *Journal of Molecular Biology*. 283, 193-203.

Mans B, J: Evolution of Vertebrate Hemostatic and Inflammatory Control Mechanisms in Blood-Feeding Arthropods. *J Innate Immun* 2011;3:41-51.

Mans BJ, Neitz AW (2004) Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 1–17.

Maroli, M., Khoury, C., Frusteri, L., Manilla, G. 1996. Distribution of dog ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) in Italy: a public health problem. *Ann Ist Super Sanita*. 32, 387-397.

Martins, J.R., Furlong, J. 2001. *AveRmectin* resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *The Veterinary Record*. 149, 64.

Mehlhorn, H., Al-Rasheid, K.A.S., Al-Quraishy, S. et al. Research and increase of expertise in arachno-entomology are urgently needed. *Parasitol Res* 110, 259–265 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2480-7>.

Moraes, J., Arreola, R., Cabrera, N., Saramago, L., Freitas, D., Masuda, A., da Silva Vaz Jr., I., Tuena de Gomez-Puyou, M., Perez-Montfort, R., Gomez-Puyou, A., Logullo, C. 2011. Structural and biochemical characterization of a recombinant triosephosphate isomerase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 41, 400-409.

Moraes, J. L. C. ; Arreola, R. ; Nallely Cabrera ; Saramago L. ; FREITAS, Daniela Reis Joaquim de ; MASUDA, Aoi ; VAZ JR., Itabajara ; Gómes-Puyou, M.T. ; Gómes-Puyou, A. ; Péres-Montfort, R. ; OLIVEIRA, C. J. L. . Structural and biochemical characterization of a recombinant Triosephosphate Isomerase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 41, p. 400-409, 2011.

Moraes, Jorge ; Galina, Antônio ; Alvarenga, Patrícia H. ; Rezende, Gustavo Lazaro ; Masuda, Aoi ; VAZ JR, Itabajara da Silva ; Logullo, C. . Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Biochemistry & Molecular Biology*, v. 146(4), p. 528-533, 2007.

Nanna Torpe, Sandeep Gopal, Oguzhan Baltaci, Lorenzo Rella, Ava Handley, Hendrik C. Korswagen, Roger Pocock, A Protein Disulfide Isomerase Controls Neuronal Migration through Regulation of Wnt Secretion, *Cell Reports*, Volume 26, Issue 12, 2019.

Nicolas Dejeans, Christophe Glorieux, Samuel Guenin, Raphael Beck, Brice Sid, Rejane Rousseau, Bettina Bisig, Philippe Delvenne, Pedro Buc Calderon, Julien Verrax. 2012. Overexpression of GRP94 in breast cancer cells resistant to oxidative stress promotes high levels of cancer cell proliferation and migration: Implications for tumor recurrence. *Free Radical Biology and Medicine* 52:6, 993-1002.

Nolan, J., Wilson, J., Green, P., Bird, P. 1989. Synthetic pyrethroid resistance in field samples in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Australian Veterinary Journal*. 66, 179-182.

O'Dwyer, L.H., Massard, C.L., Pereira de Souza, J.C. 2001. Hepatozoon canis infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 94, 143-150.

Oronsky B, Oronsky N, Scicinski J, Fanger G, Lybeck M, Reid T. Rewriting the epigenetic code for tumor resensitization: a review. *Transl Oncol*. 2014;7(5):626-631. Published 2014 Oct 24. doi:10.1016/j.tranon.2014.08.003.

Ortiz, E.M., Santamaría, V.M., Ortiz, N.A., Soberanes, C.N., Osorio, M.J., Flanco, B.R., Martínez, I.F., Quezada, D.R., Fragoso, S.H. 1995. Caracterización of *Boophilus microplus* resistance to ixodicides in México. *Seminário Internacional de Parasitología Animal*. Acapulco (México). 58–66.

Patarroyo, J., Costa, J. 1980. Susceptibility of Brazilian samples *Boophilus microplus* to organophosphorus acaricides. *Tropical Animal Health and Production*. 12, 6-10.

Paulsen CE, Carroll KS. Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chem Rev*. 2013;113(7):4633-4679.

Paz, G.F., Labruna, M.B., Leite, R.C. 2008. Ritmo de queda de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de cães artificialmente infestados. *Rev Bras Parasitol Vet*. 17, 139-144.

Pei JF, Li XK, Li WQ, et al. Diurnal oscilações de H endógena 2 O 2 sustentadas por p66 Shc regular relógio circadiano. *Nat Cell Biol* . 2019; 21 (12): 1553-1564.

Prigogine I. Time, structure, and fluctuations. *Science*. 1978;201(4358):777-785. doi:10.1126/science.201.4358.777.

Ryser, H.J., Levy, E.M., Mandel, R., DiSciullo, G.J. 1994. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91, 4559-4563

Ryser, H.J.-P., Flückiger, R., 2005. Keynote review: Progress in targeting HIV-1 entry. *Drug Discovery Today*. 10, 1085-1094.

Santos, C.X.C., Stolf, B.S., Takemoto, P.V.A., Amanso, A.M., Lopes, L.R., Souza, E.B., Goto, H., Laurindo, F.R.M. 2009. Protein disulfide isomerase (PDI) associates with NADPH oxidase and is required for phagocytosis of *Leishmania chagasi* promastigotes by macrophages. *J Leukoc Biol*. 86, 989-998.

Santos VT, Ribeiro L, Fraga A, et al. The embryogenesis of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: the establishment of a new chelicerate model system. *Genesis*. 2013;51(12):803-818.

Soberanes, C.N., Santamaría, V.M., Fragoso, S.H., García, V.Z. 2002. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. *Tec Pec Mex* 40:81-92.

Sonenshine, D.E. 2006. Tick pheromones and their use in tick control. *Annual Review of Entomology*. 51, 557-580.

Sonenshine, D.E., Kocan, K.M., de la Fuente, J. 2006. Tick control: further thoughts on a research agenda. *Trends in Parasitology*. 22, 550-551.

Stamos JL, Weis WI. O complexo de destruição da β -catenina. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5: a007898.

Tanaka, Leonardo Y.; Oliveira, Percillia V.S.; Laurindo, Francisco R.M Peri/Epicellular Thiol Oxidoreductases as Mediators of Extracellular Redox Signaling Antioxidants & Redox Signaling 2020 .

Tobias-Santos, Vitória; Guerra-Almeida, Diego; Mury, Flavia; Ribeiro, Lupis; Berni, Mateus; Araujo, Helena; Logullo, Carlos; Feitosa, Natália Martins; De Souza-Menezes, Jackson; Pessoa Costa, Evenilton; Nunes-Da-Fonseca, Rodrigo . Multiple Roles of the Polycistronic Gene *Tarsal-less/Mille-Pattes/Polished-Rice* During Embryogenesis of the Kissing Bug *Rhodnius prolixus*. *Frontiers In Ecology And Evolution*, V. 7, P. 1-9, 2019.

Venè, R., Cardinali, B., Arena, G., Ferrari, N., Benelli, R., Minghelli, S., Poggi, A., Noonan, DM, Albini, A., & Tosetti, F. (2014). A glicogênio sintase quinase 3 regula a morte celular e a sinalização de sobrevivência em células tumorais sob estresse redox. *Neoplasia* (New York, NY) , 16 (9), 710–722.

Venzal, J.M., Guglielmo, A.A., Estrada-Peña, A., Cabrera, P.A., Castro, O. 2003. Ticks (Ixodida: Ixodidae) parasitising humans in Uruguay. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 97, 769-772.

Zomosa-Signoret, V., Hernández-Alcántara, G., Reyes-Vivas, H., Martínez-Martínez, E., Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., Tuena De Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. 2003. Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry*. 42, 3311-3318

ANEXO1- Preparo do meio L15

Preparação do Meio L-15 concentrado segundo (Munderloh e Kurtti, 1989).

Dissolver o conteúdo L-15 (Sigma, #L4386) (para volume final de 1 litro) em 900 ml de água estéril e em seguida adicionar:

Ácido l-Aspártico	299mg
Ácido l-Glutamínico	500mg
l-Prolina	300mg
Ácido α-cetoglutâmico	299mg
l-Glutamina	292mg
d-Glicose	14410mg
Solução de Vitaminas *	1 ml
Solução de Minerais **	1 ml

Manter o recipiente envolto em papel alumínio. Dissolver os ingredientes sob leve agitação, por 90 minutos. Ajustar o pH para 6,2. Completar volume para 1 litro e filtrar em membrana de 0,22 μ m. Estocar por até 2 meses a 4°C (ao abrigo da luz).

*Obs. Preparo de solução de vitaminas:

Ingredientes	Peso (mg/100ml)
Ácido p-aminobenzóico	100
Cianocobalamina	50

d-biotina	10
------------------	----

**Obs. Preparo de solução de minerais:

Ingredientes	Peso (mg/100ml)
Solução A:	
CoCl 6H₂O	20
CuSO₄ 5H₂O	20
MnSO₄ H₂O	160
ZnSO₄ 7H₂O	200
Solução B:	
NaMoO₄ 2H₂O	20
Solução C:	
Na₂SeO₃	20
Solução D:	
Glutaciona Reduzida	1000
Ácido ascórbico	1000
FeSO₄ 7H₂O	50
Solução A	1 ml
Solução B	1 ml
Solução C	1 ml

Os ingredientes das soluções devem ser dissolvidos em água estéril na ordem em que foram listadas e o volume de cada solução deve ser completado para 100 ml.

ANEXO 2: LISTA DOS PRIMERS UTILIZADOS

***RmPDI-1* Clonagem do inserto no vetor pGEM-T Easy**

Forward: 5`ATGGCGATAGCACTTCTTGCC (21pb) Ta: 55 °C

Reverse: 5`CTAAAGTTCAACGTGCTTCTTGACC (25 pb) Ta: 55 °C

RmPDI1- RNAi

Forward: 5`GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCTGTTCTGTGGCCCTGGGTA
Temp: 54°C 20 pb (sem T7)

Reverse: 5`GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCAAGGTTCTTGCAAGTGGCC
Temp: 53°C tm. 19 pb (sem T7)

Amplicon 527 pb

RmPDI1 qPCR

Reverse: 5`CTTCTTGCCGTGCTGCCAG Tm: 57°C

Reverse: 5`CTTCTTGCCGTGCTGCCAG Tm: 57°C

amplicon 78 pb

***RmPDI-2* Clonagem do inserto no vetor pGEM-T Easy**

Forward: 5` ATGCTCTGGCAAGGCGTCATTGGG (24pb) Ta: 60 °C

Reverse: 5` CTTGAGGCACACGAAGTGCCACTTGTC (27 pb) Ta: 60 °C

Rm PDI2-RNAi

Forward: `GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCAAGGTTAATCGGTCTACTGTGC

Temp: 52.5°C 23 pb (sem T7)

Reverse: 5`GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAGTGATGGCAAACGCGTG

Temp: 52.5°C tm. 18 pb (sem T7)

Amplicon 545 pb

RmPDI2 qPCR

Forward: 5` GGTCTACTGTGCTGCTTAGCGG Tm: 56°C

Reverse: 5` CTCTGCTTGAGGATGAGCACACC Tm: 57°C

amplicon 77 pb

***RmPDI-2* Clonagem do inserto no vetor pGEM-T Easy**

Forward: 5` ATGAAGCACTTAGTTTTGTTAGCCG (25 b) Tm: 55 °C

Reverse: 5` TCATAATTCTTCCTTGGCCTTCTT (22 pb) Ta: 55 °C

RmPDI3-RNAi

Forward: 5`GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCGCTTTTATATCGGCAGTCCT
Temp: 53°C 21 pb (sem T7)

Reverse: 5`GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCCAGGACTCCCTTTGCTTGT

Temp: 53°C tm. 20 pb (sem T7)

Amplicon 505 pb

RmPDI3 qPCR

Forward: 5` AAGCACTTAGTTTTGTTAGCCGCT Tm: 55°C

Reverse: 5` TCAGATCCCGAGTAGTCGAGGAC Tm: 56°C

amplicon 77 pb

dsGFP- Gene alvo

Foward: 5'- TAATACGACTCACTATAGGGCCACGTCAAGCACCACCACC -3'

Reverse: 5'- TAATACGACTCACTATAGGGGCGTAGTTTTTCCTTATCGCG -3'

Elongation factor 1-alpha (ELF1A, Nijhof et al, 2009)

Forward: 5`-CGT CTA CAA GAT TGG TGG CAT T-3`

Reverse: 5`-CTC AGT GGT CAG GTT GGC AG-3`

Amplicom:108 pb
