

ERICA MIE AKAGI

Avaliação dos efeitos de um inibidor do tipo Kunitz (Amblyomin-X)  
em culturas celulares de carcinoma renal.

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina para  
obtenção do título de Mestrado  
em Ciências pelo programa de  
pós-graduação em Biologia  
Molecular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Marisa Chudzinski-Tavassi

São Paulo  
2010

Akagi, Erica Mie

Avaliação dos efeitos de um inibidor do tipo Kunitz (Amblyomin-X) em culturas celulares de carcinoma renal. / Erica Mie Akagi. – São Paulo, 2010.

xvii, 67p.

Tese de Mestrado – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina.  
Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular.

Titulo em inglês: Effects of a Kunitz-type inhibitor (Amblyomin-X) on cell cultures of renal carcinoma.

1. Carcinoma de Células Renais. 2. Amblyomin-X. 3.Morte Celular. 4. Ciclo Celular. 5. IL-6.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA**

**Chefe do Departamento:**

Profa. Dra. Yara Maria Corrêa da Silva Michelacci

**Coordenadora do curso de Pós-Graduação:**

Profa. Dra. Helena Bonciani Nader

ERICA MIE AKAGI

Avaliação dos efeitos de um inibidor do tipo Kunitz (Amblyomin-X)  
em culturas celulares de carcinoma renal.

Presidente da Banca: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Marisa Chudzinski-Tavassi

Banca Examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dulcinéia Saes Parra Abdalla

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leny Toma

---

Prof. Dr. Magnus Régios Dias da Silva

Aprovada em: \_\_28\_\_ / \_\_Fevereiro\_\_ / \_\_2011\_\_

ESTE TRABALHO FOI REALIZADO NO LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA  
DO INSTITUTO BUTANTAN



**APOIO FINANCEIRO:**

FAPESP Processo 08/52338-7

## EPÍGRAFE

*E ainda que tivesse o dom de profecia,  
e conhecesse todos os mistérios e toda a  
ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de  
maneira tal que transportasse os  
montes, e não tivesse amor, nada seria.*

**I Coríntios 13:2**

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao meu amor Rafael, aos meus queridos pais, Carmen e Akagi; e a minha amiga e irmã Cristiane; pelo incentivo, esforço e, principalmente, amor que me dedicaram para que fosse possível conquistar mais esta etapa da minha vida. Amo muito vocês.*

## **AGRADECIMENTOS**

*A criação, execução e conclusão deste projeto não seria possível sem a preciosa colaboração de diversas pessoas que contribuíram para a sua realização. Com o risco de cometer alguma injustiça por omissão, gostaria de destacar algumas pessoas a quem devo uma palavra especial de agradecimento:*

*Primeiramente, agradeço a Deus por todas as graças e obstáculos que tive e terei durante o trajeto de minha vida.*

*Agradeço aos meus pais, Carmen e Akagi, que me proporcionaram grandes oportunidades, que me apoiaram e me repreenderam em todas as minhas decisões e atitudes, e por terem me amado muito.*

*Agradeço ao meu amor, melhor amigo e protetor, Rafael, que soube me apoiar, que esteve ao meu lado (mesmo nos momentos de garota enxaqueca), que me deu broncas e elogios nos momentos que mais precisei e que soube me amar do jeito que sou.*

*Agradeço a minha irmãzinha, Cristiane, por ter sido minha melhor amiga e confidente, por ter me agüentado e me auxiliado durante a minha trilha.*

*A minha orientadora, Dra. Ana Marisa Chudzinski-Tavassi, pela oportunidade que me foi oferecida, por me orientar, aconselhar e guiar meus passos inseguros neste árduo processo de transformação.*

*Aos meus amigos e colegas do laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan – Tainá Barros, Karla de Quequi, Paulo Luiz de Sá Junior, Daniel Furlim, Nicole Mambeli, Jafia Lacerda, Janaína Ventura, Simone Simons, Daniella Oliveira, Sandra Barreto, Linda Carrijo, Miriam Paola Flores, Luana, Kátia Moraes, Dra. Isabel Batista, Dra. Fernanda Faria, Heleusa, Adrian, Patrícia, Antonia, Valdeli, Beatriz, Márcia, Kleber – que me auxiliaram a realização deste trabalho. Obrigada por compartilharem todos esses momentos de experiências e ensinamentos desta etapa de minha vida. Que as amizades verdadeiras sejam eternas.*



*Agradeço ao Dr. Alexandre Pereira, Dra. Marilene Demasi, Dra. Maria Helena Belini, Dr. Durvanei Maria, por terem contribuído e auxiliado a conclusão deste trabalho.*

*Agradeço a Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, Profa. Dra. Leny Toma, Prof. Dr. Magnus Régios Dias da Silva, Profa. Dra. Vivien Jane Coulson Thomas, Que se prontificaram a examinar este trabalho.*

## SUMÁRIO

Epígrafe .....	v
Dedicatória.....	vi
Agradecimentos.....	vii
Lista de abreviaturas.....	xi
Lista de figuras.....	xiii
Lista de tabela.....	xv
Resumo .....	xvi
Abstract. ....	xviii
1. Introdução.....	1
1.1 Ciclo Celular. ....	3
1.2 Resposta Inflamatória em Tumores. ....	4
1.3 Mecanismos de Morte Celular.....	6
1.4 Proteassomo.....	7
1.5 Inibidores da Coagulação Sangüínea .....	10
1. Amblyomin-X .....	10
2 Objetivo .....	13
3 Materiais e Métodos.....	14
3.1 Cultura das Linhagens Tumerais Humanas e Murinas.....	14
3.2 Avaliação de citotoxicidade do Amblyomin-X.....	14
3.3 Análise do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo .....	15
3.4 Liberação de Interleucina-6.....	16
3.5 Determinação do tipo Morte Celular em Células Renca.....	16
3.5.1 Avaliação da Citotoxicidade por Citometria de Fluxo.....	16
3.5.2 Análise do tipo de Fragmentação do DNA.....	17
3.5.3 Análise de Células Apoptóticas por Microscopia de Fluorescência. ....	17
3.6 Potencial inibitório do Amblyomin-X sobre a atividade proteassômica .....	18
3.7 Análise Estatística.....	19
4 Resultados.....	20
4.1 Ação do Amblyomin-X em Células Caki-1 .....	20

4.1.1 Morfologia das Células Caki-1 pós tratamento .....	20
4.1.2 Viabilidade Celular por MTT .....	24
4.1.3 Análise das Fases do Ciclo Celular .....	26
4.1.4 Avaliação da Liberação de Interleucina-6 .....	29
4.2 Ação do Amblyomin-x em células Renca .....	31
4.2.1 Morfologia das Células Renca pós-tratamento .....	31
4.2.2 Viabilidade Celular por MTT .....	35
4.2.3 Análise das Fases do Ciclo Celular .....	37
4.2.4 Avaliação da Via de Morte por Citometria de Fluxo .....	42
4.2.5 Fragmentação do DNA em Extrato de Células Renca .....	46
4.2.6 Microscopia de Fluorescência .....	47
4.2.6.1 Tipo de Morte Celular .....	47
4.2.6.2 Modificações Morfológicas .....	48
4.2.7 Análise da Atividade Proteassômica .....	49
5 Discussão .....	51
6 Conclusão .....	55
7 Bibliografia .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Amblyomin-X** – *Amblyomma cajennense* inibidor de Fator Xá

**ATCC**- (American Type Culture Collection) Banco de Células Americano

**B16F10** – Melanoma Murino

**Caki-1** - Carcinoma Renal Humano

**CCR** - carcinoma de células renais

**CDDP** – Cisdiaminodicloroplatinum ou Cisplatina, é um agente quimioterápico freqüentemente usado para o tratamento de várias linhagens de neoplasias.

**CDKs** - ciclinas dependente de quinases

**CKI** - inibidor de ciclina dependente de quinase

**CHO** - *Chinese Hamster Ovarian*

**DMEM** – meio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMSO** – dimetilsulfóxido

**EDTA** – (Ethylenediamine tetraacetic acid) ácido etilenodiamino tetra-acético

**EGTA** - (ethylene glycol tetraacetic acid) ácido etileno glicol tetra-acético

**ELISA** – (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Ensaio Imunoenzimático

**ESTs** – (*Expressed Sequence Tags*) Caracteres de Seqüências Expressas

**FitC** - Fluorescein isothiocyanate

**FT** – Fator Tissular

**FVIIa** – Fator VII ativado da coagulação

**FXa** – Fator X ativado da coagulação

**HIF** - Fatores de Indução de Hipóxia

**HUVECs** – *Human Vein Endothelial Cells*

**IFN- $\alpha$**  – Interferon Alfa

**I $\kappa$ B** – inibidor do Fator Nuclear- $\kappa$ B

**IL-6** – Interleucina-6

**MgCl<sub>2</sub>** - Cloreto de Magnésio

**MIA PaCa-2** – Carcinoma de Pâncreas

**MMC** - Mitomicina C é um antimetabólito alquilante derivado do *Streptomyces caespitosus*, que atua bloqueando a replicação de DNA e RNA e inibindo a síntese protéica, comumente utilizado como quimioterápico.

**MMPs** – Metaloproteinase de Matriz

**MnSOD** – (Manganese Superoxide Dismutase) removedor de radicais livres

**MTT** - sal tetrazolium, 3-[4,5 dimethyl thiazole-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide

**NF- $\kappa$ B** - Fator Nuclear-kappaB

**NaCl** – Cloreto de sódio

**PBS** – (Phosphate buffered saline) Tampão Fosfato salino

**PCD** – Morte celular programada

**PDGF** – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

**PSMB2** - subunidade catalítica  $\beta$ 2 proteassômica

**Renca** - Adenocarcinoma Renal Murino

**Rpm** – Rotações por Minuto

**RPMI-1640** - (Roswell Park Memorial Institute) meio para cultivo celular

**SK Mel-28** – Melanoma Humano

**Suc-LLVY-AMC** - 7-amino-4-metilcumarina (AMC) peptídeo marcado que é amplamente utilizado como substrato para fluorogenico proteassomo 20S, calpaínas e outras proteases quimotripsina-like.

**TAMs** - Macrófagos Associados ao Tumor

**TAP** – Proteína Anticoagulante de Carrapato

**TFPI** – (tissue factor pathway inhibitor-1) inibidor do fator tecidual humano

**TGF- $\alpha$**  - Fator de Crescimento Transformante Alfa

**TNF- $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral Alfa

**VEGF** – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

**VHL** - von Hippel Lindau (gene supressor tumoral)

**z-ARR-AMC** - 7-amino-4-metilcumarina (AMC) peptídeo marcado que é amplamente utilizado como substrato para fluorogenico proteassomo 20S, calpaínas e outras proteases tripsina-like.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Degradação de Proteínas pelo sistema Ubiquitina-Proteassomo .....	8
Figura 2. Alinhamento estrutural de domínios Kunitz .....	11
Figura 3. Morfologia das células Caki-1 após 24 horas de tratamento .....	22
Figura 4. Morfológicas das células Caki-1 após 48 horas de tratamento.....	24
Figura 5. Viabilidade de Células Caki-1 após 24 horas de tratamento .....	25
Figura 6. Viabilidade de Células Caki-1 após 48 horas de tratamento .....	25
Figura 7. Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo (24 horas).....	26
Figura 8. Fases do Ciclo Celular de Caki-1 após 24 horas de tratamento .....	27
Figura 9. Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo (48 horas).....	28
Figura 10. Fases do Ciclo Celular de Caki-1 após 48 horas de tratamento .....	28
Figura 11. Concentração de IL-6 em Caki-1 após 24 horas de tratamento.....	29
Figura 12. Concentração de IL-6 em Caki-1 após 48 horas de tratamento.....	30
Figura 13. Morfologia das células Renca após 24 horas de tratamento .....	32
Figura 14. Morfologia das células Renca após 48 horas de tratamento .....	34
Figura 15. Viabilidade das células Renca após 24 horas de tratamento .....	35
Figura 16. Viabilidade das células Renca após 48 horas de tratamento .....	36
Figura 17. Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo (24 horas) .....	37
Figura 18. Fases do Ciclo das células Renca após 24 horas de tratamento .....	38
Figura 19. Distribuição das Fases do Ciclo Celular de Renca .....	39
Figura 20. Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo (48 horas) .....	40
Figura 21. Fases do Ciclo das células Renca após 48 horas de tratamento .....	41
Figura 22. Citotoxicidade por citometria de fluxo após 24 horas de tratamento ...	43
Figura 23. Apoptose em células Renca após 24 horas de tratamento.....	44
Figura 24. Citotoxicidade por citometria de fluxo após 48 horas de tratamento ...	44
Figura 25. Apoptose em células Renca após 48 horas de tratamento.....	45
Figura 26. Degradação do DNA em células Renca tratadas .....	46
Figura 27. Microscopia de Fluorescência de células Renca.....	47
Figura 28. Tipo de morte de células Renca tratadas .....	48
Figura 29. Potencial Pró-Apoptótico de Amblyomin-X em células Renca .....	49

Figura 30. Atividade Proteassômica do tipo Tripsina.....	50
Figura 31. Atividade Proteassômica do tipo Quimiotripsina.....	50

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Porcentagem de Citotoxicidade após 24 horas de tratamento ..... 43

Tabela 2. Porcentagem de Citotoxicidade após 48 horas de tratamento ..... 45



## RESUMO

O carcinoma de células renais (CCR) representa atualmente uma patologia de grande interesse clínico. Sua incidência vem aumentando, especialmente os achados acidentais, que hoje representam 50% dos casos novos diagnosticados <sup>(23)</sup>. Por tratar-se de patologia altamente resistente à quimioterapia e radioterapia, seu potencial de cura encontra-se no tratamento cirúrgico, quando em estádios iniciais, órgão-confinados <sup>(62)</sup>.

Inúmeros ensaios clínicos foram propostos para tratar tumores localmente avançados ou metastáticos, mas os resultados inconsistentes encontrados na literatura sejam com quimioterapia, imunoterapia, hormonioterapia ou radioterapia demonstram que a pesquisa clínica deverá progredir em outras direções <sup>(22)</sup>.

Foi produzida, em nosso laboratório, uma proteína recombinante oriunda de uma biblioteca de cDNA das glândulas salivares do carrapato *Amblyomma cajennense*, denominada Amblyomin-X, capaz de inibir o fator Xa de coagulação e de induzir a citotoxicidade em diferentes linhagens de células tumorais <sup>(24)</sup>.

Neste trabalho foram avaliados os efeitos do Amblyomin-X em culturas de adenocarcinoma de células renais murinas (Renca) e carcinoma de células renais humanas (Caki-1) com diferentes concentrações deste composto. Analisamos a morfologia e viabilidade celular, ciclo celular e o tipo de morte celular induzido pelo tratamento com a proteína. E também foi avaliado o potencial de inibição da atividade proteassômica frente ao tratamento com Amblyomin-X.

Os resultados mostraram que as linhagens Caki-1 e Renca são sensíveis ao Amblyomin-X, o qual induz modificações nas características morfológicas e viabilidade celular após 24 e 48 horas de tratamento. Observamos também que houve morte dose e tempo-dependente, modulação das fases G0/G1 e diminuição das fases S e G2/M do ciclo celular e que em altas concentrações de Amblyomin-X, devido ao seu efeito citotóxico, diminui todas as fases do ciclo celular. Em células Caki-1 ocorreu decréscimo dos níveis de Interleucina-6. Os resultados descritos neste trabalho sugerem que o Amblyomin-X induz citotoxicidade em células Renca através do mecanismo de Apoptose. Um dos possíveis alvos do Amblyomin-X é o sistema ubiquitina-proteassomo, visto que foi observada a inibição da atividade catalítica do proteassomo do tipo quimiotripsina em células tratadas com Amblyomin-X.

## ABSTRACT

The renal cell carcinoma (RCC) is currently a disease of great clinical interest. Its incidence is increasing, especially the incidental findings, which now represent 50% of new cases diagnosed. Because it is highly resistant to disease chemotherapy and radiotherapy, their potential to cure is the surgical treatment, while in the early stages, órgano-confined.

Numerous clinical trials have been proposed to treat locally advanced or metastatic tumors, but results are inconsistent in the literature with chemotherapy, immunotherapy, hormone therapy or radiotherapy have shown that clinical research should progress in other directions.

It was produced in our laboratory, a recombinant protein originating from a cDNA library of the salivary glands of *Amblyomma cajennense* called amblyomin-X, capable of inhibiting factor Xa coagulation and induce cytotoxicity in different tumor cell lines.

This study evaluated the effects of Amblyomin-X in cultured murine renal cell adenocarcinoma (Renca) and human renal cell carcinoma (Caki-1) at different concentrations (0.15 to 1.5  $\mu$ M) of this compound. We analyze the morphology and cell viability, cell cycle and the type of cell death induced by treatment with the protein. It also evaluated the potential of proteasome inhibition of the activity front in dealing with Amblyomin-X.

Then determine that the strains Caki-1 and Renca are sensitive to Amblyomin-X, which induces changes in morphology and cell viability after 24 and 48 hours of treatment with Amblyomin-X. We also observed that death was dose-dependent and time-dependent, inducing a decrease in all phases of the cell cycle and decreased levels of IL-6. The results described herein suggest that the Amblyomin-X induces cytotoxicity in Renca cells through the mechanism of apoptosis. One of the possible targets of Amblyomin-X is the ubiquitin- proteasome system, as was also observed inhibition of catalytic activity of the proteasome chymotrypsin type.

## 1. INTRODUÇÃO

O termo carcinoma de células renais (CCR) designa neoplasias renais de origem epitelial com potencial maligno. Este carcinoma é responsável por cerca de 3% das neoplasias malignas que acometem adultos, e 90 a 95% das neoplasias renais, sendo que sua incidência tem aumentado cerca de 3% ao ano. O paciente pode apresentar sintomatologia clínica variada, sendo esta freqüentemente silenciosa, diagnosticada tardiamente ou incidentalmente por exames de imagem.

O tecido que origina o CCR é o epitélio tubular renal proximal. Ocorrem nas formas esporádicas (não hereditária) e hereditárias. Em ambas ocorrem alterações estruturais do braço curto do cromossomo 3 (3p) (van den Berg A, Buys CHCM, 1997)(Alimov et al., 2000) alterações estas devidas a deleção ou translocação freqüentemente de 3p12-14, 3p21 e 3p25) (van den Berg A, Draaijers TG , 1997). Outras aberrações freqüentes no CCR são (Boer et al., 2000), trissomia de cromossomo 5, trissomia do 12 e 20 e perda dos cromossomos 8, 9, 13q e 14q.

Estudos genéticos de famílias com risco para desenvolvimento de câncer renal levam a clones de genes cujas alterações resultariam em desenvolvimento tumoral. Esses genes podem ser supressores tumorais (VHL, TSC) ou oncogenes (Takahashi et al., 2001) (Phillips et al., 2001).

A maioria das formas esporádicas e hereditárias de CCR está associada com alterações do gene supressor tumoral von Hippel Lindau (VHL). O VHL forma um complexo com várias proteínas que “marcam” os Fatores de Indução de Hipóxia (HIF) para serem degradados pelo proteassomo 26S. Mutações no gene VHL induzem a acumulação de HIF, isso resulta no aumento de transcrição de fatores de crescimento, como VEGF, PDGF, TGF- envolvidos na angiogênese (Vaziri et al., 2009).

Os tumores CCR são de 25 a 30% assintomáticos e descobertos incidentalmente por estudos de diagnóstico de imagem. Desenvolvendo quadros como Eritrocitose, insuficiência hepática não metastática (síndrome de Stauffer), polineuromiopia, amiloidose, anemia, febre, caquexia, perda de peso, hipercalcemia, dermatomiosite, aumento de velocidade de hemossedimentação, e hipertensão arterial sistêmica. Citocinas como a IL-6, eritropoetina e óxido nítrico liberados pelo tumor são responsáveis por essas condições.

Aproximadamente 30% dos pacientes com CCR apresentam doença metastática (pulmões 75%; tecidos moles 36%; ossos 20%; fígado 18%; SNC 8%; cutâneo 8%) ao diagnóstico e evoluirão com prognóstico sombrio, a despeito das terapêuticas utilizadas atualmente.

CCR é um tumor urológico de difícil cura, porque a radiação, a quimioterapia tradicional ou a terapia hormonal tem sido relativamente ineficaz, com apenas 10% dos pacientes demonstrando resposta a estes tratamentos. 25 - 57% dos casos de pacientes com CCR já apresentam metástase no momento do diagnóstico. Em outros casos, aproximadamente 60% dos pacientes, após a nefrectomia curativa, desenvolveram metástase dentro de 10 anos (Klatte et al., 2007). A média de sobrevida dos pacientes com doença metastática é de aproximadamente 8 meses (Vermeulen K, Bockstaele DRV, 2003).

Atualmente, não existe uma bem sucedida modalidade terapêutica para o tratamento da CCR.

Terapias com citocinas, incluindo IFN- $\alpha$  e IL-1, -2, e -12, tem sido o tratamento padrão para pacientes selecionados com CCRs recorrentes, metastático, ou não operáveis (Kadhim et al., 1997).

Uma série de nucleosídeos análogos, tais como gemcitabina (2', 2'-difluorodeoxycytidine) e floxuridine (2'-desoxi-5 - fluorouridine), têm sido utilizados para o tratamento da CCR em estudos pré-clínicos e estudos com graus variáveis de sucesso (Klatte et al., 2007).

Para o tratamento de CCR avançado tem-se utilizado uma pequena molécula inibidora do receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) denominada Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar®). Mais recentemente uma pequena molécula inibidora de quinase com atividade contra o VEGFR, foi aprovado sunitinib (SU11248, Sutent®), para os tratamentos de tumores CCR avançados (Chang et al., 2007).

No entanto, os benefícios de sobrevivência obtidos com esses tratamentos são normalmente acompanhados por importantes toxicidades e um potencial detrimento da qualidade de vida. Portanto, ainda existe uma necessidade de busca de novas drogas para o tratamento definitivo e eficaz do CCR.

## 1.1. CICLO CELULAR

Divisão celular consiste em dois processos consecutivos, caracterizados principalmente por replicação e segregação do cromossomo replicado em duas células separadas. Originalmente, o ciclo celular foi dividido em dois estágios: mitose (M) - o processo de divisão nuclear (citocinese); e interfase - intervalo entre as duas fases M, que se caracteriza por síntese de proteínas necessárias ao processo mitótico e duplicação do DNA. A interfase inclui as etapas G1, S e G2 (Vermeulen K, Berneman ZN, 2003). A replicação do DNA ocorre na fase S. A fase S é precedida por um “gap” chamado G1, durante o qual a célula se prepara para a síntese do DNA, e é seguido por um gap chamado G2 durante o qual a célula se prepara para a mitose. Células em G1 podem, antes de comprometer a replicação do DNA, entrar em um estado quiescente denominado G0 (Vermeulen K, Berneman ZN, 2003)(Vermeulen K, Bockstaele DRV, 2003).

O ciclo celular de mamíferos é controlado por uma subfamília de ciclinas dependente de quinases (CDKs) que são ativadas em pontos específicos do ciclo celular. A ativação é modulada por vários ativadores (ciclinas) e inibidores (inibidores Ink4, Cip e Kip). Até agora, foram identificadas nove CDKs e, destas, cinco são ativas durante o ciclo celular, ou seja, durante as fases G1 (CDK4, CDK6 e CDK2), S (CDK2), G2 e M (CDK1) (Malumbres et al., 2009).

Mutações associadas a tumores freqüentemente desregulam determinados complexos ciclina - CDK, resultando em outras contínuas proliferações ou re-entradas, não programadas, no ciclo celular, duas propriedades características da maioria das células tumorais humanas.

Diferentes estratégias de intervenção terapêutica podem modular a atividade de CDKs: estratégia indireta - regulação da atividade das CDK ; ou estratégia direta - inibição da atividade catalítica das CDK quinases. Abordagens para a estratégia indireta incluem super expressão de inibidores de ciclinas dependentes de quinase (CKI), síntese de peptídeos que mimetizam os efeitos de CKI, diminuição dos níveis de ciclinas, modulação da maquinaria proteasomal, modulação do estado de fosforilação da CDK e das enzimas que as regula (Malumbres et al., 2009).

Estratégias terapêuticas diretas levam em consideração a inibição específicas de CDKs (Malumbres et al., 2009)(Vermeulen et al., 2003).

## 1.2. RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM TUMORES

Células tumorais produzem muitas citocinas e quimiocinas que atraem leucócitos. Os componentes inflamatórios de uma neoplasia incluem além de moléculas quimioatrativas, uma população de leucócitos diversificada, como neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos, mastócitos e linfócitos, capazes também de produzir uma variedade de citocinas, fatores de crescimento e mediadores citotóxicos incluindo serino e cisteinoproteases, metaloproteinases de matriz (MMPs), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas e interferons.

Em muitos tumores sólidos a abundância de macrófagos associados ao tumor (TAMs) está relacionada a um prognóstico ruim. Através da liberação de uma grande variedade de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, citocinas e outros mediadores inflamatórios, os TAMs favorecem a angiogênese e aumentam o potencial invasivo das células tumorais (Leek et al., 2003)(Chen et al., 2005).

A mais importante via de regulação da resposta inflamatória é a via clássica do fator de transcrição NF-kappaB. Este fator induz a translocação de p65-p50 ativando genes que promovem proliferação e sobrevivência celular (Li Q and Verma I M, 2002).

Estudos recentes indicam ainda que o NF-kappaB é essencial no desenvolvimento do câncer resultante de doenças inflamatórias crônicas (Greten et al., 2004)(Luo et al., 2004)(Pikarsky et al., 2004). Assim, o controle do seu potencial oncogênico pode ser de grande importância na prevenção do desenvolvimento tumoral.

Citocinas são glicoproteínas de baixa massa molecular, que são rapidamente sintetizadas e normalmente secretadas por diferentes células (principalmente fagócitos mononucleares e linfócitos T ativados), principalmente após estimulação. Eles atuam em diferentes células-alvo adjacentes (pleiotropismo) muitas vezes de uma maneira aditiva, sinérgica, ou antagônica. Em organismos multicelulares, citocinas são mediadores intercelulares que regulam a sobrevivência, crescimento, diferenciação e as funções efetoras das células. Portanto, não é surpreendente que citocinas possam afetar

significativamente o crescimento tumoral *in vivo*. Por outro lado, elas também são produzidas por células tumorais e representam uma rede com uma variedade de membros de diferentes massas moleculares, que funcionalmente podem atuar estimulando ou inibindo o crescimento tumoral. Além disso, como as citocinas são mediadoras da resposta efetora da imunidade celular inata e adquirida, elas provavelmente estão envolvidas no mecanismo de evasão das células tumorais do sistema de imunovigilância (Nicolini et al., 2006).

A Interleucina-6 é uma citocina multifuncional produzida por vários tipos de células linfóides e não linfóide. As primeiras funções detectadas para a IL-6 foram a indução da diferenciação de células B e produção de imunoglobulinas. A IL-6 tem estimulado células hepáticas a sintetizar proteínas de fase aguda, desempenhando um papel na hematopoiese e na ativação de células T, e também atuar como um potente fator de crescimento para células de mieloma e plasmocitoma.

Células CCR secretam IL-6 e também expressam receptores de IL-6. Diversas publicações demonstram que a IL-6 desempenha um papel no crescimento dessas células. Além disso, a elevação do nível sérico IL-6 tem sido relatada como associada ao prognóstico de pacientes com tumor renal. No entanto, pouco se sabe sobre a correlação entre a expressão de IL-6 e a resistência das células CCR a agentes quimioterápicos antineoplásicos (Mizutani et al., 1995)( Vasto et al., 2008).

Vários agentes quimioterápicos antineoplásicos induzem a morte celular por apoptose, e IL-6 tem suprimido a indução deste tipo de morte ocasionado pelos agentes citotóxicos. Alguns agentes anticancerígenos quimioterapêuticos, como Cisplatina (CDDP) e Mitomicina C (MMC) exercem a sua atividade citotóxica em parte devido à geração de radicais livres. Tem sido relatado que IL-6 aumenta a expressão de MnSOD (Manganese Superoxide Dismutase) um removedor de radicais livres, e o anticorpo anti-IL-6 anula o aumento na expressão da MnSOD.

Devido à produção de IL-6 por células CCR, é possível que a IL-6 possa regular fatores de sensibilidade e resistência das células CCR a agentes anticancerígenos (Mizutani et al., 1995).

Embora toda a resposta tumoral para terapia anticancer tenha sido intensamente estudada, pouco se sabe sobre as contribuições dos vários tipos de células envolvidas em

respostas aos tratamentos, bem como de outros fatores como a produção de citocinas, em resposta aos diferentes tratamentos (Keyes et al., 2002).

### **1.3. MECANISMOS DE MORTE CELULAR**

A homeostase tecidual é dependente do perfeito balanço entre proliferação e morte celular. Uma desregulação desse balanço pode resultar em doenças relacionadas à morte celular indesejada ou proliferação descontrolado (Vermeulen et al., 2003). O equilíbrio entre vida e morte é rigidamente controlado e os elementos defeituosos podem ser eliminados por um processo chamado de “morte celular programada” ou apoptose.

As primeiras características morfológicas da apoptose incluem, aparecimento de “blebbing” (protuberâncias irregulares na membrana celular), retração celular, rearranjo do citoesqueleto, condensação da cromatina e fragmentação nuclear. Durante a apoptose ocorre a participação ativa das células afetadas na cascata de autodestruição culminando em degradação do DNA (via ativação de endonucleases), desintegração nuclear e formação de corpos apoptóticos. Estes corpos apoptóticos são rapidamente retirados do tecido por macrófagos. Nesta sinalização ocorre a translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana, marcando as células que deverão ser fagocitadas.

Anexina V é uma proteína de 37kDa que pertence à família das Anexinas, sendo muito utilizada em estudos para diferenciar o processo de morte celular. Esse marcador exhibe, na presença de íons cálcio, alta afinidade para ligação seletiva a fosfatidilserina presente apenas superfície de células apoptóticas.

Existem duas vias de sinalização que medeiam a apoptose: via extrínseca, onde a apoptose é mediada por receptores de morte na superfície celular; e via intrínseca, o qual a mitocôndria desempenha uma importante função. Em ambas as vias ocorrem à ativação de Caspases (enzimas que possuem um resíduo de cisteína no sítio ativo e clivam substratos que possuem resíduo de ácido aspártico em seqüências específicas) os quais promovem o aparecimento das alterações celulares que caracterizam a apoptose (Call et al., 2008)( Bröker et al.,2005)(Tan et al., 2009).

Diferentemente, a necrose é acompanhada por um dano tecidual maciço, onde alterações na forma e função das mitocôndrias rapidamente tornam a célula incapaz de



manter a homeostase celular interna (Wyllie et al., 1993). A membrana plasmática é o local de maiores danos, e a perda da integridade da membrana resulta em desregulação da pressão osmótica, provocando inchaço e ruptura celular. Assim, o conteúdo celular é liberado no espaço tecidual circundante provocando uma resposta inflamatória (Ueda et al., 1994). Na necrose, a degradação do DNA é um fenômeno tardio e a cromatina é digerida por proteases e endonucleases, ocorrendo destruição das histonas e exposição de toda a extensão do DNA (Wyllie et al., 1993).

Existem vários estudos que tentam elucidar outros tipos de morte celular, onde as células não apresentam morfologia característica de apoptose e tampouco de necrose, como, por exemplo, ocorre na autofagia.

#### **1.4. PROTEASSOMO**

A regulação da atividade protéica pela síntese e degradação de moléculas protéicas específicas é vital para a integridade metabólica e proliferação. É bem estabelecido que o proteassomo tem uma função central no catabolismo de uma variedade de proteínas, resultando na ativação de certas vias e bloqueando outras (Teicher et al., 1999).

Em células eucarióticas, a via ubiquitina-proteassomo é a principal via de degradação protéica não lisossomal, controlando a degradação de proteínas intracelulares. Sabe-se que a indução da apoptose, através da inibição do proteassomo, ocorre devido a uma acumulação inicial de proteínas de vida curta, como p53, p27, membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 e proteínas que estão envolvidas na regulação do ciclo celular, incluindo ciclinas e inibidores de ciclinas dependentes de quinases. No entanto, o mecanismo pelo qual a apoptose é desencadeada pela diminuição da atividade proteassomal, permanece especulativa (Vaziri et al., 2009)(Demasi et al., 2003).

O sistema proteassomo também regula a atividade do Fator Nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que representa um alvo essencial para os inibidores de proteassomo. Os inibidores de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) são degradados pela via ubiquitina-proteassomo. Quando NF- $\kappa$ B é ativado, ocorre a fosforilação dos I $\kappa$ B resultando na translocação do NF- $\kappa$ B ao núcleo, onde este ativa a transcrição de genes envolvidos em uma variedade de funções celulares, como a

regulação da apoptose, proliferação e angiogênese. Ativação de NF- $\kappa$ B leva a inibição da apoptose pela indução da expressão de proteínas antiapoptóticas (An et al., 2004).

O proteassomo 26S é um grande complexo (1500-2000kDa), de multi-subunidades, presente no núcleo e citoplasma de eucariotos (Brooks et al., 2000)(Almond et al., 2002). A subunidade catalítica deste complexo, referida como proteassomo 20S, é uma estrutura cilíndrica, constituída de quatro anéis heptaméricos, contendo subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . A subunidade  $\beta$  contém o sítio de atividade catalítica ativa. O proteassomo é uma treonina protease que possui pelo menos três atividades catalíticas distintas, que estão associadas com o proteassomo: quimiotripsina, tripsina e caspase. A habilidade de reconhecer e de se ligar ao substrato poliubiquitinado é conferida pela subunidade 19S, que se liga a cada extremidade do proteassomo 20S. Tanto a montagem do proteassomo 26S quanto à degradação dos substratos protéicos são dependentes de ATP.

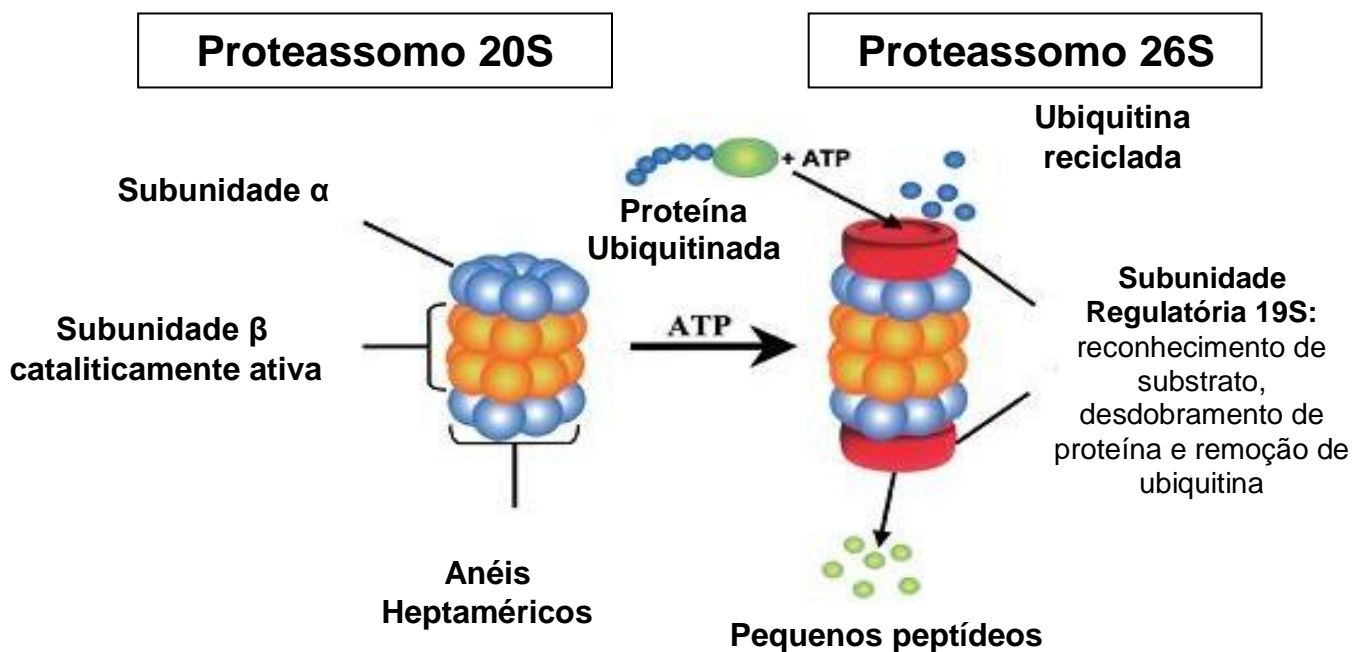


Figura 1. Degradação de Proteínas pelo sistema Ubiquitina-Proteassomo. Substratos protéicos são primeiramente conjugados à múltiplas moléculas de ubiquitina. O substrato ubiquitinado é rapidamente degradado pelo proteassomo 26S, que é um complexo ATP-dependente contendo a subunidade catalítica 20S, juntamente com duas subunidades reguladoras 19S (Figura adaptada: Almond et al., 2002).

### 1.4.1. INIBIDORES DO PROTEASSOMO

A ubiquitinação de proteínas-alvo para proteólise é controlada por um grupo de enzimas do sistema ubiquitina. Monômeros de ubiquitina são primeiramente ativados para a conjugação a outras proteínas por uma enzima de ativação de ubiquitina (E1). A E1 ligada a ubiquitina é então transferida para uma enzima conjugadora de ubiquitina (E2), e a proteína-alvo. O último passo requer uma ligase ubiquitina (E3), que está envolvida na seleção de uma proteína para ubiquitinização.

A combinação de alvos específicos para a degradação pelo sistema ubiquitina, a modulação da protease multicatalítica 20S, pela remodelação da subunidade  $\beta$  e a associação com complexos regulatórios, constituem um elevado nível de regulação da proteólise proteassomal. Diferentes classes de inibidores de proteassomo podem afetar diferentemente a degradação de vários substratos proteassômicos, controlando assim os níveis celulares de determinadas proteínas que estão envolvidas na oncogenicidade e progressão tumoral, sem desempenhar, necessariamente, um efeito sistêmico generalizado (Almond et al., 2002)(Demasi et al., 2003).

A tumorigênese é caracterizada pela proliferação celular descontrolada ou por uma falha durante a apoptose. Como o proteassomo é um importante regulador de ambos os processos, alvos terapêuticos para manipular a atividade proteassômica poderiam potencialmente restaurar a homeostase normal em alguns cânceres.

Estudos recentes têm demonstrado que inibidores do sistema proteassomo potencialmente podem induzir a apoptose em células neoplásicas, em contrapartida causam reduzida citotoxicidade em células normais (Almond et al., 2002).

## 1.5. INIBIDORES DA COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA

Dentre os inibidores fisiológicos da coagulação sanguínea, o inibidor do fator tecidual humano do tipo-1 (TFPI-1, tissue factor pathway inhibitor-1), classificado como um membro dos inibidores da família Kunitz do tipo BPTI (Brooks et al., 2000), é um importante inibidor do complexo FVIIa/FT e também do FXa. O TFPI-1 humano é uma proteína composta por três domínios do tipo Kunitz (K1, K2 e K3). O primeiro domínio possui uma região ácida na porção N-terminal onde está presente o sítio de ligação ao FVIIa. No segundo domínio encontra-se a região responsável pela ligação ao FXa. O terceiro domínio apresenta uma região básica na porção C-terminal, cuja função ainda não está elucidada (Rao et al., 1998). O mecanismo de inibição do TFPI-1 envolve duas etapas, na primeira delas o inibidor se associa ao Fator Xa e ao Fator VIIa formando um complexo ternário. A inibição propriamente dita ocorre na etapa seguinte, onde há a formação de um complexo quaternário entre o complexo TFPI/FXa/FVIIa e o Fator Tecidual (Sandset et al., 1997).

## 1.6. AMBLYOMIN-X

Em nosso laboratório, a secreção salivar do carrapato *Amblyomma cajennense* tem sido estudada e também a partir das glândulas salivares deste carrapato foi construída uma biblioteca de cDNA (Batista et al., 2008). Baseado no banco de *Seqüências mais expressas (ESTs)* construído, um gene com seqüência homóloga a inibidores de FXa, já isolados de outros carrapatos, foi clonado e uma proteína recombinante obtida. Este inibidor recombinante, denominado Amblyomin-X (~15 kDa), apresenta um domínio do tipo Kunitz na região N-terminal. O Amblyomin-X é capaz de inibir o FXa da coagulação sanguínea na presença de fosfolipídeos (Batista et al., 2010), sugerindo a sua classificação na família dos inibidores do tipo TFPI (figura 2).

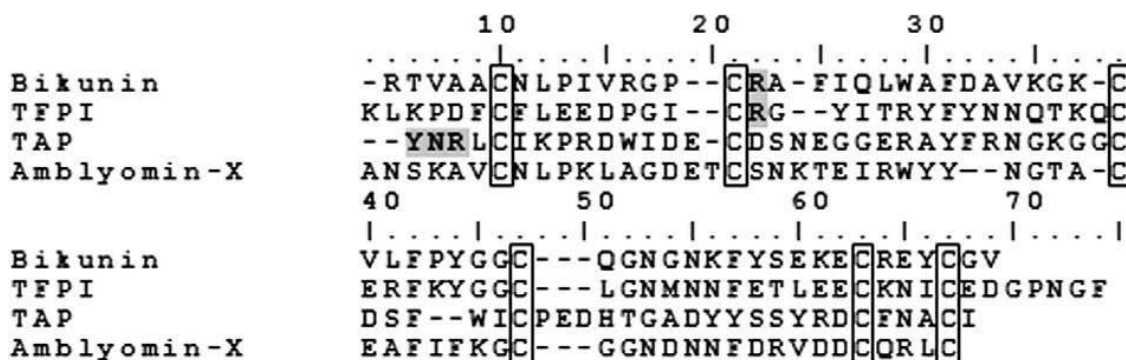


Figura 2. Alinhamento estrutural de domínios Kunitz usando as cisteínas Cys como referência: Bikunin domínio 2, TFPI - segundo domínio Kunitz tipo 2, Proteína Anticoagulante de Carrapato (TAP) e Amblyomin-X. Principais resíduos inibitória (fundo cinza) e Cys (caixas) (Figura adaptada: Batista et al., 2010).

Testes globais de coagulação sanguínea, realizados na presença de Amblyomin-X, mostraram que este inibidor é capaz de prolongar, de forma acentuada, o tempo de protrombina (TP) bem como o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA). A importância da presença de fosfolípidios para a atividade inibitória do Amblyomin-X foi reforçada por testes utilizando corpos apoptóticos capturados de células CHO (*Chinese Hamster Ovarian*), que são partículas ricas em fosfolípidios. De acordo com os resultados, na presença destes fosfolípidios, o Amblyomin-X causa um prolongamento acentuado no tempo de coagulação em relação ao controle.

Além do efeito inibitório sobre o Fator Xa, o Amblyomin-X demonstrou ser capaz de induzir apoptose em diferentes linhagens tumorais, incluindo melanoma murino (B16F10), melanoma humano (SK MEL-28) e carcinoma de pâncreas (MIA PaCa-2). Por outro lado, esta proteína não demonstrou efeito citotóxico sobre células endoteliais normais (HUVECs-*Human Vein Endothelial Cells*) nem sobre linhagens de fibroblastos humanos normais (Chudzinski-Tavassi et al., 2010).

Estudos *in vivo*, utilizando camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma melanótico (B16F10) tratados com o Amblyomin-X, mostraram significativa redução da massa tumoral (tumor dorsal). Além disso, o índice de metástase foi altamente reduzido, após tratamento por 14 dias após o implante tumoral (Chudzinski-Tavassi et al., 2010). Observou-se também que a proteína parece possuir atividade anti-angiogênica uma vez

que foi capaz de inibir a formação de vasos ao redor do tumor implantado (Chudzinski-Tavassi et al., 2010).

Embora o Amblyomin-X apresente atividade inibitória de FXa, hemogramas completos do sangue de camundongos tratados com doses diárias de 1mg/Kg do Amblyomin-X demonstraram que o sangue dos animais manteve a capacidade coagulante, o hematócrito e níveis de hemoglobina próximos ou iguais aos dos animais controles (sem tumor). Esses resultados claramente demonstram que o Amblyomin-X é capaz de exercer seu efeito anti-tumoral sem, no entanto, causar fenômenos hemorrágicos, que poderiam resultar do seu potencial anticoagulante.

A análise das expressões gênicas das linhagens tumorais SK-MEL-28 (Melanoma Humano) e MIA PaCa-2 (Adenocarcinoma pancreático) por Microarray, mostraram que houve uma alta expressão do gene que codifica a subunidade catalítica  $\beta$ 2 proteassômica (PSMB2). A avaliação do sistema ubiquitina-proteassomo nessas linhagens revelou que após 4 horas de tratamento com 0,5 $\mu$ M e 1,0 $\mu$ M Amblyomin-X houve diminuição da atividade proteassômica somente do tipo tripsina e, após 24 horas houve diminuição tanto da atividade tipo tripsina quanto do tipo quimiotripsina. Esses resultados sugerem fortemente que o proteassomo pode ser um dos alvos celulares do Amblyomin-X (Chudzinski-Tavassi et al., 2010).

Diante dos dados obtidos, acreditamos que o Amblyomin-X pode ser um forte candidato quimioterápico, apresentando inúmeras vantagens, em relação aos tratamentos usuais, por uma ação seletiva para células tumorais. E por ser o CCR um câncer altamente resistente aos tratamentos, o Amblyomin-X poderá vir a ser uma possibilidade de terapia efetiva.

## 2. OBJETIVO

- Avaliação do efeito do Amblyomin-X, um inibidor do tipo Kunitz, em células tumorais renais.

### Objetivos Específicos:

- Análise do Ciclo Celular;
- Determinação do tipo de Morte Celular;
- Liberação de Interleucina-6;
- Ação na atividade proteolítica do proteassomo.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### ***3.1. Cultura das Linhagens Tumoriais Humanas e Murinas***

As linhagens tumorais Caki-1 (Carcinoma Renal Humano) e Renca (Adenocarcinoma Renal Murino) foram gentilmente cedidas pela Dra. Maria Helena Bellini, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) – USP, e cultivadas de acordo com as especificações fornecidas pela doadora e de acordo com o American Type Culture Collection (ATCC).

Após estabilização das culturas, as células foram rotineiramente transferidas por tripsinização (0.25% de tripsina em PBS) para placas. Células Caki-1 foram mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle (DME - Cultilab) suplemento com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 25mM HEPES, 2mM L-Glutamina (Sigma Chemical Company). Células Renca foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute - Cultilab) suplemento com 10% soro fetal bovino (Cultilab), 2mM L-Glutamina (Sigma Chemical Company), 1mM Piruvato de Sódio (Sigma Chemical Company), 0,1mM Aminoácidos não essenciais (Invitrogen).

#### ***3.2. Avaliação de citotoxicidade do Amblyomin-X sobre culturas de carcinoma de células renais***

As células ( $10^4$  células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços por 24 horas e tratadas com Amblyomin-X (0,15 a  $1,5\mu\text{M}$ ), ou solução salina (controle). Após o período de incubação (24 e 48 horas), avaliou-se a viabilidade das células tratadas e controles pelo teste de MTT. As placas foram mantidas em estufa umidificada à  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ .

As células aderidas foram incubadas por 3h à  $37^\circ\text{C}$  com MTT 0.5 mg/mL (tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, AMRESCO) em meio de cultura suplementado com 10% SFB. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado e 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO, SIGMA) foram adicionados em cada poço.

A viabilidade celular foi aferida usando-se como referência a absorbância de 540 nm, no aparelho Spectra Max-190 (Molecular Devices).



No teste de MTT, as células que permanecem aderidas formam cristais de coloração azul chamados de cristais de formazan, a partir do sal tetrazolium, 3-[4,5 dimethyl thiazole-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Posteriormente, os cristais de formazan são dissolvidos em DMSO e colorimetricamente detectados à 540nm.

Houve correlação dos resultados obtidos do ensaio de MTT com a contagem de células com azul de tripan (SIGMA).

### **3.3. Análise do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo**

As células ( $10^4$  células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços por 24 horas e tratadas com Amblyomin-X (0.15 a  $1.5\mu\text{M}$ ), ou meio de cultura (controle). Após o período de incubação (24 e 48 horas), foram desgrudadas com tripsina 0,25 % - EDTA 0,02 % (CULTILAB) e centrifugadas a 1000 rpm por 5 min à 4 °C. Os sobrenadantes foram congelados a  $-20^\circ\text{C}$ , para uso posterior, e as células permeabilizadas com etanol 70 % gelado. Após 12 horas de refrigeração, as células foram novamente centrifugadas e em seguida misturadas com 200  $\mu\text{L}$  de reagente contendo iodeto de propídio (20  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), Triton X-100 (20  $\mu\text{L}$ ), RNase-A (2 mg/mL). A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 30min, protegida da luz, e em seguida submetida a citometria de fluxo (Guava system GE) para avaliação das fases do ciclo celular.

Também foram realizados experimentos, em colaboração com o aluno Jean Gabriel de Souza do nosso laboratório, para avaliar a ação de 105nM de amblyomin-X em células Renca após 24 horas de tratamento. A distribuição das fases do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo no FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA,USA). Os resultados obtidos pelo programa de aquisição Cell-Quest (BD) foram analisados pelo software WinMDI 2,8 FACS. Os resultados foram expressos em porcentagem média de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular: DNA fragmentado (M4) - apoptose, G0/G1(M3), S (M2)e G2/M (M1).

### **3.4. Ação do Amblyomin X na liberação de Interleucina- 6**

Culturas confluentes de Caki-1 foram tratadas por 24 e 48 horas, com diferentes concentrações de Amblyomin X (0.15 – 1.5  $\mu$ M) ou meio de cultura (controle). Os sobrenadantes das culturas foram coletados e as concentrações de IL-6 foram analisadas por ensaio imunoenzimático, utilizando kit ELISA para a determinação de IL-6 Humano (Biosource). Em cada orifício da placa de 96 poços (disponibilizada pelo kit) foram pipetados os sobrenadantes dos diferentes tratamentos com Amblyomin-X e das células controle e, em seguida, adicionado uma solução anti-IL-6 biotilado. Após 2 horas de incubação, acrescentou-se uma solução de Estreptavidina-HRP em cada poço e 30 minutos adicionais de incubação à temperatura ambiente. O cromógeno e a solução de interrupção foram adicionados, após período de 30 minutos de incubação no escuro. Para a obtenção dos níveis de IL-6 no sobrenadante, foi utilizado como referência uma absorbância de 450nm e as leituras foram realizadas no aparelho Spectra Max-190 (Molecular Devices).

### **3.5. Determinação do tipo de Morte Celular induzida pelo Amblyomin-X em células Renca**

#### **3.5.1. Avaliação da Citotoxicidade por Citometria de Fluxo**

As células ( $10^4$  /poço) foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas com Amblyomin-X (0.15, 0.3, 0.6, 0.8, 1.0 e 1.5  $\mu$ M), ou com meio de cultura (controle). Após o período de incubação (24 e 48 horas), onde as células foram tripsinizadas e centrifugadas (1000 rpm, 10 min). Em seguida, foram ressuspendidas em 200  $\mu$ L de Tampão de Ligação (Hepes 10mM, NaCl 140mM, e CaCl<sub>2</sub> 2,5mM). A análise do tipo de morte celular foi avaliada utilizando-se dois marcadores fluorescentes: Iodeto de Propídio (10  $\mu$ L) e Anexina-V conjugado com FITC (5  $\mu$ L)(SIGMA). Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, no escuro, a fluorescência das células foi avaliada por citometria de fluxo

(Guava System, GE). Considerou-se células no princípio do processo apoptótico àquelas marcadas com Anexina V-FitC somente e células necróticas as marcadas por ambos, Iodeto de Propídio e Anexina V-FitC.

### **3.5.2. Análise da Fragmentação do DNA**

Experimento realizado em colaboração com a Dra. Carolina Berra, pós-doutoranda do nosso laboratório.

As células ( $10^5$  /poço) foram semeadas em placas de 6 poços e tratadas com 0,6 e 1  $\mu$ M de Amblyomin-X, ou com meio de cultura (controle). Após 24 horas de incubação, foram tratadas com solução de lise (EDTA 10mM; Tris-HCl 50mM pH8,0; 0,25% NP-40; Proteinase K 0,5mg/mL) a 50°C por 2 horas. O DNA foi precipitado com um volume de 2,5 $\mu$ L de etanol-NaCl “overnight” à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 12.000 x g por 30min à 4°C. O precipitado foi lavado com etanol 70% e secado à temperatura ambiente. Depois foi dissolvido em tampão (10mM Tris-HCl pH8,0; 0,1mM EDTA) contendo Rnase A (600mg/mL) e incubado à 37 °C por 1 hora. A concentração do DNA extraído foi medida espectrofotometricamente usando-se como referência a absorvância de 260 nm, no Spectra Max-190 (Molecular Devices).

A fragmentação do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%. Para a marcação do DNA foi utilizado 1 $\mu$ L de Brometo de Etídio (1ng/mL). A análise do gel foi realizada sob iluminação ultravioleta em absorvância 320nm (Hoefer – Macrovue UV – 20) e fotografado, utilizando-se o sistema de fotodocumentação Doc-Print.

### **3.5.3. Análise de Células Apoptóticas por Microscopia de Fluorescência**

Os ensaios de Microscopia de Fluorescência foram realizados em colaboração com o Dr. Alexandre Pereira, pesquisador do Laboratório de Genética do Instituto Butantan e do doutorando Paulo Luiz de Sá Junior de nosso laboratório.

Células apoptóticas foram avaliadas através da captação “in situ” de iodeto de propídio e Hoechst 33258, como descrito por Zhang HT e colaboradores (2010). As células

Renca foram cultivadas em placas de 6 poços ( $10^5$  /poço) e tratadas com Amblyomin-X (0,6 e  $1\mu\text{M}$ ), ou com meio de cultura (controle) e mantidas em estufa umidificada à  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Após 24 horas de tratamento, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e marcadas com Iodeto de Propídio (1ng/mL) e Hoechst 33258 ( $1\mu\text{M}/\text{mL}$ ) e foram incubadas no escuro por 10min. Após esse tempo de incubação, as células foram analisadas em microscópio de fluorescência (NIKON TE 2000). Após a aquisição das imagens, as células foram contadas sendo consideradas viáveis aquelas com fluorescência azul e inviáveis as com fluorescência vermelha.

Para determinar a morfologia das células tratadas com Amblyomin-X (0,6 e  $1\mu\text{M}$ ) em relação às controles, as células foram marcadas com Iodeto de Propídio ( $50\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e Laranja de Acridina ( $50\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubadas no escuro por 10min. Após esse tempo, adicionou-se DAPI (para marcar os núcleos de todas as células) que foram a seguir analisadas por Microscopia de Fluorescência.

Considerou-se para análise que: o DAPI (azul) marca o conteúdo do DNA celular de todas as células, o Iodeto de Propídeo (vermelho) marca o DNA das células com membrana celular lesada, e o Laranja de Acridina faz interações iônicas com componentes ácidos na célula (como DNA, RNA, Lisossomo e células fagocitadas). Em pH ácido cora em laranja e em pH neutro ou básico cora em verde. Células vivas são coradas com DAPI e laranja de acridina, células apoptóticas são coradas com DAPI e Iodeto de Propídeo.

### ***3.6. Avaliação do potencial inibitório do Amblyomin-X sobre a atividade proteassômica***

Os experimentos envolvendo o Proteassomo foram realizados em colaboração com a Dra. Marilene Demasi, pesquisadora do nosso laboratório.

Células Renca foram cultivadas em garrafa de  $25\text{cm}^2$  ( $10^6$  células/garrafa) e tratadas com Amblyomin-X ( $0,6\mu\text{M}$ ) ou sem tratamento (controle). Após os tempos de incubação (4 e 16 horas) em estufa umidificada à  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ , as células aderidas nas foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas (1000rpm, 10min,  $4^\circ\text{C}$ ).

Os precipitados celulares foram ressuspensos em Tris-HCl 50 mM pH 7.5 contendo NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, 10% (v/v) glicerol, 0.5% (v/v) Nonidet P-40 and MgCl<sub>2</sub> 1 mM. Após a lise das células por passagem da suspensão celular em seringas de insulina (10 vezes), as amostras de células tratadas e não tratadas foram incubadas em gelo por 30 minutos e centrifugadas a 15000 x g por 30 minutos. A concentração protéica do sobrenadante foi determinada e alíquotas da proteína total foram utilizadas para determinação da atividade proteossômica e imunoenaios. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Chudzinski-Tavassi, 2010).

Peptídeos Fluorogênicos (AMC,7-amido-4-metilcumarínico; Calbiochem, USA) foram utilizados como sonda fluorescente para determinação da atividade proteolítica do proteassomo. Suc-LLVY-AMC foi usado como um peptídeo padrão para avaliar a atividade do tipo quimiotripsina e z-ARR-AMC para determinar a atividade do tipo tripsina. Extrato celular (25–100 µg de proteína) foi incubado a 37°C com 125–500 µM do fluoropeptídeo. A emissão de fluorescência em 440nm (excitação em 365nm) foi registrada por 1 hora e os resultados expressos como a porcentagem de hidrólise do substrato proporcional à extração total das células controles não tratadas e foram calculadas baseadas na diferença entre a atividade hidrolítica total do extrato celular e atividade determinada em amostras anteriormente incubadas com inibidores de proteassomo padrão (lactacystin ou NLVS).

### **3.7. Análise Estatística**

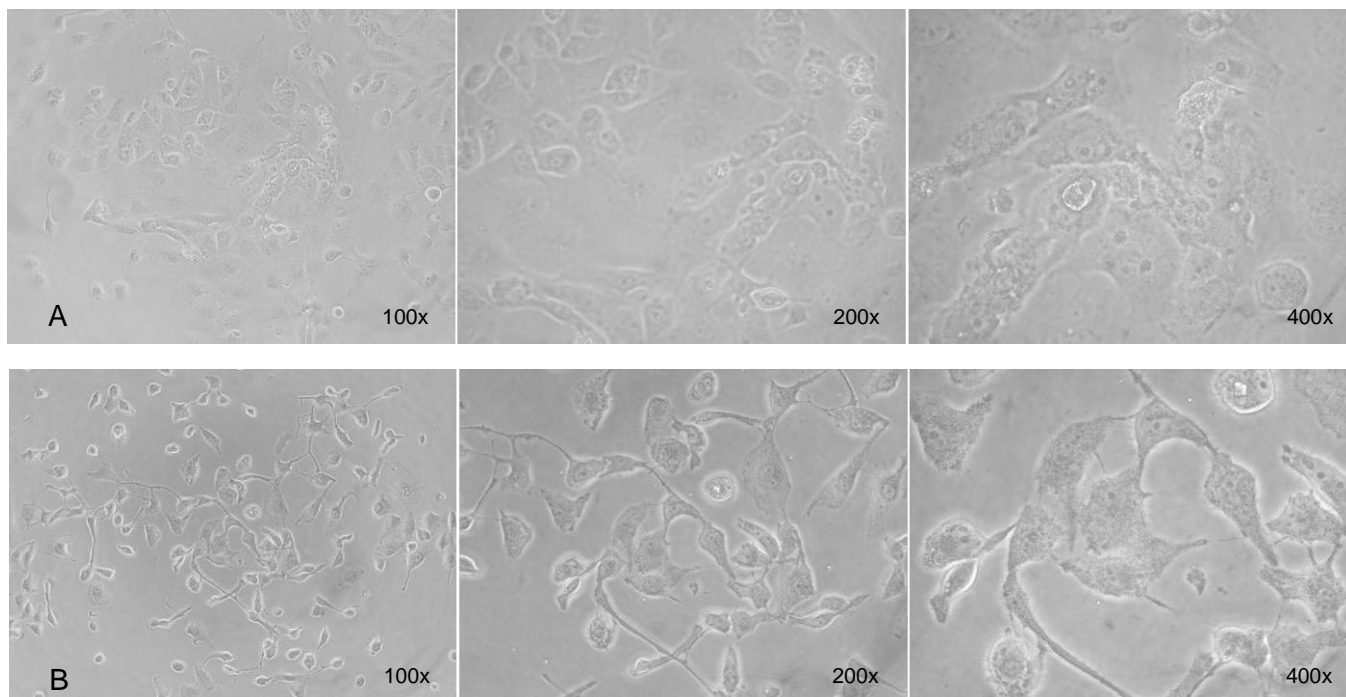
Análise Estatística foi realizada utilizando software GraphPad Prism 5. Os dados foram expressos como média ± SD. A significância estatística (asteriscos) da diferença entre as células controles e as tratadas com Amblyomin-X foi analisada pelo teste ANOVA e Bonferroni's post test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001). Todos os experimentos foram repetidos pelo menos 3 vezes.

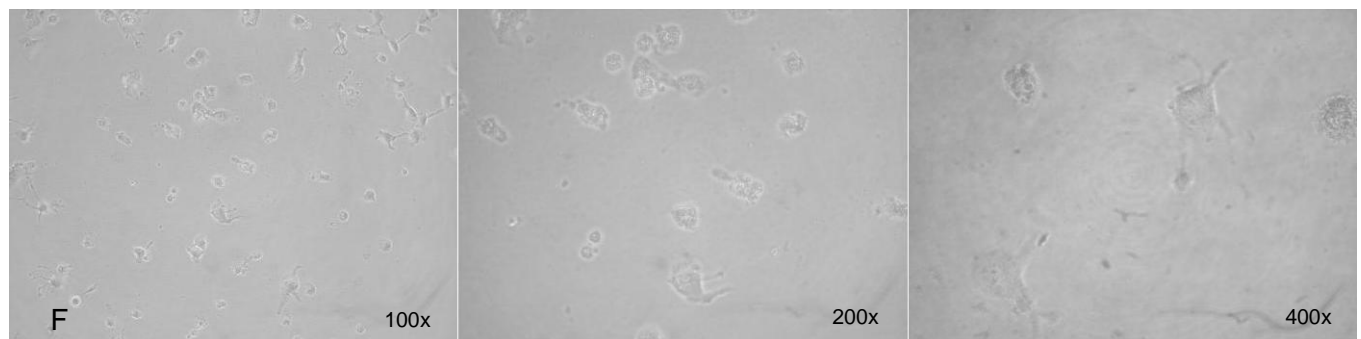
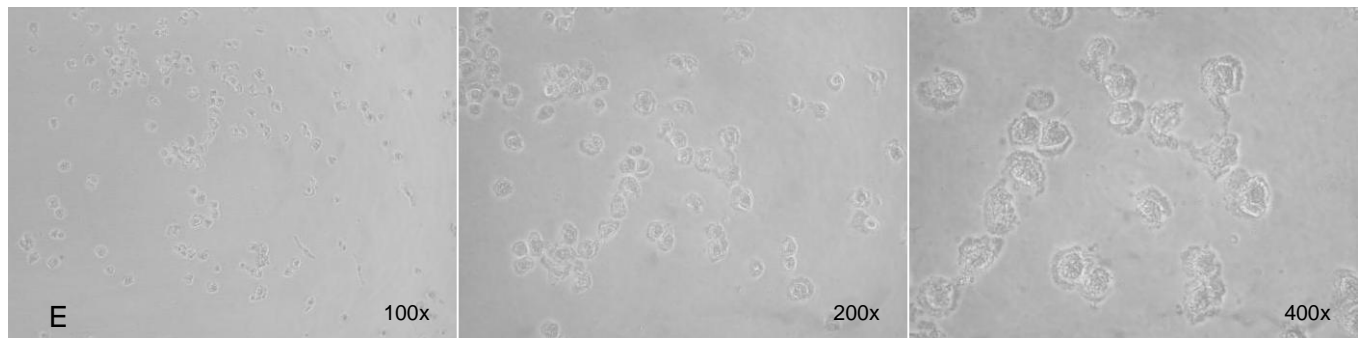
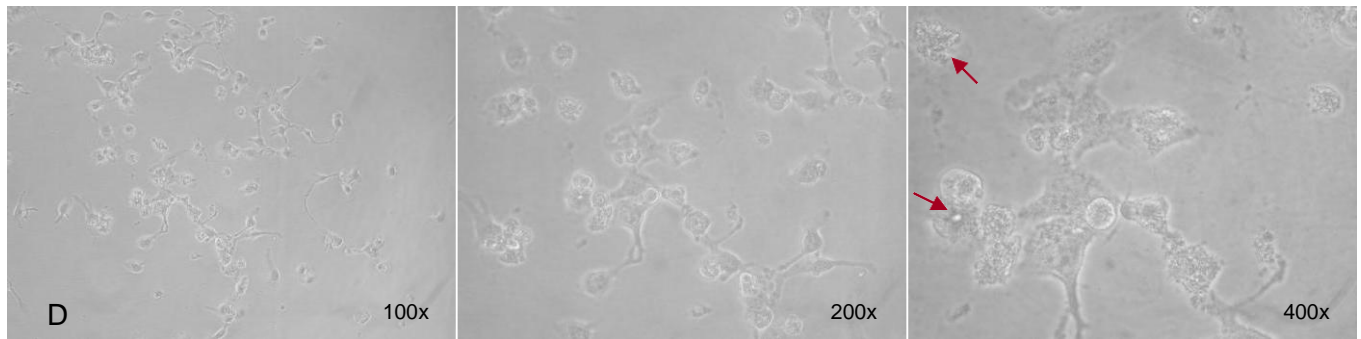
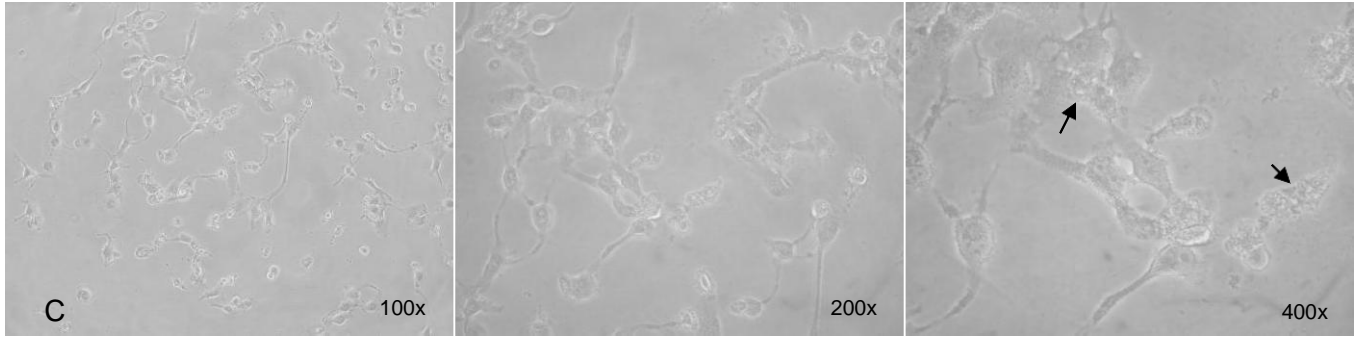
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Ação do Amblyomin-X em Células Caki-1

#### 4.1.1. Morfologia das Células Caki-1 pós-tratamento

Após 24 e 48 horas de tratamento das células Caki-1 com diferentes concentrações de Amblyomin-X (0,15; 0,3; 0,6; 0,8; 1 e 1,5  $\mu$ M), foram observadas alterações morfológicas para todas as concentrações de Amblyomin-x utilizadas, quando comparadas com os controles, sendo mais proeminentes nas maiores concentrações. A figura 1 mostra o padrão das alterações. Em C, observam-se vacuolizações (setas pretas), aspectos fusiformes e prolongamentos celulares. Em D, observamos o início do arredondamento das células. Em E, F e G, células arredondadas, indicando morte celular.





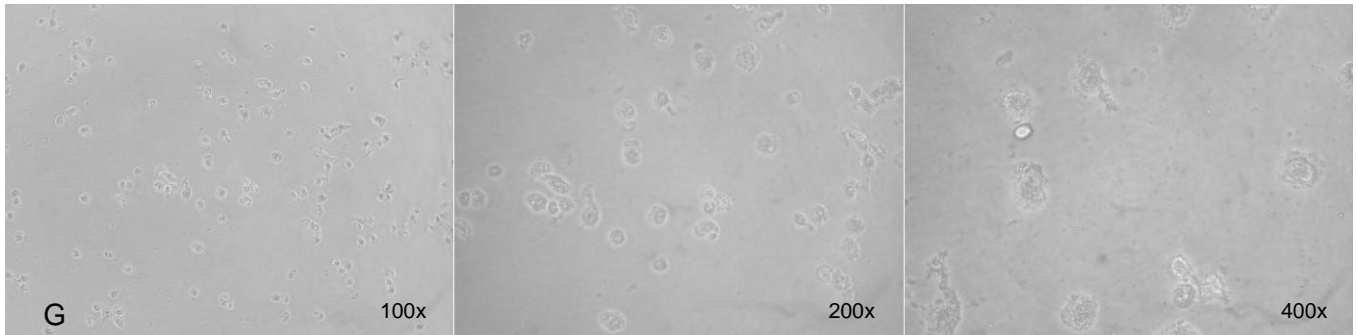
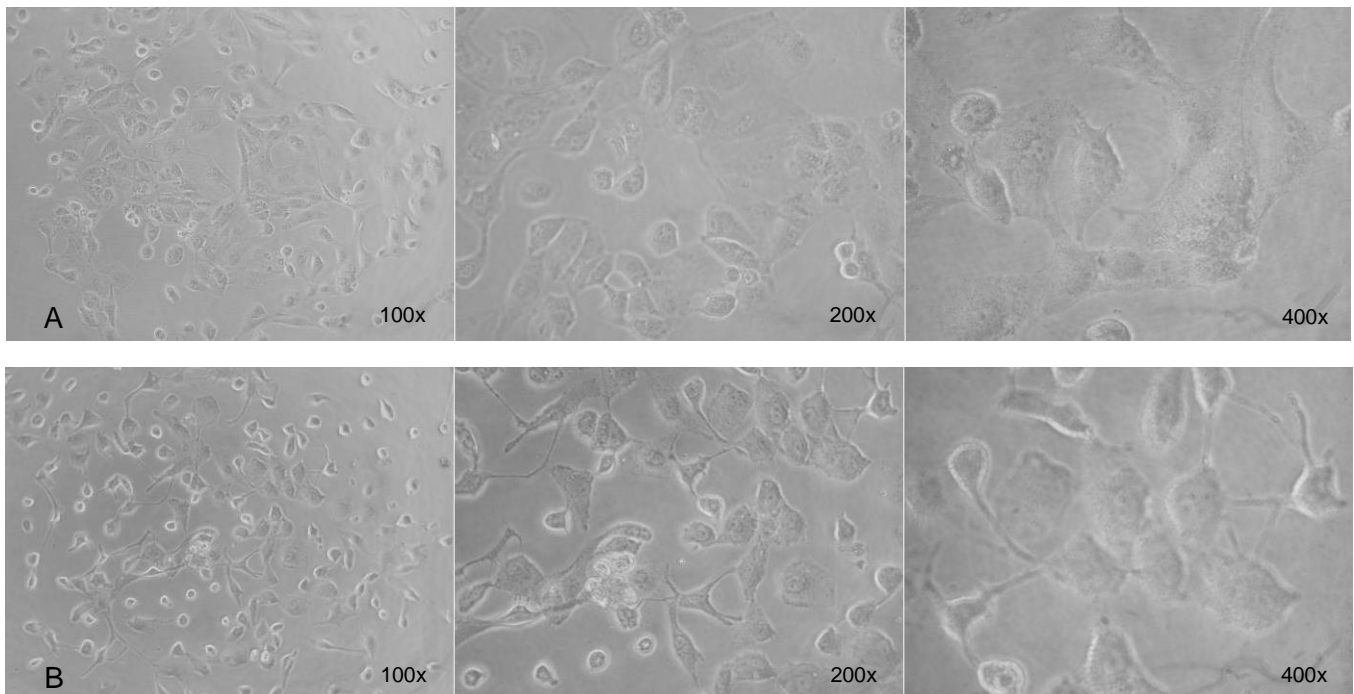
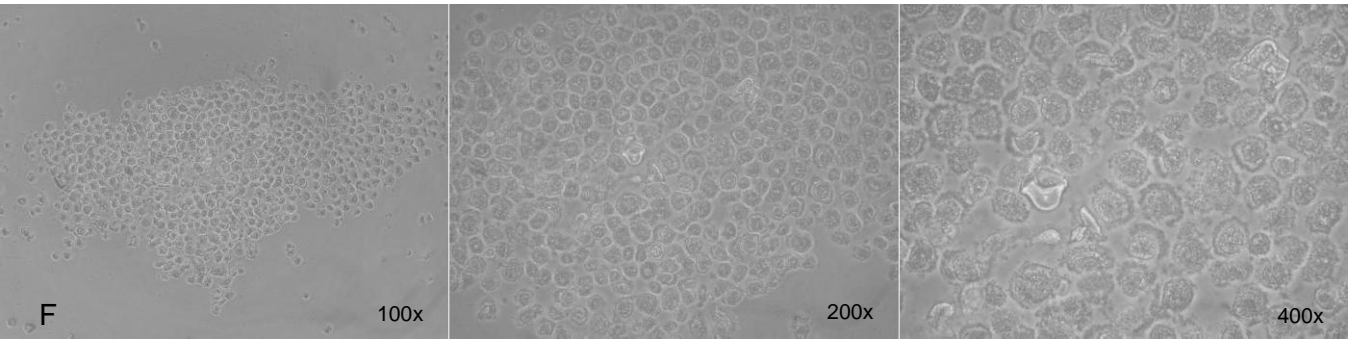
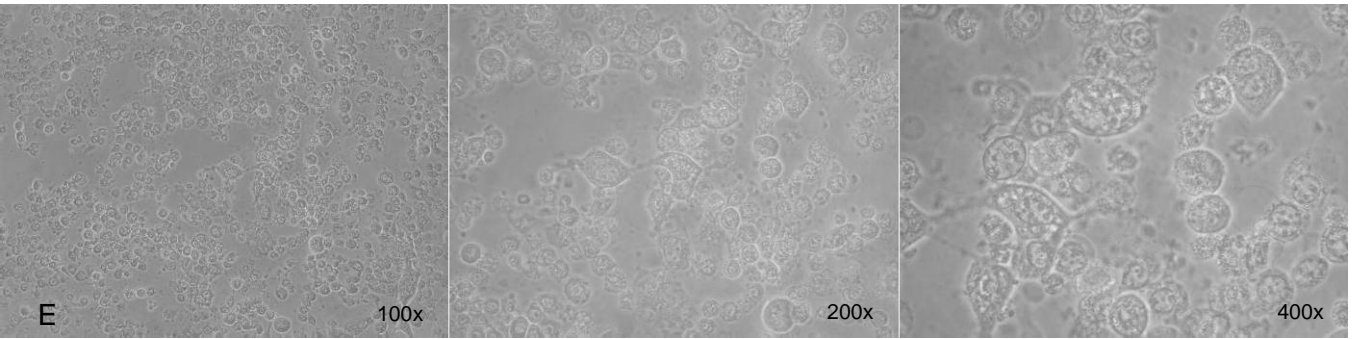
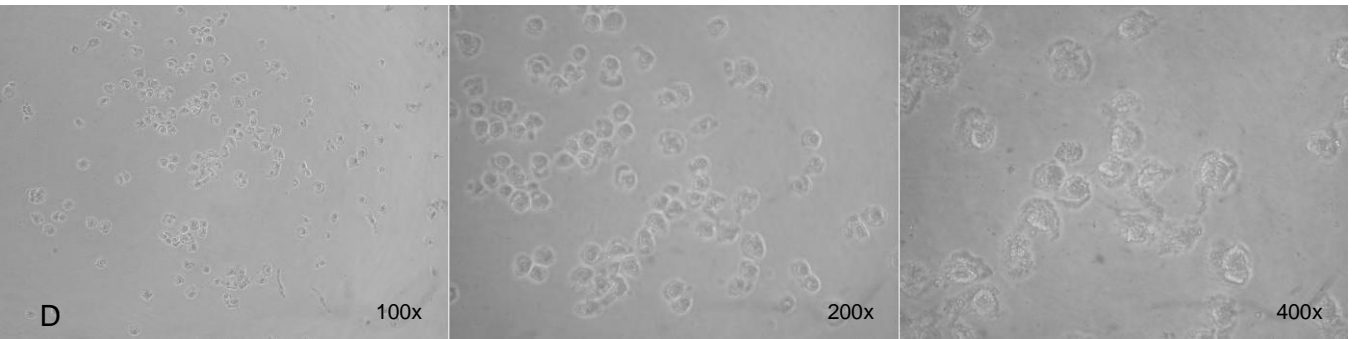
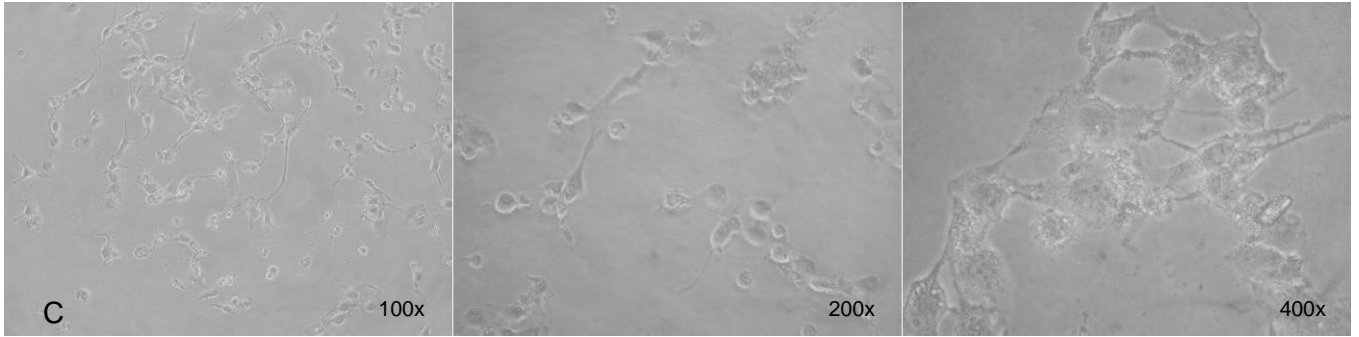


Figura 3. Morfologia das células Caki-1 após 24 horas de tratamento, nos aumentos de 100X, 200X e 400X. A: Células sem tratamento (controle); B, C, D, E, F e G: Células tratadas com 0,15; 0,3; 0,6; 0,8; 1 e 1,5 $\mu$ M de Amblyomin-X, respectivamente. Setas pretas: vacuolizações. Setas vermelhas: início do arredondamento celular.

Na figura 4 estão mostradas as alterações observadas após 48 horas de tratamento. Após este tempo, as alterações foram mais proeminentes a partir de 0,15 $\mu$ M (B). C: prolongamentos celulares; em D, E, F e G: arredondamento de todas as células e perda das características iniciais. F e G: aglomerados celulares no centro da placa.







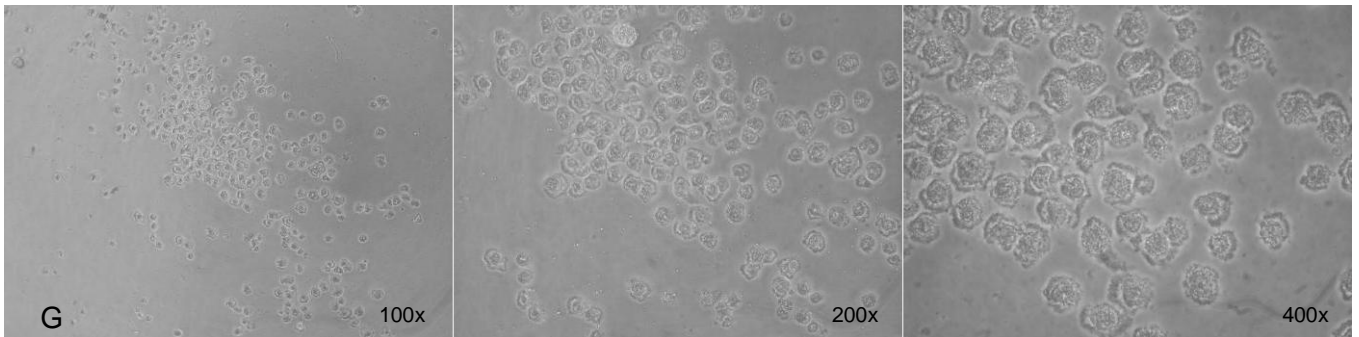


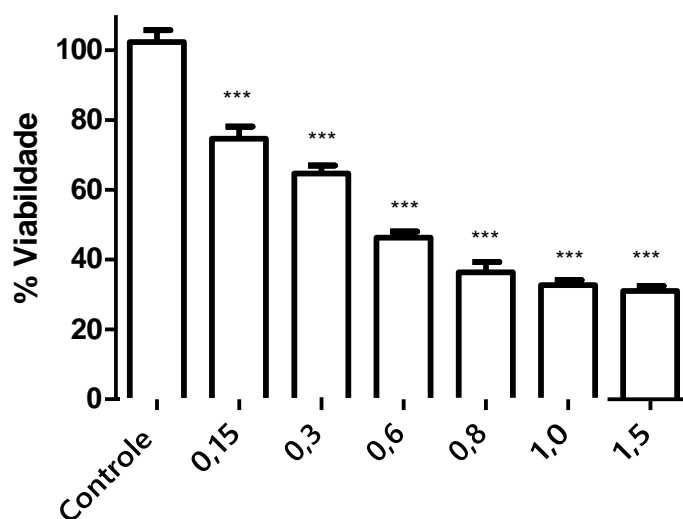
Figura 4. Morfologia das células Caki-1 após 48 horas de tratamento, nos aumentos de 100X, 200X e 400X. A: Células sem tratamento (controle); B, C, D, E, F e G: Células tratadas com 0,15; 0,3; 0,6; 0,8; 1 e 1,5 $\mu$ M de Amblyomin-X, respectivamente.

#### **4.1.2. Viabilidade Celular por MTT**

Caki-1 foram incubadas por 24 e 48 horas com 0,15; 0,3; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,5 $\mu$ M de Amblyomin-X. As figuras 5 e 6 mostram a redução da viabilidade de células Caki-1 após tratamento com diferentes concentrações de Amblyomin-X e indicam um efeito dose-dependente.

Na menor concentração (0,15 $\mu$ M) ocorre morte celular superior a 20%. Nas concentrações de 1,0 e 1,5  $\mu$ M observa-se alta citotoxicidade (morte acima de 70%).

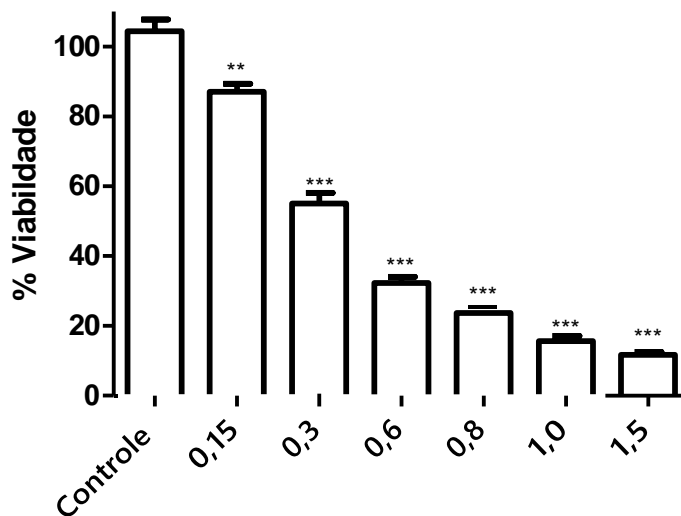
### Viabilidade de Células Caki-1 após 24 horas de Tratamento com Amblyomin-X



#### Células Tratadas ou Não com Amblyomin-X (μM)

Figura 5. Viabilidade das células Caki-1 por MTT após 24 horas de tratamento com Amblyomin-X (0,15 a 1,5 μM), ou sem tratamento (controle). Viabilidade analisada pela formação de cristais de formazan em células aderidas. Média ± SD determinada a partir de três experimentos independentes. \*\*\*p<0.001 comparados ao grupo controle, como determinado por "one-way" ANOVA.

### Viabilidade de Células Caki-1 após 48 horas de Tratamento com Amblyomin-X



#### Células Tratadas ou Não com Amblyomin-X (μM)

Figura 6. Viabilidade de células Caki-1 por MTT após 48 horas de tratamento com Amblyomin-X (0,15 a 1,5 μM), ou sem tratamento (controle). Viabilidade analisada pela formação de cristais de formazan em células aderidas. Média ± SD determinada a partir de três experimentos independentes. \*\*\*p<0.001 e \*\*p<0.01 comparados ao grupo controle, como determinado por "one-way" ANOVA.

### 4.1.3. Análise das Fases do Ciclo Celular

As fases do ciclo das células Caki-1 tratadas com Amblyomin-X (0,15 a 1,5 $\mu$ M) foram avaliadas por citometria de fluxo (Guava System).

Nas figuras 7 e 8 pode-se verificar diminuição da porcentagem de todas as fases do ciclo celular após 24 horas de tratamento em todas as concentrações utilizadas. Esses resultados mostram alto potencial citotóxico do Amblyomin-x para estas células.

#### Fases do Ciclo Celular de Caki-1 após 24 horas de tratamento

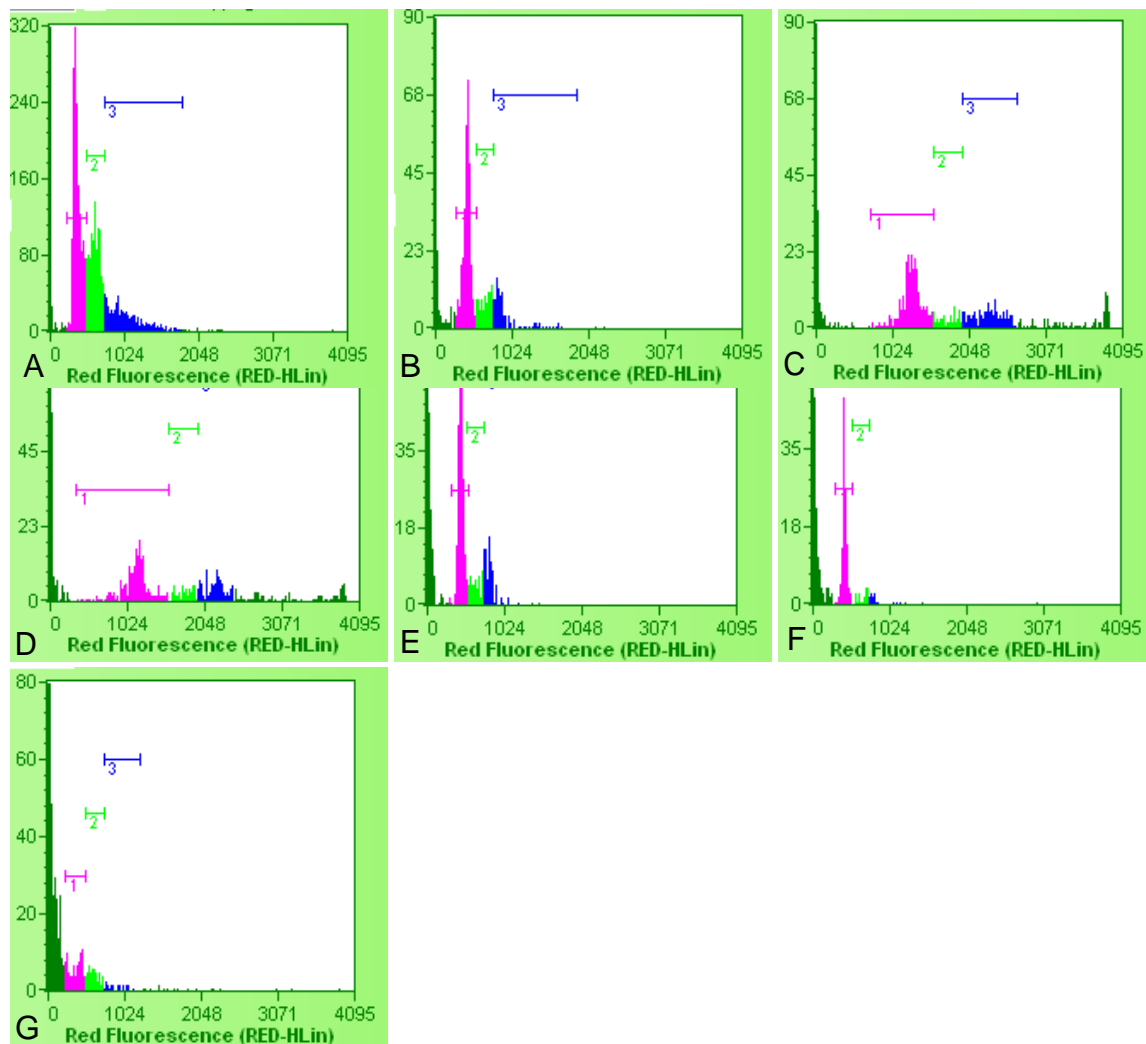


Figura 7. Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo, em células Caki-1 após 24 horas de tratamento com Amblyomin-X (0,15 a 1,5 $\mu$ M), ou sem tratamento (controle). A: Células sem tratamento; B, C, D, E, F e G: Células tratadas com 0,15; 0,3; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,5  $\mu$ M de Amblyomin-X, respectivamente.

## Fases do Ciclo Celular de Caki-1 tratadas por 24 horas com Amblyomin-X

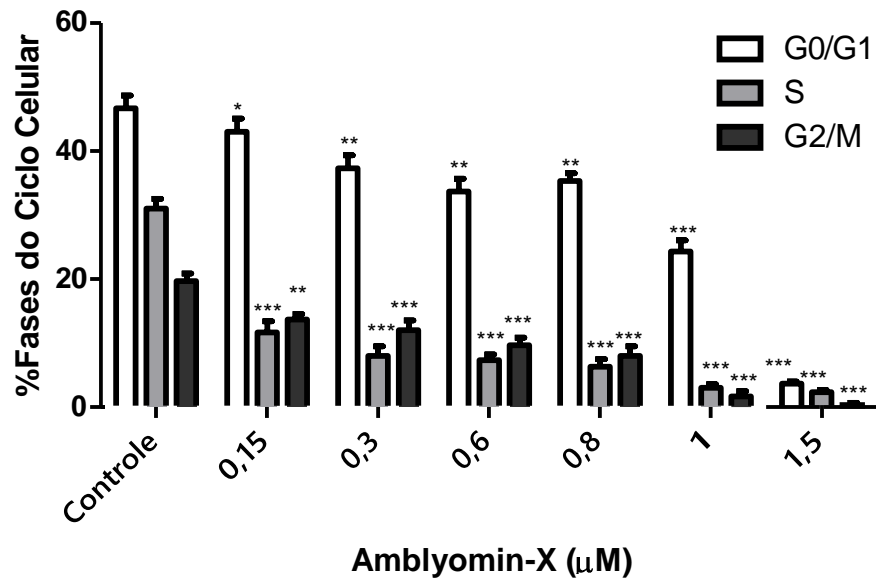
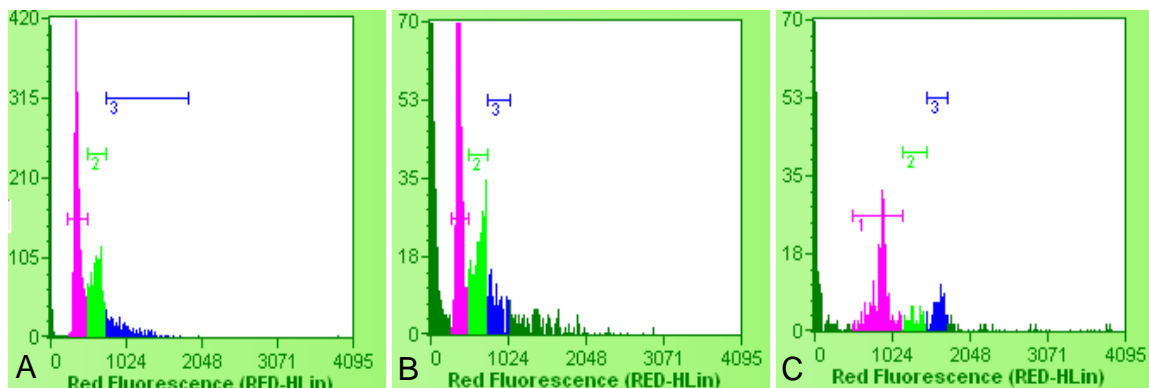


Figura 8. Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo em células Caki-1 após 24 horas de tratamento com Amblyomin-X (0,15 a 1,5 μM), ou sem tratamento (controle). Média ± SD determinada a partir de três experimentos independentes. \*p<0.05, \*\*p<0.01 e \*\*\*p<0.001 comparados ao grupo controle, como determinado por “two way” ANOVA.

As figuras 9 e 10 mostram a diminuição da porcentagem de todas as fases do ciclo celular nas células Caki-1 após 24 de tratamento com diferentes concentrações de Amblyomin-X.

## Fases do Ciclo Celular de Caki-1 após 48 horas de tratamento



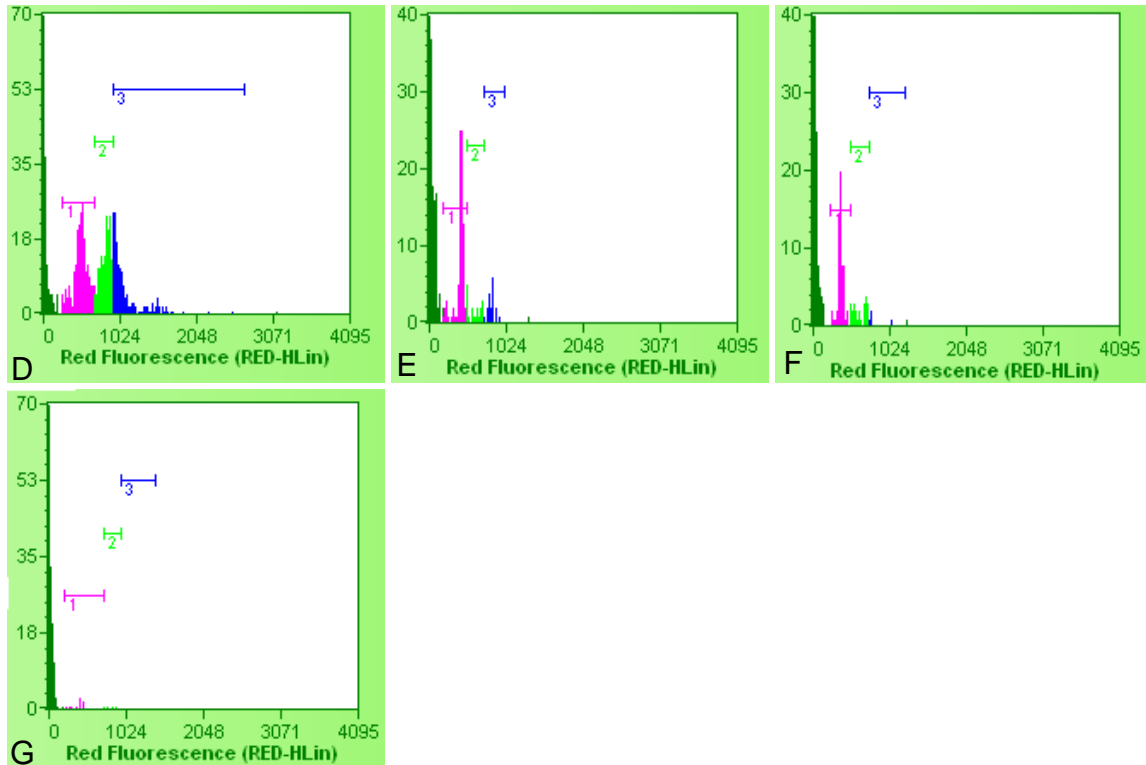


Figura 9. Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo em células Caki-1 após 48 horas de tratamento com Amblyomin-X (0,15 a 1,5  $\mu$ M), ou sem tratamento (controle). A: Células sem tratamento; B, C, D, E, F e G: Células tratadas com 0,15; 0,3; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,5  $\mu$ M de Amblyomin-X, respectivamente.

### Fases do Ciclo Celular de Caki-1 tratadas por 48 horas com Amblyomin-X

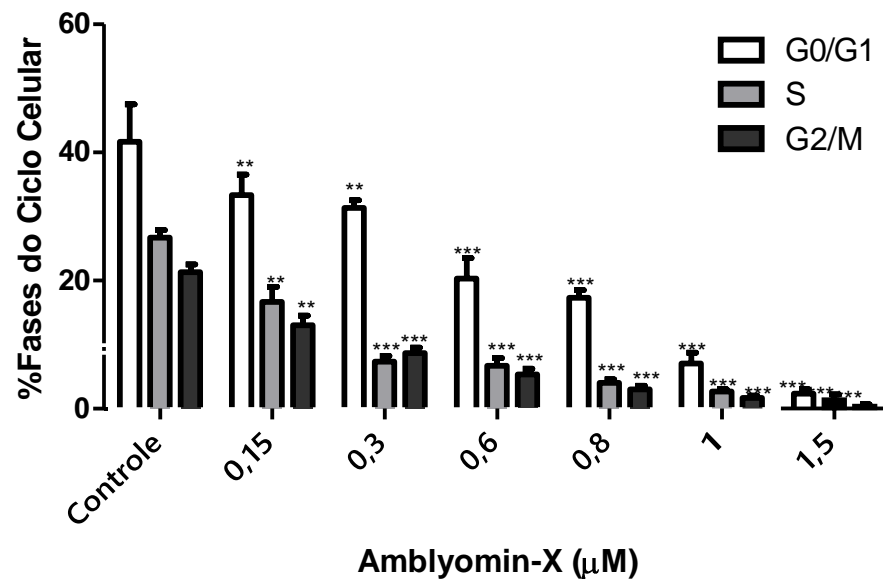


Figura 10. Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo de células Caki-1 após 48 horas de tratamento com Amblyomin-X (0,15 a 1,5  $\mu$ M), ou sem tratamento (controle). Média  $\pm$  SD determinada a partir de três experimentos independentes. \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  comparados ao grupo controle, como determinado por two way ANOVA.

#### 4.1.4. Avaliação da Liberação de Interleucina-6

A liberação de interleucina-6 nas células Caki-1 foi determinada após 24 e 48 horas de tratamento com Amblyomin-X. Observou-se diminuição dos níveis de IL-6 proporcional ao aumento das concentrações de Amblyomin-X, em ambos períodos de tratamento 24 e 48 horas (figura 11 e 12).

#### Determinação de IL-6 em Caki-1 após 24 horas de tratamento com Amblyomin-X

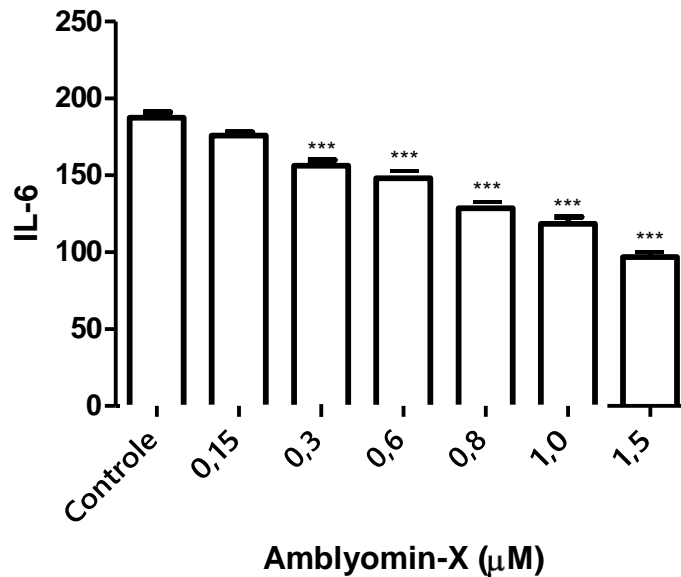


Figura 11. Concentração de Interleucina-6 por ensaio Imunoenzimático competitivo em células Caki-1 após 24 horas de tratamento com Amblyomin-X (0,15 a 1,5 $\mu\text{M}$ ), ou sem tratamento (controle). Média  $\pm$  SD determinada a partir de três experimentos independentes. \*\*\* $p < 0.01$  comparados ao grupo controle, como determinado por "one-way" ANOVA.

## Determinação de IL-6 em Caki-1 após 48 horas de tratamento com Amblyomin-X

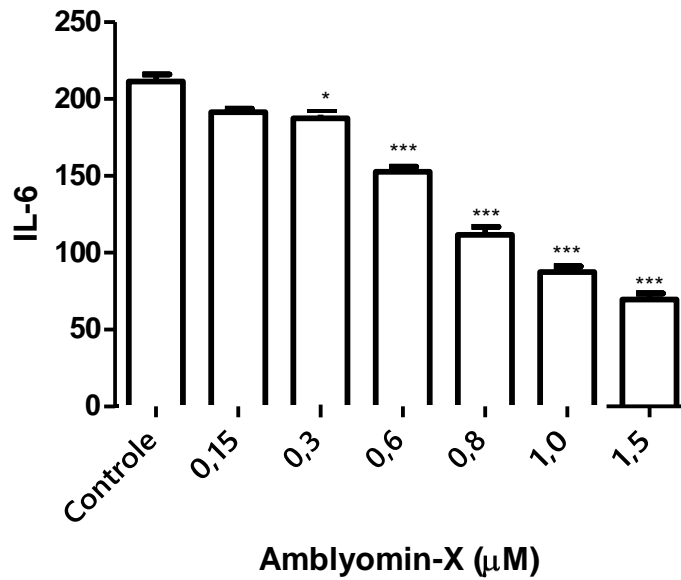


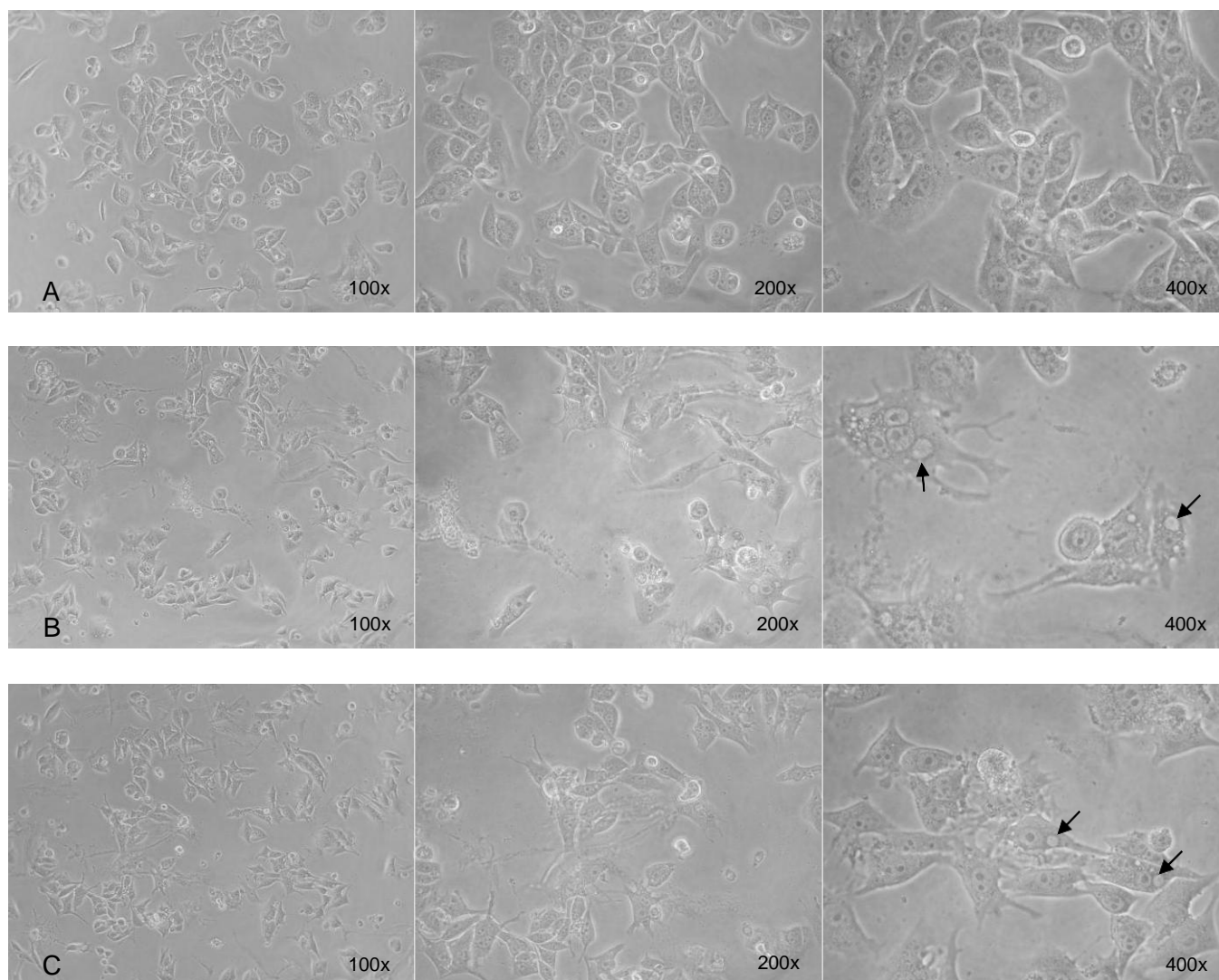
Figura 12. Concentração de Interleucina-6 por ensaio Imunoenzimático competitivo em células Caki-1 após 48 horas de tratamento com Amblyomin-X (0,15 a 1,5μM), ou sem tratamento (controle). Média ± SD determinada a partir de três experimentos independentes. \* $p < 0.05$  e \*\*\* $p < 0.001$  comparados ao grupo controle, como determinado por "one-way" ANOVA.



## 4.2. Ação do Amblyomin-X em Células Renca

### 4.2.1. Morfologia das Células Renca pós-tratamento

O tratamento com Amblyomin-X induziu modificações morfológicas em todas as concentrações utilizadas (0,15 a 1,5 $\mu$ M), indicando dose-dependência, observados após 24 e 48 horas de tratamento (figura 13 e 14, respectivamente). Na figura 13, foram visualizados vacuolizações (setas) e arredondamento parcial em C, D, E, F e G.



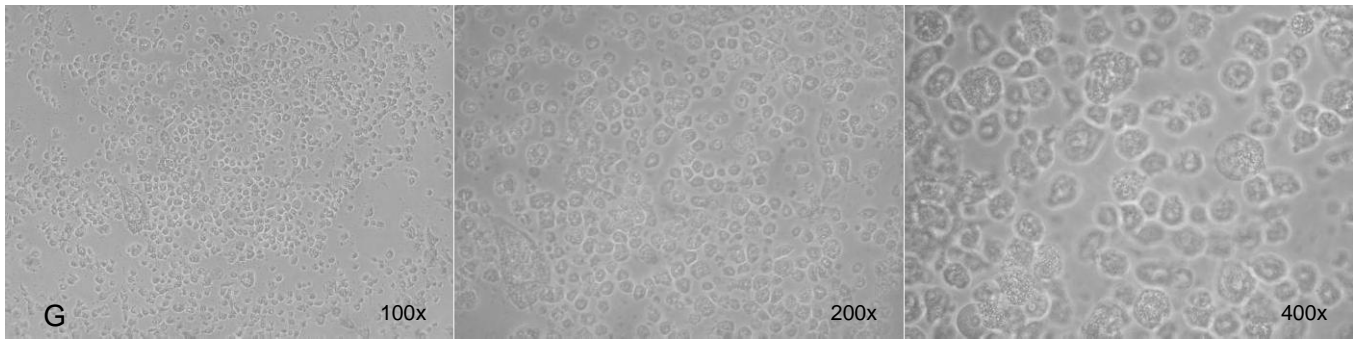
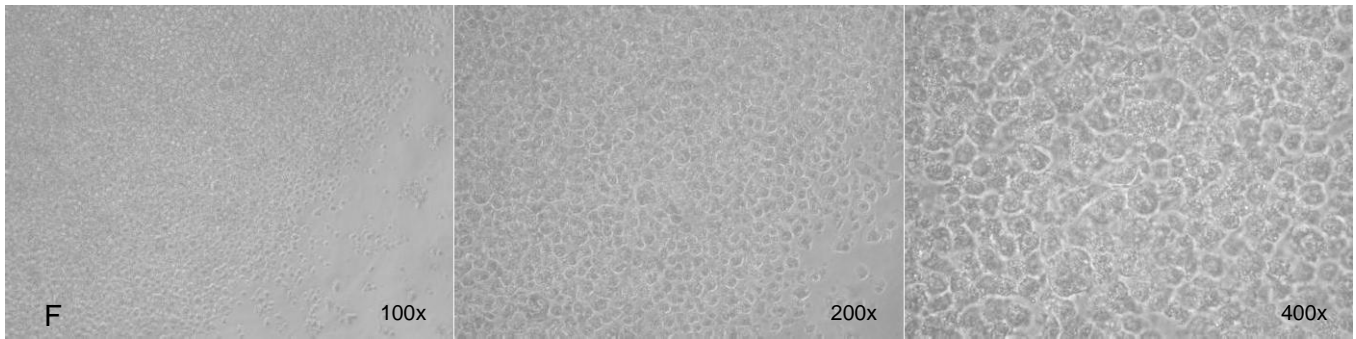
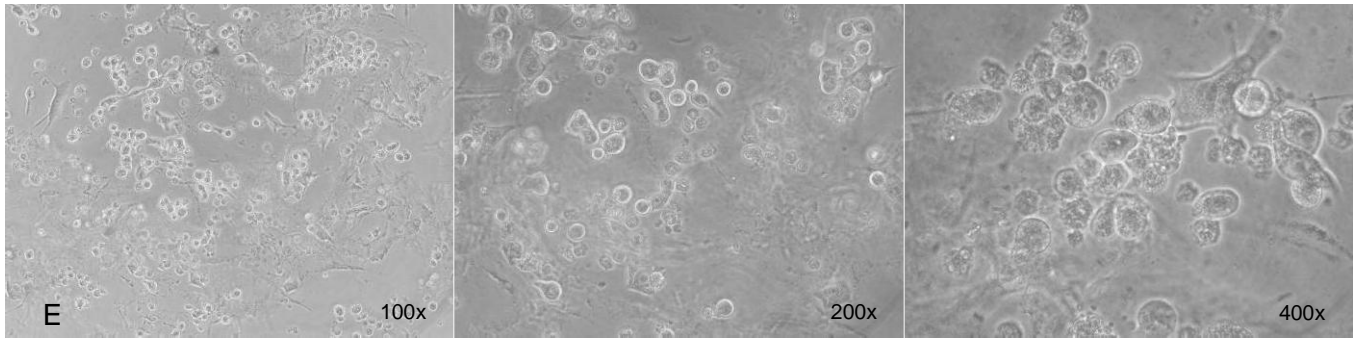
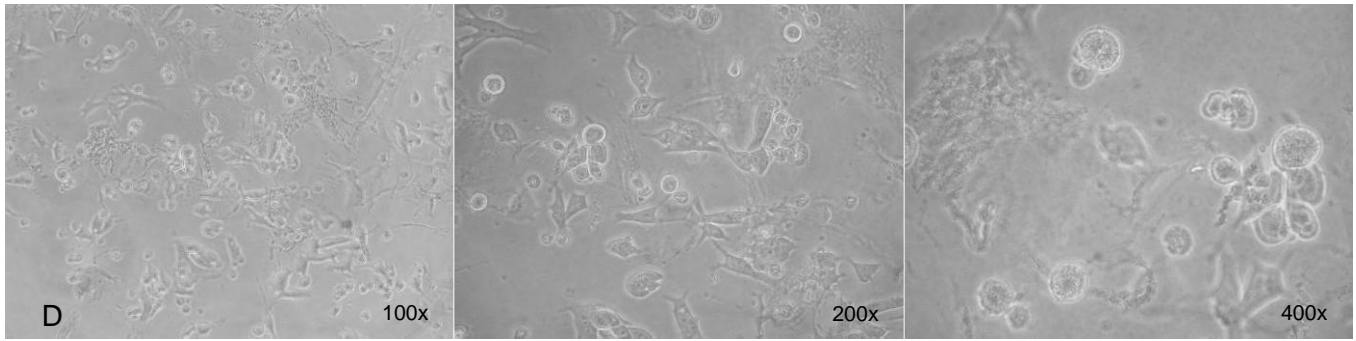
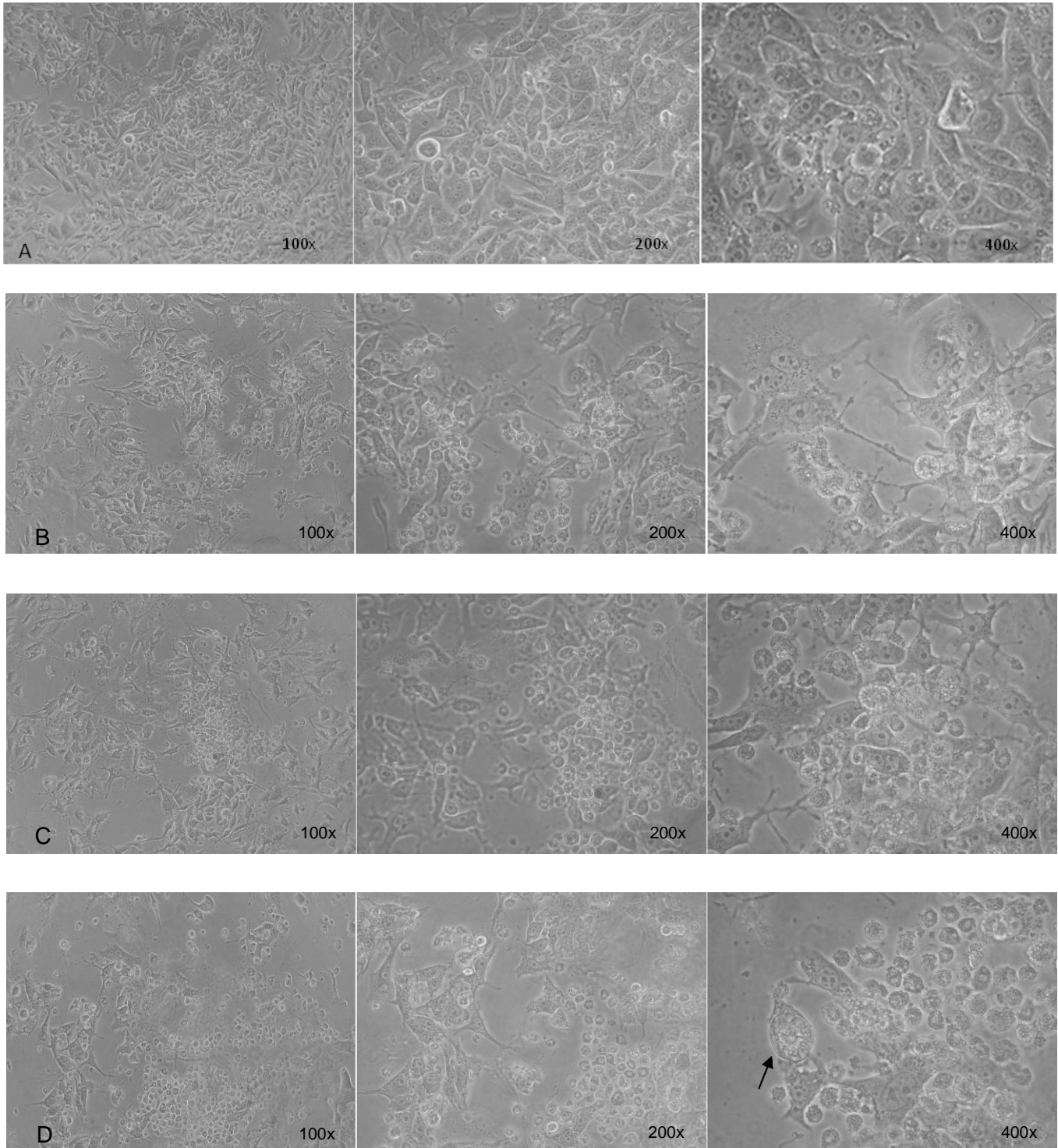


Figura 13. Morfologia das Células Renca após 24 horas de tratamento, nos aumentos de 100X, 200X e 400X. A: Células sem tratamento; B, C, D, E, F e G: Células tratadas com 0,15; 0,3; 0,6; 0,8; 1 e 1,5  $\mu$ M de Amblyomin-X, respectivamente.

Após 48 horas de tratamento (figura 14) as células apresentaram prolongamentos, características fusiformes e arredondamentos nas menores concentrações (0,15 e 0,3 $\mu$ M). Em D, E, F e G o arredondamento é ainda mais visível ocorrendo diminuição no número de células, indicando alta citotoxicidade. Em D, destaca – se a imagem de uma célula iniciando o arredondamento (seta).



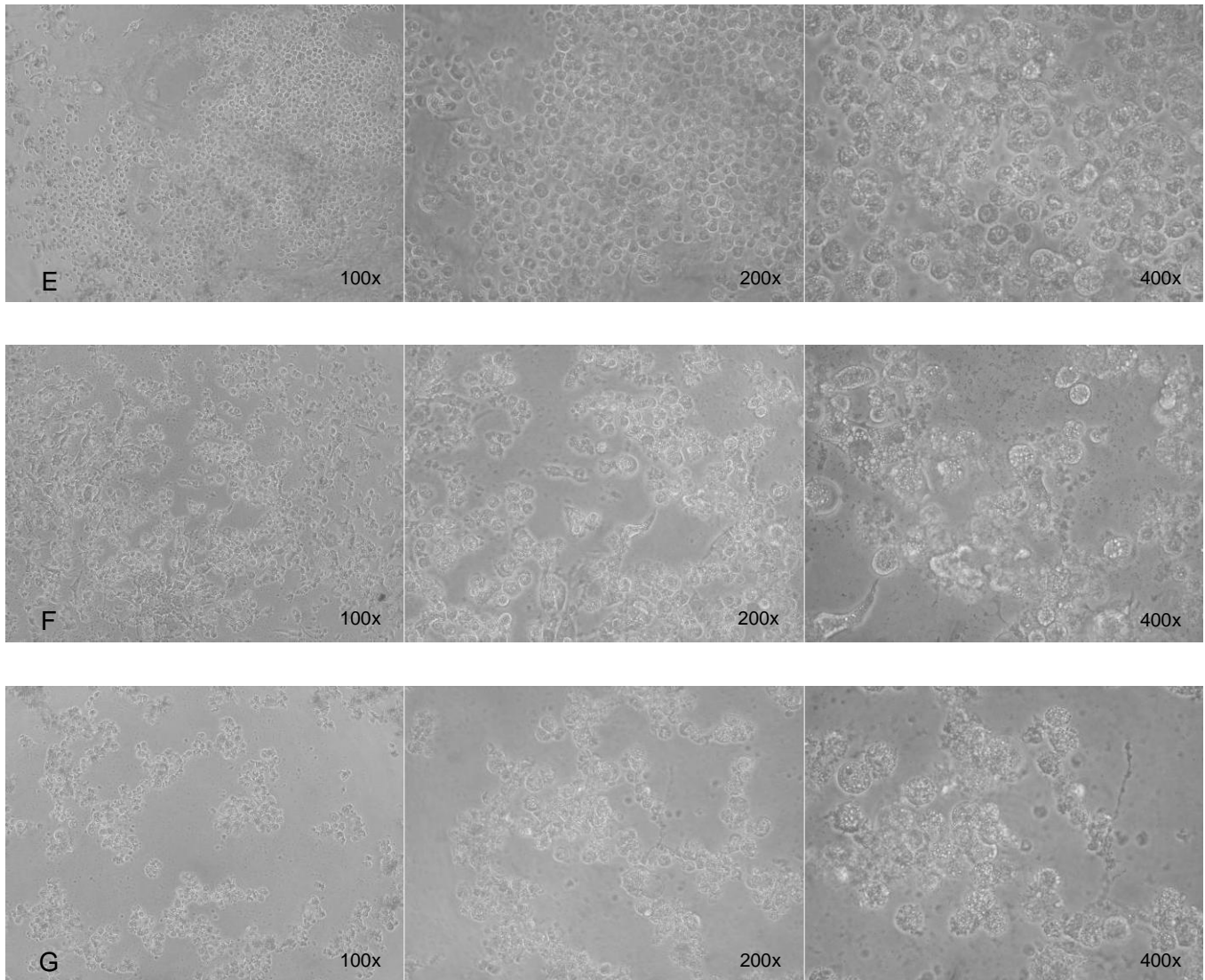


Figura 14. Morfologia das células Renca após 48 horas de tratamento, nos aumentos de 100X, 200X e 400X. A: Células sem tratamento (controle); B, C, D, E, F e G: Células tratadas com 0,15; 0,3; 0,6; 0,8; 1 e 1,5 $\mu$ M de Amblyomin-X, respectivamente. \*Alteração de imagem A 400x em 30/10/19.

#### 4.2.2. Viabilidade Celular por MTT

Pelo teste de MTT verificou-se que após 24 e 48 horas de tratamento com Amblyomin-X (0,15 a 1,5 $\mu$ M) ocorreu citotoxicidade dose- e tempo- dependentes. A partir de 0,15 $\mu$ M ocorreu diminuição de cerca de 40% da viabilidade celular após 24 horas de tratamento com Amblyomin-X.

#### Viabilidade de Células Renca após 24 horas de Tratamento com Amblyomin-X

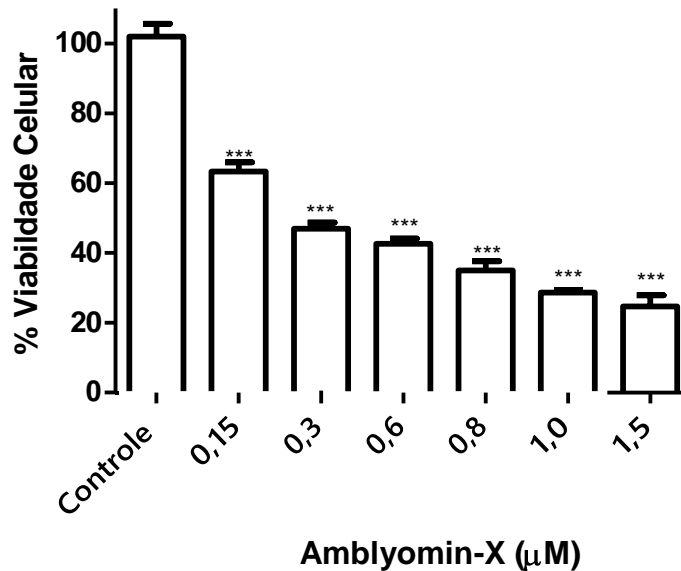


Figura 15. Viabilidade celular por MTT das células Renca após 24 horas de tratamento com Amblyomin-X (0,15 a 1,5  $\mu$ M), ou sem tratamento (controle). Viabilidade analisada pela formação de cristais de formazan nas células aderidas. Média  $\pm$  SD determinada a partir de três experimentos independentes. \*\*\* $p$ <0.001 comparados ao grupo controle, como determinado por "one-way" ANOVA.

Após 48 horas de tratamento, as concentrações de 1 e 1,5  $\mu\text{M}$  (figura 16), induziram morte de cerca de 90% das células, indicando forte efeito citotóxico.

### Viabilidade de Células Renca após 48 horas de Tratamento com Amblyomin-X

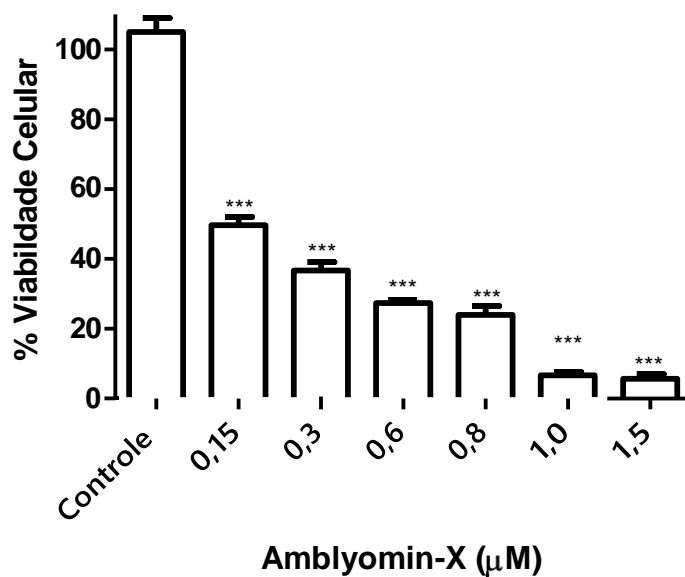


Figura 16. Viabilidade das células Renca por MTT após 48 horas de tratamento com Amblyomin-X (0,15 a 1,5  $\mu\text{M}$ ), ou sem tratamento (controle). Viabilidade analisada pela formação de cristais de formazan nas células aderidas. Média  $\pm$  SD determinada a partir de três experimentos independentes. \*\*\* $p < 0,001$  comparados ao grupo controle, como determinado por "one-way" ANOVA.

### 4.2.3. Análise das Fases do Ciclo Celular

As fases do ciclo celular foram analisadas por citometria de fluxo após 24 e 48 horas de tratamento com 0,15; 0,3; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,5 $\mu$ M de Amblyomin-X. Nas figuras 17 e 18, pode-se observar a diminuição de todas as fases do ciclo celular de células Renca tratadas. Nestas concentrações não houve modulação de alguma fase específica do ciclo celular.

#### Fases do Ciclo Celular de Renca após 24 horas de tratamento

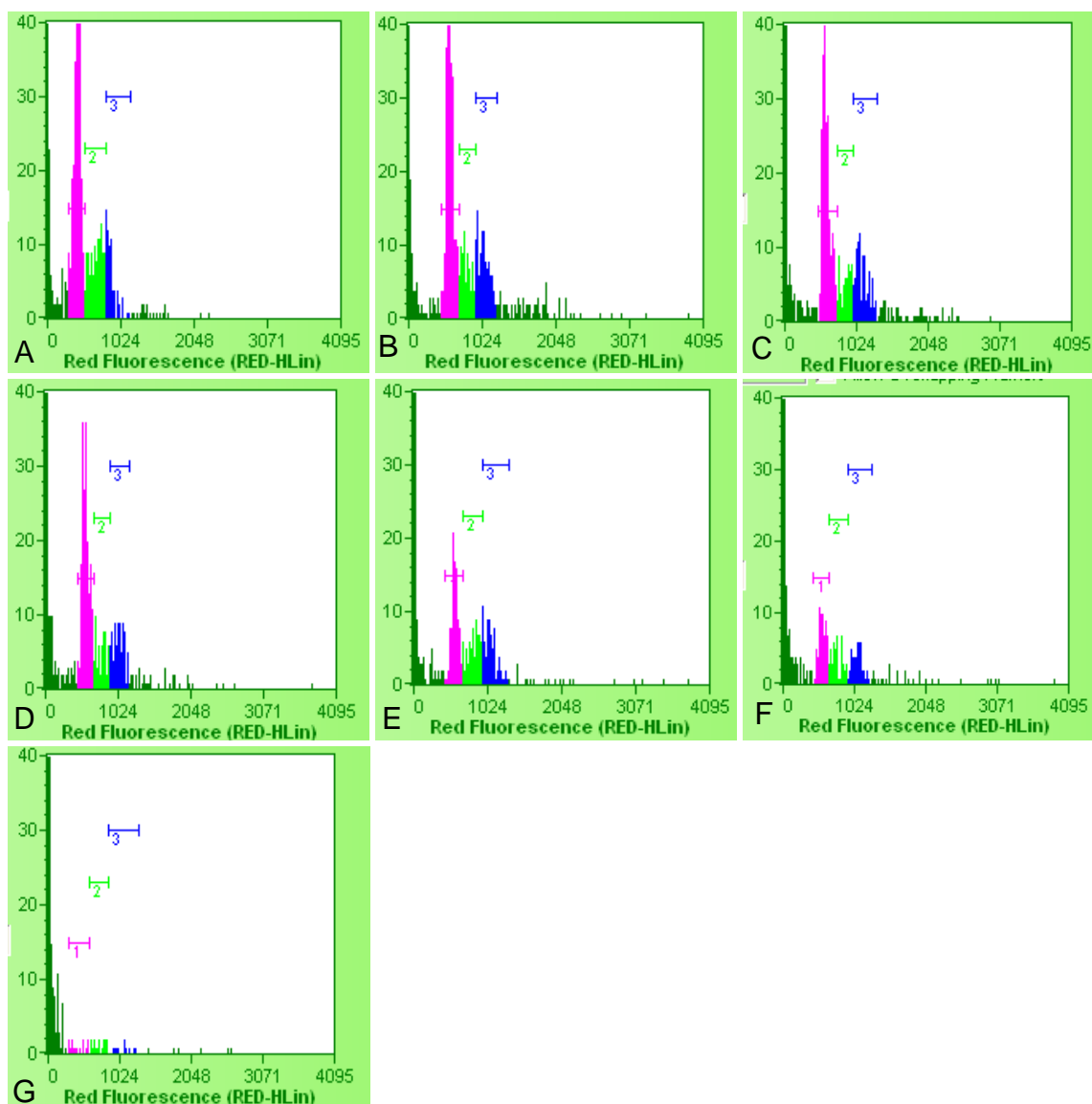


Figura 17. Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo de células Renca tratadas por 24 horas com Amblyomin-X (0,15 a 1,5 $\mu$ M), comparadas com o controle (sem tratamento). A: Células sem tratamento; B, C, D, E, F e G: Células tratadas com 0,15; 0,3; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,5  $\mu$ M de Amblyomin-X, respectivamente.

## Ciclo Celular de Renca tratadas por 24 horas com Amblyomin-X

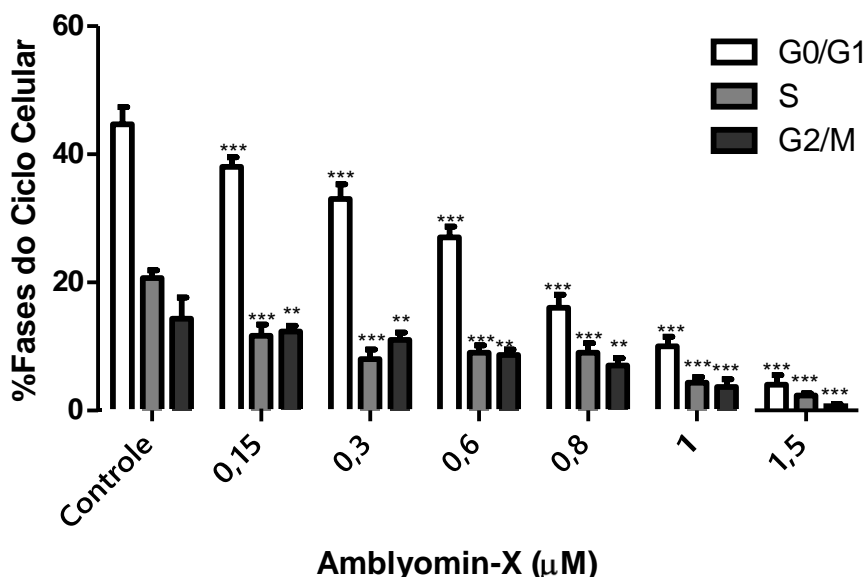


Figura 18. Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo em células Renca após 24 horas de tratamento com Amblyomin-X (0,15 a 1,5  $\mu$ M), ou sem tratamento (controle). A média  $\pm$  SD foi determinada a partir de três experimentos independentes. \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  comparados ao grupo controle, como determinado por “two way” ANOVA.

Para determinar se o Amblyomin-X causa modulação do ciclo celular em células Renca foi realizado em colaboração com os alunos Jean Gabriel de Souza e Hamilton Campos Zampolli do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, novas análises das fases do ciclo celular com menor concentração de Amblyomin-x.

Células Renca foram tratadas com 105nM de Amblyomin-X e, após 24 horas de tratamento, foram analisadas por citometria de fluxo FACScan. Na figura 19, observa-se que houve modulação na fase G0/G1 e diminuição das fases S e G2/M quando comparadas a células sem tratamento (controle).



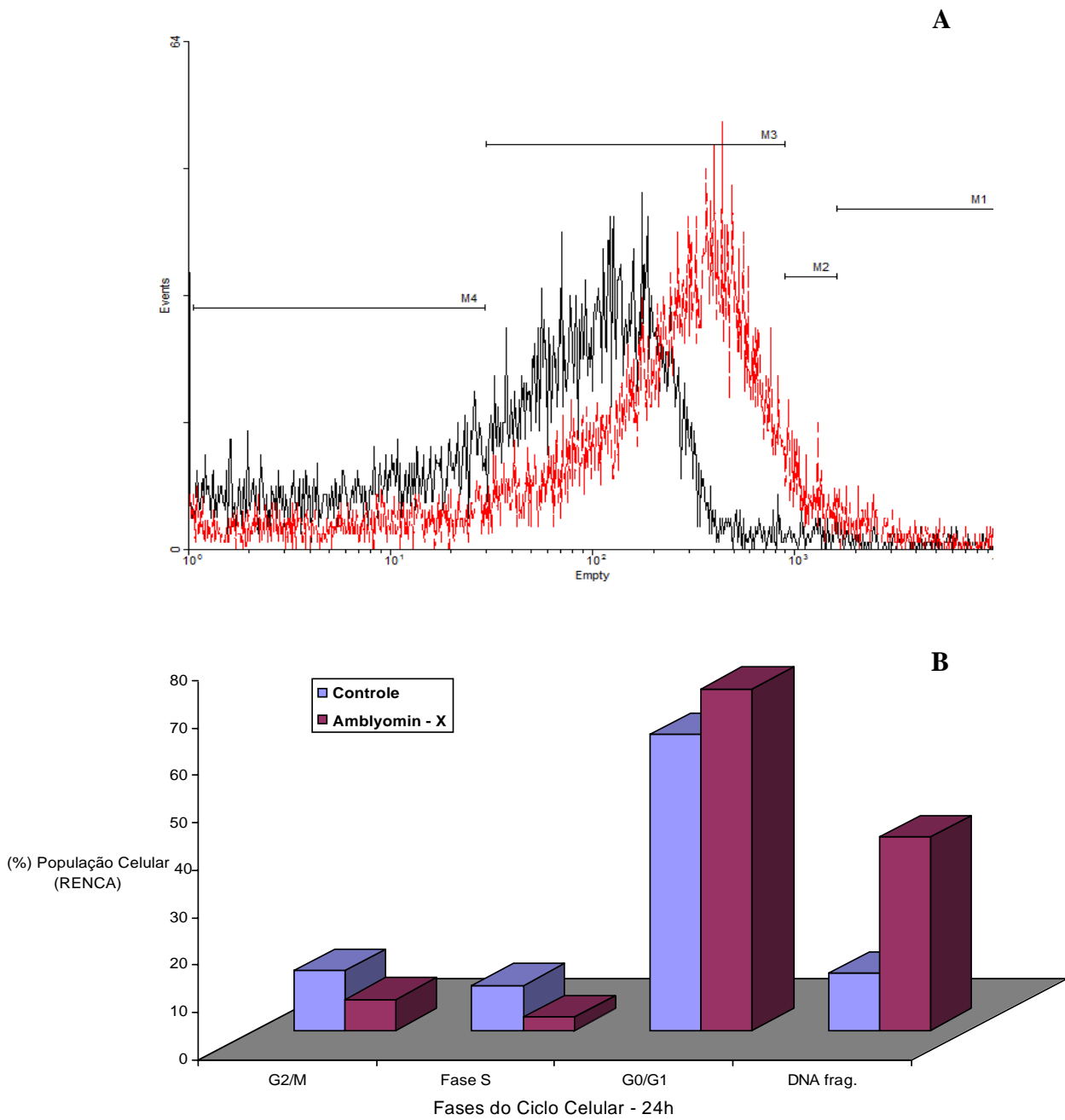


Figura 19. Distribuição das fases do ciclo celular de células RENCA: (A) Grupos controle, em vermelho, e células tratadas com 105 nM de Amblyomin – X, em preto. Histograma representativo das fases do ciclo celular M1- proliferativa G2/M, M2 fase S síntese, M3 quiescente G0/G1 e M4 DNA fragmentado. Média e desvio padrão dos grupos controle e tratado Amblyomin – X (B).

Após 48 horas de tratamento, nas mesmas condições, os efeitos foram ainda mais proeminentes (figuras 20 e 21).

### Fases do Ciclo Celular de Renca após 48 horas de tratamento

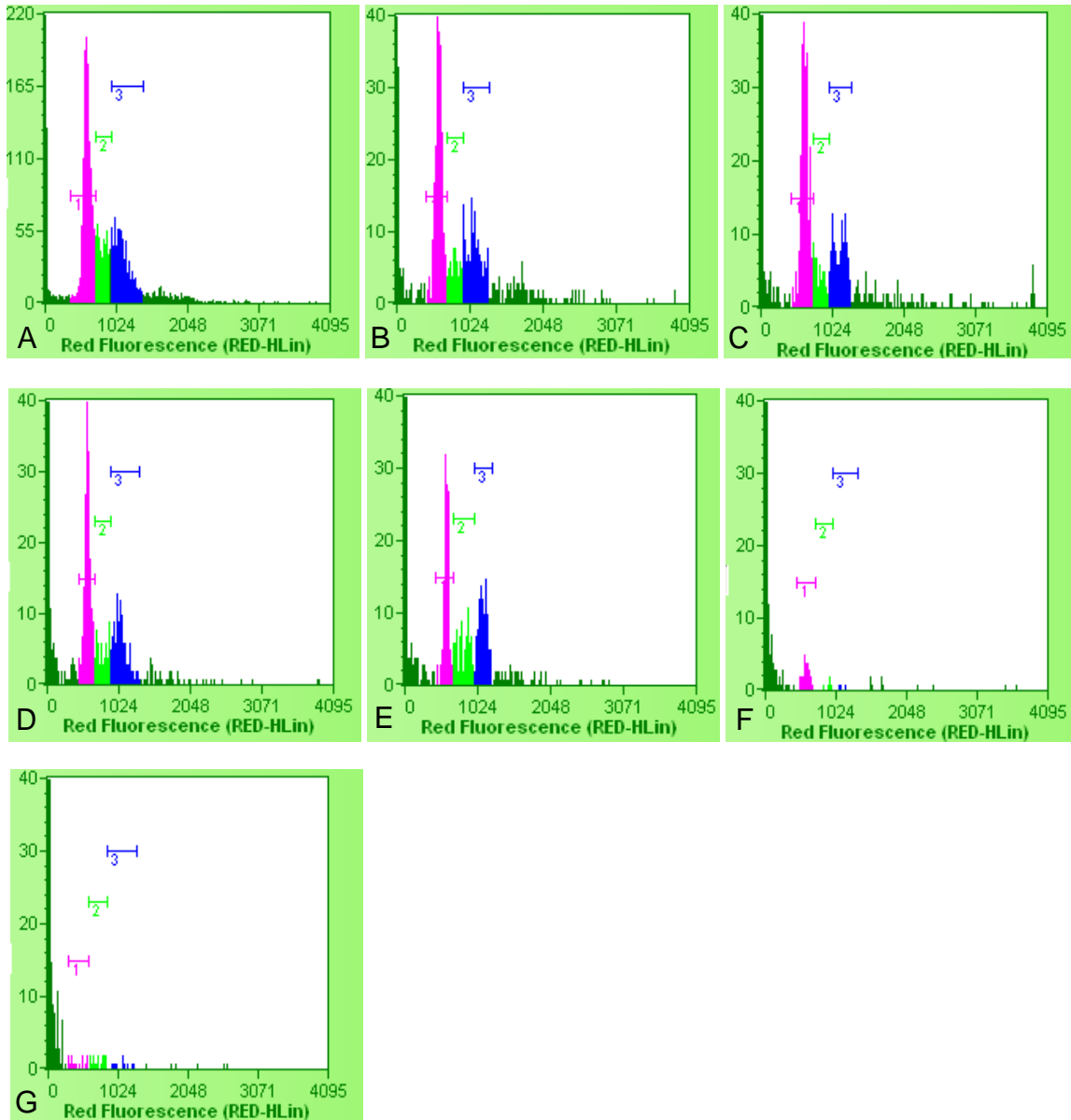


Figura 20. Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo em células Renca após 48 horas de tratamento com Amblyomin-X (0,15 a 1,5  $\mu$ M), ou sem tratamento (controle). A: Células sem tratamento; B, C, D, E, F e G: Células tratadas com 0,15; 0,3; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,5  $\mu$ M de Amblyomin-X, respectivamente.

## Fases do Ciclo Celular de Renca tratadas por 48 horas com Amblyomin-X

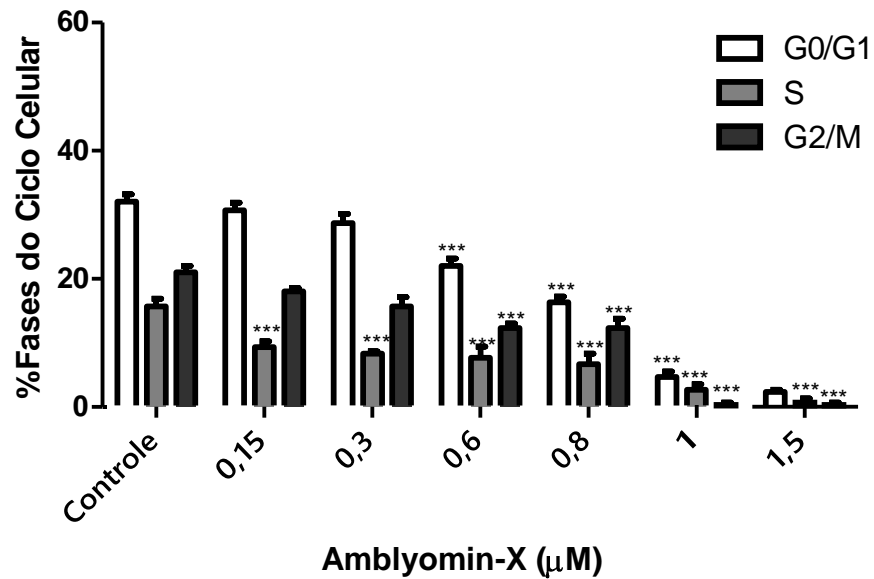


Figura 21. Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo em células Renca após 48 horas de tratamento com Amblyomin-X (0,15 a 1,5µM), ou sem tratamento (controle). A média  $\pm$  SD foi determinada a partir de três experimentos independentes. \*\*\* $p < 0.001$  comparados ao grupo controle, como determinado por "two way" ANOVA.

#### **4.2.4. Avaliação da Via de Morte por Citometria de Fluxo**

Para determinar a via de morte induzido pelo Amblyomin-X, células Renca tratadas (0,6; 0,8; 1,0 e 1,5 $\mu$ M) por 24 e 48 horas, foram marcadas com Anexina V-FitC e Iodeto de Propídeo e analisadas por citometria de fluxo, como mostram as figuras 22, 23, 24 e 25. Os parâmetros para análise das imagens obtidos na citometria de fluxo foram baseados nos trabalhos de Liu JW et al. (2010) e de Zheng YL et al. (2010).

**a** (quadrante inferior esquerdo): Células viáveis, negativas para ambos marcadores; **b** (quadrante inferior direito): células no início do processo apoptótico, marcadas somente com Anexina V – FitC; **c** (quadrante superior direito): células em apoptose tardia ou necrose, marcadas por Anexina V-FitC e Iodeto de Propídeo; **d** (quadrante superior esquerdo): células em necrose tardia, marcadas apenas com Iodeto de Propídeo.

O Amblyomin-X induziu citotoxicidade de forma dose-dependente nas células Renca. As células controle (sem tratamento) apresentaram viabilidade superior a 95% (*quadrante a*). As células tratadas com Amblyomin-X apresentaram morte superior a 45%, como pode ser observado nos quadrantes *b*, *c* e *d*, em ambos os tempos de tratamento (24 e 48 horas).

Observa-se nas figuras 22 e 23 aumento de células apoptóticas (apoptose inicial + apoptose tardia). Isso reitera a hipótese de que o Amblyomin-X induz morte via mecanismo de apoptose e de forma dose- dependente.

## Citotoxicidade em células Renca após 24 horas de tratamento com Amblyomin-X

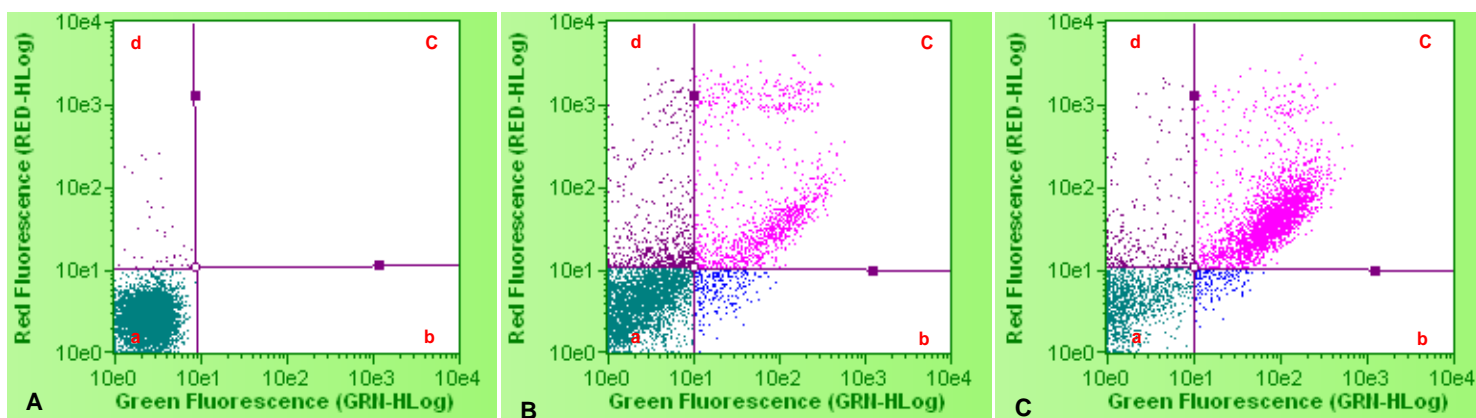


Figura 22. Citotoxicidade em células Renca tratadas com Amblyomin-X por 24 horas. **A**: células controle (não tratadas). **B**: células tratadas com 0,6  $\mu$ M de Amblyomin-X; e **C**: células tratadas 1,0  $\mu$ M de Amblyomin-X.

Análise realizada por citometria de fluxo (GUAVA System, GE) usando Anexina V-FitC e Iodeto de Propídeo como marcadores. O quadrante **a**: células viáveis, **b**: células em apoptose, em **c**: células em apoptose tardia/necrose, e **d**: células em necrose tardia.

Células Renca após 24 horas de tratamento com Amblyomin-X

	Viáveis (a)%	Apoptose Inicial (b)%	Apoptose Tardia ( c )%	Necrose Tardia (d)%
Controle (A)	94.68	0.18	1.8	3.34
0,6 $\mu$ M Ambly (B)	57.88	6.16	26.32	9.64
1,0 $\mu$ M Ambly (C)	27.61	3.72	62.58	6.10

Tabela 1. Porcentagem de células mortas após tratamento com Amblyomin-X por 24 horas. Análise realizada por citometria de fluxo usando os marcadores Anexina V-FitC e Iodeto de Propídeo. Controle: células Renca sem tratamento.

## Morte Celular após 24 horas de tratamento com Amblyomin-X

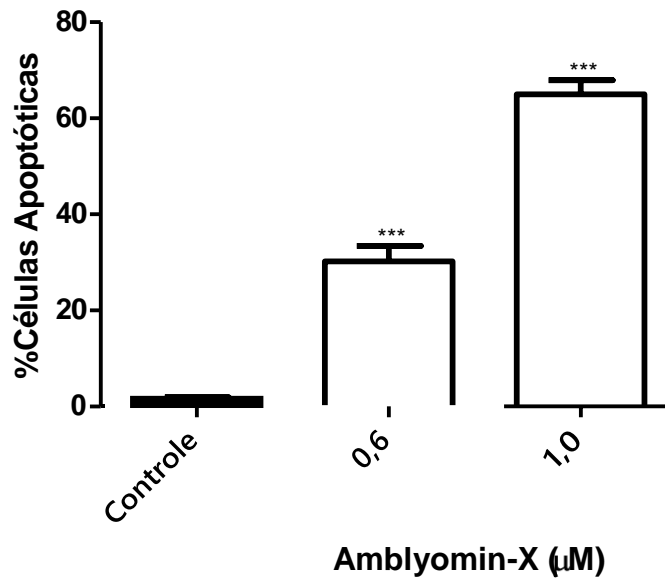


Figura 23. Apoptose em células Renca tratadas por 24 horas com Amblyomin-X. Ensaio realizado por citometria de fluxo (GUAVA System, GE) usando Anexina V-FitC e Iodeto de Propídeo como marcadores. Controle: células Renca em meio de cultura, sem nenhum tratamento. Média  $\pm$  SD determinada a partir de três experimentos independentes. \*\*\* $p < 0.001$  comparados ao grupo controle, determinado por "one-way" ANOVA.

## Citotoxicidade em células Renca após 48 horas de tratamento com Amblyomin-X

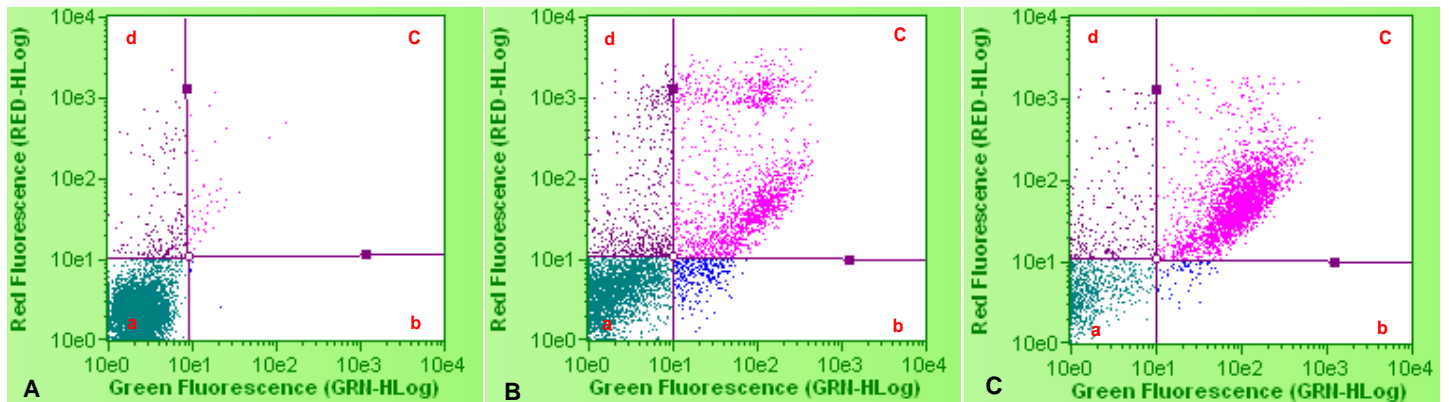


Figura 24. Citotoxicidade em células Renca tratadas com Amblyomin-X por 24 horas. **A**: células controle (não tratadas); **B**: células tratadas com 0,6 µM de Amblyomin-X; e **C** células tratadas 1,0 µM de Amblyomin-X.

Análise realizada por citometria de fluxo (GUAVA System, GE) usando Anexina V-FitC e Iodeto de Propídeo como marcadores. O quadrante **a**: células viáveis, **b**: células em apoptose, em **c**: células em apoptose tardia/necrose, e **d**: células em necrose tardia.

Células Renca após 48 horas de tratamento com Amblyomin-X

	Viáveis (a)%	Apoptose Inicial (b)%	Apoptose Tardia ( c )%	Necrose Tardia (d)%
Controle (A)	92.82	0.22	1.70	5.26
0,6 $\mu$ M Ambly (B)	50.70	5.84	32.86	10.60
1,0 $\mu$ M Ambly (C)	19.25	1.82	72.94	6.00

Tabela 2. Porcentagem de células mortas após tratamento com Amblyomin-X por 48 horas. Análise realizada por citometria de fluxo usando os marcadores Anexina V-FitC e Iodeto de Propídeo. Controle: células Renca sem tratamento.

### Morte Celular após 48 horas de tratamento com Amblyomin-X

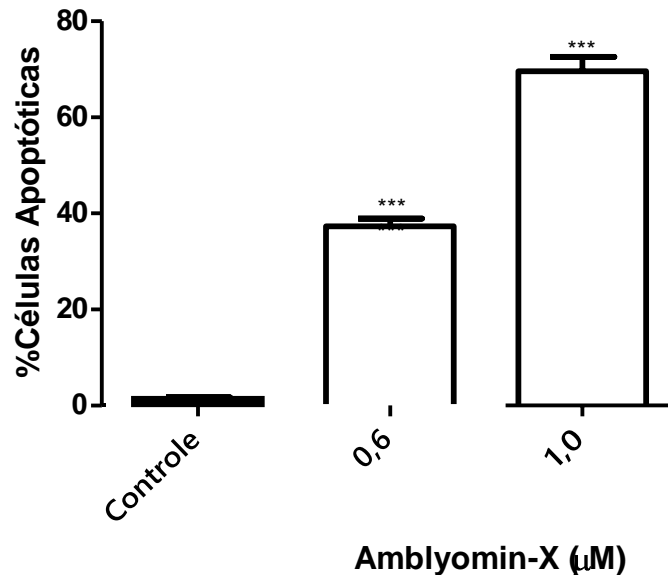


Figura 25. Apoptose em células Renca tratadas por 48 horas com Amblyomin-X. Ensaio realizado por citometria de fluxo (GUAVA System, GE) usando Anexina V-FitC e Iodeto de Propídeo como marcadores. Controle: células Renca em meio de cultura, sem nenhum tratamento. Média  $\pm$  SD determinada a partir de três experimentos independentes. \*\*\* $p$ <0.001 comparados ao grupo controle, determinado por "one-way" ANOVA.

#### 4.2.5. Fragmentação do DNA em Extrato de Células Renca

Experimento realizado em colaboração com a Dra. Carolina Berra, pós-doutoranda em nosso laboratório.

Na figura 26 está representada a degradação do DNA das células Renca tratadas por 24 horas com 0,6 e 1,0 $\mu$ M de Amblyomin-X (**C** e **D**, respectivamente), ou sem tratamento (**B**, controle).

O padrão de degradação observado nas células tratadas (**C** e **D**) indica apoptose (escada).

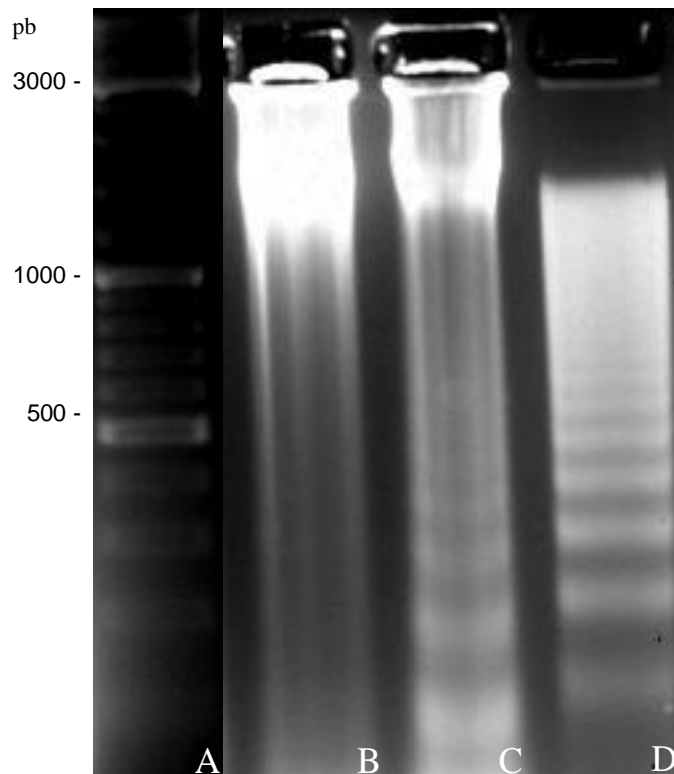


Figura 26. Degradação do DNA por eletroforese em gel de agarose. **A**: marcador de peso molecular (O'Gene Ruler DNA Ladder Mix - Fermentas); **B**: células controle sem tratamento; **C**: células Renca tratadas com 0,6 $\mu$ M de Amblyomin-X; **D**: células Renca tratadas com 1,0 $\mu$ M de Amblyomin-X.



## 4.2.6. Microscopia de Fluorescência

### 4.2.6.1. Tipo de Morte Celular

As células foram encontradas coradas em azul (Hoechst 33258), que marca o conteúdo do DNA celular; em vermelho (Iodeto de Propídeo), que marca o DNA das células com membrana celular lesada; e em rosa (ambos marcadores) células em apoptose.

Nas figuras 27 e 28, observar-se redução das células viáveis após tratamento com Amblyomin-X (figuras 27 B e C) comparado às células controle (27 A). O aumento da concentração de Amblyomin-X induz aumento de células apoptóticas (rosa).

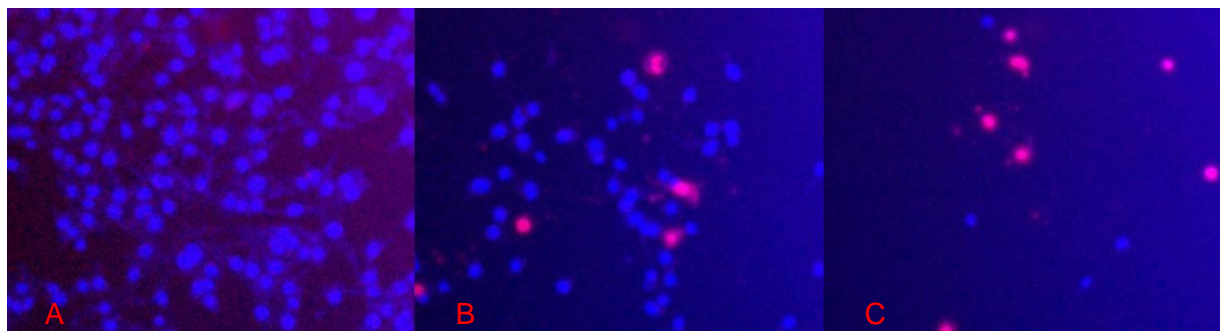


Figura 27. Microscopia de Fluorescência de células tumorais renais murinas (Renca) tratadas com 0,6 e 1,0  $\mu\text{M}$  Amblyomin-X. **A**: células controle (sem tratamento). **B** e **C**: células tratadas com 0,6 e 1,0  $\mu\text{M}$  de Amblyomin-X, respectivamente. Observa-se, após o tratamento, diminuição das células viáveis.

### Análise dos Efeitos do Amblyomin-X por Microscopia de Fluorescência



Figura 28. Tipo de morte de células Renca tratadas com 0,6 e 1,0 M de Amblyomin-X. Controle são células Renca sem nenhum tratamento. A média  $\pm$  SD foi determinada a partir de três experimentos independentes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  e \*\*\* $p < 0.001$  comparados ao grupo controle, como determinado por “two way” ANOVA.

#### 4.2.6.2. Modificações Morfológicas

A morfologia das células Renca tratadas ou não com Amblyomin-X foi avaliada por Microscopia de Fluorescência. As células foram coradas em azul com DAPI, que marca o conteúdo do DNA celular; em vermelho com Iodeto de Propídeo, que marca o DNA das células com membrana celular lesada; e com Laranja de Acridina, que faz interações iônicas com componentes ácidos na célula (como DNA, RNA, Lisossomo e células fagocitadas). Em pH ácido a coloração é laranja e em pH neutro ou básico a coloração é verde.

Na figura 26 A observa-se a morfologia intacta das células controle sendo o núcleo marcado em azul com DAPI e verde, com laranja de acridina.

Após 24 horas de tratamento com 1,0  $\mu$ M de Amblyomin-X as células apresentaram várias mudanças morfológicas como se pode observar na Figura 29. B, C e D. Nessas

imagens observa-se características típicas de morte por apoptose, como mudanças na superfície celular (“blebbing”) e formação dos corpos apoptóticos (figura 29. B, seta), retração celular (figura 29. C e D, setas), indicando morte por apoptose.

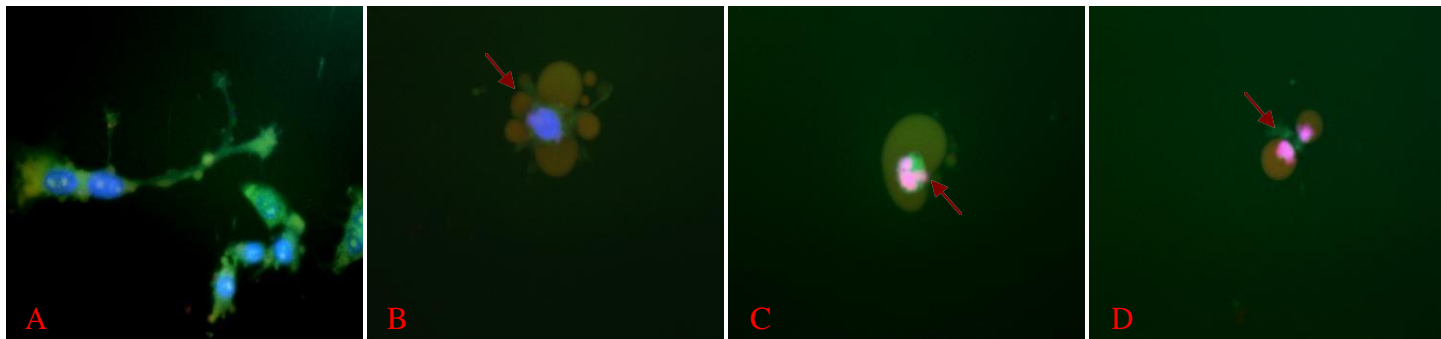
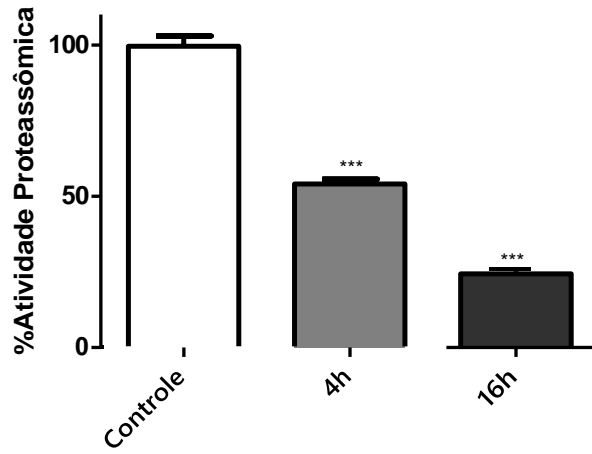


Figura 29. Microscopia de Fluorescência de células Renca tratadas com Amblyomin-X (1,0 $\mu$ M). A: Células sem tratamento (controle); B, C e D: células após 24 horas de tratamento com 1,0 $\mu$ M de Amblyomin-X.

#### **4.2.7. Análise da Atividade Proteassômica**

Para investigar a inibição do proteassomo como um possível alvo do Amblyomin-X, foi realizado, em colaboração com a Dra. Marilene Demasi, a inibição da atividade catalítica do proteassomo tipo quimiotripsina e tipo tripsina, utilizando-se peptídeos fluorogênicos LLVY e ARR, respectivamente. Após tratamento do extrato protéico de células Renca com Amblyomin-X 0,6 $\mu$ M, por 4 e 16 horas. Detectou-se a atividade inibitória do Proteassomo do tipo tripsina após 16 horas e do tipo quimiotripsina tanto após 4 quanto 16 horas de tratamento (figuras 30 e 31).

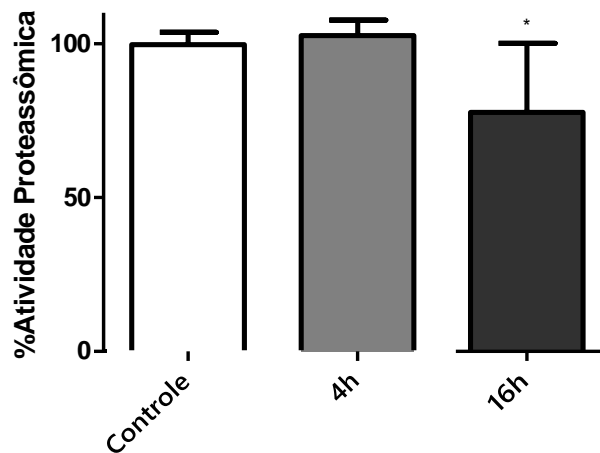
### Inibição da Atividade Tipo Quimiotripsina do Proteassomo



**Amblyomin-X 0,6μM**

Figura 30. Atividade do tipo Tripsina do Proteassomo utilizando substrato ARR, após 4 e 16 horas de tratamento de células Renca com Amblyomin-X 0,6μM. Controle são células Renca sem nenhum tratamento. Média ± SD determinada a partir de três experimentos independentes. \*\*\*p<0.001 comparados ao grupo controle, como determinado por “one-way” ANOVA.

### Inibição da Atividade do Tipo Tripsina do Proteassomo



**Amblyomin-X 0,6μM**

Figura 31. Atividade do tipo Quimiotripsina do Proteassomo utilizando substrato LLVY, após 4 e 16 horas de tratamento de células Renca com Amblyomin-X 0,6μM. Controle são células Renca sem nenhum tratamento. Média ± SD determinada a partir de três experimentos independentes. \*\*\*p<0.001 comparados ao grupo controle, como determinado por “one-way” ANOVA.

## 5. DISCUSSÃO

As opções terapêuticas para o Carcinoma de células renais são limitadas e insuficientes para controlar esta doença. Assim, este tumor é mais um forte candidato ao estudo de novas alternativas para seu tratamento, especialmente pela grande resistência à quimioterapia e radioterapia e aos novos fármacos que estão sendo lançados no mercado.

Alguns produtos naturais extraídos de plantas e outros organismos vivos são conhecidos por possuir eficácia como potenciais drogas anticancer (Shiah et al., 2007). Saliva de carrapato, por exemplo, pode ser fonte de produtos naturais uma vez que contém ampla gama de moléculas fisiologicamente ativas que participam em diversos processos fisiológicos, como a coagulação e a fibrinólise, imunidade e inflamação e angiogênese (Hovius et al., 2008) (Francischetti et al., 2009)(Chudzinski-Tavassi et al., 2010). O Amblyomin-X, é uma molécula recombinante, obtido a partir de uma biblioteca de cDNA das glândulas salivares do carrapato *Amblyomma cajennense*, capaz de inibir o fator Xa (FXa) da coagulação sanguínea e também promover atividade citotóxica em diferentes linhagens de células tumorais, sem, contudo, induzir importantes efeitos citotóxicos em células normais como as células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) e fibroblastos (Chudzinski-Tavassi, 2010). Este efeito citotóxico do Amblyomin-X ocorre pela indução de apoptose em diversas linhagens tumorais indicando um potencial terapêutico para esta molécula.

As linhagens Caki-1 e Renca foram cultivadas e tratadas com Amblyomin-X nas concentrações de 0,15 a 1,5  $\mu\text{M}$  e as alterações morfológicas nas células tratadas, em relação aos controles (sem tratamento) foram muito evidentes. Não foram realizados experimentos para avaliar mecanismos de morte na linhagem Caki-1 de Carcinoma Renal Humano (cedida gentilmente pela Dra. Maria Helena Bellini Marumo do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – USP) uma vez que as mesmas apresentaram problemas na ampliação não permitindo a obtenção de números de células suficientes para os experimentos.

Nas imagens obtidas após 24 e 48 horas de tratamento (Figuras 3, 4, 13 e 14) são observadas células arredondadas, indicando atividade do Amblyomin-X, sendo este efeito dose-dependente.

Experimentos realizados em paralelo pelo mestrando Jean Gabriel de Souza do nosso laboratório mostraram acúmulo na fase G0/G1 do ciclo das células Renca após tratamento por 24 horas, com 105 nM de Amblyomin-X, repercutindo, assim, na modulação da capacidade de proliferação celular. Em concentrações mais elevadas a modulação do ciclo celular na fase G0/G1 deixou de existir. Também se verificou redução na expressão de ciclina D1, sendo que esses resultados corroboram com os dados de análises do ciclo celular de células SK-Mel-28 e Mia-PaCa-2 tratadas com 0,5 e 1,0 $\mu$ M de Amblyomin-X, as quais apresentaram aumento nas fases G0/G1 e diminuição nas fases S e G2/M do ciclo celular, quando comparadas com células sem tratamento (Chudzinski-Tavassi et al., 2010).

Vários agentes quimioterápicos antineoplásicos induzem a apoptose, e IL-6 tem suprimido a indução de apoptoses pelos agentes citotóxicos. Mizutani, Y. et al (1995) propõem em seu trabalho que Interleucina-6 é um possível fator regulador da sensibilidade e resistência das células CCR à agentes antitumorais e também, estes autores sugerem que agentes que possam inibir a secreção de IL-6 podem tornar estas células mais sensíveis ao seu tratamento.

Os níveis de IL-6, detectados nos sobrenadantes das células Caki-1 tratadas com Amblyomin-X, diminuíram à medida que foi aumentada a concentração da proteína, sendo também diminuídos conforme o aumento de tempo de tratamento. A redução dos níveis de Interleucina-6 pode ser um dos alvos pelo qual o Amblyomin-X induz apoptose nestas células. Porém, não se sabe ao certo se essa diminuição dos níveis de IL-6 ocorrem também devido a citotoxicidade do tratamento com Amblyomin-X.

Além do Amblyomin-X induzir alterações morfológicas, tais como protuberâncias na membrana plasmática (blebbing), formação de corpos apoptóticos e retração das células tratadas com 0,6 e 1,0 $\mu$ M (Figura 29), também no ensaio de MTT verificou-se perda significativa da viabilidade das células tratadas com Amblyomin-X, de maneira dose-dependente. Os experimentos com anexina-V em conjunto com o corante vital PI, um método sensível para detectar as fases da apoptose (Figuras 22 e 24), apoiou as sugestões de que o tratamento com Amblyomin-x induz a apoptose em células nestas

células. Além disso, a citometria de fluxo de células coradas com Hoechst / PI e laranja de acridina / IP, confirmaram a apoptose como mecanismo de morte celular em Renca.

Porém, durante os experimentos, foram observadas vacuolizações nas células tratadas com Amblyomin-X, que poderiam sugerir outro tipo de morte celular (Paraptose, por exemplo).

A morte celular programada (PCD) é uma forma de morte em que a célula desempenha um papel ativo de induzir sua própria morte. A PCD abrange morte por apoptose, por autofagia, catástrofe mitótica ou paraptose. Estes tipos de mortes programadas diferenciam-se da apoptose por algumas características como por exemplo, apresentarem modificações citoplasmáticas diversas, vias de sinalizações diferentes, e outras (Sperandio et al., 2004).

A apoptose é um mecanismo rigidamente controlado por expressões genéticas decorrentes da interação célula e meio externo, levando à produção de várias moléculas com atividades específicas que resultam em alterações funcionais celulares. Este processo de morte possui um papel essencial na manutenção da homeostase tecidual e é importante em certas condições patológicas, incluindo o câncer (Israels et al., 1999).

A Paraptose é uma forma de PCD caracterizada por vacuolização citoplasmática, diferente morfológicamente das células apoptóticas por apresentar estes “espaços vazios no citoplasma celular”, não ocorrendo ativação de caspases e ausência de inibição por inibidores de caspase e Bcl-xl.

Estas vacuolizações citoplasmática também foram descritos por alguns autores como vacuolizações autofágicas e esses estudos indicam que a autofagia e apoptose podem estar vinculadas. Segundo alguns autores, a inibição da apoptose pode levar a morte celular autofágica crônica (Boya et al., 2005) (Carneiro et al., 2010) (Gonzalez-Polo et al., 2005).

Neste trabalho também foram realizados testes preliminares para avaliar a função do Amblyomin-X no proteassomo. Os resultados, que podem ser observados nas figuras 30 e 31, indicam que ocorreu uma significativa redução da atividade do tipo quimiotripsina do proteassomo.

Inibidores de proteossomo podem parar ou retardar a progressão do câncer, interferindo com a degradação temporal de moléculas regulatórias, tais como Ciclina-E, p21, p27, p53, topoisomerases I, II e IκB. A inibição do proteassoma mediada pela

degradação I $\kappa$ B pode limitar a metástase e fazer com que células cancerosas em divisão tornem-se mais sensíveis à apoptose. Assim, inibidores de proteossomo podem agir através de vários mecanismos para deter o crescimento do tumor, metástase e angiogênese, oferecendo uma nova abordagem para o tratamento do câncer.

Pode-se também especular que o Amblyomin-X possa regular negativamente os níveis de NF- $\kappa$ B. O proteossomo, por sua vez, pode inibir indiretamente essa molécula, uma vez que ele degrada o inibidor de NF- B (I B). Em células normais, o NF- B encontra-se conjugado ao I B no citoplasma. Após o I B ser degradado, o NF- B é liberado e quando translocado ao núcleo da célula ele inicia a transcrição gênica de proteínas envolvidas na progressão tumoral (Meteoglu et al., 2008).

O primeiro inibidor de proteossomo aprovado para uso clínico no tratamento de mieloma múltiplo é o Bortezomibe (VELCADE®). Alguns estudos têm indicado que o Bortezomibe está associado com o aumento da apoptose devido a inibição da atividade do NF- $\kappa$ B. Da mesma forma que observado nos resultados com Amblyomin-X, o Bortezomibe inibe a atividade tipo quimiotripsina do proteossomo 20S.

Em alguns estudos de carcinoma renal, *in vitro*, o Bortezomibe demonstrou alguma eficácia, porém existem muitos resultados contraditórios na literatura. Estudos clínicos de fase II com esse fármaco, em carcinoma renal, não estão sendo muito promissores. Toxicidade atribuída ao Bortezomibe (fadiga, neuropatias sensoriais, náusea, anemia e transaminite) provavelmente reflete a consequência de inibição não específica do sistema ubiquitina-proteossomo (Corn et al., 2007).

Os resultados preliminares da atividade do proteossomo apresentados neste trabalho indicam que o Amblyomin-X tem grande potencial inibitório sobre a atividade catalítica do mesmo, levando-nos a sugerir uma potencial relevância para o tratamento deste tipo de câncer.

Em resumo, a apoptose induzida pelo Amblyomin-X, como evidenciado pelos testes de anexina V, degradação do DNA e microscopia de fluorescência, contribuem para os efeitos inibitórios do Amblyomin-X sobre a viabilidade das células Renca. Ainda, acreditamos que um possível alvo do Amblyomin-X seja a inibição do sistema ubiquitina-proteossomo. Estes resultados são consistentes com estudos anteriores em que o Amblyomin-X induziu apoptose em melanoma humano (SK-Mel-28) e adenocarcinoma pancreático (Mia Paca-2).



## 6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que o Amblyomin-X tem atividade tóxica para células de carcinomas renais, *in vitro*, e que a sua atividade antitumoral contra CCR ocorre por indução de apoptose.

A morte induzida pelo Amblyomin-X indica ser pela via apoptótica, uma vez que por diversas abordagens (degradação de DNA, Citometria de Fluxo, Microscopia de Fluorescência) foram evidenciadas características deste tipo de morte. Um dos alvos moleculares do Amblyomin-X possivelmente seja o proteassomo.

Estes achados sugerem que o Amblyomin-X pode ser um promissor agente para a terapia de tumores renais resistentes a drogas e / ou imunoterápicos, embora estudos adicionais sejam necessários para esclarecer os mecanismos pelos quais o Amblyomin-X induz esta citotoxicidade.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott P. Proteasome Inhibitors: A Novel Class of Potent and Effective Antitumor Agents. *Cancer Research*; 59: 2615-2622, 1999.
2. Alimov A, Kost-Alimova M, Liu J, et al. Combined LOH/CGH analysis proves the existence of interstitial 3p deletions in renal cell carcinoma. *Oncogene*; 19: 1392-1399, 2000.
3. Almond JB, Cohen GM. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 16: 433-443, 2002.
4. An J, Sun Y, Fisher M, Rettig MB. Maximal apoptosis of renal cell carcinoma by the proteasome inhibitor bortezomib is nuclear factor-KB dependent. *Molecular Cancer Therapeutics*; 3(6): 727-36, 2004.
5. Baisch H, Otto U, Klöppel G. Antiproliferative and Cytotoxic Effects of Single and Combined Treatment with Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and/or  $\alpha$  Interferon on a Human Renal Cell Carcinoma Xenotransplanted into nu/nu Mice: Cell Kinetic Studies. *Cancer Research*; 50: 6389-6395, 1990.
6. Batista IFC, Chudzinski-Tavassi AM, Faria F, Simons SM, Barros-Batesti DM, Labruna MB, Leão LI, Ho PL, Junqueira-de-Azevedo ILM. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Toxicon*; 51: 823-834, 2008.
7. Batista IFC, Ramos OHP, Ventura JS, Junqueira-de-Azevedo ILM, Ho PL, Chudzinski-Tavassi AM. A new Factor Xá inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a

- unique domain composition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 493: 151-156, 2010.
8. Bill J, Zapala L, Nowis D, Jakobisiak M, Golab J. Statins potentiate cytostatic/cytotoxic activity of sorafenib but not sunitinib against tumor cell lines *in vitro*. *Cancer Lett*; 288(1):57-67, 2010.
  9. Boer JM, Huber WK, Sultmann H, et al. Identification and classification of differentially expressed genes in renal cell carcinoma by expression profiling on a global human 31,500 element cDNA array. *Genome Res*; 11: 1861-1870, 2001.
  10. Bours V, Bentires-Alj M, Hellin AC, Viatour P, Robe P, Delhalle S, Benoit V, Merville MP. Nuclear Factor-kB, Cancer, and Apoptosis. *Biochemical Pharmacology*; 60: 1085–1090, 2000.
  11. Bröker LE, Kruyt FAE, Giaccone G. Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clinical Cancer Res.*; 11(9): 3155-62, 2005.
  12. Brooks P, Fuertes G, Murray RZ, Bose S, Knecht E, Rechsteiner MC, Hendil KB, Tanaka K, Dyson J, Rivett AJ. Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem J*; 346: 155–161, 2000.
  13. Broze GJ Jr, Miletich JP. Isolation of the tissue factor inhibitor produced by HepG2 hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:1886-90, 1987.
  14. Bukowski RM. Cytokine combinations: therapeutic use in patients with advanced renal cell carcinoma. *Semin Oncol*; 27(2): 204-12, 2000.

15. Call JA, Eckhardt SG, Camidge DR. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *Lancet Oncol.*; 9(10): 1002-11, 2008.
16. Castedo M, Perfettini JL, Roumieri T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*; 23:2825–2837, 2004.
17. Chand HS, Schmidt AE, Bajaj SP, Kisiel W. Structure-function analysis of the reactive site in the first Kunitz-type domain of human tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biol Chem.* 279:17500-7, 2004.
18. Chang YS, Adnane J, Trail PA, Levy J, Henderson A, Xue D, Bortolon E, Ichetovkin M, Chen C, McNabola A, Wilkie D, Carter CA, Taylor ICA, Lynch M, Wilhelm S. Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol*; 59:561-574, 2007.
19. Chen JJ, Lin YC, Yao PL, Yuan A, Chen HY, Shun CT, Tsai MF, Chen CH, Yang PC. Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. *J Clin Oncol.*;23(5):953-64, 2005.
20. Chen N, Debnath J. Autophagy and tumorigenesis. Review. *FEBS Letters* 584: 1427–1435, 2010.
21. Chen N, Karantza-Wadsworth V. Role and regulation of autophagy in cancer. Review. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793 :1516–1523, 2009.

22. Childs R, Chernoff A, Contentin N, et al: Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *N Engl J Med*; 343(11): 750-8, 2000.
23. Chow WH, Devesa SS, Warren JL. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA*; 281(17): 1628-31, 1999.
24. Chudzinski –Tavassi AM, De-Sá-Júnior PL, Simons SM, Maria DA, Ventura JS, Batista IFC, Faria F, Durães E, Reis EM, Demasi M. A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. *Toxicon*; 2010.
25. Corn PG. Role of the ubiquitin proteasome system in renal cell carcinoma. *BMC Biochem*. 8 Suppl 1:94, 2007.
26. Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Review Cancer*; 9(7): 501-7, 2009.
27. Demasi M, Davies KJA. Proteasome inhibitors induce intracellular protein aggregation and cell death by an oxygen-dependent mechanism. *FEBS Letters*; 542: 89-94, 2003.
28. De Mulder PHM, van Herpen CML, Mulders PAF. Current treatment of renal cell carcinoma. *Annals of Oncology* 15: 319 - 328, 2004.
29. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*; 35:495–516, 2007.
30. Fernandez P., Rickles F. R. Tissue factor and angiogenesis in cancer. *Curr. Opin. Hematology*, 9: 401-406, 2002.

31. Fombonne J, Padrón L, Enjalbert A, Krantic S, Torriglia A. A novel paraptosis pathway involving LEI/L-Dnasell for EGF-induced cell death in somato-lactotrope pituitary cells. *Apoptosis*; 11: 367–375, 2006.
32. Francischetti IM, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JM. The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci.*;14:2051–2088, 2009.
33. Fulda S. Modulation of Apoptosis by Natural Products for Cancer Therapy. Review. *Planta Med*; 76: 1075–1079, 2010.
34. Guchelaar HJ, Vermes A, Vermes I, Haanen C. Apoptosis: molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy. Review. *Pharmacy World & Science*; 19 (3): 119-125, 1997.
35. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*;118(3):285-96, 2004.
36. Hovius JWR, Levi M, Fikrig E. Salivating for knowledge: potential pharmacological agents in tick saliva. *PLOS Medicine*; 5(2): 202-208, 2008.
37. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *Stem Cells*; 17: 306-313, 1999.
38. Jariel-Encontre, Bossis G, Piechaczyk. Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1786: 153-77, 2008.
39. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of Cell Death Signaling Pathways. Review. *Cancer Biology & Therapy* 4:2, 139-163, 2005.
40. Kadhim SA, Bowlin TL, Waud WR, Angers EG, Bibeau L, DeMuys JM, Bednarski K, Cimpoaia A, Attardo G. Potent Antitumor Activity of a Novel Nucleoside Analogue,

BCH-4556 ( $\beta$ -L-Dioxolane-cytidine), in Human Renal Cell Carcinoma. *Cancer Research*; 57:4803-4810, 1997.

41. Keyes K, Cox K, Treadway P, Mann L, Shih C, Faul MM, Teicher BA. An *in vitro* Tumor Model: Analysis of Angiogenic Factor Expression after Chemotherapy. *Cancer Research*; 62: 5597-5602, 2002.
42. Kim HS, Kim WS, Park SH, Jung CW, Choi HY, Lee HM, Jeon SS, Ha H, Hwang IG, Lee S, Lim HY. Molecular biomarkers for advanced renal cell carcinoma: Implications for prognosis and therapy. *Urologic Oncology*; 1-7, 2008.
43. Kim JH, Jung JY, Shim JH, Kim J, Choi KH, Shin JA, Choi ES, Lee SO, Chintharlapalli S, Kwon KH, Leem DH, Cho NP, Cho SD. Apoptotic Effect of Tolfenamic Acid in KB Human Oral Cancer Cells: Possible Involvement of the p38 MAPK Pathway. *J Clin Biochem Nutr.* 47(1): 74-80, 2010.
44. Klatte T, Pantuck AJ, Kleid MD, Belldegrun AS. Understanding the Natural Biology of Kidney Cancer: Implications for Targeted Cancer Therapy. *Reviews in Urology*; 9(2):47-56, 2007.
45. Leek RD, Harris AL. Tumor-associated macrophages in breast cancer. Review. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*; 7(2):177-89, 2002.
46. Li Q and Verma I M. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*; 2(10): 725-734, 2002.
47. Liu JW, Cai MX, Xin Y, Wu QS, Ma J, Yang P, Xie HY, Huang DS. Parthenolide induces proliferation inhibition and apoptosis of pancreatic cancer cells *in vitro*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*; 29(108):1-7, 2010.

48. Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, Karin M. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts Inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell*; 6(3):297-305, 2004.
49. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews.*; 9: 153-166, 2009.
50. Mani A, Gelmann EP. The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Its Role in Cancer. *Journal Clinical Oncology*; 23(21): 4776-89, 2005.
51. McConkey DJ, Zhu K. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resistance Updates*; 11(4-5):164-179, 2008.
52. McLaughlin JK, Lipworth L: Epidemiologic aspects of renal cell cancer. *Semin Oncol*; 27(2): 115-23, 2000.
53. Meloni -Ehrig AM. Renal cancer: cytogenetic and molecular genetic aspects. *Review. Am J Med Genet*; 30: 164-172, 2002.
54. Meteoglu I, Erdogan IH, Meydan N, Erkus M, Barutca S. NF-KappaB expression correlates with apoptosis and angiogenesis in clear cell renal cell carcinoma tissues. *Journal of Experimental e Clinical Cancer Research*; 27:53, 2008.
55. Mizutani Y, Bonavida B, Koishihara Y, Akamatsu K, Ohsugi Y, Yoshida O. Sensitization of Human Renal Cell Carcinoma Cells to cis-Diamminedichloroplatinum(II) by Anti-Interleukin 6 Monoclonal Antibody or Anti-Interleukin 6 Receptor Monoclonal Antibody. *Cancer Research*; 55:590-596, 1995.
56. Morais C, Healy H, Johnson DW, Gobe G. Inhibitor of nuclear factor kappa B attenuates tumor progression in an animal model of renal cell carcinoma. *Nephrol Dial Transplant*. 25(5): 1462-74, 2010.



57. Motegi A, Murakawa Y, Takeda S. The vital link between the ubiquitin–proteasome pathway and DNA repair: Impact on cancer therapy. Review. *Cancer Lett.* 283(1):1-9, 2009.
58. Nicolini A, Carpi A, Rossi G. Cytokines in breast cancer. Review. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 17: 325–337, 2006.
59. Park WH, Cho YH, Jung CW, Park JO, Kim K, Im YH, Lee MH, Kang WK, Park K. Arsenic trioxide inhibits the growth of A498 renal cell carcinoma via cell cycle arrest or apoptosis. *Bioch Bioph Res.*; 300:230-235, 2003.
60. Peggs KS, Quezada SA, Allison JP. Cancer immunotherapy: co-stimulatory agonists and co-inhibitory antagonists. Review. *Clinical and Experimental Immunology*, 157: 9–19, 2009.
61. Phillips JL, Pavlovich CP, Walther M, Ried T, Linehan WM. The genetic basis of renal epithelial tumors: advances in research and its impact on prognosis and therapy. *Curr Opin Urol*; 11: 463-469, 2001.
62. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*; 431(7007):461-6, 2004.
63. Rao CN, Cook B, Liu Y, Chilukuri K, Stack MS, Foster DC, Kisiel W, Woodley DT. HT-1080 fibrosarcoma cell matrix degradation and invasion are inhibited by the matrix-associated serine protease inhibitor TFPI-2/33 kDa MSPI. *Int J Cancer*, 76(5):749-56, 1998.
64. Ritchie AW, Chisholm GD. The natural history of renal carcinoma. *Semin Oncol*; 10(4): 390-400, 1983.

65. Sandset PM, Bendz B. Tissue factor pathway inhibitor: clinical deficiency states. Review. *Thromb Haemost.* 78:467-70, 1997.
66. Shearwin-Whyatt LM, Kumar S. Caspases in Developmental Cell Death. Critical Review. *IUBMB Life*, 48: 143–150, 1999.
67. Shiah HS, Lee WS, Juang SH, Hong PC, Lung CC, Chang CJ, Chou KM, Chang JY. Mitochondria-mediated and p53-associated apoptosis induced in human cancer cells by a novel selenophene derivative, D-501036. *Biochem. Pharmacol.*, 73:610–619, 2007.
68. Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell J, Tithof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *International Journal of Oncology*; 22: 107-113, 2003.
69. Sievers E, Dreimüller P, Haferkamp A, Schmidt-Wolf IGH, Büchler MW, Schmidt J, Märten A. Characterization of Primary Renal Carcinoma Cultures. *Urol Int.*; 79: 235-243, 2007.
70. Sperandio S, Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *PNAS*. 97(26): 14376–14381, 2000.
71. Sperandio S, Poksay K, Belle I, Lafuente MJ, Liu B, Nasir J, Bredesen DE. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death and Differentiation*; 11: 1066-1075, 2004.
72. Steller H. Mechanisms and Genes of Cellular Suicide. *SCIENCE*; 267:1445-1449, 1995.

73. Takahashi M, Rhodes DR, Furge KA, et al. Gene expression profiling of clear cell renal carcinoma: gene identification and prognostic classification. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98(17): 9754-9759, 2001.
74. Tan LM, Ooi JP, Ismail N, Moad AIH, Muhammad TS. Programmed Cell Death Pathways and Current Antitumor Targets. *Pharmaceutical Research*. 26(7), 2009.
75. Teicher BA, Ara G, Herbst R, Palombella VJ, Adams J. The Proteasome Inhibitor PS-341 in Cancer Therapy. *Cinical Cancer Research*; 5: 2638-2645, 1999.
76. Ueda N, Shah S. Apoptosis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*; 124:169 - 177, 1994.
77. van den Berg A, Buys CHCM. Involvement of multiple loci on chromosome 3 in renal cell cancer development. *Genes Chromosome Cancer*; 19: 59-76, 1997.
78. van den Berg A, Draaijers TG, Kok K, et al. Normal FHIT transcripts in renal cell cancer and lung cancer-derived cell lines, including a cell line with a homozygous deletion in the FRA3B region. *Genes Chromosomes Cancer*; 19: 220-227, 1997.
79. van den Berg E, Dijkhuizen T. Classification of renal cell cancer based on cytogenetic analysis. *Contrib Nephrol*; 128: 51-61, 1999.
80. Vasto S, Carruba G, Lio D, Colonna-Romano G, Di Bona D, Candore G, Caruso C. Inflammation, ageing and cancer. Review. *Mechanisms of Ageing and Development*; 130(1-2):40-5, 2008.
81. Vaziri SAJ, Grabowski DR, Hill J, Rybicki LR, Burk R, Bukowski RM, Ganapathi MK, Ganapathi R. Inhibition of Proteasome Activity by Bortezomib in Renal Cancer Cells

Is p53 Dependent and VHL Independent. *Anticancer Research*; 29:2961-2970, 2009.

82. Vermeulen K, Berneman ZN, Bockstaele DRV. Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation*; 36:165-175, 2003.
83. Vermeulen K, Bockstaele DRV, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.*; 36:131-149, 2003.
84. Wyllie AH. Apoptosis. *British Journal of Cancer*; 67: 205-208, 1993.
85. Wu Xx, Kakehi Y, Jin Xh, Inui M, Sugimoto M. Induction of Apoptosis in Human Renal Cell Carcinoma Cells by Vitamin E Succinate in Caspase-independent Manner. *Urology*; 73(1): 193-199, 2009.
86. Yang Y, Kitagaki J, Wang H, Hou X, Perantoni AO. Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy. Review. *Cancer Scia*; 100(1): 24-28, 2009.
87. Yeo EJ, Chun YS, Cho YS, Kim J, Lee JC, Kim MS, Park JW. YC-1: A Potential Anticancer Drug Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1. *J. National Cancer Institute*; 95: 516-525, 2003.
88. Young AN, Amin MB, Moreno CS, et al. Expression profiling of renal epithelia; neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. *Am J Pathol*; 158:1639-1651, 2001.
89. Zhang HT, Luo H, Wu J, Lan LB, Fan DH, Zhu KD, Chen XY, Wen M, Liu HM. Galangin induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via the mitochondrial pathway. *World Journal of Gastroenterology*; 16(27): 3377-3384, 2010.

