

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

RENAN DE SOUZA BIN

**Caracterização da propriedade inibitória de angiogênese de uma
proteína salivar de carrapato *Rhipicephalus microplus*.**

RENAN DE SOUZA BIN

**Caracterização da propriedade inibitória de angiogênese de uma
proteína salivar de carrapato *Rhipicephalus microplus*.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO **PARCIAL** DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Bin, Renan de Souza

Caracterização da propriedade inibitória de angiogênese de uma proteína salivar de carrapato ligante de igG, Ribeirão Preto, 2023.

126 p f.

Dissertação de Mestrado, apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP.
Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Santos, Isabel Kinney Ferreira de Miranda.

1. IGBP; 2. angiogênese; 3.gangliosídeos; 4.saliva do carrapato; 5.Domínio do ativador gangliósido GM2; 6.tumores.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de Paulo para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em:

Banca examinadora

Profª. Dra. Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos.

Instituição: Universidade de São Paulo.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Roger Chammas

Instituição: Universidade de São Paulo.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Minha avó Tereza, que sempre me incentivou a ser uma pessoa curiosa e observar o mundo ao meu redor. (*In Memoriam*).

Especialmente toda a minha família: minha mãe Renata, meu pai Luiz, por me proporcionarem a oportunidade de um dos meus maiores bens, que é o estudo. Juntamente com meu irmão, Luan, sempre acreditaram na minha capacidade e nas minhas ideias. Obrigado por todo o amor incondicional e carinho, além de servirem de abrigo nos meus momentos de fragilidade. Minhas tias Magali, Sandra, Aline e Ana, meu tio Juliano e meu avô Amado. Às minhas primas Karla, Rafaela, Maria Eduarda, Maria Clara e Ana Paula, que mesmo acompanhando-me de longe, estiveram presentes.

Aos meus amigos de vida que sempre me acompanham, vibram e me dão suporte quando necessário Gabriela castro, Gabriela nunes, Henrique Paschoalino, Lidiane Bortolotti, Gustavo Leoni e em especial a Mayssa Andrade por sempre estar a disposição em me ajudar de várias formas e por todo carinho que existe em nossa amizade.

A Prof^ª. Dra^a. Isabel por ter me dado a oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa; pela orientação e ajuda durante o meu mestrado; pela confiança depositada em mim e por compartilhar o seu conhecimento e histórias de vida. Com toda a certeza, uma das minhas maiores inspirações científicas.

A Liliana Moura Massis (Lili), por acreditar em mim no começo da minha graduação e por me inspirar com todo o seu amor por imunologia. Através dela, me encontrei na biologia.

Aos meus amigos do departamento de imunologia, pela amizade, companhia, auxílio, apoio e festinhas, claro. A Isabela Daher, Ana Julia Bittar, Aline Carvalho, Ualter Cipriano, Jefferson Elias, Fernanda Mesquita, Ítalo Souza, Nayara Pereira, Anderson Santos. Em especial, Joseana de Oliveira que se fez presente dentro e fora da instituição.

A todos os alunos do laboratório de Imunoparasitologia da FMRP-USP, que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho e sempre proporcionaram um ambiente de trabalho descontraído e amigável: Jessica Fiorotti, Mauricio Pena, Marina Grejo e Thales Galdino. Em especial, Jessica e

Mauricio, que não mediram esforços para me auxiliar com o andamento do projeto, além de conselhos e experiências de vida.

A Barbara Yasmim, uma grande amiga do departamento de biologia celular, que me acompanhou e auxiliou em experimentos. Agradeço por toda a parceria e amizade.

Ao Vinicius Mendes e Diego Araújo, por toda companhia e parceria na maior parte do tempo.

Aos funcionários e técnicos Olinda Mara, Wander Ribeiro, Denise Ferraz, Wendy Martins, Izaira Brandão, Ana Flávia, Rosi, Elizabete Rosa e Maria Ivone, pela ajuda com equipamentos, informações e experimentos. Em especial, a técnica Dorlei Santos, pelo amor, amizade, apoio e ajuda no laboratório, sem esquecer dos quitutes, claro.

Ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, que me proporcionou grandes momentos de aprendizado e sempre me serviu como casa na maior parte do tempo nesses últimos 2 anos.

Ao Profº. Drº. Roger Chammas e à Pesquisadora Jr. Mara de Souza Junqueira, pelo auxílio, atenção e por terem me recebido tão bem no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo - ICESP e na Faculdade de Medicina da USP.

Ao Profº. Drº. Ivarne Luis dos Santos Tersariol e ao Profº. Drº. Fábio Dupart Nascimento por me terem recebido na Universidade Federal De São Paulo - UNIFESP e auxiliado com o projeto.

À empresa GloboBiotech-GloboAves, pela doação dos ovos embrionados utilizados no projeto.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP, juntamente com a FMRP-USP.

“O Guia diz que há toda uma arte para voar – respondeu Ford. – Ou melhor, um jeitinho. O jeitinho consiste em aprender como se jogar no chão e errar.”.

Douglas Adam

RESUMO

BIN, R.S. Caracterização da propriedade inibitória de angiogênese de uma proteína salivar de carrapato *Rhipicephalus microplus*. 2023. Tese (Mestrado) - Imunologia Básica e Aplicada – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Os carrapatos duros se alimentam de sangue da poça hemorrágica que formam na pele de seus hospedeiros. Conseqüentemente, eles ingerem grandes quantidades de imunoglobulinas. Para ajudar o repasto de sangue pelo carrapato fêmea, os carrapatos machos secretam saliva contendo vários tipos de proteínas, sendo uma delas a proteína de ligação a IgG (IGBPs). Estudos anteriores demonstraram que as IGBPs ligam nas porções constantes (Fc) de imunoglobulinas e interferem nas funções efetoras dessas proteínas. Também demonstraram no ensaio de angiogênese em Matrigel que a IGBP era forte inibidor desse processo biológico. Por meio do software interpro foi observado bioinformaticamente que a IGBP possui um domínio do ativador gangliosídeo 2 monossialilado (GM2A). O GM2A é um cofator de β -hexosaminidase A, que catalisa a degradação de ceramidas sialiladas, ou gangliosídeos, em membranas de células eucarióticas. Os gangliosídeos livres são eliminados em grandes quantidades por células durante a inflamação e reparo de feridas e em doenças como retinopatias e câncer, processos que envolvem angiogênese. Considerando esses dados, examinamos se a IGBP inibe a angiogênese no modelo de membrana corioalantóide de embriões de galinha e, por meio de arranjo de qPCR para processo de angiogênese, demonstramos que a IGBP impactava significativamente a expressão gênica de células endoteliais de coelho tratadas com a proteína. Demonstramos que a IGBP se liga na membrana de células tumorais por meio de imunofluorescência. Em outro modelo, em camundongos C57Bl / 6 e BALB/c, examinamos o efeito do IGBP no crescimento do tumor e formação de vasos neles. Dessa maneira foi possível mostrar que a IGBP diminui a vascularização da membrana corioalantóide e que inibe os tumores, reduzindo sua vascularização e disponibilidade de gangliosídeos promotores de tumor. Esses resultados podem indicar que a IGBP merece ser desenvolvida como uma nova droga antitumoral, além de confirmar sua nova função antiangiogênica, mas que mais ensaios para descrever os mecanismos pelos quais ela possibilita esses resultados são necessários.

Palavras-chave: IGBP; angiogênese; gangliosídeos; saliva do carrapato; domínio do ativador gangliosídeo GM2; tumores.

ABSTRACT

BIN, R.S. Characterization of the angiogenesis inhibitory property of a salivary protein from the *Rhipicephalus microplus* tick. 2023. Thesis (Master's) - Basic and Applied Immunology - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Ticks feed on blood from the hemorrhagic pool they create on their host's skin. Consequently, they ingest significant amounts of immunoglobulins. To aid the female tick's blood meal, male ticks secrete saliva containing various types of proteins, including Immunoglobulin G-binding proteins (IGBPs). Previous studies have shown that IGBPs bind to the constant regions (Fc) of immunoglobulins and interfere with the effector functions of these proteins. They have also demonstrated strong inhibitory effects of IGBP on the angiogenesis process in the Matrigel assay. Through bioinformatic analysis using InterPro software, it was observed that IGBP possesses a domain similar to the monosialylated ganglioside activator 2 (GM2A). GM2A is a cofactor for β -hexosaminidase A, which catalyzes the degradation of sialylated ceramides, or gangliosides, in the membranes of eukaryotic cells. Free gangliosides are released in large quantities by cells during inflammation, wound repair, and in diseases such as retinopathies and cancer, processes involving angiogenesis. Considering this data, we examined whether IGBP inhibits angiogenesis in the model of the chorioallantoic membrane of chicken embryos and demonstrated through qPCR array for the angiogenesis process that IGBP significantly impacted the gene expression of rabbit endothelial cells treated with the protein. We also demonstrated that IGBP binds to the membrane of tumor cells through immunofluorescence. In another model, using C57Bl/6 and BALB/c mice, we examined the effect of IGBP on tumor growth and vascular formation. In this way, it was possible to show that IGBP reduces the vascularization of the chorioallantoic membrane and inhibits tumors by reducing their vascularization and availability of tumor-promoting gangliosides. These results suggest that IGBP deserves to be developed as a new anti-tumor drug, in addition to confirming its new anti-angiogenic function. However, further assays are required to describe the mechanisms by which it enables these results.

Keywords: IGBP; angiogenesis; gangliosides; tick saliva; GM2 ganglioside activator domain; tumor.

