

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**Efeito da Ezetimiba na absorção do colesterol através do
transportador Niemann Pick como ferramenta de controle de
carrapatos**

JULIANA FERREIRA DOS SANTOS BRITO

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Efeito da Ezetimiba na absorção do colesterol através
do transportador Niemann Pick como ferramenta de
controle de carapatos**

JULIANA FERREIRA DOS SANTOS BRITO

**Sob a Orientação do
Professor Emerson Guedes Pontes
e Co-orientação da Professora
Bruna de Azevedo Baêta**

Dissertação submetida como
requisito parcial para
obtenção do grau de **Mestra
em Química**, no Programa de
Pós-Graduação em Química,
Área de Concentração em
Química.

Seropédica

2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B862e Brito, Juliana Ferreira dos Santos, 1993-
Efeito da ezetimiba na absorção do colesterol
através do transportador Niemann Pick como ferramenta
de controle de carrapatos / Juliana Ferreira dos
Santos Brito. - Seropédica, 2025.
61 f.: il.

Orientador: Emerson Guedes Pontes.
Coorientadora: Bruna de Azevedo Baêta.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em
Química, 2025.

1. Ezetimiba. 2. Carrapatos. 3. Colesterol. 4.
Colesterol éster. 5. Lipídios. I. Pontes, Emerson
Guedes , 1974-, orient. II. Baêta, Bruna de Azevedo,
1984-, coorient. III Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química. IV.
Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

JULIANA FERREIRA DOS SANTOS BRITO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2025

Emerson Guedes Pontes. Dr. UFRRJ (Orientador)

Cristiane Martins Cardoso de Salles Dra. UFRRJ

Luciano Aparecido Meireles Grillo Dr. UFAL



TERMO Nº 138/2025 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 06/03/2025 13:50)
CRISTIANE MARTINS CARDOSO DE SALLES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CoordCGQ (12.28.01.00.00.00.58)
Matrícula: ####817#0

(Assinado digitalmente em 12/03/2025 16:15)
EMERSON GUEDES PONTES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBQ (11.39.00.24)
Matrícula: ####553#7

(Assinado digitalmente em 06/03/2025 17:11)
LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.####.237-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: 138, ano: 2025, tipo: TERMO, data de emissão: 06/03/2025 e o código de verificação: 3f940b6af6

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido por todo apoio e parceria, sempre me incentivando a não desistir e a dar meu melhor sempre. Você e meu filho Arthur me fazem querer alcançar minha melhor versão.

Aos meus pais Osvaldo Lopes e Mirtes Elaine, meus maiores exemplos, por todo o carinho, amor e incentivo desde a infância e por nunca medirem esforços para me dar a melhor educação. As minhas irmãs que sempre me levantam quando eu me sinto fraca e penso em desistir, me dando palavras de amor e compreensão.

Ao meu orientador Emerson Pontes por todo ensinamento, confiança e palavras de encorajamento, paciência e pela oportunidade de estar realizando o trabalho.

A minha co-orientadora Bruna Baeta que me ensinou tudo sobre cultivo celular com maestria e sempre me deu todo apoio que precisei.

Aos meus colegas do LBBMA por toda a parceria, em especial Luan, Matheus, Elaine e Lorena. Também aos estagiários Livia Azevedo e Renan Albuquerque que tocaram grande parte do trabalho, sem vocês eu não teria conseguido.

Aos meus colegas do LCCN pelos anos de aprendizado e parceria, em especial a Ana Clara por estar sempre disposta a ajudar na manutenção das células sempre com seu jeito doce.

Ao professor Carlos Maurício e sua aluna Dandara pelo carinho e atenção que me deram na parte de modelagem molecular, obrigada pela paciência e por todos os ensinamentos.

A minha amiga Nathally Nascimento por toda a ajuda que me deu em modelagem molecular, por todo apoio e palavras de incentivo.

A todos os membros da banca que prontamente aceitaram o convite e sempre muito gentis.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Brito, Juliana Ferreira dos Santos. Efeito da ezetimiba na absorção do colesterol através do transportador Niemann Pick como ferramenta de controle de carapatos: Seropédica, RJ. 2025. 63p. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

O uso de acaricidas químicos é a principal forma de controle de infestações de carapato. Porém a falta de conhecimento ou até mesmo a forma errada de uso desses produtos leva a uma população de carapato mais resistentes a acaricidas além do impacto ambiental causado por esses produtos químicos. Dessa forma, é importante conhecer todos os aspectos biológicos do carapato, no sentido de se desenvolver novas ferramentas de controle. Há muita informação sobre o perfil lipídico de outros artrópodes, porém pouco se sabe sobre esse perfil em carapatos. A ezetimiba é um fármaco muito usado no tratamento da hipercolesterolemia e age como inibidor seletivo da absorção de colesterol onde prejudica o transporte do mesmo. Este trabalho tem como objetivo avaliar a viabilidade celular, o perfil lipídico de linhagens celulares embrionárias de duas espécies de carapato antes e após tratamento com ezetimiba. Avaliar através de modelagem molecular a interação da ezetimiba com o transportador de colesterol, Niemann Pick, das duas espécies. As células utilizadas foram BMP36 e IDE8, de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Ixodes scapularis*, respectivamente. As placas de 12 poços contendo as células alvo possuíam uma concentração pré-definida. Após formação de monocamada confluente as células foram tratadas com ezetimiba em três concentrações diferentes ($25 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ e $100 \mu\text{M}$) e avaliadas em três tempos diferentes de contato (24, 48 e 72 horas). Ensaios de viabilidade foram realizados e as amostras foram encaminhadas à extração de lipídios e análise por cromatografia em camada fina. No tempo de 24 horas foi observado uma diminuição na viabilidade da linhagem IDE8 apenas na concentração mais alta, porém em 48 horas a concentração de $50 \mu\text{M}$ também apresentou diminuição significativa. Já na linhagem BMEP36 apenas após 72 horas de tratamento foi possível observar diminuição significativa exclusivamente na concentração de $100 \mu\text{M}$. O perfil lipídico das linhagens celulares foi determinado e observou-se a presença de colesterol (CHO) e éster de colesterol (CHOE). Foi possível constatar, que as células

embrionárias de carrapato sofrem influência com a adição do inibidor de colesterol e os níveis de colesterol e éster de colesterol são diminuídos. Avaliando-se os resultados, conclui- se que o perfil lipídico encontrado nas células embrionárias de linhagens diferentes de carrapato é semelhante ao encontrado no corpo gorduroso do carrapato. Portanto, pode-se afirmar que a ezetimiba, substância utilizada para inibir a absorção de colesterol em humanos, inibe a absorção de colesterol afetando também os níveis de éster de colesterol em células de carrapatos *in vitro*. Por fim, foi realizado um estudo teórico de docking molecular, utilizando a função de pontuação ChemScore, visando observar a interação da ezetimiba com modelos de transportador de colesterol de ambos os carrapatos, construídos a partir do molde da proteína C1 de Niemann-Pick humana (NPC1L1). Verificou-se que o ligante interage favoravelmente com a proteína presente no metabolismo do colesterol dos carrapatos, tendo uma leve vantagem na interação com o modelo *I. scapularis*. Contudo, estudos sobre a energia envolvida na formação dos complexos poderia fornecer dados mais completos.

Palavras-chave: células embrionárias, transportador, lipídio, viabilidade celular, modelagem molecular

ABSTRACT

Brito, Juliana Ferreira dos Santos. Effect of ezetimibe on cholesterol absorption through the Niemann-Pick transporter as a tool for tick control: Seropédica, RJ. 2025. 63p. Dissertation (Master Degree in Chemistry). Institute of Exact Sciences, Department of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

The use of chemical acaricides is the main method used to control tick infestations. However, a lack of knowledge or even incorrect use of these products leads to a tick population that is more resistant to acaricides, in addition to the environmental impact caused by these chemicals. Therefore, it is important to understand all the biological aspects of ticks to develop new control tools. There is much information about the lipid profile of other arthropods, but little is known about this profile in ticks. Ezetimibe is a drug widely used in the treatment of hypercholesterolemia that acts as a selective inhibitor of cholesterol absorption, impairing its transport. This study aimed to evaluate the viability and lipid profiles of embryonic cell lines of two tick species before and after ezetimibe treatment. To evaluate, through molecular modeling, the interaction of ezetimibe with the cholesterol transporter Niemann Pick of the two species. The cells used were BMP36 and IDE8 from *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* and *Ixodes* *scapularis*, respectively. The 12-well plates containing target cells had a predefined concentration. After the formation of a confluent monolayer, the cells were treated with ezetimibe at three different concentrations (25, 50, and 100 μ M) and evaluated at three different contact times (24, 48, and 72 h). Viability assays were performed, and the samples were subjected to lipid extraction and analysis by thin-layer chromatography. At 24 h, a decrease in the viability of the IDE8 lineage was observed only at the highest concentration; however, at 48 h, the concentration of 50 μ M also showed a significant decrease. In the BMEP36 line, a significant decrease was observed only after 72 h of treatment at 100 μ M. The lipid profile of the cell lines was determined, and the presence of cholesterol (CHO) and cholesterol esters (CHOE) was observed. It was observed that tick embryonic cells were influenced by the addition of the cholesterol inhibitor, and the levels of cholesterol and cholesterol ester were reduced. Evaluating the results, it was concluded that the lipid profile found in embryonic cells of different tick lineages was similar to that found in the tick fat body. Therefore, ezetimibe, a

substance used to inhibit cholesterol absorption in humans, inhibits cholesterol absorption and affects cholesterol ester levels in tick cells *in vitro*. Finally, a theoretical molecular docking study was performed using the ChemScore scoring function to observe the interaction of ezetimibe with cholesterol transporter models of both ticks constructed from the human Niemann-Pick C1 protein (NPC1L1) template. It was found that the ligand interacts favorably with the protein present in the cholesterol metabolism of ticks, with a slight advantage in the interaction with the *I. scapularis* model. However, studies of the energy involved in the formation of these complexes can provide more complete data.

Keywords: embryonic cells, transporter, lipid, cellular predictions, molecular modeling

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Carrapato <i>Ixodes scapularis</i>	14
Figura 2 – Linha do tempo mostrando a descoberta dos sete patógenos humanos transmitidos por <i>Ixodes scapularis</i>	15
Figura 3 - O carapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> parasitando seu hospedeiro, o boi (<i>Bos taurus</i>).....	16
Figura 4 – Representação do ciclo do carapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> demonstrando a fase parasitária e não parasitária.....	17
Figura 5 – Estrutura química do colesterol com representação de anéis de A a D, grupo cabeça polar. (LEHNINGER, 2014).....	19
Figura 6 – Mecanismo de ação da ezetimiba e sobre a proteína transportadora de membrana NPC1L1 na inibição da absorção de colesterol.....	21
Figura 7 - Fórmula molecular da droga ezetimiba.....	22
Figura 8 - Suplementos para os meios L15 e L15B.....	25
Figura 9 - Divisão de poços em concentrações diferentes de tratamento com Ezetimiba (EZE) com controle contendo meio e solvente (etanol). Foram preparadas 3 placas dessa maneira, possibilitando as análises nos diferentes tempos (24h, 48h, 72h) em triplicata.....	29
Figura 10 - Placa contendo apenas meio de cultura para ser utilizado como controle (Cmeio). Cada fileira de poços foi cuidadosamente manipulado em fluxo de capela laminar para manter o cultivo sem contaminações, possibilitando as análises nos diferentes tempos (24h, 48h, 72h) em triplicata.....	30
Figura 11 - Desenho experimental da divisão de placas. Placas 1,2 e 3 contendo células tratadas e controle de meio com etanol (Cetanol) e placa 4 apenas contendo meio de cultura. Possibilitando, assim, obter amostras nos diferentes tempos (24h, 48h, 72h) em triplicata.....	31
Figura 12: sítio de interação do transportador com a ezetimiba (sombreado), na estrutura cristalográfica de referência (PDB ID: 7DFZ).....	35

Figura 13 - Viabilidade celular relativa ao controle da célula IDE8 analisada nos tempos 24, 48 e 72 horas após tratamento com ezetimiba. Foram utilizados três grupos de células tratadas em diferentes concentrações (25 µM, 50 µM, 100µM), além de células controle contendo apenas meio (C) e células com meio e etanol (Cet). Todos os grupos foram mantidos em estufa com temperatura ideal da célula e todo o experimento realizado com seis amostras tratadas em mesmas condições, onde os dados apresentados representam a média de cada grupo.....	38
Figura 14 - Viabilidade celular relativa ao controle da célula BMEP36 analisada nos tempos 24, 48 e 72 horas após tratamento com ezetimiba. Foram utilizados três grupos de células tratadas em diferentes concentrações (25 µM, 50 µM, 100µM), além de células controle contendo apenas meio (C) e células com meio e etanol (Cet). Todos os grupos foram mantidos em estufa com temperatura ideal da célula e todo o experimento realizado com seis amostras tratadas em mesmas condições, onde os dados apresentados representam a média de cada grupo.....	39
Figura 15: Células IDE8 tratadas com ezetimiba em diferentes concentrações nos tempos de 24, 48 e 72 horas, com os respectivos controles contendo apenas meio de cultura (Cm) e controle com meio e etanol (Ce).....	41
Figura 16: Células BMEP36 tratadas com ezetimiba em diferentes concentrações nos tempos de 24, 48 e 72 horas, com os respectivos controles contendo apenas meio de cultura (Cm) e controle com meio e etanol (Ce).....	42
Figura 17 – Quantificação referente à célula embrionária BMEP36 no período de 24 e 48 horas após tratamento com ezetimiba. Valores obtidos através do programa Image Lab 6.0.1.....	44
Figura 18 – Quantificação referente à célula embrionária BMEP36 no período de 24 e 48 horas após tratamento com ezetimiba. Valores obtidos através do programa Image Lab 6.0.1.....	44
Figura 19: Redocagem da ezetimiba na proteína (7DFZ) com ChemPLP . Sobreposição da melhor pose (átomos de C em laranja) e o ligante co-cristalizado (átomos de C em verde).....	46
Figura 20: Redocagem da ezetimiba na proteína (7DFZ) com GoldScore . Sobreposição da melhor pose (átomos de C em laranja) e o ligante co-cristalizado (átomos de C em verde).....	46

Figura 21: Redocagem da ezetimiba na proteína (7DFZ) com ChemScore. Sobreposição da melhor pose (átomos de C em laranja) e o ligante co-cristalizado (átomos de C em verde).....	47
Figura 22: Redocagem da ezetimiba na proteína (7DFZ) com ASP. Sobreposição da melhor pose (átomos de C em laranja) e o ligante co-cristalizado (átomos de C em verde).....	47
Figura 23: sobreposição da ezetimiba no sítio ativo do transportador de colesterol humano e na cavidade do modelo: A) <i>Ixodes scapularis</i> (átomos de C na referência em verde; solução 14, átomos de C em rosa claro (RMSD: 1,24 Å); B) <i>Rhipicephalus microplus</i> (átomos de C referência em verde; solução 1, átomos de C em magenta (RMSD: 1,28 Å). Ambos com as cadeias laterais dos resíduos livres.....	49
Figura 24: interação da ezetimiba com os resíduos do sítio de interação do transportador de colesterol A) no modelo <i>Ixodes scapularis</i> ; B) no modelo <i>Rhipicephalus microplus</i>	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes adicionados no meio Leibovitz L15, que depois de suplementado passa a ser L15B.....	24
Tabela 2: Resíduos correspondentes ¹ entre a referência e os modelos, no sítio de interação.....	35
Tabela 3: Parâmetros obtidos na redocagem da ezetimiba, realizado pelo GOLD....	45
Tabela 4: Parâmetros obtidos na docagem da ezetimiba no transportador de colesterol de <i>Ixodes scapularis</i>	48
Tabela 5: Parâmetros obtidos na docagem da ezetimiba no transportador de colesterol de <i>Rhipicephalusmicroplus</i>	49
Tabela 6: Interações intermoleculares identificadas na cavidade do modelo <i>Ixodes scapularis</i> , pelo servidor PLIP.....	52
Tabela 7: Interações intermoleculares identificadas na cavidade do modelo <i>Rhipicephalus microplus</i> , pelo servidor PLIP.....	53

Sumário

1.INTRODUÇÃO	13
2.OBJETIVO	14
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1Visão geral do carrapato.....	13
3.2 Metabolismo de lipídeos em carrapatos.....	18
3.3 Absorção de Colesterol proveniente da dieta em carrapatos.....	20
3.4 Cultivo Celular de carrapatos.....	22
3.5 Modelagem Molecular.....	26
4.MATERIAIS E METODOS	27
4.1 Manutenção das células.....	28
4.2 Tratamento de células com ezetimiba.....	29
4.3 Extração de lipídios.....	32
4.4 Cromatografia de camada fina (TLC).....	33
4.5 Modelagem Molecular.....	33
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Viabilidade Celular.....	37
5.2 Alteração morfológica.....	39
5.3 Análise do perfil lipídico.....	43
5.4 Análise do perfil lipídico.....	45
6.CONCLUSÃO	54
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

Os carapatos são ectoparasitas, hematófagos e apresentam grande preocupação entre médicos e veterinários pois enquanto se alimentam, se tornam vetores eficientes de diversos patógenos podendo causar doenças graves em animais e até mesmo pessoas. Além de ser um vetor em potencial, durante sua alimentação, o carapato provoca danos diretos aos seus hospedeiros, principalmente gados, causando grande impacto na economia.

A principal forma de controle desses ectoparasiitas é o uso de acaricidas químicos, porém o uso desses químicos apresentam diversas desvantagens ao meio ambiente, além de deixarem resíduos em produtos de origem animal e o surgimento de carapatos mais resistentes a esses químicos. Por esse motivo, os carapatos tem sido alvo de muitos estudos, visando entender melhor sua fisiologia, bem como as moléculas que regulam a interação carapato-hospedeiro e os mecanismos que participam desse processo.

A busca por novas metodologias de controle desses animais tem apresentado resultados importantes relacionados ao metabolismo de lipídios desses animais, porém ainda pouco se sabe sobre esse assunto. Estudos revelam o colesterol como lipídio mais abundante no corpo gorduroso do carapato, levando o colesterol a ser um alvo de pesquisas como um possível caminho na busca por novas metodologias para controle de carapatos.

O Colesterol é responsável pela fluidez e permeabilidade das células e apresenta papel importante na regulação da pressão osmótica intracelular e extracelular. Os carapatos utilizam a proteína Niemann-Pick contendo domínio C1 (NPC1) para absorver colesterol proveniente da dieta para posteriormente ser usado como precursor de moléculas importantes para vários processos fisiológicos (Xavier et al., 2021 ; Maritz-Olivier et al., 2023). Porém é possível encontrar uma vasta literatura relacionada ao metabolismo de colesterol em insetos e outros ectoparasitas, mas para carapatos os dados ainda são escassos.

Xavier e colaboradores (2021) destacam que ao inibir o metabolismo de colesterol em fêmeas de *R. Microplus* utilizando ezetimiba afeta diretamente o desenvolvimento de

embriões deixando os ovos mais suscetíveis à colonização de bactérias. De Dios-Blázquez e colaboradores (2024) descrevem uma alta mortalidade em *Ornithodoros moubata* adulto alimentado com sangue tratado com ezetimiba e demonstra que o metabolismo de colesterol ao ser inibido causa efeitos prejudiciais ao carapato.

Este trabalho propõe gerar novos dados relacionados ao mecanismo de ação da proteína Niemann-Pick utilizando de ferramentas como cultivo celular para avaliar a viabilidade celular e o perfil lipídico de linhagens celulares embrionárias de carapato antes e depois do tratamento com ezetimiba. Além de utilizar a modelagem molecular para prever características estruturais presentes na interação da ezetimiba com o transportador de colesterol, Niemann Pick, a fim de entender melhor o impacto da inibição da absorção de colesterol para esses ectoparasitas.

2. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo avaliar linhagens celulares embrionárias de duas espécies de carapato antes e depois do tratamento com ezetimiba. Avaliar através da interação da ezetimiba com o transportador de colesterol, Niemann Pick, das duas espécies.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade celular das células embrionárias tratadas e não tratadas com ezetimiba;
- Estudar imagens de morfologia celular das células identificando diferenças pós tratamento;
- Avaliar o perfil Lipídico das células embrionárias quantificando colesterol, éster de colesterol em cada uma delas frente ao inibidor ezetimiba;
- Avaliar a interação da ezetimiba com o transportador de colesterol Niemann Pick das duas espécies utilizando modelagem molecular.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Visão geral do carrapato

Os carrapatos pertencem ao Filo Arthropoda, Subfilo Chelicerata, Classe Arachnida, Subclasse Acarina, Ordem Ixodida e distribuídos em três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nutalliellidae. A Família Ixodidae é a que apresenta maior número de espécies quando comparada com as outras famílias. São mais de 720 espécies divididas em 14 gêneros e são conhecidos como carrapatos duros por terem um escudo dorsal resistente. Outra característica dessa família é que os machos são, em maioria, menores que as fêmeas. Os gêneros da família Ixodidae de maior importância em relação a fauna brasileira são *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Amblyomma*, cada um com características morfológicas diferentes. O gênero *Ixodes*, por exemplo, não possui olhos nem festões e possuem um sulco anal anterior ao ânus. O gênero *Amblyomma* possui o aparelho bucal longo e a espécie *Rhipicephalus sanguineus* é o carrapato marrom do cachorro (GUGLIELMONE et al., 2010, GARCIA et al., 2019).

Carrapatos são ectoparasitos, ou seja, vivem na superfície do corpo de seus hospedeiros. Outra característica importante do carrapato é ser hematófago, o que significa que se alimenta do sangue de aves, mamíferos, répteis ou anfíbios e é durante esse processo de alimentação que eles se tornam vetores de agentes patogênicos como bactérias, vírus, entre outros, afetando de modo geral a saúde pública e causando efeitos na economia devido ao impacto na pecuária.

O carrapato *Amblyomma sculptum* (conhecido como carrapato-estrela) é um exemplo de carrapato causador de grande impacto na saúde pública por transmitir o agente causador da febre maculosa que é letal. Outra espécie que possui grande importância é o carrapato *Ixodes scapularis* (figura 1), conhecido popularmente como carrapato de perna preta. É conhecido por ser vetor de sete patógenos causadores de doenças como a doença de Lyme, anaplasmosse, babesiose, doença de *Borrelia*

miyamotoi, doença do vírus Powassan e erliquiose associada a *Ehrlichia muris eauclarensis*. (EISEN *et al.*, 2018)



Figura 1- Carrapato *Ixodes scapularis*. (Retirado de <https://www.britannica.com/science/Lyme-disease>

O carrapato *Rhipicephalus microplus* (figura 2), conhecido popularmente como carrapato do boi, apresenta grande importância. Essa espécie tem como principal hospedeiro o boi, porém também pode ser encontrada parasitando outros animais como equinos e ovinos. Além do fato de serem responsáveis pela transmissão de agentes causadores de doenças, a presença dessa espécie em animais pode levar a outros problemas como miasse, queda na produção de leite, anemia, desvalorização do couro, irritação, prostração e até mesmo levar o animal a morte. O impacto econômico causado por este ectoparasita na indústria Brasileira é estimado por GRISI *et al.*, 2014 em US\$ 3,24 bilhões/ano. Essa espécie é conhecida como vetor dos agentes da tristeza parasitária bovina causada pelos protozoários *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e a riquetsia *Anaplasma marginale* (SAREZ *et al.*, 2011; LEAL *et al.*, 2006)



Figura 2 - O carapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* parasitando seu hospedeiro, o boi (*Bos taurus*). Retirado de www.icb.usp.br/~marcelcp/Boophilus.htm.

Quanto ao ciclo de vida do carapato, de maneira geral, possui quatro principais estágios, sendo eles: ovo, larva, ninfa e adulto (VECHTOVA *et al.*, 2020). Com exceção do primeiro estágio, em todos os estágios o animal precisa de um hospedeiro para se alimentar. Os carapatos ixodídeos se alimentam uma vez por estágio e o tempo do ciclo de vida varia a cada espécie (BENDELE *et al.*, 2019). No caso do *Rhipicephalus microplus*, por exemplo, pode-se dividir seu ciclo de vida em duas fases, parasitária ou não parasitária (figura 3). A fase não parasitária se trata do período em que a teleóGINA se desprende do animal e cai no solo para encontrar um lugar seguro e escuro para depositar seus ovos. Após isso a fêmea morre, enquanto o macho vive por alguns dias. Ao final da embriogênese há eclosão e as larvas vão para as pontas das folhas agrupadas e ficam à espera de um hospedeiro, podendo esperar por mais de oitenta dias. A fase parasitária se inicia no momento em que a larva encontra um hospedeiro em potencial e se alimenta dando continuidade no ciclo e indo de larva para ninfa e após 9 a 16 dias vai para o estágio de adulto (GONZALES *et al.*, 1974).

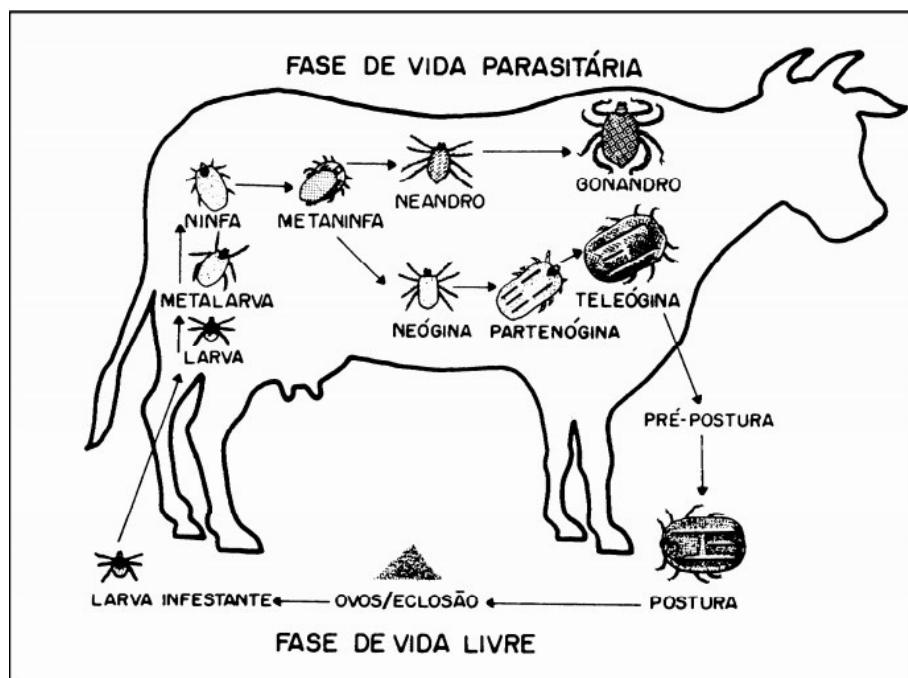


Figura 3 – Representação do ciclo do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* demonstrando a fase parasitária e não parasitária (Retirado de Gonzales *et al.*, 1974).

Desse modo, é visível e incontestável a importância de estudos relacionados a busca de conhecimento de aspectos biológicos do carrapato, devido aos impactos na saúde pública decorrentes destes parasitos, somado a prejuízos econômicos para criadores de gados, galinhas, entre outros animais (PEGRAM *et al.*, 1990; TORINA *et al.*, 2014). Hoje, a principal forma de controle de infestações desse ectoparasitas se dá pelo uso de acaricidas, entretanto, a falta de conhecimento sobre aspectos biológicos do carrapato, ou até mesmo da forma correta da aplicação desses produtos, podem levar a populações de carrapatos mais resistentes a acaricidas (EUROPEAN *et al.*, 2018, Obaid *et al.*, 2022). Além disso, o uso indevido de compostos químicos causam, também, contaminação ambiental e podem deixar resíduos químicos em produtos derivados de animais tratados. (CASTRO-JANER *et al.*, 2010, SHAKYA *et al.*, 2020).

É crescente o número de pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de vacinas contra este parasito, porém ainda não há registros de vacina eficaz até o momento. O conhecimento aprofundado sobre a fisiologia do carrapato, assim como a interação parasito-hospedeiro e moléculas envolvidas em sua sobrevivência podem levar a uma formulação eficaz de vacina como controle de infestações de carrapato.

4.2 Metabolismo de lipídeos em carrapatos

Os lipídios constituem basicamente os lipídios neutros e fosfolipídios. As funções dos lipídios são muito estudadas em insetos, porém, pouco se sabe sobre esse assunto em carrapatos. Os lipídios possuem uma variedade de funções celulares, além de ser a forma principal de armazenamento de energia, são também, os principais constituintes das membranas celulares (LEHNINGER *et al.*, 2014). O contorno de uma célula é composta pela membrana plasmática que consiste em moléculas de lipídios e proteínas, que não se ligam covalentemente, formando ao redor da célula uma barreira fina, flexível, resistente e hidrofóbica (MAXFIELD *et al.*, 2002). Com o crescimento da célula, são inseridas novas moléculas de proteínas e lipídios fazendo com que haja divisão celular com formação

de duas células, cada uma com sua membrana plasmática. Os lipídios presentes na membrana são em sua maioria fosfolipídios e colesterol (QUARTACCI *et al.*, 2002; JIANG *et al.*, 2019).

Estudos apontam um perfil característico de lipídios no carrapato *R. microplus*. Foram avaliados os lipídios nos ovos, hemolinfa e corpo gorduroso de fêmeas utilizando a cromatografia em camada delgada (Thin liquid chromatograph – TLC). No corpo gorduroso de *R. microplus*, foram encontradas quantidades significativas de triacilglicerol (TAG), colesterol esterificado (CHOE), e colesterol livre (CHO) sendo o último o mais abundante. Demonstrando a importância da molécula de colesterol no carrapato bovino *Rhipicephalus Boophilus microplus*, o qual é capaz de estocar colesterol livre e esterificado em tecidos de reserva (IWUALA *et al.*, 1979; ANGELO *et al.*, 2013).

A busca por mais informações sobre a embriogênese do carrapato tem sido muito importante para elaboração de novas metodologias para controle desses vetores. Em embriões de *R. microplus* verificou-se que os principais lipídeos neutros e carregados são utilizados em diferentes fases do desenvolvimento embrionário deste carrapato. Detectou-se que os lipídeos neutros presentes em embriões em desenvolvimento são: monoacilglicerol (MAG), 1,3 diacilglicerol (1,3-DAG), 1,2 diacilglicerol (1,2-DAG), ácidos graxos (AG), triacilglicerol (TAG) e colesterol esterificado (CHOE) (MORAES *et al.*, 2007). Além disso, outros trabalhos tem mostrado que a principal proteína da hemolinfa (sangue dos insetos) tem o colesterol como principal lipídio transportado (MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2000).

O colesterol (figura 4) é uma molécula anfipática e enquanto constituinte estrutural de membrana, apresenta um grupo hidroxila C3, orientado para fora da bicamada e pode formar ligações de hidrogênio com um grupo fosfato de um fosfolipídio. A porção apolar apresenta estrutura triterpenoide tetracíclica e uma cadeia de hidrocarbonetos que interagem com as cadeias apolares do fosfolipídio organizando a membrana, sua fluidez e fluxo de moléculas (ALBERTS *et al.*, 2002). Essa fluidez e permeabilidade apresenta papel importante na regulação da pressão osmótica intracelular e extracelular. É considerado um esterol, que consiste em quatro anéis fusionados, três com seis carbonos e um com cinco. Formado por 27 átomos de carbono, com uma cabeça polar e um corpo hidrocarbonado apolar

constituído pelos quatro anéis do núcleo esteroide e pela cadeia alifática lateral ligada em C-17. É o principal esterol sintetizado no tecido animal (LEHNINGER *et al.*, 2014).

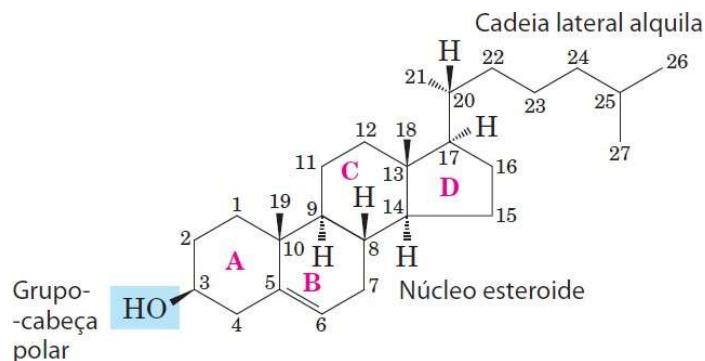


Figura 4 – Estrutura química do colesterol com representação de anéis de A a D, grupo cabeça polar. (LEHNINGER *et al.*, 2014)

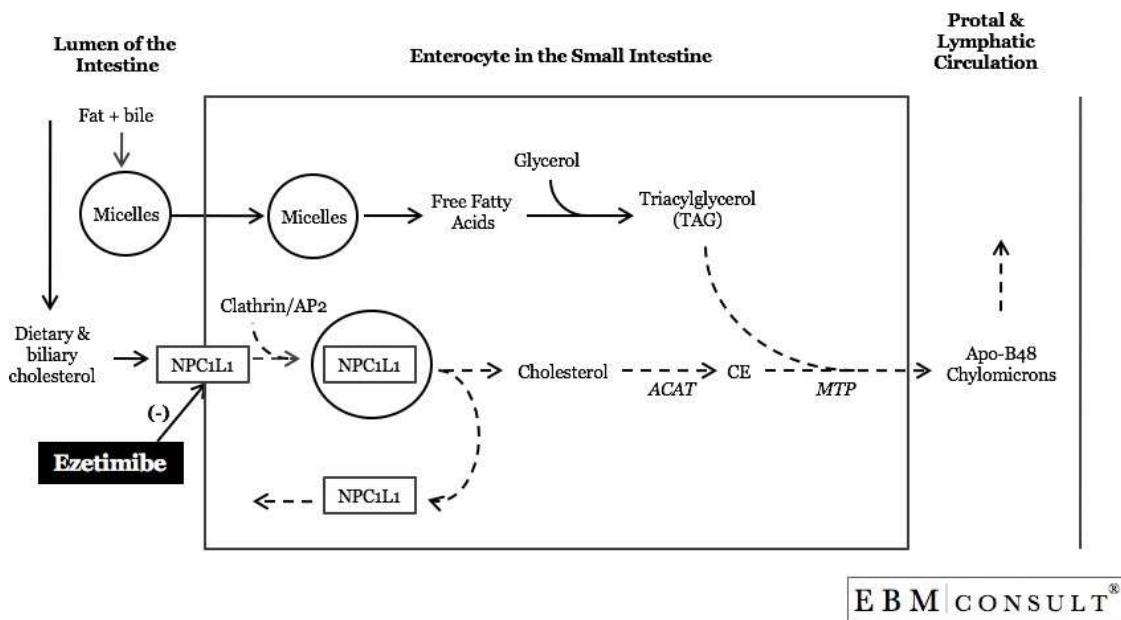
Um outro evento importante da molécula de colesterol é a formação de regiões denominadas de *lift rafts* na bicamada fosfolipídica e participam de eventos de endocitose (GUAN *et al.*, 2013; ZHUANG *et al.*, 2002). Uma outra característica importante é o seu papel como precursor de hormônios, mais especificamente hormônios sexuais, e outros relacionados ao metabolismo energético (ALBERTS *et al.*, 2002). Um dos hormônios que é sintetizado a partir do colesterol é a 20-hidroxiecdisona, envolvida com a muda, processo fisiológico importante e que está associado ao desenvolvimento e manutenção da vida dos artrópodes (LAFONT *et al.*, 2005; MAURER *et al.*, 1993; REWITZ *et al.*, 2006; TIHIDI-ESFAHANI *et al.*, 2011).

Um ponto importante e que deve ser destacado, é que os artrópodes em geral não são capazes de sintetizar essa molécula, sendo dependente de fontes exógenas. Isso se deve ao fato desse grupo de animais ter perdido o gene que codifica para a enzima que converte a molécula de farnesil pirofosfato em esqualeno (SEEGMILLER *et al.*, 2002; VINCI, XIA & VEITIA, 2008).

4.3 Absorção de Colesterol proveniente da dieta em carrapatos

Como não são capazes de sintetizar colesterol, o carrapato retira o que precisa quando se alimenta. Os lipídeos presentes no sangue são triacilglicerol (TAG), fosfolipídeos (FL), éster de colesterol (COL-E) e ácidos graxos (AG). A digestão e absorção de lipídeos em insetos hematófagos é realizada principalmente no intestino gerando produtos como colesterol e ácidos graxos livres. Porém, pouco se conhece sobre esse processo e as etapas posteriores (MAJEROWICZ; GONDIM, 2013). Segundo Godim e colaboradores (2018), após a alimentação com sangue, o inseto hematófago ativa o metabolismo de lipídeos, devido a liberação e neuropeptídeos e hormônios, que atua em diferentes alvos. Um desses alvos é o corpo gorduroso que tem grande importância por ser responsável por funcionar como reserva de energia para suprir demandas como ovoogenese ou até mesmo a necessidade de sobreviver a um longo tempo de jejum. (GODIM *et al.*, 2018). O processo de absorção de colesterol é muito mais conhecido em vertebrados do que invertebrados.

Menos ainda se conhece em relação a absorção de colesterol no carrapato, a maior parte do que se sugere são baseados em outros artrópodes ou vertebrados. Em vertebrados, o triacilglicerol (TAG) provenientes de uma alimentação é hidrolisado por lipases pancreáticas indo a monoacilglicerol (MAG), diacilglicerol (DAG) ácidos graxos (AG) e o éster de colesterol (CHO-E) é convertido em colesterol livre (CHO) e AG. Os lipídeos, em forma de micelas, são captados pela proteína transportadora Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1). No interior das células, ocorre o transporte para o retículo endoplasmático onde o colesterol pode ser reesterificado ou voltar ao lúmen intestinal (Figura 5) (NGHIEM-RAO; MAVIS; PATEL, 2014).



E B M CONSULT®

Figura 5 – Mecanismo de ação da ezetimiba e sobre a proteína transportadora de membrana NPC1L1 na inibição da absorção de colesterol. (ANTHONY *et al.*, 2015)

A proteína transportadora NPC1L1 tem papel fundamental no processo de absorção de colesterol e uma vez inibida, o metabolismo de colesterol é influenciado. Um fármaco muito utilizado responsável por inibir essa absorção é a ezetimiba (EZE). É um fármaco muito usado no tratamento da hipercolesterolemia e age como inibidor seletivo da absorção de colesterol (LIOUDAKI *et al.*, 2011). Se caracteriza com um pó branco, cristalino solúvel em etanol, metanol, acetona e praticamente insolúvel em água. Tem como ponto de fusão aproximadamente 163°C, massa molecular de 409,41 g mol⁻¹, é estável em temperatura ambiente com estrutura química mostrada na figura 6 (BURNETT *et al.*, 1994).

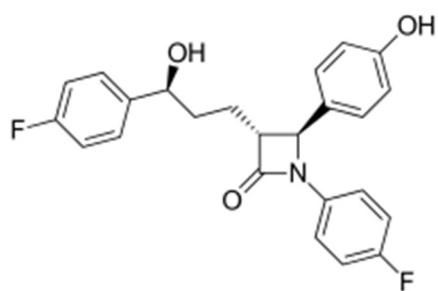


Figura 6 - Fórmula molecular da droga ezetimiba (BURNETT *et al.*, 1994)

A ezetimiba pode ser usada sozinha ou em conjunto com estatinas inibindo o transporte de colesterol. Existem estudos que utilizam esse fármaco em linhagens celulares avaliando o comportamento delas frente ao inibidor e comprovam que a droga interfere no transporte intracelular, reduzindo os percentuais de infecção da mesma por um vírus (LUCIFORA *et al.*, 2012). Além disso, outros autores relatam a ampla variedade de aplicações relacionadas a ezetimiba. Como Andrade-Neto e colaboradores (2016) sugerem que a ezetimiba interfere na biossíntese de esteróis em parasitas *Leishmania*. Xavier e colaboradores (2021) relatam que o uso da ezetimiba utilizando alimentação artificial inviabiliza o desenvolvimento do embrião além de deixar os ovos mais suscetível a colonização por bactérias. Ahmed e colaboradores (2023) relatam as possíveis propriedades anticancerígenas utilizando técnicas de viabilidade celular e docagem molecular para explorar o efeito da ezetimiba em células cancerígenas. De Dios-Blázquez e colaboradores (2024) mostra que a inibição da absorção de colesterol com ezetimiba resultou em até 77% de mortalidade em *Ornithodoros moubata* adulto, além de influenciar o desempenho reprodutivo feminino em termos de número e fertilidade dos ovos postos. Todos esses autores evidenciam o grande potencial da ezetimiba para pesquisas *in vivo* e *in vitro*.

4.4 Cultivo Celular de carrapatos

A técnica de cultivo celular de carrapatos consiste em manter e manipular células controlando suas condições para manter as características bioquímicas, fisiológicas e genéticas iniciais (SALATA *et al.*, 2021). É utilizado no isolamento e propagação de patógenos como *Ehrlichia ruminantium* (BELL-SAKYI *et al.*, 2000), *Ehrlichia canis* (EWING *et al.*, 1995) e *Anaplasma marginale* (MUNDERLOH *et al.*, 1996), entre outros patógenos transmitidos por carrapatos. O uso de linhagens celulares tem sido muito utilizado em estudos relacionados ao fornecimento de substratos para realização de diagnósticos e produção de vacinas, sobre mecanismo de ação de drogas, sinalização celular, entre outros. Tem como vantagem a redução da necessidade de experimentação animal na realização de estudos, além disso, o cultivo celular é uma ferramenta muito utilizada em estudos sobre mecanismo de ação de drogas, sinalização celular, produção de vacinas, entre outros. o estudo da biologia de

carapatos e das doenças transmitidas por eles. É usado em todo o mundo e apresenta grande importância na medicina veterinária permitindo o fornecimento de substratos para realização de diagnósticos e produção de vacinas, além de reduzir a necessidade de experimentação animal na realização de estudos.

As linhagens celulares podem ter origem embrionárias ou provenientes de órgãos como ovário e tubos de Malpighi. Os estágios do artrópode mais utilizados para cultivo de células são os de ninfa ou os ovos (KURTTI; BUSCHER 1979). A metodologia mais comumente usada foi descrita por Kurtti e colaboradores (1988). As células embrionárias são obtidas através de um macerado de ovos que precisam passar por um processo de esterilização de suas superfícies, assim como é preconizada a esterilização da superfície dos carapatos fêmea antes mesmo de fazerem a postura. A esterilização é necessária pelo fato do cultivo celular precisar ser livre de contaminações, e por isso faz-se uso de fluxos de capela laminar, instrumentos autoclavados e meios de cultura filtrados. Quando os ovos são macerados e as células passam a crescer em frascos de cultivo, essa cultura passa a ser chamada de células primárias. Essas células conseguem manter as características do tecido de origem por um curto tempo, logo depois começam a se degradar e suas características começam a mudar. Conforme são repicadas predominam as células de maior capacidade de proliferação que ainda possuem características do tecido de origem, mas possuem alta proliferação. Assim, passam a ser chamadas de linhagem celular contínua e são muito usadas em pesquisas por terem a capacidade de serem mantidas por um longo tempo (MOLINARO, 2010).

A primeira linhagem de célula de carapato foi de *Rhipicephalus appendiculatus* proveniente de tecidos de adultos em desenvolvimento (VARMA et al., 1975). Porém, as linhagens celulares estabelecidas são, em sua maioria, estabelecidas a partir de células embrionárias, pois a capacidade de multiplicação nesse estágio de desenvolvimento é maior. (BELL-SAKYI, 1991; MUNDERLOH et al., 1994)

É importante destacar que é necessário todo um cuidado para que as células sobrevivam por tempo suficiente para serem feitos experimentos. Fatores como temperaturas de armazenamento, meio de cultura específico para cada linhagem, pH ideal e ambiente estéril garantem que a célula continue viva e dando origem a outras células. Outro fator essencial são os meios de cultura utilizados como fonte de

nutrientes para as células. Esses meios são soluções ricas em nutrientes que contém tudo o que a célula necessita para sobreviver de acordo com suas necessidades metabólicas, energéticas e estruturais. Para escolher o meio de cultivo ideal, é necessário consultar a literatura e referências de bancos oficiais.

Outro item determinante para o crescimento da célula é a temperatura de incubação que pode variar de 28°C a 37°C. Para as células de *Rhipicephalus microplus*, por exemplo, usa-se 28°C. Já para células do carrapato *Ixodes scapularis* utiliza-se a temperatura de 30°C. Além disso, outro fator que influencia é o pH do meio de cultura que deve ser semelhante ao ambiente de proliferação celular dentro de larvas, ninfas e adultos em desenvolvimento. (MUNDERLOH; KURTTI, 1995)

Uma forma de controlar a saúde da linhagem celular ou se existe algum efeito de substâncias em sua proliferação é a utilização de testes de viabilidade celular. A integridade da membrana celular tem grande importância para a viabilidade da célula que consiste na contagem de células saudáveis e metabolicamente ativas (ADAN *et al.*, 2016). Um exemplo, amplamente utilizado, de ensaio de viabilidade é a utilização de métodos de exclusão de corantes, como o ensaio de exclusão do corante azul de tripano (Tripan).

O uso de linhagens celulares em pesquisas que visam novas formas de controle de infestações de carrapato são cada vez mais usadas. A busca por conhecimento sobre os mecanismos celulares ativados com o uso de acaricidas, além da modulação de genes envolvidos nesse processo podem beneficiar a busca por novos acaricidas. (MANGIA *et al.*, 2018).

4.5 Modelagem Molecular

Devido a seu baixo custo e rapidez na geração de resultados, o uso de métodos e ferramentas computacionais no desenvolvimento de fármacos tem crescido nos últimos anos, pois podem ser aplicados em todas as etapas do mesmo, ou seja, desde a triagem até os estágios pré-clínicos, reduzindo, assim, o risco de falhas. Uma dessas ferramentas é a modelagem molecular, amplamente aplicada na Química Medicinal moderna, que consiste em modelar e analisar estruturas tridimensionais de moléculas e suas propriedades, incluindo biomacromoléculas e seus complexos com moléculas bioativas (chamadas ligantes). (ARSHADI *et al.*, 2020) (FORSTER, 2002)(GUIDO & ANDRICOPULO, 2008) (SANT'ANNA, 2002) (SHAKER *et al.*, 2021)

A modelagem molecular tem se mostrado uma ferramenta cada vez mais poderosa e eficiente para construção de hipóteses e interpretação de dados que podem ser comprovados experimentalmente. Desse modo, é muito importante que os dados gerados na modelagem molecular sejam interpretados em paralelo com outros dados da Química Medicinal, para se fazer uma comparação de resultados teóricos e experimentais, sempre que possível. Com isso, tem-se a garantia da qualidade do modelo ou realizam-se possíveis modificações, se necessário. A principal razão para utilização de modelos moleculares é entender melhor as estruturas e suas propriedades com auxílio da Química Teórica, que utiliza programas específicos para realizar os cálculos necessários, e computação gráfica para construir e manipular os modelos. Na prática, partindo de um modelo inicial da estrutura molecular, os programas utilizam modelos teóricos para gerar um sistema otimizado dessa estrutura. (SANT'ANNA, 2015).

No campo da descoberta de novos candidatos à fármacos, a modelagem molecular é usada no Planejamento de Fármacos Auxiliado por Computador (CADD - *Computer Aided Drug Design*). O CADD utiliza ferramentas e técnicas computacionais para o Planejamento de Fármacos baseado na Estrutura do Alvo (SBDD – *Structure Based Drug Design*) ou Baseado nos Ligantes (LBDD – *Ligand Based Drug Design*). A abordagem LBDD utiliza o conhecimento prévio sobre os compostos bioativos, tais como estrutura e atividade, para construir modelos que relacionem ambos. Ela é

empregada, em geral, quando a estrutura 3D da proteína alvo é desconhecida. A vertente SBDD explora o modo de interação proteína-ligante, a fim de estudar fatores estruturais que sejam importantes para a ligação e, assim, propor novos candidatos à ligantes ou modificações naqueles já conhecidos (SHAKER *et al.*, 2021; SANT'ANNA, 2002; MENDES, 2023).

Tendo em vista a vertente SBDD, uma das técnicas que mais cresceu em estudos de Química Medicinal nos últimos anos foi a Docagem Molecular (conhecida também como Ancoramento Molecular ou, ainda, no inglês *Molecular Docking*) que permite prever o modo com que um ligante irá interagir com uma molécula alvo no seu sítio de interação conhecido, geralmente uma proteína. (KUNTZ *et al.*, 1982). Essa abordagem da modelagem molecular possui alto potencial para prever se há interações energeticamente favoráveis entre moléculas, elucidando as razões moleculares responsáveis pela ação de ligantes ou fármacos. Esse procedimento é feito em um processo multietapas onde se busca a posição, orientação e conformação que maximiza as interações intermoleculares, as chamadas “poses”. (FERREIRA 2017) (Dong *et al.*, 2018)

Um dos programas de docagem utilizados para minimizar as inúmeras variáveis do processo é o GOLD (Genetic Optimization for Ligand Docking) (CCDC) (VERDONK *et al.*, 2003), que considera os ligantes flexíveis e a proteína rígida, mas com rotação livre para cadeias laterais de resíduos doadores de ligação de hidrogênio. É possível também conferir rotação livre para um número limitado de outras cadeias laterais, se necessário. No programa GOLD é utilizado um Algoritmo Genético (AG) para gerar os modos de interação entre um ligante e o alvo (JONES *et al.*, 1997; KITCHEN *et al.*, 2004).

Uma variedade de estudos utilizando ferramentas computacionais para melhor entendimento da relação do fármaco ezetimiba com seus resultados voltados ao tratamento de doenças cardiovasculares e seu possível potencial anticancerígeno tem surgido nos últimos anos. (UGWU *et al.*, 2018) (SALGADO *et al.*, 2021) (GU *et al.*, 2022) (AHMED *et al.* 2023).

5. MATERIAIS E METODOS

5.1 Manutenção das células

O cultivo celular foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As linhagens de células IDE8 e BMP36 foram cultivadas no laboratório de cultivo celular com todo o equipamento específico para este fim. A linhagem de células de carrapato *I. scapularis* (IDE8) foi mantida em meio Leibovitz's L15B suplementado com soro fetal bovino inativado 5%, caldo de triptose fosfatada 10%, lipoproteína bovina concentrada 0,1%, L-glutamina (200 mM) 1%, solução de antibióticos penicilina (10.000 UI) e estreptomicina (10 mg/ml) 1%, com pH ajustado para 6,8. Já as linhagens de células do carrapato *R. microplus* foram mantidas em meio Leibovitz's L15 suplementado com soro fetal bovino inativado 20%, caldo de triptose fosfatada 10%, L-glutamina (200 mM) 1% e solução de antibióticos penicilina (10.000 UI) e estreptomicina (10 mg/ml) 1%, com pH ajustado para 6,8.

Tabela 1 – Componentes adicionados no meio Leibovitz L15, que depois de suplementado passa a ser L15B.

Ácido Aspártico	299 mg
Ácido Glutâmico	500 mg
Prolina	300 mg
Ácido α -cetoglutárico	299 mg
D-glicose	2239 mg
Estoque de Minerais	1 ml
Estoque de Vitaminas	1ml

L-15:

L-15 (Leibovitz) medium	70ml
Tryptose phosphate broth	10ml
Foetal calf serum (heat-inactivated)	20ml
L-glutamine 200mM	1ml
Penicillin (10,000units)/ streptomycin (10,000 μ g)	1ml

L-15B: **Adjust final pH to a nice orange colour using sterile 1N sodium hydroxide**

L-15B medium (Munderloh & Kurtti, 1989)*	85ml
Tryptose phosphate broth	10ml
Foetal calf serum (heat-inactivated)	5ml
Bovine lipoprotein (ICN) 10% solution in L-15B	1ml
L-glutamine 200mM	1ml
Penicillin (10,000units)/ streptomycin (10,000 μ g)	1ml

Figura 7 – Suplementos para os meios L15 e L15B.

As linhagens celulares foram mantidas em frascos de 75 cm² com renovação semanal do meio de cultura até que apresentasse uma confluência com formação da monocamada. Após esse período, o frasco foi utilizado para preparo de um concentrado de células contendo $5,0 \times 10^5$ cel/mL de meio para o repique em placas de 12 poços. Desse concentrado, 2 mL foram adicionados a cada poço em um total de 4 placas de 12 poços. Após o subcultivo, as placas foram mantidas por 24 horas em ambiente livre de contaminação e em suas respectivas estufas com as temperaturas ideais. A contagem das células foi realizada utilizando Câmara de Neubauer para normalização dos resultados.

5.2 Tratamento de células com ezetimiba

Em 3 placas de 12 poços foram preparados poços com diferentes concentrações de ezetimiba diluída em etanol nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Além do tratamento, foi preparado células controle de solvente contendo apenas etanol e uma quarta placa foi preparada contendo apenas meio de cultura (figura 8).

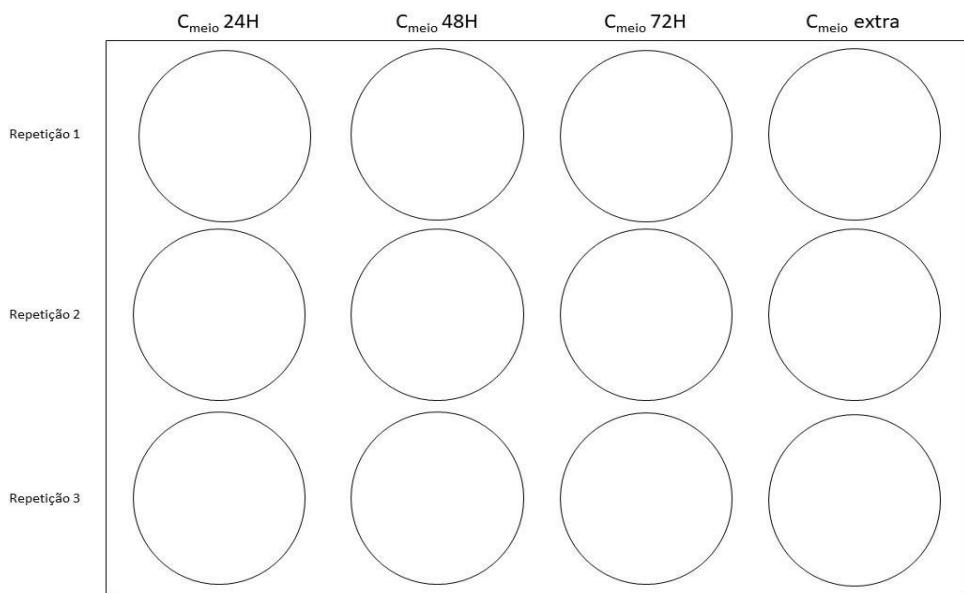


Figura 8 - Placa contendo apenas meio de cultura para ser utilizado como controle (Cmeio). Cada fileira de poços foi cuidadosamente manipulado em fluxo de capela laminar para manter o cultivo sem contaminações, possibilitando as análises nos diferentes tempos (24h, 48h, 72h) em triplicata.

As concentrações utilizadas foram $25 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ e $100 \mu\text{M}$ (figura 9).

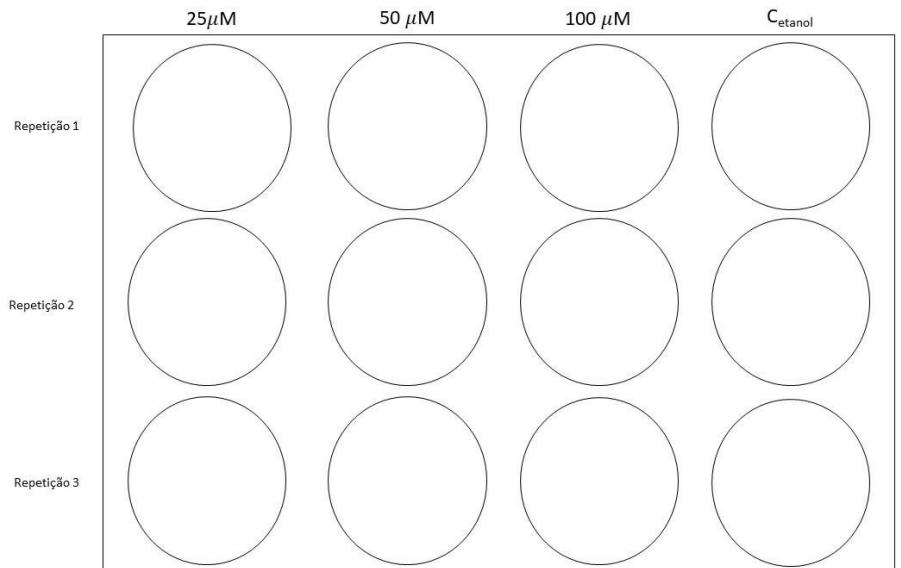


Figura 9 – Divisão de poços em concentrações diferentes de tratamento com Ezetimiba (EZE) com controle contendo meio e solvente (etanol). Foram preparadas 3 placas dessa maneira, possibilitando as análises nos diferentes tempos (24h, 48h, 72h) em triplicata.

A delineação do experimento foi realizado de acordo com a figura 10.

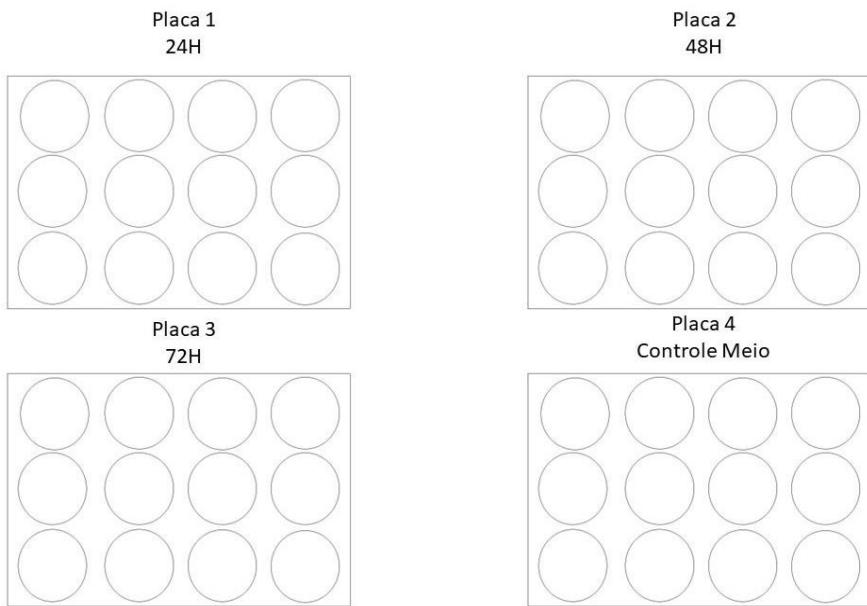


Figura 10 - Desenho experimental da divisão de placas. Placas 1,2 e 3 contendo células tratadas e controle de meio com etanol (Cetanol) e placa 4 apenas contendo meio de cultura. Possibilitando, assim, obter amostras nos diferentes tempos (24h, 48h, 72h) em triplicata.

A solução estoque de ezetimiba foi previamente preparada utilizando 12 mg do fármaco diluído em 3 mL de etanol para solubilizar, dando origem a uma solução concentrada. Para as concentrações de 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M foram adicionados às células 5 μ L, 10 μ L e 20 μ L respectivamente dessa solução concentrada em poços contendo células com 2 mL de meio de cultura.

Após os respectivos tempos, as amostras foram preparadas para extração e caracterização de lipídios. A solução retirada de cada poço foi transferida para tubos Falcon de 15 mL onde foram separados 20 μ L de cada poço para determinar a viabilidade celular com Azul de Tripan. O azul de tripano se trata de um corante colorimétrico que permite a identificação da quantidade de células vivas (sem coloração) e células mortas (coradas em azul) utilizando um hemocitômetro. É um

teste rápido e simples, e por isso é muito utilizado para avaliar a saúde de uma célula antes de iniciar o experimento, ou até mesmo as condições da célula após tratamento com qualquer estímulo citotóxico. (CROWLEY *et al.*, 2016).

Os tubos foram submetidos à centrifugação por 10 minutos por 1400 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi retirado permanecendo no falcon apenas um pellet de células, foi adicionado 10 mL de PBS (tampão) e submetido a nova centrifugação por 10 minutos a 1400 rpm. Dessa segunda centrifugação o sobrenadante foi descartado e o sedimento transferido para tubo eppendorf com 1mL de PBS para posterior centrifugação e armazenamento das células a -20 °C.

A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer, contando-se os quatro quadrantes das extremidades para cada célula. Para a viabilidade celular, foi utilizado azul de tripam na proporção de 1:1 de células A viabilidade foi analisada em microscópio segundo Crowley e colaboradores (2018).

A morfologia das células tratadas e controles foi observada utilizando esfregaços de citocentrífuga, que após confeccionados foram fixados em metanol durante três minutos e corados em Giemsa (Sigma Aldrich®) a 10% durante trinta e cinco minutos. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5.3 Extração de lipídios

A extração de TLC foi realizada no LBBMA do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A extração foi feita segundo Bligh e Dyer (1959).

Colocou-se as amostras extraídas em um tubo cônico e acrescentou-se água ultrapura, de forma que o volume final (H_2O + tecido) alcançou um volume total de 500 μL . Em seguida, foi adicionado ao tubo 1 mL de metanol e 2 mL de clorofórmio e colocou-se por 2 minutos no vórtex. Após, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm, retirou-se a fase orgânica (parte inferior), e transferiu-se para outro tubo devidamente identificado. Adicionou-se ao novo tubo 1 mL de metanol e 500 μL de água ultrapura, a amostra foi novamente agitada em vórtex por 2 minutos e centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. Retirou-se a fase orgânica e transferiu-se

para outro tubo para secagem em nitrogênio (N_2). Por fim, as amostras foram congeladas para futura separação através de cromatografia de camada fina TLC.

5.4 Cromatografia de camada fina (TLC)

Antes de começar, colocou-se a placa de cromatografia em camada delgada para aquecer para secá-la e ativá-la. Em seguida, os pontos onde as amostras seriam colocadas foram devidamente identificados. Cada ponto foi estabelecido com 1 cm de distância do ponto adjacente, de 0,5 cm cada. A distância para a corrida foi de 15 cm a partir dos pontos. Utilizou-se diferentes concentrações dos padrões de colesterol (CHO) e éster de colesterol (CHOE), diluídos em clorofórmio, para construção de uma curva padrão. Nos poços padrões foram pipetados 2 μ g, 4 μ g, 12 μ g e 20 μ g de CHO, e 2 μ g, 4 μ g, 6 μ g e 10 μ g de CHOE. Nos outros poços, foram adicionados 10 μ L das amostras previamente diluídas em 30 μ L de clorofórmio.

Na cuba de cromatografia, adicionou-se uma solução contendo 90 mL de hexano + 60 mL de éter etílico + 1,5 mL de ácido acético para a primeira corrida. Fechou-se a cuba para a saturação e após meia hora inclinou-se a placa de maneira que apenas a superfície inferior entrasse em contato com a solução presente na cuba. Após finalizar a primeira corrida (a solução chegou aos 7,5 cm marcados inicialmente na placa), preparou-se a segunda solução contendo 120 mL de hexano + 30 mL de clorofórmio + 1,5 mL de ácido acético para correr até os 15 cm.

Após as corridas, a placa foi corada segundo Ruiz e Ochoa (1997), com solução Cherring. Colocou-se a placa seca na estufa em alta temperatura e aguardou-se a queima e evidenciação das bandas. As imagens foram obtidas por escaneamento digital e a análise das bandas foi feita pelo programa Image Lab 6.0.1.

5.5 Modelagem Molecular

Com a finalidade de se entender melhor a interação da ezetimiba com transportadores de colesterol presente no metabolismo dos carrapatos *Ixodes scapularis* e de *Rhipicephalus microplus* realizou-se um estudo de modelagem

molecular, que foi executado pelo Laboratório de Modelagem Molecular - LabMol, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, campus Seropédica.

Uma vez que não são encontrados estudos na literatura descrevendo as interações com a proteína inibidora de colesterol em carrapatos, este trabalho teve como ponto de partida a proteína Niemann-Pick humana. A estrutura do complexo da proteína C1 de Niemann-Pick humana (NPC1L1) com o inibidor ezetimiba, obtida por criomicroscopia eletrônica com resolução de 3,58 Å, foi extraída do *Protein Data Bank* – PDB (<https://www.rcsb.org/structure/7DFZ>), com código 7DFZ (Hu *et al.*, 2021).

A redocagem foi realizada por meio do programa GOLD 2022.3.0 (CCDC), e consistiu na extração do ligante co-cristalizado com a proteína na estrutura 7DFZ para ser, posteriormente, docado no mesmo sítio de ligação do alvo. Essa estratégia foi empregada com as quatro funções de pontuação disponíveis no programa, a fim de analisar qual delas forneceria o melhor encaixe proteína-ligante, com base na pontuação e no RMSD (Raiz do Desvio Quadrático Médio).

Para a docagem, foram construídos modelos referentes ao transportador de colesterol dos carrapatos *Ixodes scapularis* e *Rhipicephalus microplus*, utilizando o servidor Swiss-Model, tendo a proteína do complexo 7DFZ como molde. Com base nas interações intermoleculares na estrutura cristalográfica (7DFZ) (Figura 12), identificou-se quais eram os resíduos presentes no sítio de interação (Tabela 2) e estes foram relacionados com seus respectivos correspondentes nos modelos *I. scapularis* e *R. microplus*, ao alinhar as estruturas de referência e modelos, no Swiss-PDB-Viewer v4.1.0.

No GOLD, foram escolhidos os resíduos Trp371 (*I. scapularis*) e o Trp523 (*R. microplus*) como centro da cavidade de interação, por corresponderem ao resíduo Trp383, que está próximo do meio da estrutura da ezetimiba no complexo molde (7DFZ) (Figura 11) e, definiu-se um raio de 12 Å para a cavidade de interação. Para fins de avaliação do comportamento do ligante na região de interesse, alterou-se o grau de liberdade das cadeias laterais dos resíduos mais próximos a ele (Tabela 2, destaque em cinza), de fixas para livres.

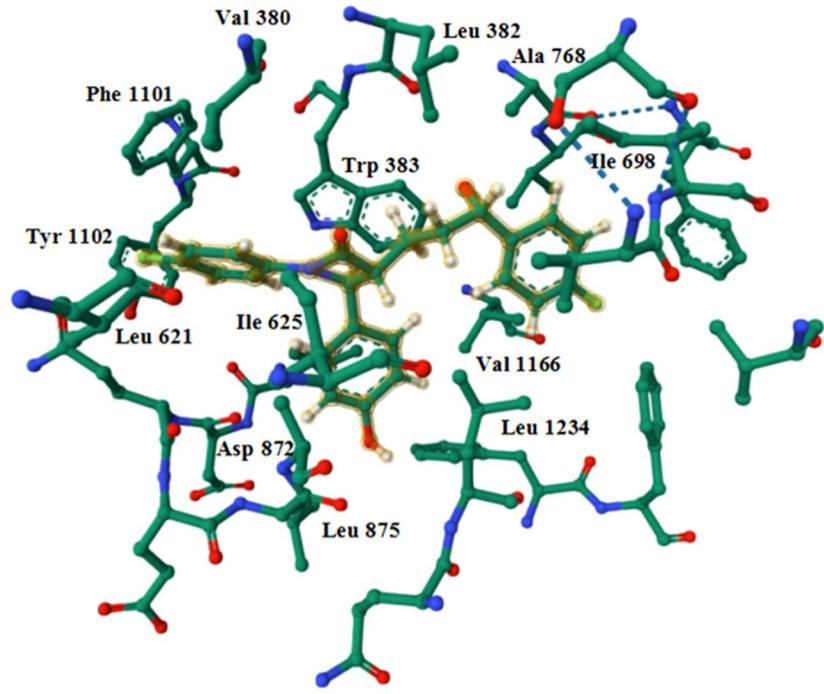


Figura 11: sítio de interação do transportador com a ezetimiba (sombreado), na estrutura cristalográfica de referência (PDB ID: 7DFZ).

Resíduos correspondentes¹ entre a referência e os modelos, no sítio de interação.

Resíduo no transportador de colesterol de <i>H. sapiens</i> (7DFZ)	Resíduo correspondente em <i>I. scapularis</i>	Resíduo correspondente em <i>R. microplus</i>
Val380	Val368	Val520
Leu382	Leu370	Leu522
Trp383	Trp371	Trp523
Leu621	Ile593	Ile757
Ile625	Leu597	Leu761
Ser695	Thr667	Thr831
Val697	Ile669	Ile833

Ile698	Val670	Ile834
Val701	Val673	Val837
Ala768	Ala740	Ala904
Val769	Val741	Val905
Phe772	Phe744	Phe908
Leu871	Leu844	Leu1007
Asp872	Asp845	Asp1008
Gln873	Gln846	Gln1009
Glu874	Glu847	Glu1010
Leu875	Ile848	Leu1011
Ala876	Ala849	Ala1012
Phe1101	Phe1071	Phe1230
Tyr1102	Tyr1072	Tyr1231
Val1166	Val1136	Val1295
Gln1233	Gln1203	Gln1361
Leu1234	Leu1204	Ile1362
Phe1238	Phe1208	Phe1366
Phe1239	Tyr1209	Tyr1367

¹ Os resíduos mais próximos ao ligante estão destacados em cinza.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Viabilidade celular

O fraco de cultivo celular utilizado para repique nas placas de poços apresentou viabilidade maior que 95% em todos os experimentos, se mostrando apta para dar

continuidade ao experimento. O repique foi feito de forma que a concentração final de células em cada poço fosse de 5×10^5 cel/ml. Após 24 horas do repique da cultura celular para as placas, houve confluência da monocamada e foi visto um perfil de célula saudável.

Os tempos utilizados no experimento foram baseados no tempo de vida das células após tratamento na concentração mais alta. Assim, os tempos utilizados foram de 24, 48 e 72 horas após o tratamento, visto que no tempo maior já não havia mais viabilidade da célula na concentração mais alta (100 μ M). além disso, vale ressaltar que a concentração mais alta partiu do que já foi visto segundo LUCIFORA e colaboradores (2012).

Em geral, a viabilidade celular é medida pelo percentual de células saudáveis presentes em um determinado grupo. Em grande parte da literatura o ensaio com Azul de Tripan é utilizado devido a rapidez nos resultados e simplicidade na execução. Este ensaio visa avaliar a sobrevivência celular e permite realizar ensaios *in vitro* de viabilidade e citotoxicidade sendo usado em diversas possibilidades de ensaios. Consiste em contagem de células coradas e não coradas pois é excluído de células intactas (vivas), mas pode corar, em azul, células com uma membrana comprometida (Kerschbaum *et al.*, 2021). Sendo, assim, possível calcular o percentual de células viáveis em cada poço.

Resultados na linhagem IDE8 sugerem que em 24 horas após o tratamento já é possível ver uma diminuição significativa na viabilidade celular relativa ao controle na concentração de 100 μ M, com uma diminuição de 51% nessa concentração. Enquanto que em concentração mais baixas não houve diferença significativa no tempo de 24 horas. Já nos tempos seguintes, além de diminuir cerca de 80% da viabilidade relativa ao controle na concentração de 100 μ M, também foi possível observar uma diminuição de 23% na viabilidade em células expostas a 50 μ M de ezetimiba. A concentração mais baixa não apresentou diferença significativa em relação aos controles. Vale ressaltar que os dados não apresentaram mudanças quando comparados os tempos de 48 e 72 horas.(figura 12)

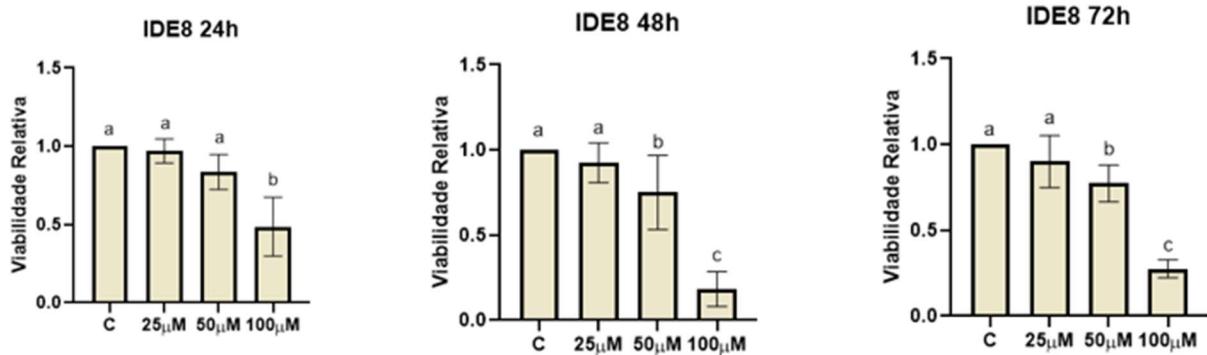


Figura 12 - Viabilidade celular relativa ao controle da célula IDE8 analisada nos tempos 24, 48 e 72 horas após tratamento com ezetimiba. Foram utilizados três grupos de células tratadas em diferentes concentrações (25 μ M, 50 μ M, 100 μ M), além de células controle contendo apenas meio (C). Todos os grupos foram mantidos em estufa com temperatura ideal da célula e todo o experimento realizado com seis amostras tratadas em mesmas condições, onde os dados apresentados representam a média de cada grupo.

Já quando observado os dados gerados da viabilidade da linhagem BMP36 proveniente do carapato *Rhipicephalus microplus*, o perfil mudou significativamente. Nos tempos de 24 e 48 horas após tratamento nenhuma diferença significativa foi observada entre as diferentes concentrações de EZE e os controles.

Mas quando observados os dados no tempo de 72 horas, a concentração de 100 μ M apresenta uma diferença de 36,4% (figura 13). Os dados citados sugerem uma diferença na resposta de cada linhagem celular ao tratamento com o inibidor de colesterol. Isso sugere uma diferença no mecanismo de absorção ou até mesmo uma maior sensibilidade a droga da linhagem IDE8.

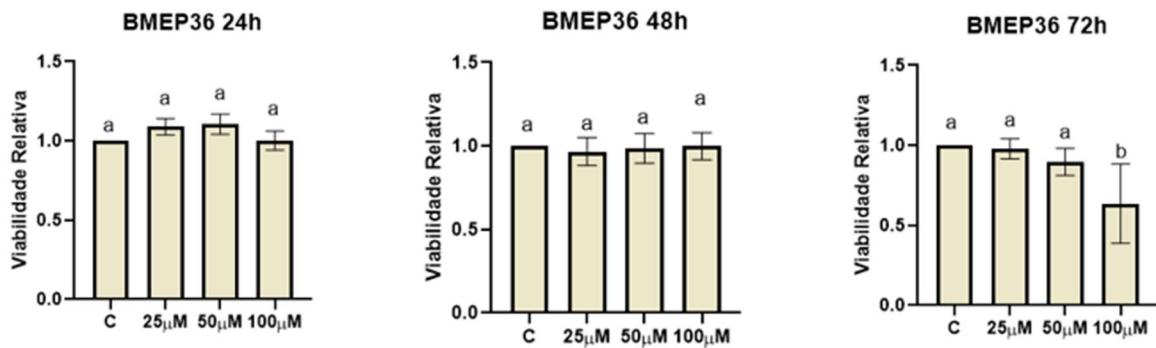


Figura 13 - Viabilidade celular relativa ao controle da célula BMEP36 analisada nos tempos 24, 48 e 72 horas após tratamento com ezetimiba. Foram utilizados três grupos de células tratadas em diferentes concentrações (25 μ M, 50 μ M, 100 μ M), além de células controle contendo apenas meio (C). Todos os grupos foram mantidos em estufa com temperatura ideal da célula e todo o experimento realizado com seis amostras tratadas em mesmas condições, onde os dados apresentados representam a média de cada grupo.

Além de sua importância como componente estrutural da membrana responsável pela permeabilidade e fluidez da célula, os lipídios também são precursores importantes de hormônios (Ke, Chao, Abbas *et al.*, 2020). Uma vez que acontece uma mudança do processo de absorção desse lipídeo inibindo seu transportados, pode impedir a formação de moléculas com papel estrutural e hormonal por exemplo levando esse animal a morte ou alterando processos fisiológicos.

6.2 Alteração morfológica

Quando observados os resultados referentes a célula IDE8 (figura 14) após 24 horas de tratamento é possível visualizar células integras, com o citoplasma e núcleo bem definidos, tanto no controle com meio quanto no controle com etanol. Nas concentrações de 25 e 50 μ M também não apresentam diferença neste tempo em relação aos controles e as células continuavam, em sua maioria, integras. Já na concentração de 100 μ M o perfil observado é diferente apresentando células

sem a citoplasma e muitas em destruição visível e aumento da quantidade de vacúolos.

No tempo de 48 horas nas células IDE8 tratadas com 50 μ M de ezetimiba já é possível observar uma maior mortalidade nas células com o citoplasma visivelmente destruído e presença de muitos vacúolos, diferente do que foi visto no tempo de 24 horas. Enquanto nos controles e nas células tratadas com 25 μ M não foi visto diferença de morfologia quando comparado aos controles. Na concentração de 100 μ M novamente um grande número de células mortas podem ser observadas por todo o campo com um número alto de debríis celulares (vestígios de células e tecidos).

Passadas 72 horas de tratamento as células que receberam tratamento com 25 μ M de ezetimiba já apresentam vácuolos nos citoplasmas indicando um estresse alto, porém as células permanecem bem definidas contendo citoplasma e núcleos visíveis. Já nas concentrações de 50 e 100 μ M já não é visto mais células integrais e um grande número de núcleos aparecem degradados por todo o campo.

Os dados de morfologia apresentados para células IDE8 reforçam o que foi visto nos dados de viabilidade onde os tempos de 48 e 72 horas influenciam diretamente na viabilidade das células nas concentrações de 50 e 100 μ M enquanto a concentração de 25 μ M não apresenta grande sensibilidade em nenhum dos tempos.

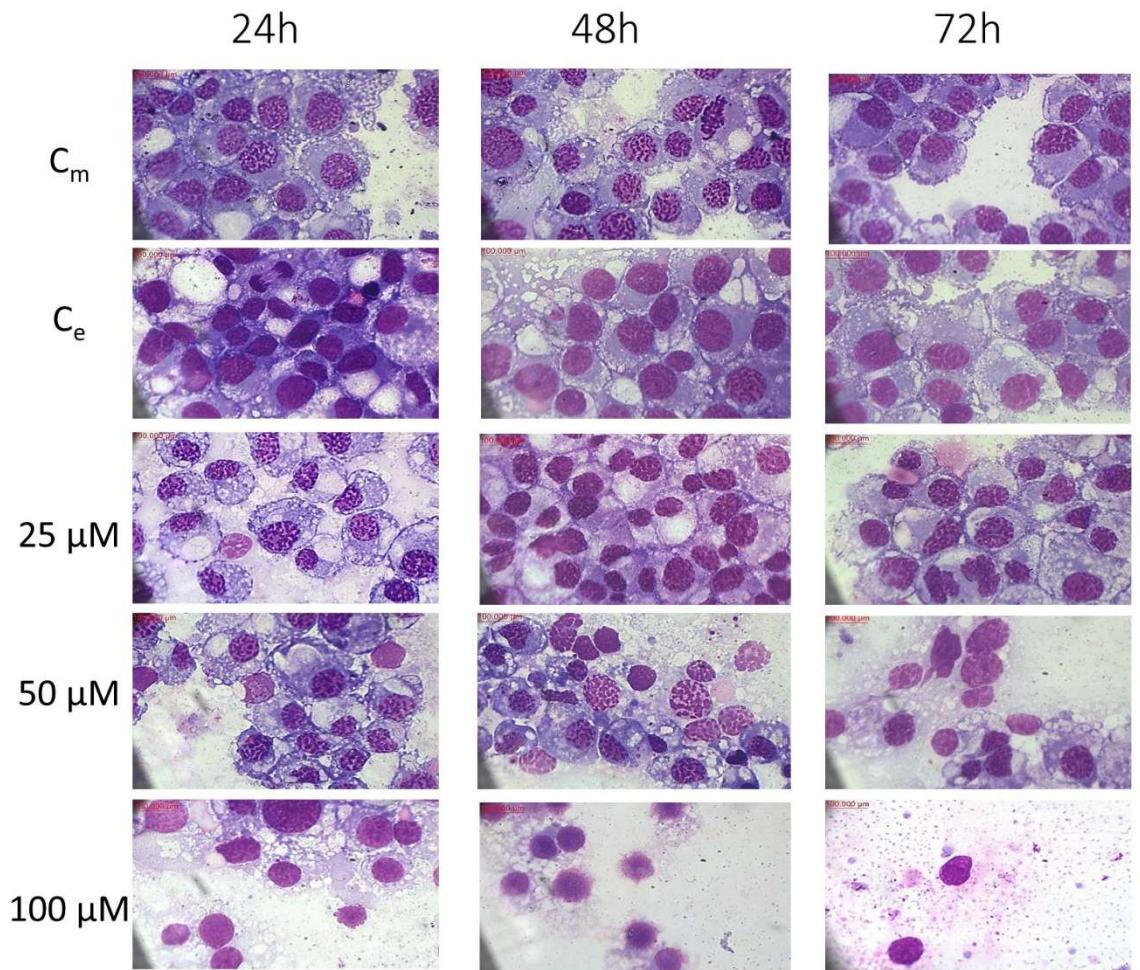


Figura 14: Células IDE8 tratadas com ezetimiba em diferentes concentrações nos tempos de 24, 48 e 72 horas, com os respectivos controles contendo apenas meio de cultura (Cm) e controle com meio e

Já em células BMEP36 é possível observar que a integridade celular se mantém ao longo do tempo tanto nos controles como nas concentrações de 25 e 50 μM, apenas com o aumento do número de vacúolos na concentração de 50 μM durante os 3 tempos, quando comparada com o controle e as células na concentração de 25 μM. Na concentração de 100 μM o efeito da ezetimiba se diferencia apenas no tempo de 72 horas onde ainda é possível observar células íntegras, porém contendo um número maior de membranas fragmentadas, inúmeros vacúolos e núcleos se degradando.(figura 15)

O perfil visualizado na morfologia para a célula BMEP36 está de acoroo com o perfil descrito na viabilidade celular onde existe uma diferença significativa apenas no tempo de 72 horas para a concentração de 100 μ M.

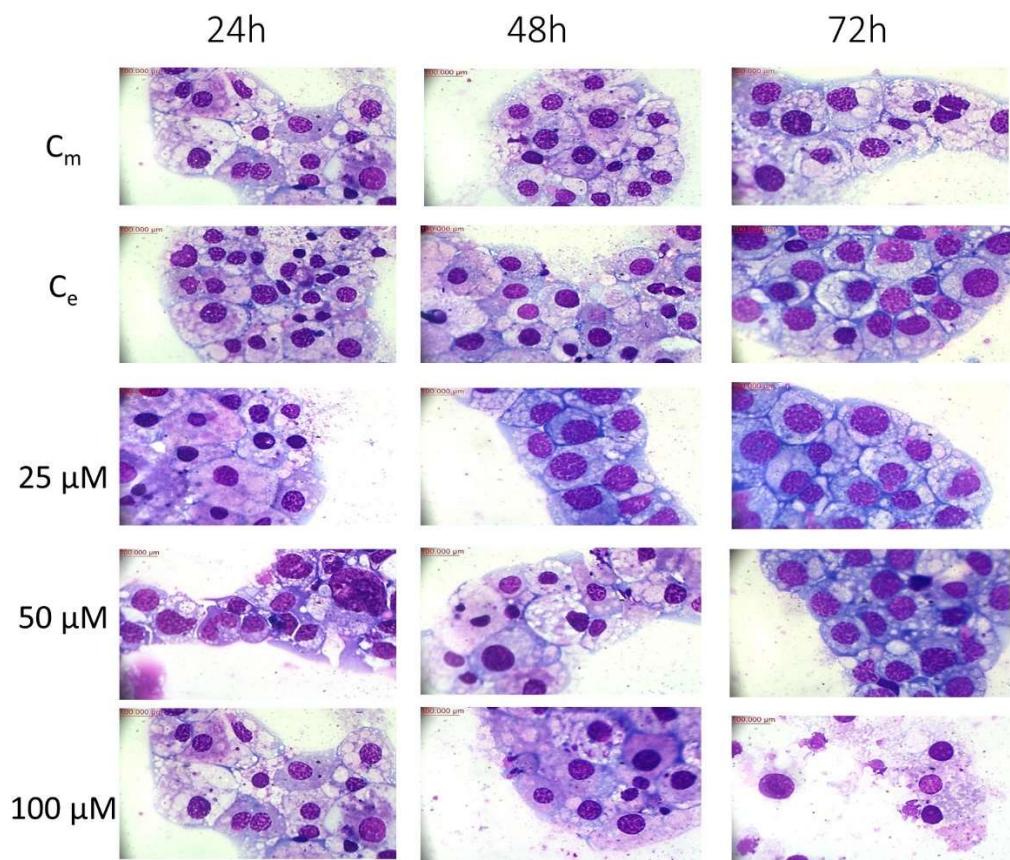


Figura 15: Células BMEP36 tratadas com ezetimiba em diferentes concentrações nos tempos de 24, 48 e 72 horas, com os respectivos controles contendo apenas meio de cultura (Cm) e controle

6.3 Análise do perfil lipídico

Foi observado que o perfil lipídico encontrado na linhagem BMEP36 é semelhante ao encontrado no corpo gorduroso desse artrópode segundo observado em Angelo e colaboradores (2013). Obteve-se grande densidade em colesterol e éster de colesterol. As placas de TLC foram analisadas pelo programa Image Lab 6.0.1 e os resultados foram transferidos para Excel para construção da curva padrão e determinação da quantidade de colesterol e éster de colesterol das amostras controle e tratadas com ezetimiba. É importante ressaltar, que após normalização dos cálculos o número de células não influencia no valor de densitometria.

No tempo de 24 horas já é possível observar uma diminuição de 72,75% na concentração de colesterol apenas na maior concentração de ezetimiba. Nas concentrações de 25 μ M e 50 μ M, no entanto, não apresentaram diferença significativa em relação aos controles. Já no tempo de 48 horas é possível observar uma diminuição significativa em todas as concentrações de tratamento quando comparadas com os controles sendo uma diminuição de 50,6%, 62,31% e 68,49% nas concentrações de 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M respectivamente. (figura 16)

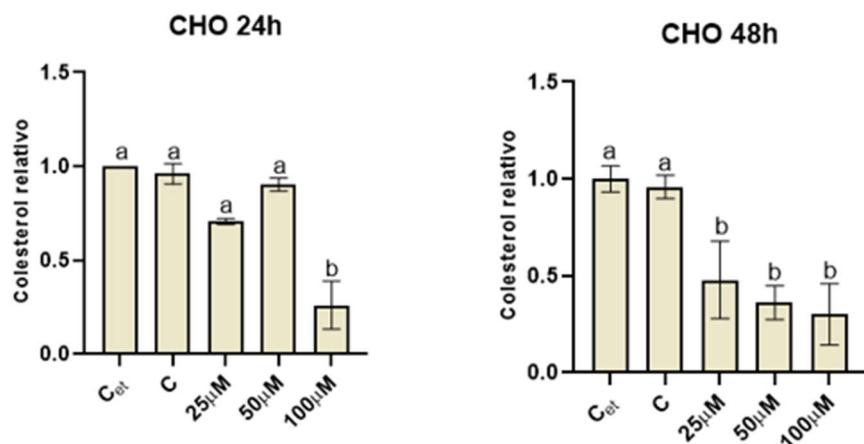


Figura 16 – Quantificação referente à célula embrionária BMEP36 no período de 24 e 48 horas após tratamento com ezetimiba. Foram utilizados três grupos de células tratadas em diferentes concentrações (25 μ M, 50 μ M, 100 μ M), além de células controle contendo apenas meio (C) e células controle contendo etanol, solvente da ezetimiba (C_{et}). Valores obtidos através do programa Image Lab 6.0.1.

Para os resultados de éster de colesterol (CHO-E), no tempo de 24 horas já apresenta uma diminuição de 72,38% na concentração mais alta de EZE, porém em 48 horas é possível observar essa diminuição também na concentração de 50 μ M apresentando uma diminuição de 69,54 % para a concentração de 50 μ M e 87,65% em células tratadas com 100 μ M (figura 17).

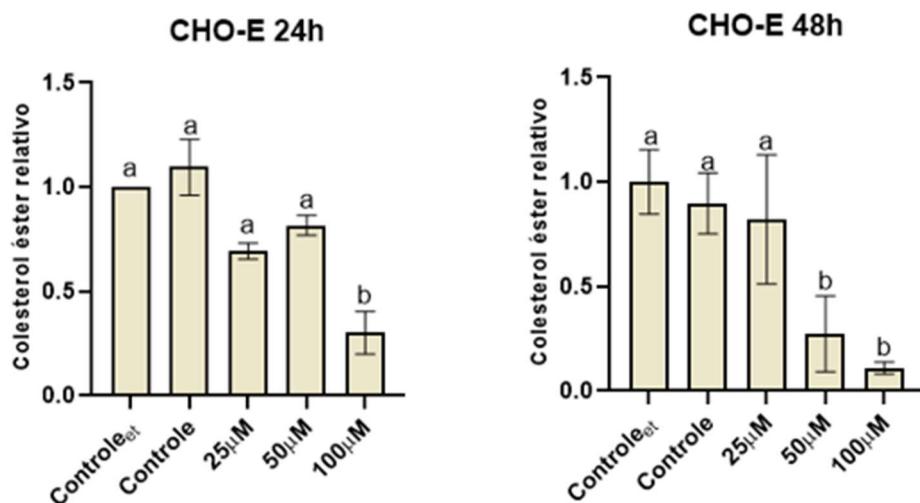


Figura 17 – Quantificação referente à célula embrionária BMEP36 no período de 24 e 48 horas após tratamento com ezetimiba. Foram utilizados três grupos de células tratadas em diferentes concentrações (25 μ M, 50 μ M, 100 μ M), além de células controle contendo apenas meio (C) e células controle contendo etanol, solvente da ezetimiba (C_{et.}) Valores obtidos através do programa Image Lab 6.0.1.

O colesterol possui papel essencial nas membranas celulares tendo um papel crucial no crescimento e desenvolvimento celular, além de outros diversos papéis na fisiologia do carrapato. Os resultados descritos acima sugerem que existe uma ação da ezetimiba sobre as células embrionárias de carrapato quando observada sua viabilidade e também na absorção de lipídeos. Considerando os resultados apresentados por Xavier e colaboradores (2021) que observou uma ação direta da ezetimiba no desenvolvimento do embrião, e também de de Dios-Blázquez e colaboradores (2024) que observou que a interrupção no metabolismo de lipídios causa efeitos prejudiciais ao parasita, podemos reforçar que a inibição do metabolismo de colesterol em carrapatos possui grande potencial para o desenvolvimento de novos métodos de controle de carrapatos.

Estudos mais detalhados são necessários para entender a diferença de resultados entre as duas linhagens de células, porém é possível sugerir que exista uma resistência maior por parte da célula BMEP36 uma vez que mesmo ocorrendo uma diminuição na absorção de colesterol e colesterol éster sua viabilidade celular não é influenciada.

6.4 Modelagem Molecular

Com base no valor de RMSD (Tabela 3), observado na redocagem, todas as funções geraram bons resultados, visto que o valor da melhor pose, em cada caso, encontra-se abaixo de 2 Å e da resolução da estrutura cristalográfica 7DFZ (3,58 Å). Um baixo RMSD indica uma maior semelhança entre as poses do ligante docado e co-cristalizado, assim, dentre todas as funções, optou-se pela ChemScore, tendo em vista o menor RMSD. A sobreposição da melhor solução, em cada função, com a pose do ligante de referência encontra-se nas figuras 18-21, nas quais é possível observar que de fato a função escolhida para a docagem é a que fornece um resultado mais próximo da estrutura cristalográfica.

Tabela 3: Parâmetros obtidos na redocagem da ezetimiba, realizado pelo GOLD.

Função	Cadeia lateral dos resíduos	Solução (pose)	Pontuação	RMSD (Å)	
ChemScore	fixa	1	40,96	9,50	
		2	40,80	9,48	
		3	40,63	9,26	
	livre	8	44,56	9,00	
		1	44,30	8,98	
		9	43,90	8,80	
		14	43,74	1,24	
		11	43,64	8,92	

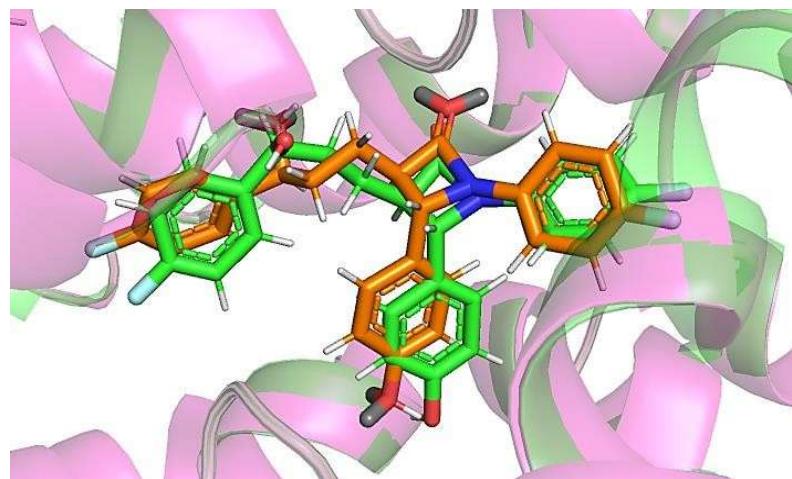


Figura 18: Redocagem da ezetimiba na proteína (7DFZ) com **ChemPLP**. Sobreposição da melhor pose (átomos de C em laranja) e o ligante co-cristalizado (átomos de C em verde).

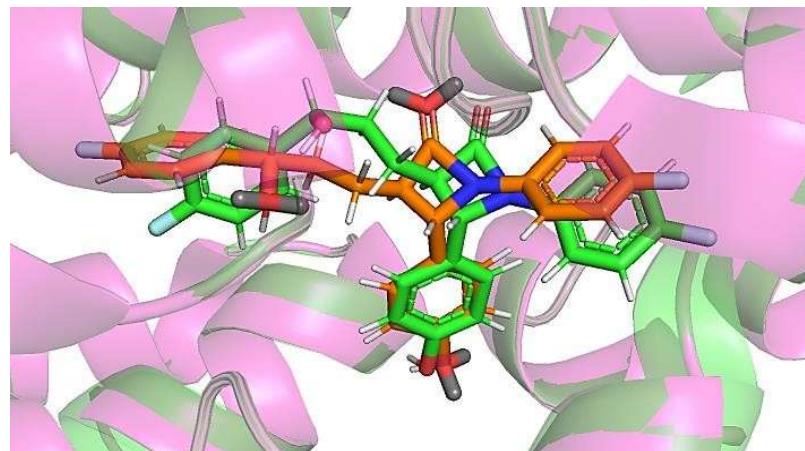


Figura 19: Redocagem da ezetimiba na proteína (7DFZ) com **GoldScore**. Sobreposição da melhor pose (átomos de C em laranja) e o ligante co-cristalizado (átomos de C em verde).

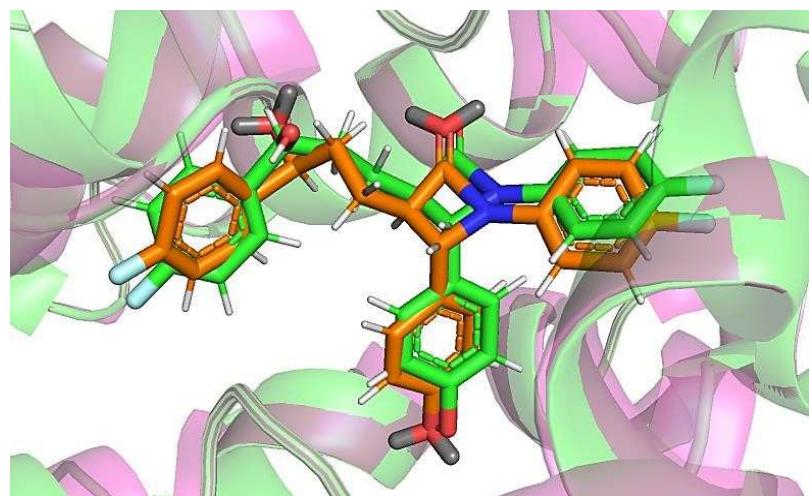


Figura 20: Redocagem da ezetimiba na proteína (7DFZ) com **ChemScore**.

Sobreposição da melhor pose (átomos de C em laranja) e o ligante co-cristalizado (átomos de C em verde).

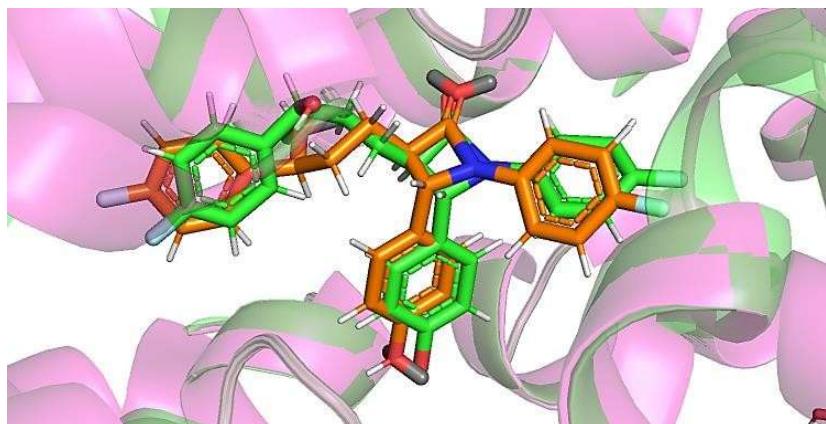


Figura 21: Redocagem da ezetimiba na proteína (7DFZ) com **ASP**.

Sobreposição da melhor pose (átomos de C em laranja) e o ligante co-cristalizado (átomos de C em verde).

Na docagem, todas as soluções apresentaram uma pontuação semelhante àquela obtida na redocagem feita com a função ChemScore, indicando uma boa interação entre a ezetimiba e os modelos propostos. Contudo, apenas uma solução em cada modelo com as cadeias laterais livres teve um RMSD menor que 2 Å e do que a resolução da estrutura do transportador de colesterol humano (7DFZ) (Tabelas 4 e

5, destaque em cinza e Figura 22). Mesmo que as soluções não sejam as de pontuação mais alta, elas encontram-se entre as cinco primeiras colocadas e formam interações intermoleculares mais semelhantes às do complexo de referência (Figuras 22 e 23). Algumas dessas interações intermoleculares e suas respectivas distâncias foram identificadas pelo servidor PLIP (<https://plip-tool.biotecltd-dresden.de/plip-web/plip/index>) (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4: Parâmetros obtidos na docagem da ezetimiba no transportador de colesterol de *Ixodes scapularis*.

Função	Cadeia lateral dos resíduos	Solução (pose)	Pontuação	RMSD (Å)
fixa		1	40,96	9,50
		2	40,80	9,48
		3	40,63	9,26
ChemScore		8	44,56	9,00
		1	44,30	8,98
	livre	9	43,90	8,80
		14	43,74	1,24
		11	43,64	8,92

Tabela 5: Parâmetros obtidos na docagem da ezetimiba no transportador de colesterol de *Rhipicephalus microplus*.

Função	Cadeia lateral dos resíduos	Solução (pose)	Pontuação	RMSD (Å)
ChemScore	fixa	4	42,55	8,90
		5	42,09	8,87
		2	42,01	8,87
		3	41,31	9,40
	livre	3	44,47	9,08
		5	43,60	9,17
		8	43,08	9,00
		1	42,32	1,28
		4	42,05	9,43

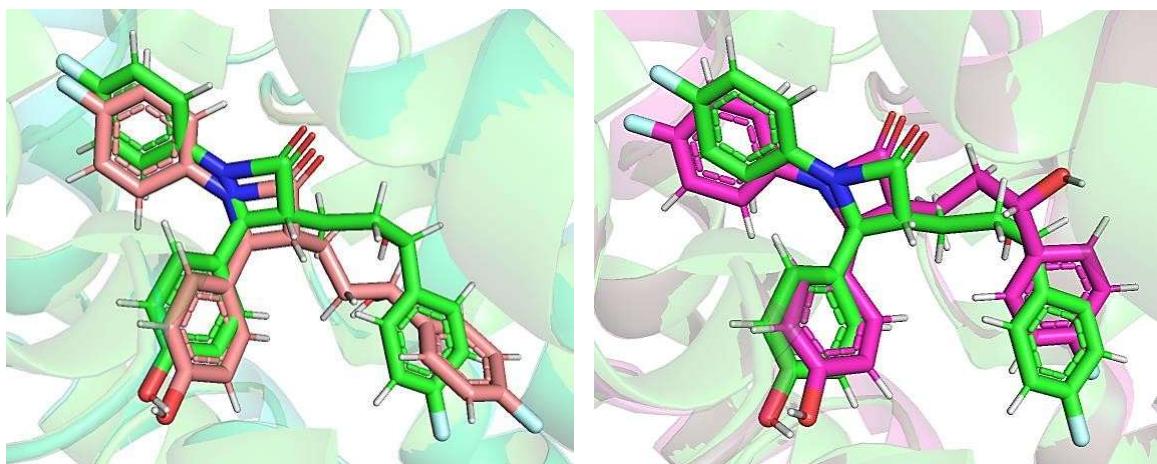


Figura 22: sobreposição da ezetimiba no sítio ativo do transportador de colesterol humano e na cavidade do modelo: A) *Ixodes scapularis* (átomos de C na referência em verde; solução 14, átomos de C em rosa claro (RMSD: 1,24 Å); B) *Rhipicephalus microplus* (átomos de C referência em verde; solução 1, átomos de C em magenta (RMSD: 1,28 Å).

Ambos com as cadeias laterais dos resíduos livres (ver tabela 5).

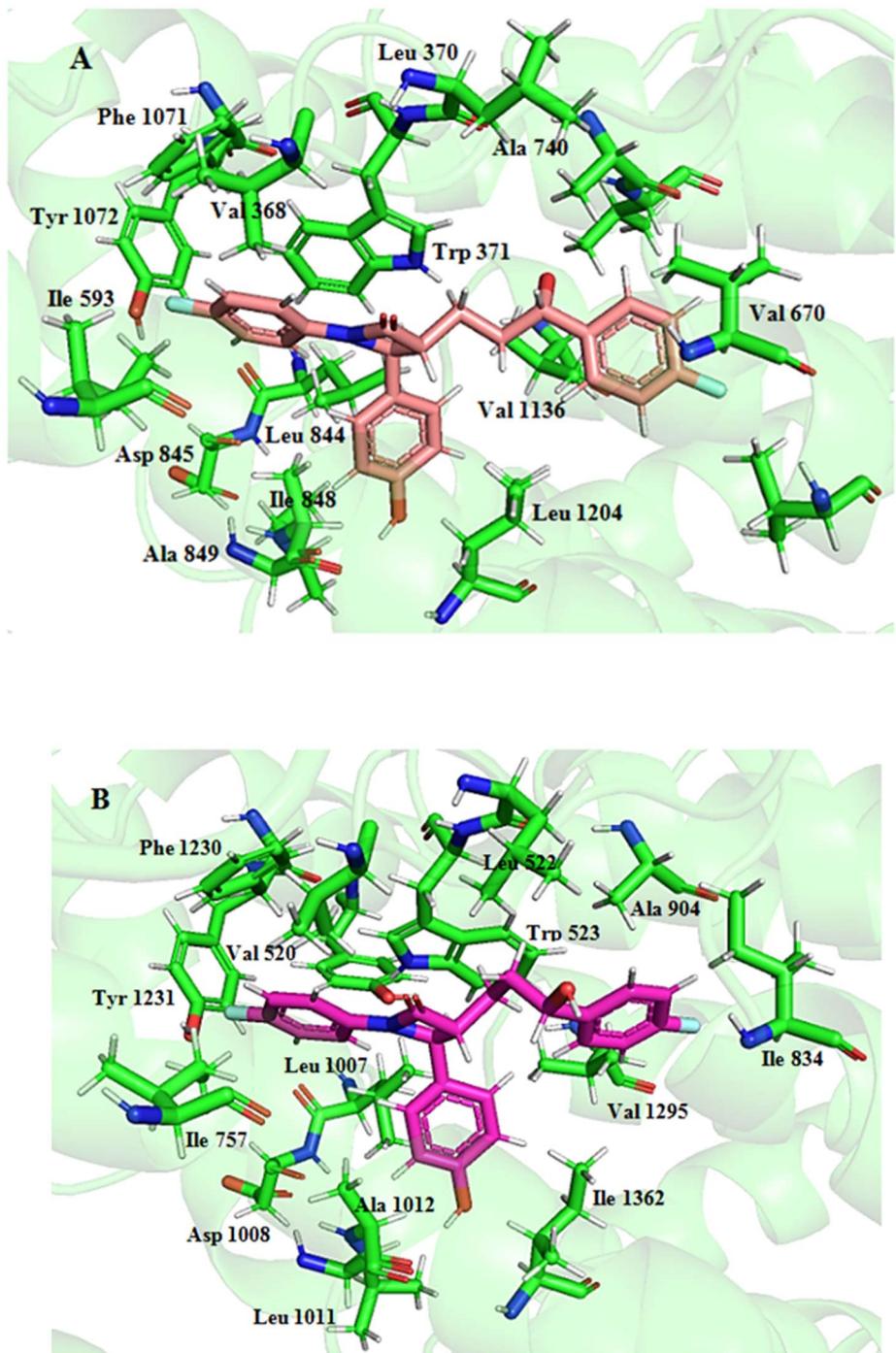


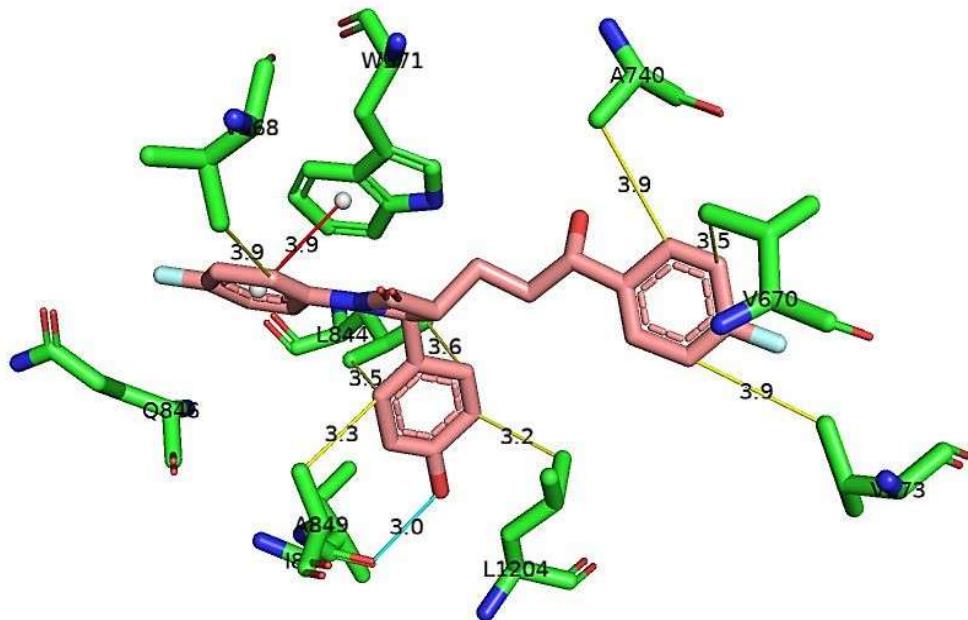
Figura 23: interação da ezetimiba com os resíduos do sítio de interação do transportador de colesterol A) no modelo *Ixodes scapularis*; B) no modelo *Rhipicephalus microplus*.

Ao analisar as interações hidrofóbicas do ligante com a proteína, no modelo do carrapato *R. microplus* (11 interações, Tabela 6) o ezetimiba possui 3 pontos de ancoramento a mais com a proteína, em comparação com o modelo do carrapato *Ixodes scapularis* (8 interações, Tabela 5); em ambos os sítios, ocorre uma ligação de hidrogênio com a carbonila do ligante e, por último, é vista somente na cavidade do modelo *I. scapularis* (Tabela 5) uma interação do tipo empilhamento p entre um anel aromático do ligante com a cadeia lateral do resíduo Trp371. Esta é uma interação não covalente que ocorre quando dois anéis aromáticos se empilham paralelamente. A interação é favorecida quando os sistemas p estão deslocados, que é o que podemos observar na *p*-F-fenila do ligante. Esse tipo de interação está diretamente ligado a estabilidade da estrutura de proteínas e na formação de complexos proteína-ligante. (FOKOUÉ *et al.* 2020).

Como pode ser observado nas tabelas 3 e 4, a diferença na pontuação entre as soluções de menor RMSD nos modelos foi mínima, assim, cabe destacar que nenhuma interação intermolecular foi predominante para este fator. Nota-se que o efeito total das interações, em cada caso, é muito semelhante, com uma ligeira vantagem para *I. scapularis*, tendo em vista que o PLIP não avalia energia dessas interações.

Visto isso, é possível observar que além da interação da ezetimiba com a proteína humana existe também uma interação com a proteína presente no metabolismo de colesterol dos dois carrapatos. Dessa maneira, pode-se afirmar que o ezetimiba também seria capaz de interagir favoravelmente com a proteína transportadora de colesterol nesses organismos.

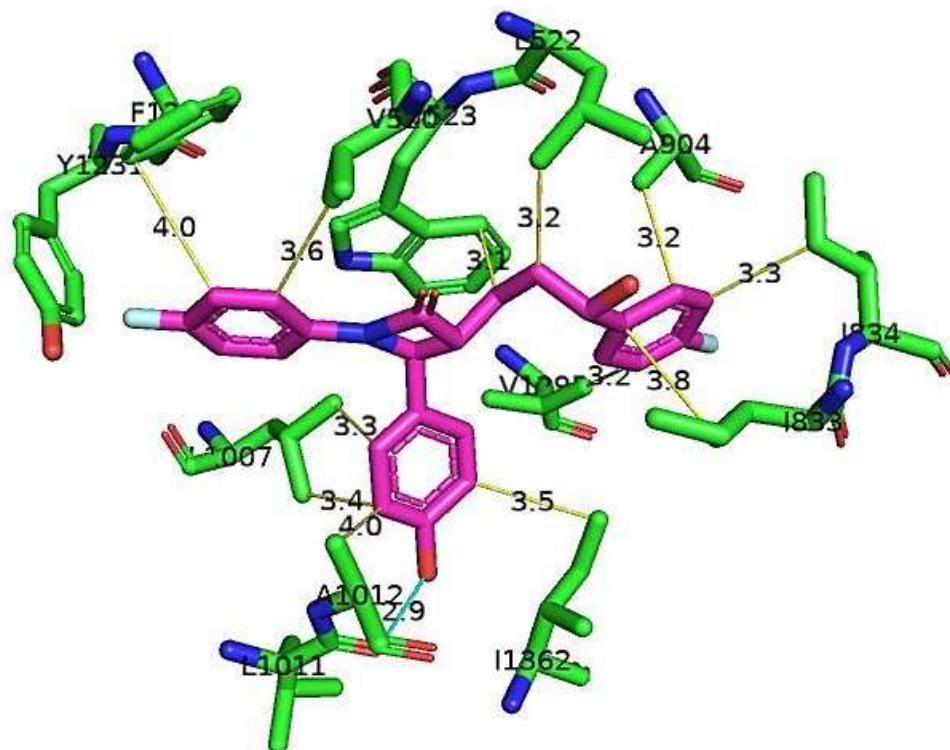
Tabela 6: Interações intermoleculares identificadas na cavidade do modelo *Ixodes scapularis*, pelo servidor PLIP.



Interação	Resíduo da proteína	Distância (Å)
Hidrofóbica (tracejado em amarelo)	Val 368	3,91
	Val 670	3,51
	Val 673	3,93
	Ala 740	3,92
	Leu 844	3,64
	Leu 844	3,54
	Ala 849	3,30
	Leu 1204	3,20
Ligação de H (tracejado em ciano)	Ile 848	3,0
π-stacking	Trp 371	3,90

(tracejado em vermelho)

Tabela 7: Interações intermoleculares identificadas na cavidade do modelo *Rhipicephalus microplus*, pelo servidor PLIP.



Interação	Resíduo da proteína	Distância (Å)
Hidrofóbica (tracejado em amarelo)	Val 520	3,60
	Leu 522	3,20
	Trp 523	3,10
	Ile 833	3,80
	Ile 834	3,32

	Ala 904	3,20
	Leu 1007	3,34
	Ala 1012	4,00
	Phe 1230	4,00
	Val 1295	3,21
	Ile 1362	3,52
<hr/>		
Ligaçāo de H (tracejado em ciano)	Leu 1011	2,90

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados experimentais citados, conclui-se que o perfil observado nas linhagens de células embrionárias do carapato *Rhipicephalus microplus* é composto majoritariamente por colesterol e éster de colesterol, semelhante ao descrito por Angelo et al (2013) que observou o mesmo perfil no corpo gorduroso. A exposição das culturas de células ao fármaco ezetimiba resulta na morte celular dependente da concentração. Ou seja, quanto maior a concentração de ezetimiba maior a morte celular. Além disso, é possível observar que também apresenta influência na quantificação de lipídeos uma vez que os níveis de CHO e CHO-E apresentam diminuição ao longo das horas. Estes resultados reforçam a utilidade das células de carrapatos como um modelo de estudo da biologia destes artrópodes em ambiente controlado. Além disso, foi possível observar que o método de cromatografia em camada delgada é eficiente para análises do perfil lipídico em células de carapato.

Os resultados teóricos, obtidos pela modelagem molecular, mostram que a ezetimiba tem a capacidade de interagir favoravelmente com os modelos construídos da proteína transportadora presente no metabolismo de colesterol dos carrapatos *Ixodes scapularis* e *Rhipicephalus microplus*. É possível sugerir, também, que a ezetimiba ligeiramente possui uma interação mais vantajosa com o transportador de

colesterol do carrapato *Ixodes scapularis* quando comparado com a interação com o modelo do *Rhipicephalus microplus*, porém um estudo sobre a energia dessas interações e dos complexos formados poderia fornecer uma informação mais detalhada sobre o comportamento observado.

Sobretudo, ainda são necessárias análises complementares para melhor elucidação destes resultados, por isso, este trabalho é o ponto inicial para um conjunto de análises adicionais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAN, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current pharmaceutical biotechnology**, 17(14), 1213–1221.2016;
- ANDRADE-NETO, V.V., CUNHA-JÚNIOR, E.F., CANTO-CAVALHEIRO, M.M., ATELLA, G.C., FERNANDES T.A., COSTA P.R.R., TORRES-SANTOS, E.C., **Antimicrob Agents Chemother** 2016;
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff, M., Roberts, K. e Walter, P. Molecular Biology of the Cell. **Programmed Cell Death (Apoptosis)**. 4^a edição. Nova York: Garland Science; 2002.
- ANGELO, Isabelle C. Neutral Lipid composition changes in the fat bodies of engorged females *Rhipicephalus microplus* ticks in response to fungal. **Parasitol Res** 112 p 501–509, 2013;
- ANTHONY J. Busti, MD, PharmD, FNLA, FAHA. “The Mechanism of Action of Ezetimibe (Zetia) on the Inhibition of Cholesterol Absorption”. **Evidence-based medicine consult** 2015;
- Ahmed TA, Ali EMM, Omar AM, Almehmady AM, El-Say KM. Enhancing Ezetimibe Anticancer Activity Through Development of Drug Nano-Micelles Formulations: A Promising Strategy Supported by Molecular Docking. **Int J Nanomedicine**. 2023 Nov 15;18:6689-6703;
- BELL-SAKYI L. *Ehrlichia ruminantium* grows in cell lines from four ixodid tick genera. **Journal of comparative pathology**, 130(4), 285–293 2004;
- BELL-SAKYI, L. Continuous cell lines from the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **The Journal of parasitology**, 77(6), 1006–1008. 1991;
- BELL-SAKYI, L.; PAXTON, E. A.; MUNDERLOH, U. G.; SUMPTION, K. J. Growth of *Cowdria ruminantium*, the causative agent of heartwater, in a tick line. **Journal of Clinical Microbiology** v. 38, n. 3, p. 1238-1240, 2000;

BENDELE, K.G., Guerrero F.D., Cameron C., Bodine D.M., Miller R.J.. Gene expression during the early stages of host perception and attachment in adult female *Rhipicephalus microplus* ticks. **Exp Appl Acarol.** 2019;

BURNETT, D. A. et al. Azetidinones as inhibitors of cholesterol absorption. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 37, o. 1733-1736, 1994;

CASTRO-JANER, E., Martins, J. R., Mendes, M. C., Namindome, A., Klafke, G. M., & Schumaker, T. T. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. **Veterinary parasitology**, 173(3-4), 300–306. 2010;

CROWLEY, L. C., Marfell, B. J., Christensen, M. E., & Waterhouse, N. J. (2016). Measuring Cell Death by Trypan Blue Uptake and Light Microscopy. **Cold Spring Harbor protocols**, 2016(7);

DE DIOS-BLÁZQUEZ L, CANO-ARGÜELLES AL, PÉREZ-SÁNCHEZ R, GONZÁLEZ-SÁNCHEZ M, OLEAGA A. First data on cholesterol metabolism in *Ornithodoros* argasid ticks: Molecular and functional characterization of the N-terminal domain of Niemann-Pick C1 proteins. **Ticks Tick Borne Dis.** 2024;

DONG D, XU Z, ZHONG W, PENG S. Parallelization of Molecular Docking: A Review. **Curr Top Med Chem.** 2018;18(12):1015-1028.

DONG, J. et al. ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. **Journal of cheminformatics**, v. 10, n. 1, 2018.

EISEN, R. J., Eisen, L. The Blacklegged Tick, *Ixodes scapularis*: An Increasing Public Health Concern. **Trends in parasitology** 2018;

EUROPEAN Food Safety Authority (EFSA), Reich H, Triacchini GA. Occurrence of residues of fipronil and other acaricides in chicken eggs and poultry muscle/fat. **EFSA J.** 2018;

EWING, S. A., MUNDERLOH, U. G., BLOUIN, E. F., KOCAN, K. M.; KURTTI, T. J. *Ehrlichia canis* in tick cell culture. *Proceedings of the 76th Conference*

of Research Workers in Animal Diseases, Chicago, USA, 13–14 November 1995.
Ames: Iowa State University Press (Abstract no. 165). 1995;

FERREIRA, F. B. et al. Structure-Based Discovery of Thiosemicarbazone Metalloproteinase Inhibitors for Hemorrhage Treatment in Snakebites. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, p. 1136-1141, 2017.

FOKUEA, H. H., PINHEIROA, P. S. M., FRAGAA, C. A. M. e SANT'ANNA C. M. R. HÁ ALGO NOVO NO RECONHECIMENTO MOLECULAR APLICADO À QUÍMICA MEDICINAL? **Quim. Nova**, Vol. 43, No. 1, 78-89, 2020.
<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170474>

GARCIA M.V., RODRIGUES, V.S., KOLLER, W.W., ANDREOTTI, K. Biologia e importância do carapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. p. 17-27. **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. Embrapa, Brasília, Distrito Federal.** 2019;

GONDIM, Katia C. et al. Lipid metabolism in insect disease vectors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 101, p. 108–123, 2018;

GONZALES, J.C. O carapato do boi: vida, resistência e controle. **São Paulo: Mestre Jou**, 101p., 1974;

GUAN, X. L., Cestra, G., Shui, G., Kuhrs, A., Schittenhelm, R. B., Hafen, E., van der Goot, F. G., Robinett, C. C., Gatti, M., Gonzalez-Gaitan, M., & Wenk, M. R. Biochemical membrane lipidomics during *Drosophila* development. **Developmental cell**, 24(1), 98–111 2013;

GUGLIELMONE, A. A., Robbins R.G., Apanaskevich D. A., Petney T. N., Estrada-Peña A, Horak I. G. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa** 2528(6): 1-28. 2010;

GUIDO, R. V.C & ANDRICOPULO, A. D. Modelagem Molecular de Fármacos. **Revista Processos Químicos**, p 24-36, 2008.

GU J, ZHU N, LI HF, et al. Ezetimiba e câncer: existe uma conexão? **Frente Farmacol** . 2022;13.IWUALA, M. O. E.; UMEZURIKE, G. M.; NWADIOGBU, N.

A Quantitative studies of the lipid components of eggs of *Boophilus decoloratus* (Koch) (Ixodoidea : Ixodidae). **Acarologia**, v.21, n.3-4, p.340-345, 1979;

JIANG, Q. X. Cholesterol-Dependent Gating Effects on Ion Channels. **Advances in experimental medicine and biology** 2019;

KURTTI, T. J.; BÜSCHER, G. Trends in tick cell culture. In: MARAMOROSCH, K.; HIRUMI, Academic Press H. **Practical Tissue Culture Applications**, New York:, 1979;

KUNTZ, I. D. et al. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal of molecular biology**, v. 161, n. 2, p. 269-288, 1982.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; AHLSTRAND, G. G. Tick tissue and cell culture in vector research. In: HARRIS, K. F. **Advances in disease vector research**, v. 5, New York: Springer-Verlag, 1988a, p. 87-109;

LAFONT, R., C. Dauphin-Villemant, J. T. Warren, and H. Rees. "Ecdysteroid Chemistry and Biochemistry." In **Comprehensive Molecular Insect Science** 2005;

LEAL, A.T., Seixas, A., Pohl, P.C., Ferreira, C.A.S., Logullo, C., Oliveira, P.L., Farias, S.E., Termignoni, C., Vaz, I.D., Masuda, A. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 114, 341 e 345. 2006;

LEHNINGER, Nelson, David L.; Cox, Michael M.- **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 6º Ed, p 859, 2014;

LIOUDAKI, E., Ganotakis, E.S., Mikhailidis, D.P. Ezetimibe: more than a low density lipoprotein cholesterol lowering drug? An update after 4 years. **Curr.Vasc. Pharmacol.** 9, 62–86. 2011;

Lucifora, J., Esser, K., & Protzer, U. A ezetimiba bloqueia a infecção pelo vírus da hepatite B após a absorção do vírus nos hepatócitos. **Pesquisa antiviral**, 97 (2), 195– 197. 2012;

MAJEROWICZ, David; GONDIM, Katia C. Insect lipid metabolism: Insights into gene expression regulation. In: MANDAL, SS (Ed.). **Recent Trends in Gene Expression.** [s.l.] : Nova Science Publishers, p. 147–189, 2013;

MANGIA, C., VISMARRA, A., GENCHI, M., EPIS, S., BANDI, C., GRANDI, G., BELL-SAKYI, L., OTRANTO, D., PASSERI, B., KRAMER, L. Exposure to amitraz, fipronil and permethrin affects cell viability and ABC transporter gene expression in an *Ixodes ricinus* cell line. **Parasites & Vectors** volume 11, Article number: 437 2018;

MAURER, P., Jean-Pierre -P Girault, Marc Larchevêque, and René Lafont. "24-Epi- makisterone a (Not Makisterone A) Is the Major Ecdysteroid in the Leaf-cutting Ant *Acromyrmex Octospinosus* (Reich) (Hymenoptera, Formicidae: Attini)." **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. 1993;

Maxfield F. R. Plasma membrane microdomains. **Current opinion in cell biology**, 14(4), 483–487. 2002;

MAYA-MONTEIRO, C. M., Daffre, S., Logullo, C., Lara, F. A., Alves, E. W., Capurro, M. L., Zingali, R., Almeida, I. C., & Oliveira, P. L. HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **The Journal of biological chemistry**, 275(47): 36584–89. 2000;

MENDES, B. H. M. Uma Nova Abordagem na Busca de Inibidores de Metaloproteases de Matriz (MMP): Estudos de Semicarbazonas e Tiossemicarbazonas Via Modelagem Molecular. 2023. 192p. **Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

MOLINARO, E.M. Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. Vol 2. **Rio de Janeiro: EPSJV**; IOC, 2010.

MORAES, J.. Embriogênese do carapato bovino *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*: uma visão integrada do metabolismo energético e caracterização de uma triose fosfato isomerase. 93f. **Rio de Janeiro, RJ. (Dissertação de doutorado em biociências e biotecnologia). Programa de Pós-graduação em biociências e biotecnologia**.

Universidade Estadual do Norte Fluminense 2007;

MUNDERLOH, U. G.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M.; GE, N. L.; EDWARDS, W. L.; KURTTI, T. J. Establishment of the tick (Acari: Ixodidae) borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 4, p. 656-664, 1996;

OBAID , M.K., ISLAM N., ALOUFFI, A., KHAN ,AZ, I. da Silva Vaz Jr., TANAKA T., Ali, A. Resistência a acaricidas em carrapatos: seleção, diagnóstico, mecanismos e mitigação. **Frente. Infecção celular. Microbiol.** , 12 (2022) , Artigo 941831

NGHIEM-RAO, T. H.; MAVIS, A.; PATEL, S. B. Cholesterol and Lipoproteins. The impact of natural infestations of ticks in Zambia on the productivity of cattle and implications for tick control strategies in central Africa. **Parasitologia. Reference Module in Biomedical Sciences.** 3° ed.: Elsevier, 2014. PEGRAM, R.G., Chizyuka H.G. 1990;

Pinzi L, Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **Int J Mol Sci.** 2019 Sep 4;20(18):4331. doi: 10.3390/ijms20184331. PMID: 31487867; PMCID: PMC6769923.

QUARTACCI, M. F., GLISIĆ, O., STEVANOVIĆ, B., & NAVARI-IZZO, F. Plasma membrane lipids in the resurrection plant *Ramonda serbica* following dehydration and rehydration. **Journal of experimental botany** 2002;

REWITZ, K. F., R. Rybczynski, J. T. Warren, and L. I. Gilbert. "The Halloween Genes Code for Cytochrome P450 Enzymes Mediating Synthesis of the Insect Moulting Hormone." In **Biochemical Society Transactions** 2006;

SALATA, C., Moutailler, S., Attoui, H., Zweygarth, E., Decker, L., & Bell-Sakyi, L. How relevant are in vitro culture models for study of tick-pathogen interactions. **Pathogens and global health**, 115(7-8), 437–45 2021;

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). **Química Nova**, v. 25, p. 505-512, 2002.

SANT'ANNA, C. M. R. Uma introdução a modelagem molecular aplicada à química medicinal. In: BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. 3. ed., 2015. Cap. 5, p. 231-248.

SEEGMILLER, A. C., DOBROSOTSKAYA, I., GOLDSTEIN, J. L., Ho, Y. K., BROWN, M. S., & RAWSON, R. B. The SREBP pathway in Drosophila: regulation by palmitate, not sterols. **Developmental cell**, 2(2), 229–238. 2002;

SHAKVA, M., Kumar, S., Fular, A. et al. Emergence of fipronil-resistant *Rhipicephalus microplus* populations in Indian states. **Exp Appl Acarol** 80 , 591–602 2020;

SUAREZ, C.E. & Noh S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**. 180(1-2): 109-125. 2011;

TOHIDI-ESFAHANI, D., Graham, L. D., Hannan, G. N., Simpson, A. M., & Hill, R. J. An ecdysone receptor from the pentatomomorphan, *Nezara viridula*, shows similar affinities for moulting hormones makisterone A and 20- hydroxyecdysone. **Insect biochemistry and molecular biology**, 41(2), 77–89. 2011;

TORINA, A., Moreno-Cid J.A., Blanda V., Fernández de Mera I.G., de la Lastra J.M., Scimeca S., Blanda M., Scariano M.E., Briganò S., Disclafani R., Piazza A., Vicente J., Gortázar C., Caracappa S., Lelli R.C., de la Fuente J. Control of tick infestations and pathogen prevalence in cattle and sheep farms vaccinated with the recombinant Subolesin-Major Surface Protein 1a chimeric antigen. **Parasit Vectors**. 2014;

VARMA, M. G. R.; PUDNEY, M.; LEAKY, C. J. The establishment of three cell lines from the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) and their infection with some arboviruses. **Journal of Medical Entomology**, v. 11, n. 6, p. 698-706, 1975;

VECHTOVA, P., Fussy Z., Cegan R., Sterba J., Erhart J., Benes V., Grubhoffer L. Catalogue of stage-specific transcripts in *Ixodes ricinus* and their potential functions during the tick life-cycle. **Parasit Vectors**. 2020;

VINCI, G., Xia, X., & Veitia, R. A. Preservation of genes involved in sterol metabolism in cholesterol auxotrophs: **facts and hypotheses**. *PLoS one*, 2008;

XAVIER, M. A., Brust, F. R., Waldman, J., Macedo, A. J., Juliano, M. A., da Silva Vaz, I., Jr, & Termignoni, C. Interfering with cholesterol metabolism impairs tick embryo development and turns eggs susceptible to bacterial colonization. **Ticks and tick-borne diseases**, 2021;

XIAO-XUE Ke, Huijuan Chao, Muhammad Nadeem Abbas, Saima Kausar, Isma Gul, Haoyan Ji, Liqun Yang, Hongjuan Cui. Niemann-Pick type C1regulates cholesterol transport and metamorphosis in silkworm, *Bombyx mori* (Dazao), **International Journal of Biological Macromolecules** 2020;

ZHUANG, M., Oltean, D. I., Gómez, I., Pullikuth, A. K., Soberón, M., Bravo, A., & Gill, S. S. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. **The Journal of biological chemistry**, 277(16), 13863–13872 2002.