HAMILTON DE CAMPOS ZAMPOLLI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINEOPLÁSICOS DO AMBLYOMIN-X
EM CARCINOMA DE CÉLULAS RENAI**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da USP / Instituto Butantan / IPT para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

**SÃO PAULO
2011**

HAMILTON DE CAMPOS ZAMPOLLI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINEOPLÁSICOS DO AMBLYOMIN-X EM
CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia da USP / Instituto
Butantan / IPT para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Chudzinski-Tavassi

Versão Original

**SÃO PAULO
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Zampolli, Hamilton de Campos.

Avaliação dos efeitos antineoplásicos do Amblyomin-X em carcinoma de células renais / Hamilton de Campos Zampolli. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Ana Marisa Chudzinski-Tavassi.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biologia molecular.

Versão do título para o inglês: Evaluation of Amblyomin-X antineoplastic effects on renal cell carcinoma.

Descritores: 1. Carcinoma de células renais 2. Metastático 3. Tratamento 4. Amblyomin-X I. Chudzinski-Tavassi, Ana Marisa II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB097/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Hamilton de Campos Zampolli.

Título da Tese: Avaliação dos efeitos antineoplásicos do Amblyomin-X em
 carcinoma de células renais.

Orientador(a): Ana Marisa Chudzinski-Tavassi.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

À minha esposa Amilene,

Meu norte e meu sul; minha aventura ao desconhecido e aconchego do lar.
Sol, céu, brisa, terra, fogo e mar. A melhor amiga, parceira e companheira. Sempre
incentivadora e otimista, preenche meu viver com entusiasmo, paciência, tolerância,
sensatez, compreensão, alegria, carinho e amor.

A mãe, cúmplice, mulher....

Todo o amor que eu puder te dar, não será suficiente para expressar o seu
significado em minha vida. Obrigado por existir e ter escolhido caminhar esta jornada
ao meu lado.

Aos meus filhos Fellipe e Lucca,

Tradução das minhas maiores realizações, razões da minha existência, da
minha alegria, da minha paz...

Meu amor incondicional e meu obrigado pela compreensão na ausência, pela
tolerância na adversidade e pelo suporte de simplesmente estarem aqui.

Ao meu pai Clóvis,

Modelo de ética, moral, retidão, caráter, altruísmo, dignidade e otimismo.

Embora não tenha conseguido alcançar suas qualidades, ter o privilégio de
ser seu filho é um alento para seguir tentando.

Minha admiração, amor e eterno obrigado.

À minha mãe Marlene,

Se eu pudesse ter escolhido, não conseguiria sonhar com melhor destino do que tê-la como mãe.

Aquela sempre presente que, com sua amizade, dedicação, companheirismo, incentivo, compreensão e amor, nutriu minha vida de felicidade .

Minha gratidão, reconhecimento e amor.

A Deus,

Por tudo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Dra. Ana Marisa Chudzinski-Tavassi, pelo constante incentivo, apóio nas dificuldades, serenidade na adversidade, estímulo no desânimo, sabedoria na orientação e compreensão em todos os momentos. Minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, por participar da minha banca de qualificação e contribuir, com suas inestimáveis sugestões, para o resultado final.

À Prof. Dra. Maria Helena Bellini Marumo, por participar da minha banca de qualificação e ajudar a aperfeiçoar este projeto.

À Prof. Dra. Maria Aparecida Nagai, pela participação em minha banca de qualificação, e pela colaboração, com suas sugestões, para a conclusão desta tese.

Ao mestrando Jean Gabriel de Souza, pela colaboração com incessantes e repetidos experimentos, formatações, culturas celulares e com experimentos *in vivo*. Espero poder retribuir sua inestimável colaboração.

Às doutoras Simone Michaela Simons, e Sandra Barreto, responsáveis pela produção, ainda trabalhosa, do Amblyomin-X pesquisado neste estudo. Meu profundo reconhecimento.

Às doutoras Isabel Batista, Marilene Demasi, Fernanda Faria, Myrian Paola Alvarez Flores, Linda Carrijo Carvalho e Janaína Ventura, pela disposição em colaborar e a sempre presente amabilidade.

À Dra. Norma Ikeda, pelas correções, formatação, colaboração e simpatia.

À Heleusa Sampaio Moura, pela colaboração nos testes bioquímicos laboratoriais.

Ao Dr. João Reinaldo de Oliveira Abrahão, chefe da divisão de Urologia do Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, pelo enorme incentivo, compreensão, paciência, tolerância e apôio incondicional para que este sonho pudesse ser realizado. Minha fidelidade e a mais sincera e eterna gratidão.

Aos doutores Rubens Dias Cortina, Pedro Assaf Jr., Eduardo Arnaldi e Michel Chebel, assistentes da divisão de Urologia do Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, pela compreensão, cobertura, apôio e amizade.

Aos doutores Oswaldo Faria de Paula Cabral, Beatriz Helena de Paula Cabral, Alexandre Oliveira Rodrigues, Francisco Buschinelli Meduna e Lorant Patocs, amigos e parceiros, que sempre compreenderam minha eventual ausência, apoiando e dando suporte à esta realização, meu eterno agradecimento e amizade.

Aos colegas da divisão de Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, pela acolhida, excelência e inestimáveis sugestões. Novas amizades que seguramente não se perderão com o tempo.

À todos os colegas, amigos, colaboradores e funcionários do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan. Meu muitíssimo obrigado por tudo.

À diretoria do Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho. Meu reconhecimento pelo incentivo, apôio, e compreensão.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da USP / IPT / Instituto Butantan. Por permitir que este ideal pudesse ser atingido.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação em Biotecnologia; Marcos, Eliane e Fábila, pela gentileza, amabilidade, simpatia e presteza em todos os momentos.

À todos os familiares e amigos, que de alguma forma conviveram e toleraram a minha labilidade de humor durante estes anos, a minha estima, meu carinho, amizade e fidelidade.

“ É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se, fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver”

Martin Luther King

RESUMO

Zampolli HC. Avaliação dos efeitos antineoplásicos do Amblyomin-X em carcinoma de células renais [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Introdução: O carcinoma de células renais metastático (CCRm) é um tumor altamente agressivo e resistente. Seu tratamento é baseado em terapia alvo molecular e citocinas. Avaliamos os efeitos antineoplásicos do Amblyomin-X, sobre CCR. **Métodos:** Avaliadas culturas de CCR RENCA e fibroblastos normais NIH/3T3 tratadas ou não com Amblyomin-X. Realizados ensaios de viabilidade celular por MTT e determinação, por citometria de fluxo, da proporção de células em apoptose/necrose; expressão da P-gp; Bad; Bax; Bcl-2; ciclina D1; caspase 3; Ki-67; p53; VEGFR1; citocromo c; análise das fase do ciclo celular; e atividade do proteassoma. Analisamos as populações celulares por microscopia eletrônica de varredura. Empregados testes T e One-way ANOVA para análise estatística. **Resultados:** O Amblyomin-X demonstrou citotoxicidade em células RENCA por indução de apoptose, diminuição de proliferação celular, inibição do proteassoma e modulação do ciclo celular em G0/G1. Em fibroblastos normais não houve citotoxicidade **Conclusão:** O Amblyomin-X apresentou efeito antineoplásico em CCR e não exerceu efeito citotóxico em células normais, demonstrando um possível potencial terapêutico no tratamento do CCRm.

Palavras-chave: Carcinoma de células renais. Metastático. Tratamento. Amblyomin-X.

ABSTRACT

Zampolli HC. Evaluation of Amblyomin-X antineoplastic effects on renal cell carcinoma [Ph. D. Thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Introduction: Metastatic renal cell carcinoma (mRCC) is a highly aggressive and resistant tumour. Its treatment is based on targeted therapies and cytokines. We have evaluated the antineoplastic effects of Amblyomin-X on RCC. **Methods:** RCC (RENCA) and fibroblasts (NIH/3T3) cell cultures treated or not with Amblyomin-X were evaluated. MTT assay was performed to determine cell viability. Apoptosis/necrosis ratio; expression of P-gp; Bad; Bax; Bcl-2; cyclin D1; caspase-3; Ki-67; p53; VEGFR1; cytochrome c; cell cycle analysis and proteasome activity were obtained by flow cytometry. Cellular populations were analysed by Scanning Electron Microscopy. Statistical analyses was performed using T-Tests and One-way ANOVA. **Results:** Amblyomin-X showed cytotoxic activity on RENCA tumor cells. It has induced apoptosis, decreased tumor cell proliferation, targeted the ubiquitin-proteasome system and modulated genes related to cell cycle in G0/G1. There was no toxicity on fibroblasts. **Conclusion:** Amblyomin-X showed antineoplastic effects on RCC cells preserved normal fibroblast cells. There is a potential role of its therapeutic use in mRCC treatment.

Key words: Renal cell carcinoma. Metastatic. Treatment. Amblyomin-X.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cronologia dos avanços no tratamento de CCRm.....	41
Figura 2 - A via PI3K/AKT e mTOR	45
Figura 3 - Os alvos dos fármacos da terapia alvo molecular.....	50
Figura 4 - Viabilidade celular e IC50% <i>in vitro</i> após 24 h de tratamento com Amblyomin-X.....	71
Figura 5 - Viabilidade celular e IC50% <i>in vitro</i> após 48 h de tratamento com Amblyomin-X.....	72
Figura 6 - Aspecto morfológico de células RENCA após 24 h de tratamento com Amblyomin-X.....	73
Figura 7 - Integridade da membrana plasmática de células RENCA após 24 h de tratamento com Amblyomin-X.....	75
Figura 8 - Integridade da membrana plasmática de fibroblastos normais NIH/3T3 após 24 h de tratamento com Amblyomin-X.....	76
Figura 9 - Avaliação da via de morte em células RENCA.....	78
Figura 10 - Avaliação da via de morte em células RENCA.....	79
Figura 11 - Avaliação da via de morte em fibroblastos normais NIH/3T3.....	80
Figura 12 - Expressão de ciclina D1 em células RENCA.....	81
Figura 13 - Expressão de ciclina D1 em fibroblastos normais NIH/3T3.....	82
Figura 14 - Expressão de caspase 3 em células RENCA.....	83
Figura 15 - Expressão de caspase 3 em fibroblastos normais NIH/3T3.....	84
Figura 16 - Expressão de Bcl-2 em células RENCA.....	85
Figura 17 - Expressão de Bcl-2 em fibroblastos normais NIH/3T3.....	86
Figura 18 - Expressão de Bad em células RENCA.....	87
Figura 19 - Expressão de Bax em células RENCA.....	88
Figura 20 - Representação de proteínas pró e anti apoptóticas em células RENCA.....	89
Figura 21 - Expressão de Bad e Bcl-2 em fibroblastos normais NIH/3T3.....	90
Figura 22 - Expressão de glicoproteína P (P-gp) em células RENCA.....	91
Figura 23 - Histogramas representativos da viabilidade mitocondrial.....	93
Figura 24 - Viabilidade e integridade da membrana mitocondrial de células RENCA.....	94

Figura 25 - Viabilidade e integridade da membrana mitocondrial de fibroblastos normais NIH/3T3.....	95
Figura 26 - Distribuição das fases do ciclo celular de células RENCA.....	97
Figura 27 - Esquema representativo das proporções de células nas diferentes fases do ciclo celular de células RENCA.....	98
Figura 28 - Distribuição das fases do ciclo celular de fibroblastos normais NIH/3T3.....	99
Figura 29 - Expressão de Ki-67 em células RENCA.....	100
Figura 30 - Expressão de Ki-67 em fibroblastos normais NIH/3T3.....	101
Figura 31 - Expressão de p53 em células RENCA.....	102
Figura 32 - Expressão de p53 em fibroblastos normais NIH/3T3.....	103
Figura 33 - Expressão do citocromo c em células RENCA.....	104
Figura 34 - Expressão do citocromo c em fibroblastos normais NIH/3T3.....	105
Figura 35 - Expressão de VEGFR1 em células RENCA.....	106
Figura 36 - Atividade catalítica proteassômica do tipo quimiotripsina.....	107
Figura 37 - Atividade catalítica proteassômica do tipo tripsina.....	108
Figura 38 - Fotomicrografia de fibroblastos normais NIH/3T3 em MEV.....	110
Figura 39 - Fotomicrografia de fibroblastos normais NIH/3T3 em MEV.....	111
Figura 40 - Fotomicrografia de fibroblastos normais NIH/3T3 em MEV.....	112
Figura 41 - Fotomicrografia de células RENCA em MEV, tratadas com Amblyomin-X (105 nM) por 24 h.....	113
Figura 42 - Fotomicrografia de células RENCA em MEV, não tratadas (controle).....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estadiamento de Robson do CCR e sobrevida em 5 anos.....	32
Tabela 2 - Classificação dos grupos de risco para CCRm do MSKCC.....	35
Tabela 3 - Principais Sistemas Prognósticos Integrados.....	37
Tabela 4 - Algoritmo do tratamento do CCR segundo NCCN (<i>National Comprehensive Cancer Network</i>).....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4E-BP1- *binding protein for eukaryotic initiation factor 4E*

AC-IX- anidrase carbônica tipo IX

AIF- fator de indução da apoptose

AKT- proteína quinase B

AMPK- *AMP-activated protein kinase*

APAF-1- *Apoptotic protease activating factor 1*

ATCC- *American Type Culture Collection*

ATP- adenosina trifosfato

B16-F10- linhagem de melanoma murino

B7-H1- *human B7 homolog 1*

Bad- *Bcl-2-associated death promoter*

Bax- *Bcl-2-associated X protein*

BCG- Bacilo de Calmette-Guérin

Bcl-2- *B-cell lymphoma 2*

BHD- gene Birt-Hogg-Dubé

BHDS- síndrome de Birt-Hogg-Dubé

BPTI- inibidor de tripsina pancreática bovina

BSA- soro albumina bovina

c-KIT- protooncogene c-KIT

Ca- cálcio

CCF- *Cleveland Clinic Foundation*

CCR- carcinoma de células renais

CCRcc- carcinoma de células renais de células claras

CCRm- carcinoma de células renais metastático

CSF-1R- *colony stimulating factor 1 receptor* o mesmo que M-CSFR
(*macrophage colony-stimulating factor receptor*)

DHL- desidrogenase láctica

DISC- complexo de sinalização de indução de morte

DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's medium*

DNA- ácido desoxirribonucleico

ECOG- escala de *performance status* do *Eastern Cooperative Oncologic Group*

EGF- fator de crescimento epidermal

EGFR- receptor de fator de crescimento epidermal

ESTs: *expressed sequence tags*

F.D.A.- *Food and Drug Administration*

FVIIa- Fator VII ativado

FXa- Fator X ativado

FH- Fumarato Hidratase

FITC- fisotiocianato de fluorescêina

FKBP-12- proteína 12

FLCN- Foliculina

Flt3- classe 3 de receptores tirosina-quinases

GM-CSF- *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

Hb- hemoglobina

HIF1 α - fator induzido por hipóxia 1 α

HIF- fator induzido por hipóxia

HLRCC- carcinoma de células renais e leiomiomatose hereditária

HPRC- carcinoma renal papilífero hereditário

IAP- proteína inibidora de apoptose

IFN α - interferon alfa

IGF-1- *Insulin-like growth factor 1*= fator de crescimento tipo insulina

IL-2- interleucina 2

IL-6- interleucina 6

IL1beta- interleucina 1 beta

Ki-67- proteína Ki-67

KPS- escala de *performance status* de Karnofsky

LAK- *Lymphokine-activated killer cell*

Mdm-2- *murine double minute 2*

MDR- *Multiple Drug Resistance*

MEC- Membrana extra celular

MET- *met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)* – oncogene MET

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

MiaPaCa- linhagem de adenocarcinoma de pâncreas

MIF- média de intensidade de fluorescência

MN- morfometria nuclear

MSKCC- *Memorial Sloan-Katterring Cancer Center*

mTOR- *Mammalian Target Of Rapamycin* - alvo da rapamicina em mamíferos

mTORC1- alvo da rapamicina em mamíferos - Complexo 1

mTORC2- alvo da rapamicina em mamíferos - Complexo 2

MTT- *Methyl Thiazolyl Blue* - método colorimétrico

MUC-1- mucina

NCCN- *National Comprehensive Cancer Network*

NF- κ B- fator nuclear kappa-beta

NK- *natural killer*

NRP-1- receptor neuro pilin

OMS- Organização Mundial de Saúde

PA- ativadores de plasminogênio

PAR- receptores ativados por protease

PBS- tampão fosfato de sódio

PDGF- fator de crescimento derivado de plaquetas

PDGFR- receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas

PK1- *3-phosphoinositide dependent protein kinase-1*

PE- Ficoeritrina

Pgp- glicoproteína P

PI- iodeto de Propídeo

PI3K- fosfatidilinositol-3-quinase

PIP2- fosfatidilinositol 4,5 bifosfato

PIP3- fosfatidilinositol 4,5 trifosfato

PKB- proteína quinase B

PLGF- fator de crescimento placentário

PSMB2- *proteasome subunit beta type-2*

PTEN- *phosphatase and tensin homolog*

pVHL- proteína de Von Hippel-Lindau

RAF-1- *proto-oncogene c-RAF*

RE- retículo endoplasmático

RET- protooncogene RET

Rheb- *Ras homolog enriched in brain* - família RAS

RPMI 1640- *Roswell Park Memorial Institute medium 1640*

S6K- quinase S6

SCF- receptores de células estaminais

SDH- succinato desidrogenase

SEER- *Surveillance, Epidemiology and End Results*

SFB- Soro Fetal Bovino

Sk Mel-28- linhagem de melanoma humano

Smac/DIABLO- *second mitochondria-derived activator of caspases / Direct IAP-Binding Protein with Low pI*

SNC- sistema nervoso central

SPI- sistemas prognósticos integrados

SSIGN- *The Mayo Clinic stage, size, grade, and necrosis score for clear cell renal cell carcinoma* ou score de estadio, tamanho, grau e necrose da Mayo Clinic para carcinoma de células renais

TC- tomografia computadorizada

TFPI- inibidor da via do fator tissular

TGF α - fator de crescimento transformante alfa

TNF- fator de necrose tumoral

TNF-alfa- fator de necrose tumoral alfa

TNF-R1-receptor TNF-1

TNM- sistema de estadiamento da UICC, União Internacional Contra o Câncer, que considera Tumor, Nodos (Linfonodos) e Metástases

TP53- proteína p53 (p53)

t-PA- ativador de plasminogênio tipo tecidual

TSC- complexo da esclerose tuberosa

TSC1- complexo da esclerose tuberosa 1 - hamartina

TSC2- complexo da esclerose tuberosa 2 - tuberina

UISS- *University of California Integrated Staging System* ou Sistema de Estadiamento Integrado da Universidade da Califórnia

uPA- ativador de plasminogênio tipo uroquinase

VEGF- fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR- receptor do fator de crescimento endotelial vascular

VHL- síndrome de Von Hippel-Lindau; Von Hippel Lindau

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	26
1.1 O Carcinoma de células renais – CCR	26
1.1.1 Fatores de risco epidemiológico	27
1.1.2 Incidência	27
1.1.3 Etnia e sexo.....	27
1.1.4 Clínica.....	28
1.1.4.1 Apresentações clínicas mais frequentes.....	28
1.1.4.2 Síndromes paraneoplásicas.....	28
1.1.5 Padrão histológico.....	28
1.1.6 Graduação histológica.....	29
1.1.7 CCR hereditário.....	29
1.1.7.1 Síndrome de Von Hippel Lindau.....	30
1.1.8 Citogenética.....	31
1.1.9 Mortalidade e morbidade	32
1.1.10 Fatores prognósticos.....	32
1.1.11 Sistemas prognósticos integrados	34
1.2 Tratamento do CCR metastático (CCRm).....	38
1.2.1 Terapias biológicas	38
1.2.2 Os avanços no tratamento do CCRm.....	40
1.2.3 Vias moleculares.....	42
1.2.3.1 VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular.....	42
1.2.3.2 mTOR - Alvo da rapamicina em mamíferos.....	43
1.2.3.3 Via PI3K - fosfatidilinositol 3-quinase.....	45
1.2.3.4 mTOR e CCR.....	46
1.2.4 Tratamento do CCRm com drogas de terapia alvo moleculares.....	47
1.2.4.1 Inibidores de receptores de tirosino quinases.....	47
1.2.4.2 Inibidores de VEGF.....	48
1.2.4.3 Inibidores de mTOR.....	48
1.2.4.4 Inibidores de EGFR.....	49
1.2.5 Tratamento atual do CCRm.....	50
1.3 Inibidores de proteases	52
1.3.1 Proteases.....	52

1.3.2 Inibidores de proteases, serinoproteases, domínio Kunitz.....	53
1.3.3 Amblyomin-X como inibidor do Fator Xa e agente pró-apoptótico.....	55
1.3.4 Ciclo celular, apoptose e seus reguladores.....	57
2 OBJETIVOS.....	60
3 MATERIAIS E MÉTODOS	61
3.1 Células RENCA.....	61
3.2 Fibroblastos normais NIH/3T3.....	61
3.3 Amblyomin-X	62
3.4 Avaliação do efeito citotóxico do Amblyomin-X em células RENCA pelo método colorimétrico MTT.....	62
3.5 Citometria de fluxo.....	63
3.6 Determinação do teste funcional do potencial elétrico mitocondrial pelo efluxo da sonda fluorescente Rodamina 123 por citometria de fluxo	63
3.7 Determinação da proporção de células mortas por apoptose ou necrose por citometria de fluxo.....	64
3.8 Determinação da expressão da glicoproteína P (P-gp) por citometria de fluxo.....	64
3.9 Análise das diferentes populações e receptores das vias de morte celular e pontos de checagem do ciclo celular de células RENCA e de fibroblastos normais NIH/3T3 por citometria de fluxo.....	65
3.10 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.....	65
3.11 Expressão do marcador Ki-67 por citometria de fluxo.....	66
3.12 Expressão da proteína p53 por citometria de fluxo.....	67
3.13 Expressão do receptor VEGFR1, por citometria de fluxo.....	67
3.14 Expressão do citocromo c por citometria de fluxo.....	67
3.15 Avaliação do Amblyomin-X como inibidor do proteassoma em células RENCA.....	68
3.16 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	69
3.17 Análise estatística.....	69
4 RESULTADOS.....	70
4.1 Efeito citotóxico do Amblyomin-X em células RENCA.....	70
4.2 Avaliação da integridade da membrana plasmática de células RENCA.....	74
4.3 Avaliação da integridade da membrana plasmática de fibroblastos normais NIH/3T3.....	76

4.4 Avaliação de morte celular de células RENCA após tratamento com Amblyomin-X.....	77
4.5 Avaliação de morte celular de fibroblastos normais NIH/3T3 após tratamento com Amblyomin-X.....	80
4.6 Expressão de ciclina D1 em células RENCA.....	81
4.7 Expressão de ciclina D1 em fibroblastos normais NIH/3T3.....	82
4.8 Expressão de caspase 3 fosforilada em células RENCA.....	83
4.9 Expressão da caspase 3 fosforilada em fibroblastos normais NIH/3T3.....	84
4.10 Expressão de proteínas da família Bcl-2.....	85
4.10.1 <i>Expressão de Bcl-2 em células RENCA</i>	85
4.10.2 <i>Expressão de Bcl-2 em fibroblastos normais NIH/3T3</i>	86
4.10.3 <i>Expressão de Bad e Bax em células RENCA</i>	87
4.10.4 <i>Expressão de Bad e Bax em fibroblastos normais NIH/3T3</i>	90
4.11 Expressão da glicoproteína P (P-gp) em células RENCA.....	91
4.12 Análises do potencial da membrana mitocondrial de células RENCA.....	92
4.13 Análises do potencial da membrana mitoncondrial de fibroblastos normais NIH/3T3.....	95
4.14 Análises das fases do ciclo celular de células RENCA.....	96
4.15 Análises das fases do ciclo celular de fibroblastos NIH/3T3.....	99
4.16 Expressão do marcador Ki-67 em células RENCA.....	100
4.17 Expressão do marcador Ki-67 em fibroblastos normais NIH/3T3.....	101
4.18 Expressão da proteína p53 em células RENCA.....	102
4.19 Expressão da proteína p53 em fibroblastos normais NIH/3T3.....	103
4.20 Expressão do citocromo c em células RENCA.....	104
4.21 Expressão do citocromo c em fibroblastos normais NIH/3T3.....	105
4.22 Expressão do receptor VEGFR1 em células RENCA.....	106
4.23 Efeitos do Amblyomin-X sobre a atividade do proteassoma em células RENCA.....	107
4.24 Resultados obtidos pela MEV.....	108
5 DISCUSSÃO.....	115
6 CONCLUSÃO	126
REFERÊNCIAS	127

1 INTRODUÇÃO

1.1 O carcinoma de células renais – CCR

O termo carcinoma de células renais (CCR) designa as neoplasias renais de origem epitelial com potencial maligno. Trata-se de enfermidade relativamente incomum, responsável por cerca de 3% das neoplasias malignas que acometem adultos, e 90 a 95% das renais. Pode apresentar sintomatologia clínica variada, sendo frequentemente silencioso, diagnosticado tardiamente ou incidentalmente por exames de imagem.

Nos Estados Unidos da América (EUA), 58.000 pessoas foram diagnosticadas com CCR em 2010 e 13.000 faleceram em sua decorrência (1). Em 2008, aproximadamente 55.000 pessoas foram diagnosticadas com CCR nos EUA, destas, 19% apresentavam doença localmente avançada, e 20% padeciam de enfermidade metastática (2).

O CCR é resistente a radioterapia e quimioterapia, esta mediada principalmente pela glicoproteína P (P-gp), e apresenta infrequente, parcial, porém reprodutível resposta a agentes imunoterápicos como interferon alfa ($IFN\alpha$) e interleucina-2 (IL-2) (3,4).

Apesar das estatísticas, um grande progresso no entendimento da biologia molecular do CCR ocorreu nos últimos 15 anos. O que acreditava-se historicamente tratar-se de uma enfermidade única, hoje é reconhecido como um conjunto heterogêneo de afecções patológicas com distintas anormalidades genéticas e história natural (1).

Apresenta-se sob duas formas, esporádica, responsável por 97 a 98% dos casos, e a hereditária com 2 ou 3% restantes. As variedades hereditárias associadas ao CCR, ainda que raras, devem ser sempre lembradas, uma vez que tem características clínicas peculiares, tendendo a bilateralidade, multifocalidade, recorrência, acometendo indivíduos mais jovens do que o CCR esporádico, e portanto, requerendo tratamentos conservadores.

1.1.1 Fatores de risco epidemiológico

Diversos fatores celulares, ambientais, genéticos, e hormonais tem sido estudados como possíveis causas do CCR (5-7), entre eles o tabagismo, que duplica o risco de CCR e contribui para um terço dos casos. O risco aumenta quanto maior for o consumo; a obesidade, particularmente em mulheres, é fator de risco para CCR; a doença policística renal associada a insuficiência renal crônica; a insuficiência renal com hemodiálise; fatores genéticos como a síndrome de Von Hippel Lindau (VHL) e o complexo da esclerose tuberosa; transplantados renais; tratamentos com imunossupressores; exposição ocupacional ao petróleo, metais pesados, solventes, asbestos e herbicidas e o uso prolongado de analgésicos com fenacetina (convertidas em paracetamol no fígado). Fatores adicionais que contribuem para o desenvolvimento do CCR incluem a hipertensão arterial, bem como o tratamento para a hipertensão e estrogoterapia.

1.1.2 Incidência

Após mais de 2 décadas em elevação, a incidência do CCR demonstra sinais de estabilização, ou até mesmo decréscimo, em todo o mundo (8). O aumento observado deveu-se particularmente a profusão de métodos de imagem que vieram a diagnosticar um maior número de casos incidentais, em estádios iniciais, enquanto os casos avançados sofreram decréscimo na incidência (9).

Segundo o levantamento da *Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER)* (2), entre 2003 e 2007, 50% dos casos ocorrem entre os 55 e os 74 anos de idade (mediana de 64 anos) com incidência ajustada pela idade de 14,1 / 100.000 habitantes/ano.

1.1.3 Etnia e sexo

O CCR é mais freqüente em descendentes do norte europeu (escandinavos) e norte-americanos que em asiáticos e africanos (2), sendo 2 vezes mais freqüente no sexo masculino.

1.1.4 Clínica

Pode permanecer clinicamente oculto ou apresentar sinais e sintomas locais, bem como relacionados à doença metastática ou a síndromes paraneoplásicas (10). A tríade clássica com dor lombar, hematúria e massa palpável ocorre em apenas 10% dos casos.

1.1.4.1 Apresentações clínicas mais frequentes

Os sintomas e sinais mais freqüentes são hematúria (40%); dor lombar (40%); massa palpável (25%); perda de peso (33%); febre (20%); hipertensão (20%); hipercalcemia (5%); sudorese noturna e varicocele usualmente esquerda (2% dos homens) (5).

1.1.4.2 Síndromes paraneoplásicas

São alterações comumente encontradas a eritrocitose, hipercalcemia, anemia, hipertensão arterial sistêmica, insuficiência hepática não metastática (síndrome de Stauffer), polineuromiopatia, amiloidose, febre, caquexia, perda de peso, dermatomiosite e aumento de velocidade de hemossedimentação. Os fenômenos tromboembólicos são comuns, estando relacionados a citocinas pró-inflamatórias liberadas pelo microambiente tumoral, como a eritropoetina, IL-6 e o óxido nítrico (10).

Aproximadamente 20% dos pacientes com CCR apresentam doença metastática ao diagnóstico, sendo os seguintes órgãos os mais afetados: pulmões 75%; tecidos moles 36%; ossos 20%; fígado 18%; SNC 8%; cutâneo 8% (5,2).

1.1.5 Padrão histológico

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) os padrões histológicos de CCR foram reclassificados por Eble e colaboradores em 2004 (11). A incidência dos histiotipos primários mais freqüentes foi descrita por Motzer em 2006 (12).

- CCR células claras (70–85%);
- CCR papilar ou papilífero (7–15%);

- CCR cromóforo (5–10%);
- Carcinoma dos ductos coletores de Bellini (1%);
- CCR cístico multi-locular de células claras;
- Carcinoma renal medular;
- Carcinomas com translocação do Xp11;
- Carcinomas associados à neuroblastoma;
- Carcinoma mucinoso e de células fusiformes;
- CCR inclassificáveis;

1.1.6 Graduação histológica

O sistema de graduação histológica mais utilizado é o de Fuhrman (13). Para a avaliação microscópica, o padrão nuclear celular é dividido em 4 graus, considerando-se o tamanho do núcleo, presença de irregularidades nucleares assim como presença de proeminência de nucléolo, como descrito abaixo:

Grau I: Núcleo arredondado e uniforme, com cerca de 10 µm de diâmetro e nucléolo ausente/pequeno;

Grau II: Núcleo levemente irregular, com diâmetro de 15 µm e nucléolo visível, mas pequeno;

Grau III: Núcleo moderadamente irregular, com diâmetro de 20 µm e nucléolo grande;

Grau IV: Núcleo acentuadamente irregular/pleomórfico e formas multilobulares, com cromatina agrupada e diâmetro maior que 20 µm

Conjuntamente com o estadiamento da patologia, o grau histológico tem valor prognóstico.

1.1.7 CCR hereditário

Há quatro síndromes hereditárias bem definidas:

1- síndrome de Von Hippel Lindau (VHL); 2- carcinoma renal papilífero hereditário (HPRC); 3- síndrome de Birt-Hogg-Dubé (BHDS); 4- CCR e leiomiomatose hereditária (HLRCC) (14).

Podemos citar ainda o complexo da esclerose tuberosa (TSC). Segundo Brugarolas (15), haveria relação entre TSC1/TSC2 e a proteína de VHL (pVHL),

desempenhando importante papel na gênese do CCR por regulação de angiogênese.

1.1.7.1 Síndrome de Von Hippel Lindau

Grande parte do atual conhecimento sobre as bases genéticas e biologia molecular do CCR esporádico está baseado no trabalho de Linehan (16) estudando CCR familiar e a doença de Von Hippel Lindau (VHL).

A síndrome de VHL é uma doença com herança autossômica dominante de alta penetrância com cerca de 100% aos 65 anos (17). Trata-se de entidade rara, com prevalência de 1/36.000 pessoas, sendo que a razão entre casos familiares/esporádicos é de 11 a 14/1 (18). As principais manifestações são hemangioblastomas de sistema nervoso central (SNC) e retina, carcinoma renal, cistos renais, feocromocitoma, tumores císticos e sólidos de pâncreas, cistoadenoma de epidídimo e tumores de saco endolinfático.

O gene VHL desempenha sua função como um gene supressor tumoral. Situa-se, telomericamente, na região mapeada como 3p26-p25. Deleção do braço curto do cromossomo 3 (3p), ocorre frequentemente no CCR associado à VHL. O gene VHL está mutado em alta porcentagem dos tumores e linhagens celulares de pacientes com CCR com células claras na forma não hereditária (19).

O carcinoma renal aparece em torno dos 35 aos 41 anos de idade e é mais precoce que o carcinoma renal esporádico. São unilaterais em 43% e bilaterais em 56% dos casos, em oposição ao carcinoma renal esporádico que é bilateral em apenas 1,8% dos casos (20). A suspeita diagnóstica pode surgir em uma ultrassonografia de rotina, porém o diagnóstico radiológico é feito pela tomografia computadorizada (TC) de abdômem. O primeiro exame é superior na diferenciação entre lesões sólidas e císticas e o segundo é mais sensível, detectando tumores com diâmetros menores que 2 cm (21). As lesões renais císticas correspondem a 60 - 75% dos tumores, e as mistas e sólidas constituem o restante dos casos (22). Os cistos são considerados lesões benignas enquanto os tumores sólidos são, potencialmente, malignos. A idade média de aparecimento dos tumores de rim é de 37 anos (15 a 67 anos) (21). As lesões renais podem ser isoladas, mas freqüentemente são múltiplas e podem acometer todo o parênquima renal.

1.1.8 Citogenética

As alterações genéticas ocorrem tanto na forma esporádica (não hereditária) quanto na hereditária do CCR. Em ambas, há alterações estruturais do braço curto do cromossomo 3 (3p) (23,24) devidas a deleção ou translocação, frequentemente 3p12-14, 3p21 e 3p25 (23). Outras aberrações freqüentes no CCR são trissomia de cromossomo 5, trissomia do 12 e 20 e perda dos cromossomos 8, 9, 13q e 14q (25). Anormalidades do braço longo dos cromossomos 6 e 10 também são encontradas e relacionadas com progressão. Estudos genéticos de famílias com alto risco para desenvolver câncer renal indicam clones de genes cujas alterações resultariam em desenvolvimento tumoral. Esses genes são tanto supressores tumorais como VHL e TSC (Complexo da Esclerose Tuberosa) ou oncogenes como MET.

Os genes atualmente relacionados ao CCR são: VHL (supressor tumoral relacionado a CCR células claras); MET (responsável pelo aumento na expressão de receptores de fatores de crescimento em CCR papilífero tipo I); BHD (gene Birt-Hogg-Dubé que codifica a FLCN, Foliculina – Supressor tumoral associado ao CCR cromóforo e Oncocitoma na síndrome de Birt-Hogg-Dubé); TSC1, TSC2 (complexo da esclerose tuberosa – supressor tumoral associado a hamartomas e CCR células claras); FH (Fumarato Hidratase, associado ao CCR papilífero tipo II) e SDH (succinato desidrogenase) (14,26).

Estudos realizados em modelos animais com inativação do gene supressor tumoral TSC1/TSC-2 em células germinativas demonstraram o desenvolvimento de CCR (27-30).

A inativação do gene PTEN/MMAC1, localizado no cromossomo 10, está relacionada à progressão da doença (31).

No CCR células claras estão associadas as deleções e inserções nos cromossomos -3p, +5q22, -6q, -8p, -9p, -14q e especificamente gene VHL (1).

Nos tumores CCR papilíferos tipo I foram encontrados, com maior freqüência, inserções nos cromossomos 7, 12, 16, 17 e 20 especialmente a trissomia do 7 (+7), onde localiza-se o protooncogene MET, e que ocorre em 75% dos CCR papilíferos esporádicos (1). Indivíduos com CCR e leiomiomatose hereditária apresentam alterações no gene fumarato hidratase (gene FH) localizado no braço longo do cromossomo 1. Trata-se de um gene supressor tumoral que codifica uma enzima relacionada ao ciclo de Krebs. Mutações neste gene resultam numa desregulação

mitocondrial na conversão de fumarato em maleato, no ciclo do ácido tricarboxílico, ou ácido cítrico, levando a um acúmulo de fumarato e hipóxia, interferindo assim na regulação de HIF (1). Estes pacientes desenvolvem caracteristicamente o CCR papilífero tipo II.

No CCR cromóforo foram encontrados deleções nos cromossomos 1, 2, 6, 10, 13, 17, 21 e mutações nos genes c-kit e TSC (1).

1.1.9 Mortalidade e morbidade

O CCR é a 6ª causa de morte por câncer (2). As taxas de sobrevida em 5 anos em estádios III e IV permanecem pouco animadoras e inalteradas desde as publicações de Robson em 1969 (32), que refletem a precariedade da sobrevida dos pacientes com enfermidade metastática e estão definidas na Tabela 1.

Tabela 1 - Estadiamento de Robson do CCR e sobrevida em 5 anos

Nível	Progressão Tumoral	Sobrevida (%)
I	Restrito ao rim	60 a 85%
II	Invasão de cápsula e gordura peri-renal	40 a 80%
III	Estádio I ou II + invasão v.renal ou v.cava	15 a 35%
	Estádio I ou II + metástase linfonodal retroperitoneal	
IV	Metástases hematogênicas	0 a 15%

Fonte: Robson et al. 1969 (32)

1.1.10 Fatores prognósticos

A discussão e compreensão dos fatores prognósticos do CCR é fundamental para uma abordagem lógica na condução destes tumores. A sobrevida depende do estadiamento tumoral, que denota o grau de extensão anatômica e o envolvimento de outros órgãos pela doença, porém, fatores prognósticos tais como a condição clínica, anormalidades laboratoriais, grau e padrão histológico, entre outros, são utilizados como variáveis independentes, podendo atribuir significado prognóstico ao

paciente com CCR (33-36). Mesmo na época atual, cerca de 20% dos pacientes apresentam-se com doença metastática no momento do diagnóstico de CCR, e, ao redor de 1/3 daqueles com doença ressecável terão recidiva durante o período de seguimento, sendo os locais mais frequentes de metástases à distância, os pulmões, ossos, fígado e cérebro (37).

Conjuntamente com o estadio da doença, acredita-se que o tipo e o grau histológico do tumor tem valor prognóstico e podem influenciar a sobrevida dos pacientes, entretanto, a graduação histológica de Fuhrman caracteriza-se por pobre reprodutibilidade e falta de uniformidade. Fuhrman e colaboradores (13), não constatarem diferença de sobrevida entre os pacientes com CCR de grau histológico II ou III. Outros estudos também demonstraram falta de valor prognóstico ao compararem os quatro grupos (38,39).

Os histiotipos primários, apresentam diferentes potenciais agressivos, impactando no prognóstico. O CCR células claras (CCRcc) apresenta prognóstico intermediário, o papilífero tipo I associa-se a prognóstico favorável enquanto o tipo II é intermediário. O cromóforo tem prognóstico favorável enquanto o medular e o de ductos coletores são bastante agressivos e de prognóstico desfavorável (36).

Parâmetros como ploidia, morfometria nuclear (MN) e marcadores biomoleculares, como a anidrase carbônica tipo IX (AC-IX), Ki-67 e VEGF, têm sido considerados potencialmente úteis, mas com pouca aplicação da prática clínica atual (39-42).

A AC-IX é uma proteína transmembrana, regulada pelo fator induzido por hipóxia 1α (HIF1 α), envolvida na regulação intra e extracelular de pH em resposta ao estresse hipóxico. Está presente em 94% dos CCRcc mas ausente na maior parte do tecidos normais (43). A baixa expressão de AC-IX ($\leq 85\%$) é fator prognóstico independente conferindo pior prognóstico e menor sobrevida. Há evidências de que a expressão de AC-IX prediz resposta à terapia com IL-2 (44). Em pacientes submetidos a terapia com antiangiogênicos, não apresentou significância estatística (45).

VEGF é outro biomarcador relacionado a sobrevivência. Níveis elevados de VEGF estão associados a menor sobrevida (1,46,47). Baixos níveis de VEGF foram observados em pacientes com CCR localizado em comparação àqueles com patologia localmente avançada ou metastática (46). Níveis séricos $> 343,5$ pg/ml indicam sobrevida significativamente inferior.

O status de VHL também foi relacionado como possível preditor de resposta à terapêutica antiangiogênica. Choueiri et al. (48) observaram, em análise multivariada, que a presença de VHL anômalo foi fator de risco prognóstico independente para prever melhor resposta aos antiangiogênicos. Schraml et al. (49) observaram que a perda de função de VHL estaria envolvida com a progressão do CCR, enquanto grau do tumor, estadió, densidade microvascular e proliferação celular tumoral não apresentaram correlação com o status de VHL.

O HIF1 α é um regulador central da angiogênese. Klatte et al. (50) investigaram a associação da expressão de HIF1 α com prognóstico para determinar seu valor como biomarcador. O HIF1 α está super-expresso em todas variedades de CCR, sendo a maior expressão observada no CCRcc. Em pacientes portadores de CCRcc metastático, a expressão de HIF1 α > 35% foi fator prognóstico independente, associado a menor sobrevida se comparado à expressão $\leq$ 35% (média sobrevida de 13,5 x 24,4 meses; p=,005).

A survivina é outro marcador de interesse. Proteína expressa em todos subtipos de CCR, relacionada à proliferação celular. Sua ação é anti-apoptótica por inibição de procaspases e algumas caspases (51). A super-expressão de survivina também confere pior prognóstico (1,52).

B7-H1 é uma proteína da superfície celular que participa na coestimulação de células T. Foi correlacionada com maior risco de morte por CCR (42,53,54).

Ki-67 é um marcador de proliferação celular. A maior expressão de Ki-67 está associada com um grau de Fuhrman maior e prognóstico pior em CCRcc. Demonstra ser um marcador independente para sobrevida livre de doença em CCRcc localizado e, aparentemente, representa melhor a agressividade do tumor que a graduação nuclear convencional (55).

1.1.11 Sistemas prognósticos integrados

Os sistemas prognósticos integrados (SPI) foram desenvolvidos visando prognosticar de forma mais precisa a sobrevida de pacientes submetidos ao tratamento do CCR. Dessa forma, permitem o aconselhamento dos pacientes, estabelecem estratégias de seguimento e identificam doentes de alto risco.

Diversos nomogramas foram e continuam sendo propostos para CCR

localizado e metastático, utilizando parâmetros como histologia, presença ou não de sintomas, estadiamento, *performance status* e tamanho tumoral. Entre os principais descritos na literatura está o do *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (MSKCC) desenvolvido por Motzer et al. (56) (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação dos grupos de risco para CCRm do MSKCC

Parâmetro	Risco
Karnofsky – Performance status	< 80%
DHL	> 1,5 LSN
Hemoglobina	< LIN
Ca sérico corrigido	> 10mg/dl
Tempo entre diagnóstico ao tratamento com IFN α	< 12 meses
Radioterapia prévia	Sim
Número de sítios metastáticos	2 ou 3

LSN = Limite superior da normalidade

LIN = Limite inferior da normalidade

Grupo de risco	Nº de fatores	% Pacientes	Sobrevida em meses
Favorável	0 a 1	37	26
Médio	2	35	14,4
Desfavorável	> 3	28	7,3

Fonte: Motzer et al. 1999 *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (MSKCC)(57)

Outros nomogramas conhecidos são o de Kattan (58), da *Mayo Clinic* (SSIGN) (59), UISS *University of California Integrated Staging System* (Sistema de Estadiamento Integrado da Universidade da Califórnia) (60), e CCF (*Cleveland Clinic Foundation*). Este último buscou validar e expandir o do MSKCC observando que todas variáveis são fatores prognósticos independentes, exceto o *performance status*, mas também a presença de metástases pulmonares, hepáticas e retroperitoneais foram consideradas variáveis independentes prognósticas (61).

Choueiri (62) reavaliou o do MSKCC em pacientes tratados com inibidores de VEGFR ou VEGF. A análise multivariada para fatores de risco para intervalo livre de

progressão identificou duas novas variáveis; contagem elevada de plaquetas (> 300 K/ μ L) e alta contagem absoluta de neutrófilos ($>4,5$ K/ μ L).

Nomogramas mais recentes tem integrado informações moleculares. Biomarcadores como como AC-IX, TP53, gelsolina e vimentina (63) foram preditores independentes em uma análise multivariada, e quando associados aos sistemas prognósticos integrados clássicos, otimizam resultados. Em outro estudo, foi incorporado um maior número de marcadores moleculares, 29 no total, relacionados com as vias de HIF e mTOR. Este estudo identificou, no modelo de análise multivariada de Cox, cinco marcadores: Ki-67; p53; VEGFR-1 endotelial; VEGFR-1 epitelial; e VEGF-D, os únicos que apresentaram significância para prever sobrevida livre de doença na análise univariada de Cox, e que seriam uma “assinatura molecular” do tumor, que, em conjunto com a escala de *performance status* do ECOG (*Eastern Cooperative Oncologic Group*), classificação T (tumor) e grau de Fuhrman estratificariam os pacientes em 3 grupos de risco. Mais uma vez, a acurácia do nomograma foi superior à do nomograma clássico (55).

Parker et al. (64) desenvolveram o *BioScore*, painel de biomarcadores composto por survivina, B7-H1 e Ki-67 em CCRcc concluindo que um alto *BioScore* correlaciona-se com morte por CCR (Tabela 3).

Tabela 3 - Principais Sistemas Prognósticos Integrados

Estudo	Metástases	Risco
Yaycioglu et al. 2001(65)	M0	Tamanho, sintomático ou assintomático
Kattan et al. 2001(58)	M0	Estadio, tamanho, sintomas, histologia
Frank et al. 2002 – SSIGN(59)	M0 e M1	Estadio TNM, tamanho, Fuhrman, necrose
Motzer et al. 2002 – MSKCC(56)	M1	Hb, DHL, Ca, KPS, intervalo diagnóstico/tratamento
Zisman et al. 2001- UISS(60)	M0 e M1	Estadio TNM, Fuhrman, ECOG
Kim et al. 2004(63)	M0 e M1	Estadio T, Estadio M, ECOG, ACIX, p53, vimentina
Mekhail et al. 2005(61)	M1	MSKCC mais Rxt, e metastases hepáticas, pulmonares e retroperitoneais
Choueiri et al. 2007(62)	M1 *	ECOG, Ca, intervalo diagnóstico/tratamento, plaquetas e neutrófilos
Karakiewicz et al. 2007(66)	M0	Estadio TNM, tamanho, Fuhrman, sintomas
Motzer et al. 2008(67)	M1	Hb, DHL, Ca, KPS, intervalo diagnóstico tratamento, número de sítios metastáticos, nefrectomia, metástases pulmonares /hepáticas, ECOG, fosfatase alcalina, trombocitose
Klatte et al. 2009(55)	M0	Estadio T, ECOG, Ki-67, p53, VEGFR-1 endotelial, VEGFR-1 epitelial, VEGF-D epithelial
Parker et al. 2009 BioScore(64)	M0	B7-H1, survivina, Ki-67
Heng et al. 2009(68)	M1*	Hb, DHL, Ca, KPS, intervalo diagnóstico/tratamento, plaquetas, neutrófilos

* : Tratados com Bevacizumab, Sunitinib, Sorafenib ou Axitinib

Fonte: Adaptado de Finley et al. 2011(1)

1.2 Tratamento do CCR metastático (CCRm)

1.2.1 *Terapias biológicas*

Os interferons são glicoproteínas naturais com propriedades antivirais, antiproliferativas e imunomoduladoras. Eles apresentam efeito antiproliferativo direto sobre as células tumorais renais *in vitro*. Estimulam células NK, e aumentam a expressão da maioria das moléculas do complexo de histocompatibilidade. O IFN α derivado de leucócitos, tem uma resposta objetiva de aproximadamente 15% (0 a 29%) (69,70). Estudos pré-clínicos demonstraram sinergia entre interferon e drogas citotóxicas, entretanto, tal associação parece não promover melhor resultado do que a monoterapia com interferon exclusiva (71,72).

IL-2 é um fator de crescimento de células T, ativador de células T e NK. A IL-2 afeta o crescimento tumoral ativando células linfóides *in vivo* sem interferir diretamente na proliferação tumoral (73-75).

Em um estudo inicial do *National Cancer Institute*, infusões intravenosas de altas doses de IL-2 combinadas com células LAK (10,76), produziram respostas objetivas em 33%, mas nos estudos multicêntricos subseqüentes estas respostas não ultrapassaram 16%; por outro lado, a adição de células LAK não promoveu nenhuma melhoria à resposta. Houve 4% de resposta completa, e destes, 80% dos pacientes seguiram vivos por 10 anos (77). A maioria dos pacientes responde ao primeiro ciclo e, aqueles que não responderem ao segundo ciclo, não responderão aos tratamentos subseqüentes.

Efeitos tóxicos da IL-2: aumento da permeabilidade vascular necessitando monitoramento freqüente em UTI. Pode produzir complicações graves como uma síndrome *sepsis-like*, com diminuição da resistência vascular periférica e queda do volume intravascular pelo extravasamento capilar. A mortalidade associada ao tratamento com IL-2 varia de 1 a 4% (78).

Tratamentos hormonais com megestrol, foram reportados para o tratamento do CCR. Nenhum benefício foi observado exceto pelo aumento de apetite. Antiestrogênicos como tamoxifeno e toremifeno também foram pesquisados, porém as respostas foram decepcionantes (79).

A radioterapia pode ser considerada em pacientes inoperáveis, especialmente para palição de dor óssea metastática ou metástases cerebrais. O prognóstico em metástases cerebrais é de 1 mês (80).

Entre 20 e 30% dos pacientes apresentam CCR metastático (CCRm) ao diagnóstico e menos de 5% apresentam metástases solitárias. A remoção da metástase única é recomendada em casos selecionados. O procedimento pode não ser curativo, mas aumenta a sobrevida específica. A nefrectomia paliativa em CCRm deve ser considerada para alívio de sintomas como dor, hematúria, hipercalcemia, eritrocitose e hipertensão. A nefrectomia na doença metastática também está indicada naqueles que serão submetidos a terapêutica sistêmica. Há relatos de 0,8% de regressão de metástases após nefrectomia paliativa (81).

O CCRm é resistente a quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia (82), entretanto, é um tumor imunogênico. Alguns relatos de regressão espontânea foram documentados em 1989, associando-se a uma possível resposta imunológica (83). Nesta mesma época, pela primeira vez, foi reportada atividade de IFN α e IL-2 no tratamento do CCRm. Outros imunomoduladores como Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), células *lymphokine-activated killer* (LAK) com IL-2, foram testados com resultados pouco animadores. Barbuto e colaboradores demonstraram um caso de remissão completa de CCRm com vacina com células dendríticas-tumorais (84). Em estudo subsequente do mesmo autor, a mesma resposta não se verificou, entretanto estabilização da patologia foi observada, demonstrando que a imunologia poderia vir a desempenhar papel relevante no tratamento do CCR (85,86). O mesmo grupo realizou tratamento idêntico, vacina de células dendríticas-tumorais, à portadores de melanoma maligno, patologia de comportamento imunológico, agressividade e prognóstico semelhante ao CCRm, com resposta variando entre 20 e 60% dos pacientes. Estratégias atuais ainda buscam empregar vacinas que estimulem o sistema imune a reconhecer e eliminar células que expressem antígenos tumor-específicos, utilizando células tumorais geneticamente modificadas, células apresentadoras de antígenos (células dendríticas) ou peptídeos tumorais específicos para elevar a especificidade da resposta (1). Estudo fase III utilizando lisado celular autólogo demonstrou um intervalo livre de progressão estatisticamente significativo superior em 5 anos (87). Terapêuticas imunológicas multimodais mais específicas, continuam utilizando células dendríticas, que podem ser carregadas com antígeno tumoral específico, para induzir citotoxicidade específica por células T. O grupo da

Universidade da Califórnia de Los Angeles tem trabalhado com células dendríticas infectadas por vírus que carregam um gene de fusão de AC-IX e GM-CSF, citocina que estimula a proliferação de células dendríticas, que induzem a expressão da proteína GM-CSF-AC-IX, altamente específica contra o CCR (88,89).

Estudo recente de fase II utiliza a vacina TG4010 que consiste em vírus *vaccinia* que expressa mucina (MUC-1) e IL-2 (90). Embora provoque resposta imunológica humoral e celular, em pacientes portadores de CCR que expressem mucina, não houve benefício na sobrevida dos mesmos.

Até 2005, o tratamento padrão dos doentes metastáticos baseava-se em imunoterapia com citocinas, particularmente IFN α . O interferon foi a primeira citocina utilizada no tratamento do CCRm demonstrando respostas em até 26% de pacientes (91,92). Respostas objetivas entre 10 e 15% foram observadas por Motzer et al. (82) e sobrevida aproximada de 12 meses. Dois estudos randomizados, placebo controlados, permitiram o registro pelo FDA, do IFN α , por demonstrarem um benefício modesto na sobrevida dos pacientes metastáticos em relação ao placebo (72,93).

A IL-2 em altas doses foi aprovada pelo FDA em 1992 baseada em estudo fase II que demonstrou resposta completa e durável em 4% dos pacientes (94). Dados recentes do estudo “SELECT” demonstraram uma taxa de resposta de 28% com remissão completa e duradoura em 6% (95), entretanto o tratamento com IL-2 é associado a toxicidade severa para promover resposta em um pequeno grupo de prognóstico favorável.

As opções para terapêutica sistêmica são limitadas. Nenhum regime quimioterápico ou hormonal é aceito como padrão de tratamento. Respostas objetivas para monoquimioterapia ou poliquimioterapia são inferiores a 5%.

O CCR é refratário à maioria dos quimioterápicos devido a super-expressão da P-gp, que atua como uma bomba de efluxo, reduzindo a concentração intracelular de agentes citotóxicos e confere resistência à múltiplas drogas (3,96).

1.2.2 Os avanços no tratamento do CCRm

A melhor compreensão da biologia molecular do CCR células claras (CCRcc) e o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas com a aprovação de drogas pertencentes a um grupo de agentes baseados em terapia alvo, enriqueceu, nos

últimos 5 anos, o armamentário terapêutico e renovou as expectativas prognósticas dos portadores de CCRm (14). O cenário contemporâneo objetiva o micro ambiente tumoral e não a célula tumoral propriamente dita. A compreensão de que a neoformação vascular tumoral é etapa inicial e fundamental na gênese do CCR, permitiu o desenvolvimento de drogas inibidoras de angiogênese, que aumentaram a sobrevida global dos pacientes bem como o intervalo livre de progressão.

A maioria do conhecimento sobre as bases genéticas do CCR provém de estudos sobre as formas hereditárias da doença. Na verdade, os genes associados a cânceres hereditários, geralmente desempenham um papel importante nas formas esporádicas, ou não hereditárias, da mesma patologia (14).

Das quatro formas de CCR hereditários melhor definidas, síndrome de VHL, carcinoma renal papilífero hereditário (HPRC), síndrome de Birt-Hogg-Dubé (BHDS) e leiomiomatose hereditária associada a carcinoma de células renais (HLRCC), (97) foi a síndrome de VHL que desempenhou um papel fundamental no entendimento do desenvolvimento, progressão e biologia molecular do CCR. A partir da descoberta da síndrome de VHL, houve um período de quase dez anos até o surgimento de novas drogas para o tratamento CCRm (Figura 1).

Figura 1 - **Cronologia dos avanços no tratamento de CCRm**

Fonte: Adaptado de Algaba F. 2010 (98).

Cerca de 75% (até 92%) dos casos de CCR esporádico, apresentam VHL aberrante, com deleção do 3p, supressão da expressão ou perda de função (99), sugerindo tratar-se de um evento inicial no desenvolvimento do CCR (100). O gene de VHL tem características de um gene supressor tumoral que codifica uma proteína chamada proteína de VHL (pVHL). Esta proteína é capaz de regular negativamente uma série de proteínas intracelulares como o HIF1 α e HIF2 α .

Em condições de oxigenação normal, a pVHL forma um complexo com outras proteínas, incluindo as elonguinas C, B e CUL 2 que tem como alvo HIF1 α e HIF2 α , em um processo de ubiquitinação e posterior degradação, via proteassoma 26S. HIF é constantemente produzido e degradado (101).

Se a pVHL for inativada, ou ocorrer um processo de hipóxia, o HIF1 α fica livre para acumular-se na célula, uma vez que escapa ao processo de ubiquitinação, ligando-se a HIF1 β e ativando a transcrição de uma série de genes que promoverão angiogênese, através de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) bem como promoverão proliferação celular através de TGF α (fator de crescimento transformante alfa) e diminuição da apoptose (101-104).

O entendimento da biologia do CCR foi acompanhado de um maior interesse em explorar novas alternativas terapêuticas incluindo a terapia alvo molecular para CCR (105). A terapia alvo pode ser definida como o uso de agentes diretamente contra moléculas extracelulares predeterminadas, transmembrana ou intracelulares, envolvidas em vias de controle sobre o crescimento celular, diferenciação, transcrição ou angiogênese.

1.2.3 Vias moleculares

1.2.3.1 VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGF é uma glicoproteína dimérica membro da super família de fatores de crescimento PDGF (*Platelet Derived Growth Factor* – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas), que inclui VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E e fator de crescimento placentário, PLGF. O VEGF é crucial tanto para a angiogênese do tecido normal quanto para o tumoral. Os efeitos pró-angiogênicos do VEGF foram

bem caracterizados e incluem a indução da divisão e migração das células endoteliais (106,107), promoção da sobrevivência das células endoteliais através da proteção contra apoptose (108) e a reversão da senescência das células endoteliais (109). O VEGF exerce o seu efeito biológico através da interação com receptores presentes na superfície celular. Esses receptores de tirosina quinase transmembrana, incluem VEGFR-1 e VEGFR-2, são seletivamente expressos nas células endoteliais vasculares. VEGFR-3 é expresso no endotélio vascular ou linfático, e no receptor neuropilin, NRP-1 expresso no endotélio vascular e neuronal (110).

A indução da via do HIF resulta na produção de VEGF, o mais proeminente regulador de angiogênese, que interage inicialmente com VEGFR-2 para promover proliferação de células endoteliais, migração e permeabilidade vascular. Subsequentemente liga-se a VEGFR-1 regulando a organização de novos capilares (111,112).

A grande maioria dos pacientes com CCRcc apresenta super-expressão de VEGF no tecido tumoral, como demonstrado pelo nível de RNAm transcrito, e da proteína VEGF identificada nos tecidos com CCR (113).

O CCR associado a mutações de pVHL é invariavelmente refratário a destruição de HIF, sugerindo que HIF desempenha um papel crítico na carcinogênese do CCR.

Numerosos genes responsivos a HIF foram descritos, parte desses genes codificam proteínas que são receptores de fatores de crescimento ou suas ligantes (114). Alguns genes que respondem a HIF estão associados a gênese tumoral. Uma produção descontrolada desses fatores de crescimento provoca estímulos para a proliferação tumoral e de células endoteliais.

Durante a gênese tumoral, a angiogênese pode ser ativada diretamente via indução de fatores de crescimento angiogênico ou indiretamente recrutando células imunológicas que liberam mediadores de angiogênese (115).

1.2.3.2 mTOR - Alvo da rapamicina em mamíferos

A rapamicina (Sirolimus) foi isolada de uma bactéria do solo em 1975 (116,117). A sua descoberta levou a identificação e clonagem do alvo da rapamicina em mamíferos, mTOR, em 1994. O mTOR é uma serina-treonina quinase

intracelular, com papel fundamental na mediação do tamanho, proliferação e sobrevivência celular (118,119).

A rapamicina é um inibidor potente e específico da mTOR e que não inibe qualquer outra quinase (116,117). Devido a alta especificidade, a rapamicina tornou-se muito útil para o entendimento da função do mTOR na biologia celular e na patogênese (118,119). Embora inicialmente isolada como antifúngico, descobriu-se que também exercia efeito imunossupressor potente e foi, por muitos anos, utilizada como terapia imunossupressora em pacientes transplantados (116,117,120).

O mTOR é a principal serina-treonina quinase na cascata de sinalização PI3K/AKT (fosfatidilinositol-3quinase/AKT), uma via frequentemente desregulada na maioria dos cânceres humanos.

Após a sua difusão na célula, a rapamicina forma um complexo com FK-506 ligando-se a proteína 12 (FKBP-12). O complexo rapamicina-FKBP-12, liga-se a mTOR inibindo-o (118,119). O mTOR é um componente de 2 complexos de sinalização conhecidos como mTORC1 e mTORC2. Estes complexos contêm duas proteínas em andaime, raptor e rictor, respectivamente (121-123) que, por interação com distintos alvos, conectam mTOR a diferentes vias de sinalização. Como resultado, mTORC1, mTORC2 tem diferentes papéis (121-124).

A ativação de mTORC1, por fatores de crescimento e aminoácidos, estimulam o crescimento e proliferação celular. A atuação de mTORC2 contribui para regular a polaridade celular e citoesqueleto de actina (121-123). Os reguladores de mTORC2 ainda são desconhecidos. A rapamicina inibe mTORC1 evitando a interação de mTOR com raptor e não afeta a atividade de mTORC2 (118,121,125-127).

O mTORC1 age como sensor e coordenador da disponibilidade de múltiplos estímulos e fatores necessários para crescimento e proliferação celular incluindo fatores de crescimento tais como IGF-1 (128,129) e EGF (130,131), assim como nutrientes: aminoácidos, glicose e oxigênio (128,129,132-136).

Através da fosforilação de 2 efetores, S6K (quinase S6) e a 4E-BP1 (*binding protein for eukaryotic initiation factor 4E*) o mTORC1 controla a translação de ciclina D1, *c myc* e outras proteínas chaves na proliferação celular (137). mTOR também regula a expressão e estabilidade de HIF1 α . Estas funções exercidas por mTORC1 são relevantes no CCR, caracterizado por perda de expressão de VHL, que acabam por aumentar a angiogênese pelos mecanismos HIF dependentes já descritos. A

perda de função de VHL também resulta na desregulação da ciclina D1, quinase ciclina-dependente fundamental na progressão do ciclo celular (138).

1.2.3.3 Via PI3K - fosfatidilinositol 3-quinase

A ativação de mTORC1 inicia-se com a ativação da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) (139), em resposta a ativação extracelular de receptores de fatores de crescimento de tirosino quinases. A PI3K fosforila a fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) para PIP3 (140). A atividade de PI3K é regulada por PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), que desfosforila PIP3 para a forma PIP2 (124,139,140) (Figura 2).

Figura 2 - **A via PI3K/AKT e mTOR.** Ativação de PI3K por fatores de crescimento, ativando AKT, processo regulado por PTEN. AKT regula TSC, que por uma cascata intermediária, ativa mTOR-C1. Glicose e O₂ regulam mTOR por via independente de AKT.

Fonte: Adaptado de Lieberthal et al. 2009 (124).

PIP3 ativa a PDK1 que, por sua vez, ativa a proteína quinase B (PKB ou AKT). AKT está envolvida na regulação de diferentes processos celulares relacionados a sobrevivência celular e regulação do ciclo celular (141,142). Alguns dos alvos de AKT incluem mTOR, glicogênio-sintase-quinase 3, p21, p27, substrato receptor de insulina1 e RAF-1 (1,143). Um dos mediadores da interação entre AKT e mTOR é o complexo da esclerose tuberosa (TSC), um dímero composto por TSC1 (hamartina) e TSC2 (tuberina). AKT ativa mTORC1 através de uma cascata intermediária (118,129,144,145), que inclui TSC1 e TSC2, assim como Rheb (família RAS), que diretamente ativa mTOR (118,129,146). TSC2 liga-se e ativa a GTPase, que inibe a atividade de Rheb, enquanto TSC1 liga-se a TSC2, sendo necessário para que este último exerça sua função (118,146,147). AKT ativa mTOR por fosforilação e inibição de TSC2 portanto liberando Rheb dos efeitos inibitórios de TSC (118,137,148,149) (Figura 2). AKT também pode ser fosforilada por mTORC2. Fatores de crescimento e aminoácidos ativam AKT e mTOR via PI3K. Fatores de crescimento utilizam-se da classe IA PI3K (133). Uma deficiência de glicose e/ou oxigênio, reduzindo as reservas energéticas celulares, inibe mTOR através de uma via independente de PI3K. Uma queda na reserva de ATP é um potente estímulo para ativação da AMPK, outra serina-treonina quinase cujo papel está na regulação metabólica celular (118,134,136,145).

1.2.3.4 mTOR e CCR

A via mTOR desempenha um papel crítico na patogênese do CCR. Mutações genéticas que ocasionam aumento na atividade de mTOR, elevam a incidência de CCRm, assim, a perda de função, por mutações do PTEN, que regula mTOR através da via PI3K/AKT é observada em cerca de 5% dos pacientes com CCR (150); na esclerose tuberosa, mutações com perda de função de genes codificadores de TSC1 ou TSC2 levam a inativação do TSC, regulador negativo de mTOR. Pacientes nestas condições tem predisposição a desenvolver CCR (15,151).

Os inibidores de mTOR demonstram grande potencial para o tratamento de pacientes portadores de CCRm e evidenciam a importância de mTOR na patogênese do CCR. O Temsirolimus, análogo da rapamicina que é administrado por via endovenosa, assim como o everolimus, derivado da rapamicina de uso oral já foram aprovados pelo F.D.A. (*Food and Drug Administration*) americano para

tratamento do CCRm (99,152-155) e fazem parte do arsenal terapêutico atual. O benefício terapêutico do bloqueio de mTOR no CCRm, está no fato deste promover a inibição do crescimento e da proliferação celular, ciclina dependente, de células endoteliais e pericitos, bem como é demonstrada sua eficácia na redução da angiogênese mediada por HIF (15,156) por diminuição da produção de HIF1 α , VEGF, PDGF e outros fatores de crescimento endoteliais. Permanecem incertos os mecanismos pelos quais mTOR aumenta a expressão de HIF.

1.2.4 Tratamento do CCRm com drogas de terapia alvo moleculares

1.2.4.1 Inibidores de receptores de tirosino quinases

São drogas de administração oral, representadas por pequenas moléculas inibidoras de tirosino quinases. Apresentam boa biodisponibilidade e meia-vida elevada, favorecendo a posologia.

O Sorafenib foi aprovado pelo FDA após estudo fase III, duplo cego, placebo controlado, para segunda linha após falha de citocinas (157). O grupo que recebeu Sorafenib (n=453) apresentou resposta global de 10% contra 2% do grupo placebo (n=450) ($p<0,001$), com intervalo livre de progressão de 5,5 meses, contra 2,8 meses do grupo placebo ($p<0,01$). Os efeitos colaterais mais importantes no grupo Sorafenib foram: hipertensão e cardiopatia isquêmica. Inicialmente desenhada para inibir RAF-1 da via de sinalização RAF/MEK/ERK, tem como alvos preferenciais: VEGFR (2 e 3), c-KIT, PDGFR, Flt3 (Figura 3).

O Sunitinib foi aprovado pelo FDA após estudo fase III randomizado, com IFN α , para primeira linha (158). O grupo Sunitinib (n=375) apresentou resposta global de 39% contra 8% do grupo que recebeu IFN α (n=375) ($p<0,000001$), intervalo livre de progressão de 11 meses contra 5 meses ($p<0,000001$), sobrevida global mediana de 26,1 meses contra 21,8 meses ($p=0,051$) e sobrevida global de 26,4 contra 20 meses ($p=0,0362$). Os efeitos colaterais observados foram hipertensão; síndrome mão-pé; diarreia; vômitos e neutropenia. Os alvos do Sunitinib são VEGFR / PDGFR / RET / c-KIT / CSF-1R (Figura 3).

O Pazopanib foi aprovado em 2009, após estudo fase III duplo cego placebo controlado, para primeira linha ou após falha de citocinas (159,160). O grupo que recebeu Pazopanib (n=435) foi dividido em pacientes sem tratamento prévio (n=233)

e pacientes que falharam à terapia com citocinas (n=202), versus grupo placebo (n=289). A resposta global foi de 30% no braço Pazopanib versus 3% no braço placebo ($p<0,0001$), com intervalo livre de progressão de 11,8 meses nos pacientes sem tratamento prévio, 7,4 meses nos que receberam citocina prévia contra 4,2 meses do grupo placebo ($p<0,0001$). Os efeitos colaterais mais comuns foram diarreia; hipertensão; mudança de coloração dos cabelos; náusea; vômitos e anorexia. Os alvos do Pazopanib são VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR $\alpha\beta$ e c-KIT (Figura 3).

O Axitinib é um inibidor de VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR e c-KIT (Figura 3) que ainda aguarda aprovação para uso, entretanto, estudo fase II para segunda linha após falha de citocinas, envolvendo 52 pacientes, apresentou resposta global de 44% sendo que 2 (4%) pacientes obtiveram remissão completa. O intervalo livre de progressão (mediana) foi de 15,7 meses e a sobrevida global de 29.9 meses (161). A hipertensão foi o efeito colateral mais importante, controlada com terapêutica habitual.

1.2.4.2 Inibidores de VEGF

O Bevacizumab é um anticorpo monoclonal de uso endovenoso que tem como alvo VEGF (Figura 3). Foi aprovado para uso em CCRm associado a IFN α , em 2009, após dois estudos fase III, AVOREN (162) e CALGB 90206 (163), com desenhos idênticos, versus IFN α , para o tratamento de primeira linha de pacientes de risco baixo e intermediário do MSKCC. Em ambos estudos houve uma resposta global de cerca de 30% no grupo que recebeu a associação (n=306) versus 13% do grupo com IFN α (n=289) ($p<0,0001$), demonstrando intervalo livre de progressão de 10,2 meses, versus 5,4 meses ($p<0,0001$). Os efeitos colaterais mais comuns foram hipertensão; sangramento; proteinúria; perfuração gastrointestinal e trombose venosa.

1.2.4.3 Inibidores de mTOR

O Temsirolimus é um inibidor de mTOR (Figura 3) de uso endovenoso aprovado para uso em primeira linha para portadores de CCRm de alto risco do

MSKCC. O estudo que permitiu sua aprovação foi um fase III denominado *Global Advanced Renal Cell Carcinoma Trial* (164), versus IFN α versus IFN α +Temsirolimus. A resposta global foi superior no grupo que recebeu apenas Temsirolimus (n=209), 9% contra 5% do grupo IFN α (n=207), e 8% da associação (n=210). Sobrevida global foi superior no grupo Temsirolimus, 10,9 meses contra 7,3 do IFN α , contra 8,4 meses da associação. O intervalo livre de progressão também foi superior no grupo Temsirolimus com significância estatística ($p<0,001$). Os efeitos colaterais mais associados a Temsirolimus foram hiperglicemia, hiperlipemia e hipercolesterolemia.

O everolimus foi o segundo inibidor de mTOR (Figura 3) aprovado para o tratamento do CCRm. O estudo *RECORD1* foi um Fase III para segunda linha após falha de inibidores de tirosina quinase versus placebo (165). O *cross-over* de pacientes foi permitido. O grupo que recebeu everolimus (n=272) apresentou 1% de resposta global versus 0% do grupo placebo (n=138) com intervalo livre de progressão de 4 meses contra 1,9 meses. ($p<0,0001$). A sobrevida maior que 56 dias ocorreu em 63% do grupo que recebeu everolimus, versus 32% do grupo tratado com placebo. Efeitos colaterais observados foram estomatite, diarreia, pneumonite, astenia, rash, hipercolesterolemia e hiperglicemia.

1.2.4.4 Inibidores de EGFR

Os inibidores de EGFR (receptor de fator de crescimento epidermal) Gefitinib e Erlotinib combinados com Bevacizumab apresentaram resultados pobres em estudos fase II (14,166-168). Estudo fase III envolvendo 417 pacientes com CCR que expressavam EGFR, em segunda linha após falha de citocinas, demonstrou algum benefício em apenas um pequeno grupo de pacientes que fortemente expressava EGFR, ainda assim com resultados controversos (169).

Figura 3 - Os alvos dos fármacos da terapia alvo molecular

Fonte: Rini et al. 2009 (170).

1.2.5 Tratamento atual do CCRm

O tratamento atual para o CCRm, ainda que não se apresente como o ideal, está fundamentado em terapia alvo molecular, com agentes anti-VEGF, anti-VEGFR, e inibidores de mTOR. A IL-2 em altas doses, por apresentar um pequeno percentual de resposta completa e durável, ainda tem lugar no arsenal terapêutico do CCRm, a despeito da elevada morbidade deste tipo de tratamento (171).

A terapia sequencial é o padrão nos casos de intolerância e/ou progressão, uma vez que a terapia combinada não apresenta bom nível de evidência na literatura que justifique sua utilização na atualidade. A melhor sequência, assim como a melhor combinação de drogas não está completamente estabelecida (172).

Dados de estudos fase III sugerem que a primeira linha de tratamento de CCRm de células claras, de baixo e médio risco do MSKCC, deve ser Sunitinib;

Bevacizumab + IFN α ; Pazopanib ou IL-2 altas doses. No alto risco, Temsirolimus é a primeira opção (171).

A segunda linha após falha de inibidores de tirosino quinases deverá ser Everolimus (165,171,173), e após falha de citocinas as opções são Sorafenib; Sunitinib ou Pazopanib (Tabela 4).

O tratamento de segunda linha após falha de Bevacizumab poderá ser realizado com Sunitinib.

Após falha do tratamento inicial com Temsirolimus, não há evidências que definam a melhor opção terapêutica.

Para outras linhagens de carcinoma de células renais, não células claras, à luz da medicina baseada em evidência, não há estudos que permitam um consenso no tratamento. Temsirolimus pode ser empregado com resultados questionáveis (Tabela 4). O uso de inibidores de receptores de tirosino quinases, como Sunitinib ou Sorafenib, também é descrito, porém ainda investigacional (171).

Há necessidade de aguardar resultados dos estudos em curso atualmente, para definir possíveis associações, novas drogas, alternativas de terapia seqüencial, bem como o papel de biomarcadores que contribuam no diagnóstico, orientação terapêutica e seguimento do pacientes portadores de CCRm.

Embora a terapêutica alvo molecular tenha produzido efeitos clínicos robustos, alguns pacientes desenvolvem resistência à esta terapia. Evidências emergentes de estudos pré-clínicos sugerem que o mecanismo de resistência é mediado por mudanças no tumor e no seu micro ambiente, que permitem a perfusão e crescimento tumoral. Reguladores dos receptores bloqueados (mTOR ou VEGF) como HIF ou AKT podem levar ao escape do bloqueio, permitindo crescimento tumoral. Este é o racional para a terapia seqüencial ou combinada, tendo estes novos elementos como alvos (174).

Tabela 4 - Algoritmo do tratamento do CCR segundo NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*).

Padrão de tratamento	Condição pré-tratamento	Terapia
Primeira linha (células claras)	Risco baixo ou intermediário	Sunitinib / IL-2 altas doses
		Bevacizumab + IFN α / Pazopanib
	Alto Risco	Temsirolimus
Segunda linha (células claras)	Citocinas	Sorafenib / Sunitinib / Pazopanib
	Inibidores de VEGFR	Everolimus, outro ITQ
	Bevacizumab	Sunitinib
	Temsirolimus	Desconhecido
CCR (Não células claras)		Temsirolimus Sunitinib, Sorafenib

Fonte: *NCCN Guidelines in Oncology: Kidney Cancer—v.2. 2011 (171)*.

1.3 Inibidores de proteases

1.3.1 *Proteases*

Proteases são enzimas que exercem funções indispensáveis em todas células eucarióticas. Em mamíferos, estão relacionadas à ativação de proteínas, resposta imune, sobrevivência e diferenciação celular, angiogênese e remodelagem da matriz celular, entre outros. De acordo com seus mecanismos catalíticos, função, especificidade, sítios ativos e estrutura, são agrupadas em 6 famílias. Dentre elas,

as serinoproteases compreendem cerca de 1/3 das proteases conhecidas. Desempenham funções na coagulação sanguínea, inflamação, pressão arterial, digestão protéica, sinalização celular, como também são relevantes na evolução tumoral, disseminação e consolidação de metástases, atuando na angiogênese, remodelação tecidual, migração celular e invasão tumoral (175).

Além de ação proteolítica, a interação com os receptores ativados por protease (PAR), pode resultar na ativação de citocinas, fatores de crescimento e outros mediadores que favorecem angiogênese, essencial para progressão tumoral (176).

1.3.2 Inibidores de proteases, serinoproteases, domínio tipo Kunitz

O controle da ação das serinoproteases por seus inibidores endógenos limita a ação deletéria destas enzimas sobre o organismo, o que é essencial para manter a homeostase e evitar patologias como o câncer. A descoberta de novos inibidores para uso terapêutico é uma estratégia a ser explorada em oncologia (177,178).

Os inibidores de serinoproteases são agrupados em cerca de 20 famílias com diferenças estruturais, e com diferentes mecanismos inibitórios. De acordo com o mecanismo de inibição são classificados em inibidores canônicos, não canônicos e serpinas. Os canônicos atuam como falsos substratos (179) interagindo com a enzima e bloqueando seu sítio ativo sem alterações conformacionais. Os não canônicos ligam-se especificamente ao sítio ativo das enzimas. As serpinas também funcionam como falsos substratos que ligando-se à enzima, alteram sua conformação e promovem a quebra de seu sítio ativo (180).

Os domínios tipo Kunitz são constituídos por pequenas moléculas ligadas a dissulfetos (resíduos com cerca de 50 aminoácidos), e encontrados em uma grande variedade de proteases, sendo que os domínios melhores caracterizados são os presentes nos inibidores de serinoproteases (181). Estes domínios são estruturas funcionais comumente encontradas em proteínas secretadas no espaço extracelular, que em geral, estão relacionadas à inibição canônica/reversível de serinoproteases. Os inibidores que apresentam um ou dois domínios do tipo Kunitz são glicoproteínas transmembrana, que podem exercer efeito proteolítico na superfície da membrana ou ainda apresentar um papel regulatório intermolecular na superfície celular (182).

Está bem estabelecido que existem proteínas inibidoras de serinoproteases de domínio Kunitz único, como o “*bovine pancreatic trypsin inhibitor*” (BPTI) ou inibidor de tripsina pancreática bovina, mas também podem ser encontradas proteínas com três domínios Kunitz consecutivos, como é o caso do principal inibidor endógeno da cascata de coagulação, inibidor da via do fator tecidual, “*tissue factor pathway inhibitor*” (TFPI).

O TFPI afeta a hemostasia durante a etapa inicial da cascata de coagulação, inibindo o Fator Xa (FXa), pela interação com seu segundo domínio Kunitz, e, assim, bloqueando o complexo FVIIa/Fator tissular, via seu primeiro domínio Kunitz. Além disso, o TFPI-2, estruturalmente homólogo ao TFPI, exerce funções importantes na manutenção da estabilidade do microambiente tumoral, inibindo a invasão tecidual, crescimento de neoplasias, bem como a formação de metástases (183). Em conjunto, estes dados, exemplificam o papel catalítico dos domínios Kunitz na hemostasia e na gênese de doenças, como a coagulação sanguínea e o câncer (182,184).

A contribuição dos inibidores de serinoproteases do tipo Kunitz no desenvolvimento tumoral vai além de uma atuação direta na matriz extracelular, inibindo a atividade proteolítica de serinoproteases. Tem sido mostrado, por exemplo, que o TFPI modifica a expressão de genes relacionados à oncogênese, angiogênese, apoptose, invasão e metástase (185).

A invasão tumoral depende de uma atividade proteolítica altamente regulada que permite a invasão da matriz extracelular pelas células tumorais. Dentre as enzimas participantes do processo, estão os ativadores de plasminogênio (PA) (ativador de plasminogênio tipo tecidual (t-PA) e tipo uroquinase (uPA), cuja expressão é regulada por diversas citocinas e fatores de crescimento com ação pró-inflamatória. Estudos recentes mostram que o Bikunin, um inibidor de serinoproteases do tipo Kunitz, inibe a formação tumoral e a formação de metástases por ação direta na atividade da plasmina e pela inibição da expressão gênica e protéica do uPA. Além disso, esse inibidor também atua de maneira indireta, inibindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 1beta (IL-1beta), essenciais para manutenção do microambiente e da angiogênese tumoral (186-188).

A expressão de ativadores de inibidores de serinoproteases do tipo Kunitz têm uma relação inversa com a malignidade dos processos cancerosos o que

implica, geralmente, em prognóstico favorável ao paciente. A literatura descrita acima, embora não tenha abrangido toda a vasta literatura sobre o papel dos inibidores de serinoproteases tipo Kunitz, mostra seu papel relevante na carcinogênese. Os mecanismos envolvidos são complexos, justamente pela ampla magnitude de ação destes inibidores.

1.3.3 Amblyomin-X como inibidor do Fator Xa e agente pró-apoptótico

Atualmente tem sido demonstrado que inúmeras moléculas bioativas são secretadas pelas glândulas salivares de carrapatos que afetam a hemostasia (cascata de coagulação, agregação plaquetária e fibrinólise). Estas substâncias anticoagulantes presentes na saliva desses artrópodes são imprescindíveis para que ocorra o repasto sanguíneo, pois mantêm o sangue do hospedeiro fluído, facilitando a alimentação (189-192). Além disso, alguns ectoparasitas apresentam importância médica e veterinária por parasitar animais domésticos e silvestres como é o carrapato *Amblyomma cajennense* que pertence à família Ixodidae, subfamília *Amblyomminae*. Este carrapato é o responsável pelo maior número de picadas em humanos sendo o principal vetor da febre maculosa, causada pela *Rickettsia rickettsii* (190-193).

Batista e colaboradores descreveram a construção de uma biblioteca de cDNA das glândulas salivares do carrapato *Amblyomma cajennense*, e dela 2000 transcritos foram sequenciados, estabelecendo o perfil dos transcritos mais expressos pela glândula salivar deste carrapato. Dentre estes, um apresentava características estruturais que se assemelhava a inibidores de FXa, do tipo TFPI, e similaridade com inibidores do tipo Kunitz. Por esta razão, este gene foi eleito para clonagem e expressão em *Escherichia coli* e *Picchia pastoris*. A proteína recombinante foi denominada Amblyomin-X (194).

Esta molécula já possui patente depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial, (INPI, PI 0406057-1), e é protegida pelo PCT baseada em suas atividades como inibidor do FXa, antitumoral, anti-metastático e provável antiangiogênico. O Amblyomin-X encontra-se licenciado para a União Química Farmacêutica Nacional.

Estudos experimentais realizados com a proteína recombinante tem mostrado sua capacidade de inibir o FXa da coagulação e, conseqüentemente interferir com a

hemostasia, prolongando o tempo de coagulação (184). Chudzinski-Tavassi e colaboradores (195) demonstraram a propriedade do Amblyomin-X em induzir morte celular por apoptose em diferentes linhagens tumorais, como as de melanoma murino e humano. A molécula apresenta efeito antitumoral *in vivo*, este último podendo estar relacionado à possível atividade antiangiogênica. Esta evidência, ainda que preliminar, está baseada nas observações em camundongos tratados, por via intraperitoneal, com o Amblyomin-X apresentaram redução da massa tumoral no tecido subcutâneo dorsal, induzida pela injeção de células de melanoma da linhagem B16-F10. A evidência da ação da proteína sobre a angiogênese foi sugerida pela menor formação de vasos na região que circunda o tumor.

Dados recentes demonstraram que o Amblyomin-X possui atividade pró-apoptótica em células tumorais. Sabe-se também que há mudança no padrão de expressão gênica das células tumorais tratadas com essa proteína, afetando principalmente genes relacionados com o crescimento e sobrevivência celular. Dentre esses o PSMB2, que codifica a subunidade catalítica $\beta 2$ proteassomal (195).

O proteassoma é descrito como um complexo protéico que apresenta atividade proteásica multicatalítica estando presente tanto no núcleo como no citoplasma, podendo representar até 1% das proteínas totais da célula (196). As atividades proteásicas majoritárias desse complexo estão relacionadas com sítios-ativos: tripsina, quimiotripsina, peptidil glutamil hidrolase (também conhecido como caspase-like) e treonina (197). O proteassoma desempenha papel fundamental na degradação de proteínas ubiquitinadas. Quando as proteínas recém sintetizadas no retículo endoplasmático (RE), organela envolvida na síntese, modificação estrutural e transporte de proteínas e lipídios (198), não apresentam um “folding” correto, são retro-translocadas para o citosol e imediatamente direcionadas para a degradação proteassomal (199,200). Este mecanismo tem um papel importante na redução da quantidade de proteínas desdobradas no RE. O bloqueio da atividade proteolítica do proteassoma por inibidores farmacológicos, tais como bortezomib/PS-341, compromete severamente a remoção de proteínas com a estrutura conformacional prejudicada, que podem se acumular dentro do lúmen RE, sobrecarregando o mesmo. (201,202). Quando essas perturbações estruturais e funcionais agudas ou crônicas comprometem a integridade do RE, implica em uma resposta de estresse específica, que por diferentes mecanismos, ativam o programa anti-apoptótico ou apoptótico da célula ou bloqueiam a progressão do ciclo celular (203).

Experimentos *in vitro* demonstraram que o Amblyomin-X foi capaz de modular negativamente a atividade proteassomal, inibindo preferencialmente a atividade do tipo tripsina. Foi observado também que o “pool” de proteínas poli-ubiquitinadas estava aumentado em células tumorais tratadas com o Amblyomin-X, sugerindo que a inibição do proteassoma deve estar envolvida no mecanismo de ação pró-apoptótica do Amblyomin-X (195).

1.3.4 Ciclo celular, apoptose e seus reguladores

Em 1964, foi proposto o termo "morte celular programada" para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental. Em 1972 o termo apoptose foi eleito para indicar esse tipo de morte celular. A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (204,205). A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas. De um modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência da matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos (*blebs*) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam em número e tamanho e rompem, originando estruturas que possuem o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (206). Outra característica muito marcante da morte por apoptose é a fragmentação inter-nucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico. Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de base (207). A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular, levou a uma intensa

investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer (208).

A apoptose pode ser induzida por diferentes agentes etiológicos, como infecção viral, radiação, várias toxinas e drogas, isquemia, perturbação metabólica, fatores hormonais e depleção de fatores de crescimento. Por outro lado, alguns outros fatores inibem a apoptose (anti-apoptóticos), como os fatores de sobrevivência tecido-específicos ou gerais, por exemplo, hormônios, citocinas e fatores de crescimento (209).

Em geral, a apoptose ocorre em duas fases distintas, a fase de decisão na qual os produtos gênicos necessários para desencadear o processo são acumulados, e a fase de execução, pela ativação em cascata de enzimas específicas, as caspases (207,210).

As caspases, proteases específicas de aspartato contendo cisteína, clivam seus substratos protéicos especificamente após um resíduo de ácido aspártico. Estão presentes no núcleo como pró-enzimas inativas, constituídas de uma subunidade grande (20 kDa) e uma pequena (10 kDa). A ativação das caspases iniciadoras, tais como as caspases 2, 8, 9 e 10, por sinais pró-apoptóticos leva a ativação proteolítica das caspases efetoras 3, 6 e 7. Essas caspases clivam um grupo de proteínas vitais (lamininas e gelsolinas) e ativam proteoliticamente enzimas latentes, como as nucleases, iniciando e executando a fase de degradação celular e as mudanças morfológicas típicas da célula (207).

Três vias celulares de sinalização distintas têm sido descritas como responsáveis pelo início da apoptose: via extrínseca ou de sinalização externa, via intrínseca ou mitocondrial e a terceira via, ativada pelo fator de indução de apoptose (AIF). Na via extrínseca, o processo é ativado por estímulos externos, por meio de ligantes a receptores de morte específicos presentes na membrana celular, que recrutam proteínas adaptadoras, ativando assim, a cascata de caspases e culminando na morte celular. Esses receptores de morte pertencem à família do receptor do fator de necrose tumoral (TNF), que compreende o receptor TNF-1 (TNF-R1), Fas (Apo-1 ou CD95), receptor de morte DR3, DR4 (TRAIL R1) e DR5 (TRAIL R2). A ligação desses ligantes a seus respectivos receptores de morte promove o recrutamento de proteínas adaptadoras (FADD com o Fas; TRADD com TNF-R1, RIP ou ambos), que juntamente com a forma inativa da caspase-8 forma um complexo de sinalização de indução de morte (DISC). Este complexo ativa a

caspase-8, iniciando-se assim, a cascata de caspases, que por sua vez ativa as caspases efetoras 3, 6 e 7 resultando na execução da morte celular apoptótica (211-213).

A via intrínseca ou mitocondrial ocorre pela ativação, por estresse, de proteínas intracelulares específicas com a participação dos membros da família de proteínas Bcl-2, considerados os mediadores essenciais de sobrevivência e apoptose celular. A família de proteínas Bcl-2 é composta por cerca de 15 membros com função pró-apoptótica (Bax, Bak, Bad, Bim, Bid, Bik, Blk e Hrk) e anti-apoptótica (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xl, Mcl-1, Bfl-1 e BHRF). Essas proteínas localizam-se na membrana mitocondrial externa, no envelope nuclear e no retículo endoplasmático das células. Os membros com função anti-apoptótica estabilizam a membrana da mitocôndria, enquanto que os pró-apoptóticos, permeabilizam e induzem a liberação do citocromo c, que na presença de ATP forma um complexo com o fator 1 de ativação da proteína apoptótica (APAF-1) e caspase-9, ativando a cascata de caspases efetoras, como a caspase-3. A terceira via de sinalização também dependente da mitocôndria, mas independente das caspases, ocorre pela liberação de fatores apoptogênicos, como citocromo c, fator de indução da apoptose (AIF), ATP, proteínas *heat shock* e *Smac/DIABLO* (*second mitochondria-derived activator of caspases / Direct IAP-Binding Protein with Low pI*), um inibidor de IAPs (proteínas inibidoras de apoptose), neutralizando sua atividade anti-apoptótica (214).

As células ainda podem sofrer apoptose em resposta a sinais internos, incluindo lesões no DNA, com a participação de genes envolvidos no controle do ciclo celular, como o gene supressor de tumor TP53. Esse gene, eleito como o “guardião do genoma”, desempenha papel importante na manutenção da integridade do DNA e na indução de apoptose, eliminando, de forma seletiva, as células danificadas, e protegendo o organismo do desenvolvimento de neoplasias (215-218).

2 OBJETIVOS

- Avaliar a resposta antineoplásica do Amblyomin-X sobre carcinoma de células renais do tipo células claras em linhagem celular RENCA – carcinoma de células renais do tipo células claras murino.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Células RENCA

A linhagem de carcinoma de células renais murinas RENCA, foi cedida gentilmente pela Prof. Dra. Maria Helena Bellini do Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), que por sua vez, as recebeu do Dr. Isaiah J. Fidler (The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX).

É uma linhagem epitelial de carcinoma de células renais do tipo convencional, CCRcc, proveniente de crescimento tumoral espontâneo na cortical renal de camundongos da linhagem BALB/c. Foi isolada em 1969, e estabelecida como linhagem em 1973 (219).

O meio de cultura utilizado para o crescimento e expansão das culturas celulares foi o RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, amino-ácidos não essenciais (0,1 mM), piruvato de sódio (1 mM), L-glutamina (2 mM) e penicilina (0,1%). As culturas foram mantidas em estufa à 37 °C, umidificada e com 5% de CO₂.

3.2 Fibroblastos normais NIH/3T3

A linhagem celular utilizada foi a de fibroblastos de camundongos NIH/3T3 obtida da American Type Culture Collection (ATCC CRL-1658, Manassas, Virginia, U.S.A). São células fusiformes de crescimento aderente em monocamadas. A manipulação celular foi realizada em condições estéreis, e as culturas foram mantidas em estufa (Sanyo MCO-18AIC(UV)) a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Os fibroblastos normais NIH/3T3 foram cultivados em garrafas de 25 cm² contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco, Grand Island, NY, U.S.A.), gentamicina (0,025 g/L), estreptomicina/penicilina (0,1 g/L) e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab), em estufa a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. As células foram cultivadas em triplicatas, contadas com o auxílio da câmara de Neubauer e a densidade celular ajustada para a concentração de 5x10⁴ células, e cultivadas em placa de cultura de Petri de 2 cm².

3.3 Amblyomin-X

O Amblyomin-X utilizado neste trabalho, é uma proteína recombinante, obtida em *Picchia pastoris* baseada na metodologia estabelecida no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, a partir de um clone descrito por Batista et al. (184). O lote utilizado para os estudos foi submetido ao controle de qualidade rotineiro estabelecido para esta molécula: Eletroforese de poliacrilamida – SDS, para controle de homogeneidade, inibição de FXa utilizando o substrato cromogênico (S2765), específico para FXa, citotoxicidade em culturas de adenocarcinoma de pâncreas (MiaPaCa) e melanoma humano (Sk Mel-28) pelo teste colorimétrico de MTT.

3.4 Avaliação do efeito citotóxico do Amblyomin-X em células RENCA pelo método colorimétrico MTT

O ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo método do MTT para avaliar o efeito do Amblyomim-X, em diferentes concentrações, em células RENCA. O ensaio colorimétrico MTT avalia a capacidade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase em reduzir o sal 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo ao produto formazan (220).

As células RENCA foram plaqueadas em placas de 96 orifícios, na concentração de 1×10^4 células por orifício e cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, em estufa de cultura umidificada e com 5% de CO₂, por períodos de 24 e 48 h. Quatro horas antes do término do tempo estabelecido, foram adicionados 20 µL de MTT (Sigma Chemicals, St Louis, USA) na concentração final de 10 µg/mL. As placas foram mantidas na estufa pelas quatro horas restantes. Após este período foram retirados 180 µL do sobrenadante de cada poço e adicionados 150 µL de dimetilsulfóxido (Sigma Chemicals, St Louis, USA) homogeneizando-se para a completa dissolução dos cristais de sal formados pelo metabolismo mitocondrial. Os resultados foram analisados através da leitura da absorbância de cada poço, em espectrofotômetro (Thermoplate), no comprimento de onda de 540 nm. O percentual de viabilidade foi obtido através da seguinte fórmula: $[(\text{Absorbância das células tratadas com Amblyomim-X} / \text{Absorbância das células não tratadas}) \times 100]$.

A concentração inibitória 50% (IC50%) foi calculada após a interpolação da concentração do composto e a viabilidade celular, a equação da reta obtida e o coeficiente de correlação (r^2). Os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.5 Citometria de fluxo

As análises foram realizadas no citômetro de fluxo Becton Dickinson FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), citômetro que permite analisar até quatro marcações independentes na amostra. As características de potência de cada laser, voltagem dos detectores e de compensação entre os vários lasers, de modo que uma amostra de células não marcadas não permitisse a presença de eventos positivos para nenhum tipo de fluorescência, foram previamente definidos pela utilização de controles negativos e positivos para cada fluorocromo utilizado; e, em seguida, as amostras marcadas e não marcadas com anticorpos específicos, confirmando sempre, desta maneira, os eventos positivos para a fluorescência esperada em cada amostra testada. Experimentos em triplicatas.

3.6 Determinação do teste funcional do potencial elétrico mitocondrial pelo efluxo da sonda fluorescente Rodamina-123 por citometria de fluxo

Este ensaio foi realizado em paralelo ao teste da avaliação da apoptose/necrose para verificar a influência de bombas de efluxo de drogas na resistência do Amblyomim-X. O teste de efluxo da sonda fluorescente Rodamina-123 foi realizado utilizando-se como controle do fenótipo funcional MDR, as células RENCA e os fibroblastos normais NIH/3T3 do grupo controle e, como amostra teste, as células RENCA e os fibroblastos normais NIH/3T3, tratados com Amblyomim-X (105 nM), após 24 h de tratamento. Resumidamente, 300 μ l da suspensão de células RENCA e de fibroblastos normais NIH/3T3 foram incubadas com ou sem a sonda Rodamina-123 (200 ng/mL), por 45 minutos, a 37 °C em estufa de cultura umidificada e com 5% de CO₂. Após a centrifugação, a 1500 rpm, por 30 minutos as células foram lavadas em PBS gelado e o potencial mitocondrial foi avaliado no citômetro de fluxo, utilizando-se o programa Cell Quest, versão 3.1, com aquisição de 10.000 eventos, empregando-se uma janela/quadrante definido (*gate*) de análise a partir dos parâmetros de espalhamento luminoso (volume - FSC X complexidade -

SSC). A partir do *gate* das células em estudo, foram obtidos histogramas de intensidade de fluorescência no canal FL1-H. Os resultados do teste funcional do efluxo da sonda Rodamina-123 foram analisados na forma de média de intensidade de fluorescência (MIF), na razão entre a MIF da amostra em estudo e do respectivo controle negativo.

3.7 Determinação da proporção de células mortas por apoptose ou necrose por citometria de fluxo

O número e a proporção de células RENCA e fibroblastos normais NIH/3T3 em apoptose ou necrose foi identificado pelo ensaio de externalização da fosfatidilserina por meio da técnica de citometria de fluxo proposta por Bucchieri et al. (221). Após a contagem total de células em câmara de Neubauer, o número de células foi ajustado para uma concentração final de 2×10^5 células/100 μ l e adicionada a solução de anexina V conjugada com FITC (fisotiocianato de fluoresceína) na concentração de 1 μ g de anticorpo diluído em tampão de ligação (10 mM Hepes/NaOH; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl_2 ; pH=7,4) e iodeto de Propídeo (PI, 15 μ g/ μ l; Sigma Chemicals, St Louis, USA). As células foram incubadas em tubos de propileno, protegidas da luz, à temperatura ambiente, durante 1 hora. A detecção da porcentagem de células em apoptose e necrose foi determinada em citômetro de fluxo. As populações celulares analisadas foram reconhecidas por meio das propriedades volume (FSC) e complexidade (SSC). A fluorescência no canal verde do FITC foi mensurada a 530 nm (detector FL1-H) e a fluorescência vermelha do iodeto de Propídeo a 585 nm (FL2-H).

3.8 Determinação da expressão da glicoproteína P (P-gp) por citometria de fluxo

Após o tratamento com o Amblyomin-X (105 nM) o nível celular foi ajustado para 5×10^5 células/mL em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino. Alíquotas de 100 μ L das suspensões celulares foram incubadas por 1 h, a 4 °C, com 1 μ g de anticorpo específico anti-P-gp (BD Biosciences), marcada com FITC.

Após este período as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 RPM e lavadas com PBS gelado. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular

ressuspenso em solução de PBS contendo 1% de paraformaldeído. A leitura e análise da expressão, em unidades arbitrárias de fluorescência, dos receptores na superfície celular foram avaliadas em citômetro de fluxo.

Neste experimento foi utilizado o programa *Cell Quest*, com aquisição de 10.000 eventos, tendo como parâmetros FSC (tamanho) e SSC (granulosidade/complexidade) em FL1/FL2, a detecção da intensidade de fluorescência da reação de ligação antígeno/anticorpo conjugado.

3.9 Análises das diferentes populações e receptores das vias de morte celular e pontos de checagem do ciclo celular de células RENCA e de fibroblastos normais NIH/3T3 por citometria de fluxo

Após o tratamento com o Amblyomin-X (105 nM) o nível de células foi ajustado para 5×10^5 células/mL em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino. Alíquotas de 100 μ L das suspensões celulares foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 0,1% em tampão FACs Flow (BD) e incubadas por 1 hora, a 4 °C, com 1 μ g de anticorpo específico anti-ciclina D1 ou Bad ou Bcl-2 conjugado com FITC (Santa Cruz, USA), 1 μ g de anticorpo específico Caspase 3 fosforilada conjugado com ficoeritrina-PE (Santa Cruz, USA) na presença ou ausência de seu inibidor específico Ac-Asp-Glu-Val-Asp-OH (BioAgency Biotecnologia Ltda).

Após este período as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 RPM e lavadas com PBS gelado. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular ressuspenso em solução de PBS contendo 1% de paraformaldeído. A leitura e análise da expressão, em unidades arbitrárias de fluorescência, dos receptores na superfície celular foram avaliadas em citômetro de fluxo.

Utilizou-se o programa *Cell Quest*, com aquisição de 10.000 eventos, tendo como parâmetros FSC (tamanho) e SSC (granulosidade/complexidade) em FL1/FL2, a detecção da intensidade de fluorescência da reação de ligação antígeno/anticorpo conjugado à PE e/ou FITC.

3.10 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

Foram adicionados, em placas de Petri de 2 cm² (Nunc, Brand Products, Germany), suspensão de 1×10^5 células/ml de células RENCA ou de fibroblastos

normais NIH/3T3, que foram incubadas em estufa de cultura a 37 °C e 5% de CO₂, durante 18 h. Após este período e confluência de 70%, as células foram tratadas com 105 nM de Amblyomin-X. Após 24 h, o sobrenadante foi aspirado com o auxílio de uma bomba de vácuo e as suspensões celulares aderidas, do controle e tratadas, foram removidas pelo tratamento com 30 mg/ml de solução de tripsina por 10 minutos à temperatura ambiente e inativada em seguida com 5 g/l do inibidor de tripsina (Sigma Sigma-Aldrich) e 0,1 g/l de ribonuclease-A.

As células foram incubadas com solução de iodeto de Propídeo (1.8 mg/ml), para a avaliação da quantidade e integridade do DNA nas fases do ciclo celular. A distribuição das fases do ciclo celular foi avaliada em citômetro de fluxo. Os resultados obtidos pelo programa de aquisição *Cell-Quest*, em média de 10.000 eventos adquirido no citômetro, foram analisados pelo software Win MDI 2.8, e o conteúdo de DNA medido em intensidade de fluorescência (FL2-H). 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).

3.11 Expressão do marcador Ki-67 por citometria de fluxo

Avaliação dos níveis de proteínas associadas a capacidade proliferativa foi realizada por citometria de fluxo. As células RENCA e fibroblastos normais NIH/3T3 foram cultivados em placas de Petri por 24 h em meio completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino e tratadas com o Amblyomin-X na concentração 105 nM por 24 h. Em seguida, as células aderentes ou presentes no sobrenadante foram tripsinizadas, transferidas para *ependorfs* estéreis e fixadas com paraformaldeído 4%. As células foram permeabilizadas com saponina 0,5% em PBS, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após a incubação, foram lavadas com solução tampão Fac's flow contendo 0,5% de soro albumina bovina (Sigma) e 0,1% de saponina em PBS (solução BSA/saponina) e incubadas com anticorpo monoclonal anti-Ki-67 MIB (BD Biosciences) na concentração de 1 µg de anticorpo para 10⁵ células, a 4 °C, durante 18 h. A seguir, as células foram lavadas com solução BSA/saponina e incubadas com anticorpo secundário conjugado com Isotiocianato de Fluoresceína – FITC. Após a incubação, por 2 h à 37 °C, as células foram lavadas com PBS e fixadas em paraformaldeído 1%. Os experimentos foram acompanhados de controle isotipo. Todos as aquisições foram realizadas em três experimentos independentes.

3.12 Expressão da proteína p53 por citometria de fluxo

A avaliação dos níveis de proteína p53 associadas a regulação, progressão do ciclo celular, reparo do DNA foi realizada por citometria de fluxo. As células RENCA e fibroblastos normais NIH/3T3 foram cultivados em placas de Petri, por 24 h, em meio completo suplementado com 10% de soro fetal bovino e tratadas com o Amblyomin-X na concentração 105 nM, por 24 h. Após este período as células aderentes foram tripsinizadas, transferidas para tubos de citometria, fixadas com paraformaldeído 4% e incubadas com anticorpo monoclonal anti-p53 (Santa Cruz USA), na concentração de 1ug de anticorpo para 10^6 células a 4 °C, por 18 h. A seguir, as células foram lavadas com solução BSA/saponina diluída em tampão Fac's Flow e incubadas com anticorpo secundário conjugado com Isotiocianato de Fluoresceína – FITC (1 ug). As aquisições foram realizadas conforme descrito no item 3.11.

3.13 Expressão do receptor VEGFR-1, por citometria de fluxo

A avaliação dos níveis do receptor R1 do VEGF foi realizada por citometria de fluxo. As células RENCA foram cultivadas, em placas de Petri, por 24 h em meio completo suplementado com 10% de soro fetal bovino e tratadas com o Amblyomin-X na concentração 105 nM. Após este período as células foram tripsinizadas, transferidas para tubos de citometria, fixadas com paraformaldeído 4% e incubadas com anticorpo monoclonal anti-VEGFR-1 (Santa Cruz USA) na concentração de 1ug de anticorpo para 10^5 células a 4 °C, por 18 h. A seguir, as células foram lavadas com solução BSA/saponina diluído em tampão Fac's Flow e incubadas com anticorpo secundário conjugado com Isotiocianato de Fluoresceína – FITC (1 ug). As aquisições foram realizadas conforme descrito no item 3.11.

3.14 Expressão do citocromo c por citometria de fluxo

A avaliação da liberação do citocromo c para o citosol foi realizada por citometria de fluxo. As células RENCA e fibroblastos normais NIH/3T3 foram cultivados em placas de Petri, por 24 h, em meio completo suplementado com 10% de soro fetal bovino e tratadas com o Amblyomin-X na concentração 105 nM, por 24 h e em

seguida as células aderentes ou presentes no sobrenadante foram tripsinizadas, transferidas para tubos de citometria, e fixadas com paraformaldeído 4%. As células foram permeabilizadas com saponina 0,5% em PBS, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas com solução tampão Fac's flow contendo 0,1% de saponina em PBS (solução BSA/saponina) e incubadas com anticorpo monoclonal anti-citocromo c (Santa Cruz USA) na concentração de 1 ug de anticorpo para 10^6 células a 4 °C, durante 18 h. A seguir, as células foram lavadas com solução BSA/saponina e incubadas com anticorpo secundário conjugado com ficoeritrina – PE (1 ug). As aquisições foram realizadas conforme descrito no item 3.11.

3.15 Avaliação do Amblyomin-X como inibidor do proteassoma em células RENCA

Após o tratamento com Amblyomin-X na concentração de 105 nM por 4 e 16 h, as células foram tripsinizadas e centrifugadas (1000 rpm, 10 min, 4 °C).

O sobrenadante foi desprezado e o sedimentado celular foi lisado mecanicamente com auxílio de uma seringa de 1 mL. O material obtido foi incubado em gelo por 30 minutos e centrifugado a 1.500 rpm por 30 minutos. A concentração de proteínas no sobrenadante foi determinada, e alíquotas da proteína total foram utilizadas para determinação da atividade proteassômica. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford.

Para avaliação da atividade proteassômica foram utilizados peptídeos fluorogênicos (AMC, 7-amido-4-meticumarino como sonda fluorescente; Calbiochem, San Diego, CA, USA). A atividade do tipo quimiotripsina foi pesquisada com o peptídeo padrão Suc-LLVY-AMC, e, para a atividade tipo tripsina, utilizou-se o z-ARR-AMC. O extrato celular, na concentração de 25 a 100 µg de proteína, foi incubado a 37 °C com 125-500 µM do fluoropeptídeo. A emissão de fluorescência em 440 nm (excitação em 365 nm) foi registrada durante 1 h. Os resultados foram expressos como porcentagem de hidrólise proporcional à extração total de células controle. O cálculo foi baseado na diferença entre a atividade hidrolítica total do extrato celular e atividade determinada em amostras anteriormente incubadas com inibidores de proteassoma padrão (lactacystin ou NLVS) (195).

3.16 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras de células RENCA e fibroblastos normais NIH/3T3 do grupo controle, não tratado, e do grupo tratado com o Amblyomin-X foram analisados por MEV. Na primeira etapa, as amostras foram fixadas com glutaraldeído 3%, por 24 h o que permitiu a penetração e a precipitação de proteínas, assegurando ótima preservação da ultraestrutura. Após este período as amostras foram lavadas em solução tampão cacodilato por 5 vezes e pós-fixadas em solução tampão OsO₄ 4%, durante 1 h e, em seguida, novamente lavadas em solução tampão. A suspensão de células foi centrifugada a 1.500 rpm por 5 minutos, resuspensas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, cultivadas em placas de Petri de 2 cm², na densidade de 10⁶ células/mL, e mantidas na presença ou ausência de 105 nM de Amblyomin-X. O tratamento foi então realizado, por 24 h, em células RENCA ou fibroblastos normais NIH/3T3. As amostras foram transferidas para cestas permeáveis do aparelho de secagem (ponto crítico-Bal-Tec), e posteriormente desidratadas em banhos duplos de álcool: 30, 50, 70, 80, 95 e 100% de concentração. Várias trocas foram necessárias para assegurar remoção completa da água. A secagem das amostras foi realizada no aparelho de ponto crítico, usando gás carbônico e as placas receberam o recobrimento metálico com ouro por pulverização catódica (*sputtering*). Terminado o processamento o material foi observado e analisado no microscópio eletrônico de varredura Philips XL30.

3.17 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelos testes T e pela análise de variância (One-way ANOVA) seguida de teste TUKEY-KRAMER e de múltiplas comparações, quando necessário. Previamente, foi realizado o Teste de Bartlett para verificação de homogeneidade entre as variâncias. Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio padrão, considerando-se como valores significantes $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito citotóxico do Amblyomin-X em células RENCA

Para a análise da citotoxicidade do Amblyomin-X foram determinadas, pelo método colorimétrico de MTT, a viabilidade celular e a concentração inibitória 50% (IC50%). O Amblyomin-X foi avaliado nas diferentes concentrações de 1 a 25 ug/mL após 24 e 48 h de tratamento (Figuras 4 e 5).

A IC50% obtida pela equação da reta demonstrou que o Amblyomin-x exerceu citotoxicidade de maneira dose dependente e a atividade manteve-se até 48 h após o tratamento. A IC50% calculada teve média de 3,8 ug/mL (105 nM) com correlação positiva de r^2 de 0.89 a 0.90 para 24 h e 4.0 ug/mL com r^2 de 0.90 para 48 h.

As alterações citológicas observadas nas células RENCA após o tratamento de 24 e 48 h demonstraram descolamento das células, formação de agregados no sobrenadante e presença de células esféricas, com núcleo picnótico e condensado, característicos de células em apoptose (Figura 6).

Figura 4 - Viabilidade celular e IC50% *in vitro* após 24 h de tratamento com Amblyomin-X. (A): Gráfico de barras representando as médias e desvio padrão dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* em células RENCA pelo método colorimétrico MTT, após 24 h de tratamento com Amblyomin-X em diferentes concentrações. (B): Determinação da concentração IC50% pela interpolação da equação da reta e do coeficiente de correlação (B), tendo como valor médio de 3.8 ug/mL (105 nM) e r^2 de 0.89.

Figura 5 - **Viabilidade celular e IC50% *in vitro* após 48 h de tratamento com Amblyomin-X.** (A): Gráfico de barras representando as médias e desvio padrão dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* em células RENCA pelo método colorimétrico MTT, após 48 h de tratamento com Amblyomin-X em diferentes concentrações. (B): Determinação da concentração IC50% pela interpolação da equação da reta e do coeficiente de correlação (B), tendo como valor médio de 4.0 ug/mL (105 nM) e r^2 de 0.90.

Figura 6 - **Aspecto morfológico de células RENCA após 24 h de tratamento com Amblyomin-X.** Imagens obtidas em microscópio invertido do grupo sem tratamento - controle, (A e B) e do grupo tratado com 105 nM de Amblyomin-X (C e D): A e C aumento 100 x , B e D aumento 400 x. A e B- Células fusiformes fibroblastóides, núcleos claros evidentes, alguns binucleados (setas tracejadas), nucléolos. C e D- Células com núcleos picnóticos em degeneração e condensação nuclear (seta cheia), numerosas células arredondadas, formação de corpos apoptóticos refringentes (setas tracejadas).

4.2 Avaliação da integridade da membrana plasmática de células RENCA

Verificou-se que após 24 h de tratamento com 105 nM de Amblyomin-X houve significativo descolamento das células para o sobrenadante. As células foram então avaliadas quanto a sua integridade e viabilidade por citometria de fluxo. A porcentagem de células com comprometimento de membrana, do grupo não tratado, foi cerca de 15%, enquanto no grupo de células que recebeu o tratamento com Amblyomin-X a porcentagem de membranas comprometidas das células aderentes foi cerca de 18,5%, e das células despreendidas, presentes no sobrenadante, foi cerca de 14%. Conforme demonstrado na Figura 7, o Amblyomin-X, na concentração utilizada de 105 nM, não alterou significativamente a integridade da membrana plasmática destas células, após 24 h de tratamento.

Figura 7 - **Integridade da membrana plasmática de células RENCA após 24 h de tratamento com Amblyomin-X.** Porcentagem de células com membrana permeável ao fluorocromo iodeto de Propídeo, avaliada por citometria de fluxo, tratadas ou não, com Amblyomin-X, 105 nM por 24 h. Não houve diferenças significativas pelo Teste de Variância de ANOVA seguido pelo Teste Múltiplo Tukey.

4.3 Avaliação da integridade da membrana plasmática de fibroblastos normais NIH/3T3

A avaliação da integridade da membrana, através do PI, foi realizada de maneira análoga à formulada no item 4.2, em fibroblastos normais NIH/3T3, objetivando determinar a ação do Amblyomin-X em células normais. Não houve diferença estatística no percentual de viabilidade e integridade da membrana celular dos fibroblastos dos grupos controle e tratado com Amblyomin-X ($p=0,66$) (Figura 8).

Figura 8 - **Integridade da membrana plasmática de fibroblastos normais NIH/3T3 após 24 h de tratamento com Amblyomin-X.** Porcentagem de células com membrana permeável ao fluorocromo iodeto de Propídeo, avaliada por citometria de fluxo, tratadas ou não, com Amblyomin-X, 105 nM, por 24 h. Não houve diferença estatística significante.

4.4 Avaliação de morte celular de células RENCA após tratamento com Amblyomin-X

A determinação da quantidade de células mortas por apoptose ou necrose, após 24 h do tratamento com 105 nM de Amblyomin-X foi realizada por citometria de fluxo. Os dots plots das populações celulares no sobrenadante e aderentes foram adquiridas pelo programa *Cell-Quest*. As células coradas em verde (Anexina-V-FITC) foram consideradas apoptóticas e aquelas coradas em vermelho (PI), necróticas. Foram consideradas viáveis as células não marcadas.

O princípio da marcação Anexina V/PI é baseado na formação dos resíduos de fosfatidilserina que sofrem translocação do folheto interior para o exterior da membrana plasmática em células apoptóticas, tornando-se acessíveis à anexina V, uma proteína de ligação a fosfolípidos dependente de cálcio, que mantém a sua afinidade pela fosfatidilserina, quando conjugada ao fluorocromo FITC.

Observou-se aumento significativo ($p < 0.001$) de células apoptóticas, após tratamento com Amblyomin-X por 24 h em ambas populações celulares (aderentes e sobrenadante). Não houve diferença significativa na proporção de células necróticas quando comparados os grupos controle e tratado, Figura 9. As médias e desvio padrão dos grupos tratado e controle estão apresentados na Figura 10.

Figura 9 - **Avaliação da via de morte em células RENCA.** Histograma representativo do *Dot plot* obtido pelo programa Cell-Quest representativo das populações de células RENCA em necrose ou apoptose *** Diferenças Estatísticas Teste de Variância de ANOVA seguido pelo Teste Múltiplo Tukey.

Figura 10 - **Avaliação da via de morte em células RENCA.** Porcentagem de células apoptóticas (Anexina-V) e necróticas (PI), tratadas ou não (controle) por 24 h com 105 nM de Amblyomin-X, aderentes ou no sobrenadante, analisadas por citometria de fluxo (B). *** Diferenças Estatísticas Teste de Variância de ANOVA seguido pelo Teste Múltiplo Tukey.

4.5 Avaliação de morte celular de fibroblastos normais NIH/3T3 após tratamento com Amblyomin-X

A determinação da quantidade de células mortas por apoptose ou necrose, em fibroblastos normais NIH/3T3, após 24 h do tratamento com 105 nM de Amblyomin-X, foi realizada, por citometria de fluxo, de maneira análoga ao item 4.4.

Após 24 h de tratamento com Amblyomin-X na concentração de 105 nM, não foi observado a presença de células desprendidas no sobrenadante. As células coradas em verde (Anexina-V-FITC) foram consideradas apoptóticas e aquelas coradas em vermelho (PI), necróticas. Foram consideradas viáveis as células não marcadas. Não houve diferença significativa na proporção de células necróticas e apoptóticas entre os grupos controle e tratado, $p=0,79$. As médias e desvio padrão dos grupos tratado e controle estão apresentados na Figura 11.

Figura 11 - **Avaliação da via de morte em fibroblastos normais NIH/3T3.** Porcentagem de células apoptóticas (Anexina-V) e necróticas (PI), tratadas ou não (controle), por 24 h, com 105 nM de Amblyomin-X, analisadas por citometria de fluxo. Não houve diferença estatística entre os grupos $p=0,79$.

4.6 Expressão de ciclina D1 em células RENCA

As aquisições dos *dots plots* por citometria de fluxo após 24 h de tratamento das células RENCA com Amblyomin-X (105 nM) demonstraram redução significativa em cerca de 52% das células aderentes permeabilizadas na expressão da ciclina D1 em comparação ao grupo controle (Figura 12).

Figura 12 - **Expressão de ciclina D1 em células RENCA.** Porcentagem de expressão da ciclina D1 em células RENCA tratadas ou não (controle) com Amblyomin-X 105 nM, por 24 h, avaliadas por citometria de fluxo. *** Diferenças Estatísticas Teste de Variância de ANOVA.

4.7 Expressão de ciclina D1 em fibroblastos normais NIH/3T3

As aquisições dos *dots plots*, por citometria de fluxo, após 24 h de tratamento de fibroblastos normais NIH/3T3 com Amblyomin-X (105 nM) não demonstraram diferença significativa entre as células aderentes permeabilizadas na expressão da ciclina D1, em comparação ao grupo controle, $p=0,09$ (Figura 13).

Figura 13 - **Expressão de ciclina D1 em fibroblastos normais NIH/3T3.** Porcentagem de expressão da ciclina D1 em fibroblastos normais NIH/3T3 tratados ou não (controle) com Amblyomin-X 105 nM, por 24 h, avaliados por citometria de fluxo. Não se observou diferença significante entre os grupos $p=0,09$.

4.8 Expressão de caspase 3 fosforilada em células RENCA

A caspase 3 foi avaliada em RENCA após 24 h de tratamento com o Amblyomin-X (105 nM). Ocorreram diferenças altamente significativas, $p < 0.001$, nas células RENCA tratadas, quando comparadas com o controle. A proporção de ativação e fosforilação da caspase 3 pelo Amblyomin-X, em relação ao grupo controle foi cerca de 9 vezes maior (Figura 14).

Figura 14 - **Expressão de caspase 3 em células RENCA.** Porcentagem de expressão da caspase 3 fosforilada nas células aderentes tratadas ou não (controle) com Amblyomin-X, 105 nM, por 24 h e analisadas por citometria de fluxo. *** Diferenças Estatísticas Teste de Variância de ANOVA.

4.9 Expressão da caspase 3 fosforilada em fibroblastos normais NIH/3T3

A caspase 3 foi avaliada em fibroblastos normais NIH/3T3 após 24 h de tratamento com o Amblyomin-X (105 nM). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e tratado na expressão de caspase 3, $p=0,26$ (Figura 15).

Figura 15 - **Expressão de caspase 3 em fibroblastos normais NIH/3T3.** Porcentagem de expressão da caspase-3 fosforilada em fibroblastos normais NIH/3T3 tratados ou não (controle) com Amblyomin-X, 105 nM, por 24 h e analisadas por citometria de fluxo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos $p=0,26$.

4.10 Expressão de proteínas da família Bcl-2

4.10.1 Expressão de Bcl-2 em células RENCA

As células RENCA aderentes permeabilizadas, do grupo tratado com Amblyomin-X (105 nM), apresentaram redução altamente significativa na expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 em comparação ao grupo controle, após 24 h de tratamento (Figura 16).

Figura 16 - **Expressão de Bcl-2 em células RENCA.** Porcentagem de expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 em células RENCA tratadas ou não (controle) com 105 nM de Amblyomin-X, por 24 h, e analisadas por citometria de fluxo. *** Diferenças Estatísticas Teste de Variância de ANOVA.

4.10.2 Expressão de Bcl-2 em fibroblastos normais NIH/3T3

Os fibroblastos normais NIH/3T3 do grupo tratado com Amblyomin-X (105 nM) por 24 h, apresentaram uma diminuição na expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 em comparação ao grupo controle, entretanto a diferença não foi estatisticamente significativa com $p=0,0535$ (Figura 17).

Figura 17 - **Expressão de Bcl-2 em fibroblastos normais NIH/3T3.** Porcentagem de expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 em fibroblastos normais NIH/3T3 tratados ou não (controle) com 105 nM de Amblyomin-X, por 24 h, e analisadas por citometria de fluxo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos $p=0,0535$.

4.10.3 Expressão de Bad e Bax em células RENCA

Nas Figuras 18 e 19 estão demonstrados os efeitos exercidos pelo Amblyomin-X na expressão das proteínas pró-apoptóticas Bad e Bax em células RENCA, submetidas a 24 h de tratamento com 105 nM de Amblyomin-X. Houve aumento significativo na expressão de ambas proteínas.

Figura 18 - **Expressão de Bad em células RENCA.** Histograma representativo e porcentagem de expressão da proteína pró-apoptótica Bad em células RENCA tratadas ou não (controle), com 105 nM de Amblyomin-X, por 24 h, utilizando citometria de fluxo. *** Diferenças Estatísticas Teste de Variância de ANOVA ($p < 0.001$).

Figura 19 - **Expressão de Bax em células RENCA.** Porcentagem de expressão da proteína pró-apoptótica Bax em células tratadas ou não (controle), com 105 nM de Amblyomin-X, por 24 h, e avaliadas por citometria de fluxo. *** Diferenças Estatísticas Teste de Variância de ANOVA.

As proporções da expressão das proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) e pró-apoptóticas (Bad e Bax) e suas comparações entre os grupos controle e tratado estão resumidamente apresentadas na Figura 20.

Figura 20 - **Representação de proteínas pró e anti apoptóticas em células RENCA.** Porcentagem da expressão de Bcl-2, Bad e Bax, expressos após tratamento com 105 nM de Amblyomin-X, por 24 h, analisados por citometria de fluxo.

4.10.4 Expressão de Bad e Bax em fibroblastos normais NIH/3T3

A expressão das proteínas pró-apoptóticas Bad e Bcl-2 nos fibroblastos normais NIH/3T3, não demonstrou diferença significativa pelo teste de variância de ANOVA, após 24 h de tratamento com 105 nM de Amblyomin-X, comparado ao controle $p=0,4278$ (Figura 21).

Figura 21 - **Expressão de Bad e Bcl-2 em fibroblastos normais NIH/3T3.** Porcentagem de expressão de Bcl-2 e Bad em fibroblastos normais NIH/3T3 tratados ou não (controle), com 105 nM de Amblyomin-X por 24 h e avaliadas por citometria de fluxo. Não houve diferença estatisticamente significativa pelo teste de variância de ANOVA entre os grupos $p=0,4278$.

4.11 Expressão da glicoproteína P (P-gp) em células RENCA

O tratamento, com Amblyomin-X (105 nM), de células RENCA diminuiu significativamente a expressão da P-gp em comparação ao grupo controle. Deve-se salientar a existência de diferentes populações de células tumorais em diferentes fases do ciclo celular, que podem justificar os resultados encontrados (Figura 22).

Figura 22 - **Expressão de glicoproteína P (P-gp) em células RENCA.** Porcentagem de expressão da proteína de resistência a múltiplas drogas P-gp na superfície de células RENCA tratadas ou não (controle), por 24 h, com 105 nM de Amblyomin-X e analisadas por citometria de fluxo. ** Diferenças Estatísticas Teste de Variância de ANOVA ($P < 0,01$).

4.12 Análises do potencial da membrana mitoncondrial de células RENCA

A energia liberada durante as reações de oxidação na cadeia respiratória mitocondrial é armazenada como um gradiente eletroquímico que consiste de um potencial elétrico trans-membrana, envolvido em diversos processos de liberação e ativação de proteínas pró e anti-apoptóticas.

Após a aquisição da intensidade de fluorescência arbitrária, emitida pela sonda rodamina 123 os resultados foram analisadas pelo programa Win MID 2.8. Os resultados representativos dos histogramas dos grupos controle e tratado estão apresentados na Figura 23.

O Amblyomin-X foi capaz de reduzir significativamente o potencial mitocondrial nas células aderentes ou presentes no sobrenadante indicando a sua efetividade na geração e liberação de fatores pró-apoptóticos, possivelmente da via intrínseca mitocondrial (Figura 24).

Figura 23 - **Histogramas representativos da viabilidade mitocondrial.** Aquisição pelo sistema Cell-Quest em citômetro de fluxo BD e análise pelo programa WinMID 2.8 para a determinação do potencial elétrico mitocondrial. (A) Células RENCA do sobrenadante tratadas com Amblyomin-X, 105 nM, por 24h (B) Células RENCA aderentes tratadas com Amblyomin-X, 105 nM, após 24 h e (C) controle.

Figura 24 - **Viabilidade e integridade da membrana mitocondrial de células RENCA.** Avaliação por citometria de fluxo do potencial elétrico mitocondrial de células RENCA aderentes e contidas no sobrenadante, após 24 h de tratamento com 105 nM de Amblyomin-X, utilizando-se a sonda fluorescente rodamina 123. *** Diferenças Estatísticas Teste de Variância de ANOVA seguido pelo Teste Múltiplo de Tukey.

4.13 Análises do potencial da membrana mitocondrial de fibroblastos normais NIH/3T3

O Amblyomin-X não influenciou no potencial da membrana mitocondrial dos fibroblastos normais NIH/3T3, com valor de $p=0,68$ nos grupos de membrana mitocondrial ativa e $p=0,66$ nos grupos de membrana mitocondrial inativa com $p=0,68$ (Figura 25).

Figura 25 - **Viabilidade e integridade da membrana mitocondrial de fibroblastos normais NIH/3T3.** Avaliação por citometria de fluxo do potencial elétrico mitocondrial de fibroblastos normais NIH/3T3, após 24 h de tratamento com 105 nM de Amblyomin-X, utilizando-se a sonda fluorescente rodamina 123. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de membrana ativa, controle e tratados $p= 0,66$ assim como no grupo de membrana inativa com $p= 0,68$.

4.14 Análises das fases do ciclo celular de células RENCA

Foram realizadas análises das diferentes fases do ciclo celular das células RENCA, após 24 h de tratamento com 105 nM de Amblyomin-X e o conteúdo de DNA/célula foi avaliado por citometria de fluxo. Os resultados mostraram acúmulo na fase G0/G1 no grupo tratado, com diferença significativa em relação ao grupo controle ($p=0,03$), repercutindo na modulação da capacidade de proliferação e aumento na proporção de células com DNA fragmentado, nas células tratadas ($p=0,0036$). Houve diminuição da população celular em G2/M no grupo tratado com valor de $p=0,0018$.

O aumento da fragmentação, em média de 2,5 vezes, foi correlacionado a modificação macroscópica das culturas com formação de células arredondadas e corpos apoptóticos, com as vias de sinalização Bcl-2 e oligomerização do complexo de proteínas mitocondriais Bad e Bax. As correlações estatísticas estão apresentadas na Figura 26, e mostraram claramente as modificações nas proporções de células com potencial proliferativo inversamente proporcional ao DNA fragmentado. As diferentes proporções entre G0/G1 – DNA fragmentado e as células com capacidade proliferativa estão apresentadas na Figura 27.

Figura 26 - **Distribuição das fases do ciclo celular de células RENCA.** Média e desvio padrão dos grupos controle e tratado com Amblyomin-X, 105 nM por 24 h: DNA fragmentado; quiescente, G0/G1; fase S, síntese e proliferativa G2/M. **Diferenças Estatísticas Teste de Variância de ANOVA seguido pelo Teste Múltiplo de Tukey.

Figura 27 - **Esquema representativo das proporções de células nas diferentes fases do ciclo celular de células RENCA.** (A): Controle e (B): Tratado com Amblyomin-X, 105 nM por 24 h. Nota-se o aumento significativo do DNA fragmentado e a presença de células quiescentes (G0/G1) nas células tratadas.

4.15 Análises das fases do ciclo celular de fibroblastos normais NIH/3T3

Foram realizadas análises das diferentes fases do ciclo celular dos fibroblastos normais NIH/3T3, após 24 h de tratamento com 105 nM de Amblyomin-X e o conteúdo de DNA/célula foi avaliado por citometria de fluxo. Os resultados mostraram diferença estatisticamente significativa apenas nos grupos em G0/G1 com valor de $p=0,046$. A proporção de DNA fragmentado, células em fases S e G2/M não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 28).

Figura 28 - **Distribuição das fases do ciclo celular de fibroblastos normais NIH/3T3.** Média e desvio padrão dos grupos controle e tratado com Amblyomin-X, 105 nM por 24 h: DNA fragmentado; quiescente, G0/G1; fase S, síntese e proliferativa G2/M. Diferença estatisticamente significativa apenas nos grupos da fase G0/G1, $p=0,046$.

4.16 Expressão do marcador Ki-67 em células RENCA

A expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 foi avaliada por citometria de fluxo em células RENCA tratadas com Amblyomin-X 105 nM por 24 h e no grupo controle. O Amblyomin-X diminuiu em mais de 4 vezes a expressão do Ki-67 no grupo tratado, com significância estatística, $p=0,0081$ (Figura 29).

Figura 29 - **Expressão de Ki-67 em células RENCA.** Porcentagem de expressão de Ki-67 em células RENCA tratadas ou não (controle), por 24 h, com 105 nM de Amblyomin-X e analisadas por citometria de fluxo. ** Diferenças Estatísticas Teste de Variância de ANOVA, $P<0,01$).

4.17 Expressão do marcador Ki-67 em fibroblastos normais NIH/3T3

A expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 foi avaliada por citometria de fluxo em fibroblastos normais tratados com Amblyomin-X 105 nM por 24 h e no grupo controle. O Amblyomin-X não influenciou na expressão de Ki-67 nos grupos avaliados com valor de $p=0,39$ (Figura 30).

Figura 30 - **Expressão de Ki-67 em fibroblastos normais NIH/3T3.** Porcentagem de expressão de Ki-67 em fibroblastos normais NIH/3T3 tratados ou não (controle) por 24 h, com 105 nM de Amblyomin-X e analisadas por citometria de fluxo. Não houve diferença estatística entre os grupos. $p=0,39$.

4.18 Expressão da proteína p53 em células RENCA

A expressão de p53 foi avaliada por citometria de fluxo em células RENCA tratadas com Amblyomin-X 105 nM por 24 h e no grupo controle. O Amblyomin-X não modificou a expressão de p53 nos grupos avaliados. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e controle, $p=0,48$ (Figura 31).

Figura 31 - **Expressão de p53 em células RENCA.** Porcentagem de expressão de p53 em células RENCA tratadas ou não (controle), por 24 h, com 105 nM de Amblyomin-X e analisadas por citometria de fluxo. Não houve diferença estatística entre os grupos ($P=0,48$).

4.19 Expressão da proteína p53 em fibroblastos normais NIH/3T3

A expressão de p53 foi avaliada por citometria de fluxo em fibroblastos normais NIH/3T3 tratados com Amblyomin-X, 105 nM por 24 h, e no grupo controle. O Amblyomin-X não modificou a expressão de p53 nos grupos avaliados. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e controle com valor de $p=0,53$ (Figura 32).

Figura 32 - **Expressão de p53 em fibroblastos normais NIH/3T3.** Porcentagem de expressão de p53 em fibroblastos normais NIH/3T3 tratados ou não (controle), por 24 h com 105 nM de Amblyomin-X e analisadas por citometria de fluxo. Não houve diferença estatística entre os grupos ($P=0,53$).

4.20 Expressão do citocromo c em células RENCA

A avaliação da liberação do citocromo c para o citosol foi realizada por citometria de fluxo em células RENCA tratadas com Amblyomin-X, 105 nM por 24 h, ou não (grupo controle). O Amblyomin-X aumentou sensivelmente a expressão do citocromo c no citosol nas células tratadas, com significância estatística pelo teste de variância de ANOVA com valor de $p=0,0059$ (Figura 33).

Figura 33 - **Expressão do citocromo c em células RENCA.** Porcentagem de expressão do citocromo c no citosol de células RENCA tratadas ou não (controle), por 24 h, com 105 nM de Amblyomin-X e analisadas por citometria de fluxo. ** Diferenças Estatísticas Teste de Variância de ANOVA ($P<0,01$).

4.21 Expressão do citocromo c em fibroblastos normais NIH/3T3

A avaliação da liberação do citocromo c para o citosol foi realizada por citometria de fluxo em fibroblastos normais NIH/3T3 tratados com Amblyomin-X 105 nM por 24 h ou não (grupo controle). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, $p=0,0558$ (Figura 34).

Figura 34 - **Expressão do citocromo c em fibroblastos normais NIH/3T3**

Porcentagem de expressão do citocromo c no citosol de fibroblastos NIH/3T3 tratados ou não (controle), por 24 h, com 105 nM de Amblyomin-X e analisadas por citometria de fluxo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados.

4.22 Expressão do receptor VEGFR-1 em células RENCA

A avaliação dos níveis do receptor R1 do VEGF foi realizada por citometria de fluxo em células RENCA tratadas ou não (controle) com Amblyomin-X 105 nM por 24 h. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do VEGFR-1 entre os grupos, com valor de $p=0,3422$ (Figura 35).

Figura 35 - **Expressão de VEGFR-1 em células RENCA.** Porcentagem de expressão de VEGFR-1 em células RENCA tratadas ou não (controle), por 24 h, com 105 nM de Amblyomin-X e analisadas por citometria de fluxo. Não houve diferença estatística entre os grupos ($P=0,3422$).

4.23 Efeitos do Amblyomin-X sobre a atividade do proteassoma em células RENCA

Os resultados obtidos em experimento preliminar mostram que houve uma significativa inibição da atividade proteassômica, especialmente do tipo quimiotripsina (Figura 36). Em contrapartida, a atividade tipo tripsina apresentou apenas uma ligeira diminuição (Figura 37).

Figura 36 - **Atividade catalítica proteassômica do tipo quimiotripsina.** Após 4 e 16 h do tratamento com Amblyomin-X, 105 nM, de células RENCA.

Figura 37 - **Atividade catalítica proteassômica do tipo tripsina.** Após 4 e 16 h do tratamento com Amblyomin-X, 105 nM, de células RENCA.

4.24 Resultados obtidos pela MEV

Após atingirem confluência, as células RENCA e os fibroblastos normais NIH/3T3 foram coletados seguindo-se o procedimento de tripsinização descrito no item **3.16** de Materiais e Métodos. A suspensão de células foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos e ressuspensa em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e cultivadas em placas de Petri de 2 cm², na densidade de 10⁵ células/mL e mantidas na presença ou ausência de 105 nM de Amblyomin-X. O tratamento foi realizado por 24 h e as células RENCA ou fibroblastos normais NIH/3T3 foram processados para análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Nas eletromicrografias representativas das células RENCA do grupo não tratado (controle), observa-se a formação de uma estrutura celular central condensada que se expande em longas estruturas ramificadas provenientes das interconexões e expansões de seu citoplasma e citoesqueleto (Figura 42). O grupo de células RENCA tratadas com Amblyomin-X apresentou mudanças morfológicas marcantes correspondentes a células em processo de apoptose, com formação de corpos apoptóticos, redução das microvilosidades, perda de adesão à matriz e formação de *blebbing* na membrana. Não há organização da matriz extracelular (MEC), e existem modificações morfológicas de grande magnitude, tal qual a formação de células arredondadas, desprendidas e debris celulares (Figura 41).

Os fibroblastos normais NIH/3T3, do grupo controle apresentaram-se como células fusiformes de aspecto fibroblastóides, firmemente aderidas à superfície de contato da placa de cultura. Observa-se a formação de uma rede tridimensional, composta por fibras e fibrilas de alta densidade, que se conectam entre as superfícies externas das células e as projeções citoplasmáticas e as células adjacentes. Não foram encontradas células com modificações, como arredondamento ou debris celulares. Sua matriz extracelular é organizada, dispondo-se e justapondo-se entre as células firmemente aderidas e recém proliferadas (Figuras 38 A; 39 A e 40 A).

Os fibroblastos normais NIH/3T3, do grupo tratado com Amblyomin-X, 105 nM por 24 h, apresentaram-se como células fusiformes de aspecto fibroblastóides, aderidas à superfície de contato na placa de cultura, sem modificações morfológicas, para este tipo celular, como arredondamento, a presença de debris celulares ou células desprendidas no sobrenadante. Observa-se a formação de uma rede tridimensional organizada, composta por fibras e fibrilas de alta densidade, que se conectam entre as superfícies externas das células e as projeções citoplasmáticas e as células adjacentes. Sua MEC é organizada (Figuras 38 B; 39 B e 40 B). O tratamento com Amblyomin-X não mostrou citotoxicidade em fibroblastos normais NIH/3T3. As análises mostram claramente a presença de células em divisão celular.

Figura 38 - **Eletromicrografia de fibroblastos normais NIH/3T3 em MEV.** (A): Fibroblastos do grupo controle, células de aspecto fusiforme tipo fibroblastóide (B): tratados com Amblyomin-X, 105 nM após 24 h. Observa-se células de aspecto fibroblastóide, fortemente aderidas à superfície, sem sinais de injúria celular (200 μm).

Figura 39 - **Eletromicrografia de fibroblastos normais NIH/3T3 em MEV.** (A): Fibroblastos do grupo controle, células de aspecto fusiforme. Em detalhe, célula em divisão celular (Seta) (B): Após 24 h de tratamento com Amblyomin-X (105 nM). Observa-se células de aspecto fibroblastoide, aderidas à superfície. Em detalhe, organização da MEC (10 µm).

Figura 40 - **Eletromicrografia de fibroblastos normais NIH/3T3 em MEV.** (A): Fibroblastos do grupo controle, células de aspecto fusiforme. Em detalhe, organização da MEC e disposição fibrilar do colágeno (10 μm) (B): Após 24 h de tratamento com Amblyomin-X, 105 nM. Em detalhe, organização da MEC com formação de rede tridimensional (3 μm).

Figura 41 - **Eletromicrografia de células RENCA em MEV, tratadas com Amblyomin-X (105 nM) por 24 h.** (A): Detalhe da dissociação e desorganização da MEC. (B): Desprendimento das células com perda das conexões e junções intercelulares. (C): Formação do corpo apoptótico e *blebbing*. (D): Corpo apoptótico e ruptura da membrana celular.

Figura 42 - **Eletromicrografia de células RENCA em MEV, não tratadas (controle).** (A): Célula RENCA, sem sinais de injúria celular, sintetizando a matriz extra celular (seta curta) e a formação de elementos fibrilares (seta longa). (B): Detalhe da organização da MEC. (C): Conexões juncional entre células RENCA. (D): Organização tridimensional da MEC.

5 DISCUSSÃO

O CCRm é uma condição clínica de extrema gravidade, para a qual, mesmo com o avanço obtido nos últimos 6 anos, com as terapias alvo moleculares, persistem inúmeras incertezas que demandam respostas.

É necessário definir marcadores específicos que possam orientar o tratamento e estabelecer fatores de risco prognóstico com maior acurácia. A pesquisa clínica deverá fornecer dados que determinem as drogas mais apropriadas, a melhor sequência terapêutica e as possíveis combinações de fármacos, e desta forma, oferecer alternativas de tratamento mais específicos e eficazes. A pesquisa básica, por sua vez, deverá, entre outros, elucidar os mecanismos de resistência adquirida com o tratamento, avaliar novos alvos terapêuticos, compreender as vias moleculares envolvidas na carcinogênese, mecanismos de metastatização e definir biomarcadores úteis.

A linhagem celular RENCA utilizada neste estudo, é derivada de um tumor que desenvolveu-se espontaneamente em camundongos BALB/c e apresenta histopatologia de carcinoma de células renais convencional (células claras) da cortical renal. A utilização de células RENCA foi escolhida por ser uma linhagem padronizada, que pode ser adquirida em bancos de tumores ao redor do mundo, e cujo cultivo é bem estabelecido. As células RENCA podem ser transplantadas para uma variedade de sítios anatômicos, dependendo do tipo de abordagem que o estudo pretenda analisar. As vias de inoculação subcutânea, intradérmica, intraperitoneal, endovenosa caldal e intrarrenal são amplamente empregadas para a inoculação das células. Em geral, a velocidade de crescimento dos tumores primários resultantes são similares, com exceção do tumor intra peritoneal que apresenta um desenvolvimento mais rápido em relação aos demais, entretanto, a metastatização segue padrões distintos. O modelo *in vivo* que melhor mimetiza a disseminação tumoral humana, e parece o ideal para avaliação do tratamento de CCRm, é o ortotópico, no espaço sub-capsular renal (222). O que parece fundamental é o fato de obedecer um padrão de crescimento que segue minuciosamente aquele do CCR humano do adulto, particularmente no que diz respeito a metastatização espontânea para os parênquimas dos pulmões e fígado (219). Essas características, tem feito com que a RENCA seja largamente utilizada,

parecendo ser a linhagem preferencial em ciência básica experimental, *in vitro* e *in vivo*, que estudam carcinoma de células renais (223).

O objetivo de utilizar o Amblyomin-X no tratamento de CCR originou-se do fato deste tumor guardar semelhanças com o melanoma maligno em relação a imunogenicidade, agressividade e resposta à terapêutica baseada nos mesmos agentes. O grupo de Chudzinski-Tavassi (195) demonstrou que o Amblyomin-X apresentou atividade citotóxica, *in vitro*, nas linhagens de células tumorais SK-Mel-28 (melanoma maligno) e Mia-PaCa (adenocarcinoma de pâncreas) e *in vivo* em camundongos portadores do melanoma B16F10. O grupo conseguiu ainda identificar um dos alvos do Amblyomin-X, observando que as atividades, tipo tripsina e tipo quimiotripsina do proteassoma diminuíram, enquanto o pool de proteínas poli-ubiquitinadas elevou-se significativamente. O mesmo ensaio realizado com extrato de fibroblastos não demonstrou inibição proteassomal (195). Os autores concluíram que o Amblyomin-X tem o proteassoma como um de seus alvos celulares. Assim sendo, observando-se que o Amblyomin-X apresentou atividade significativa contra melanoma maligno, pesquisamos sua atividade em CCR.

Os dados do presente estudo demonstraram que o Amblyomin-X, assim como no melanoma, inibiu o proteassoma em células RENCA de CCR, com a distinção de atuar principalmente por diminuição de atividade tipo quimiotripsina. Os mecanismos para tal inibição ainda não foram completamente elucidados.

O proteassoma 26S é parte do sistema ubiquitina-proteassoma de degradação de proteínas. Após a poliubiquitinação, proteínas indesejáveis são degradadas, por proteólise, pelo proteassoma 26S, que é composto pelo proteassoma 20S (núcleo), 19S (regulador) e 11S (unidade ativa). O proteassoma 26S desempenha fundamental papel fisiológico na progressão do ciclo celular, angiogênese e motilidade celular, regulando o nível de diversas proteínas alvo incluindo HIF, p53, I- κ B, topoisomerases, BID, Bad, Ciclina A, B, D e E, c-myc e outras (224).

Estudos com o inibidor de proteassoma Bortezomib em carcinoma de cólon, pulmão e mieloma múltiplo, indicaram que a inibição da atividade proteassômica é associada ao aumento da apoptose devida à inibição do NF- κ B. Há indícios que a inibição do proteassoma pelo Bortezomib induz à apoptose pelo mecanismo dependente de p53. A eficácia clínica do Bortezomib, em monoterapia, no tratamento clínico do CCRm é, entretanto, limitada (224).

Estudo fase II do MSKCC, coordenado por Motzer et al. (225) com o inibidor de proteassoma Bortezomib concluiu que o mesmo apresenta efeito antitumoral em uma parcela de pacientes com CCRm. Segundo os autores, pelo pequeno número de pacientes beneficiados, não se justificaria seu uso rotineiro nesta situação clínica, entretanto, o mesmo grupo conduz atualmente, estudos fase I e fase II que encontram-se em fase de recrutamento, propondo a associação de Bortezomib e Bevacizumab (anticorpo monoclonal anti-VEGF) para o CCRm (226), cujos resultados são aguardados com expectativa positiva.

Embora os diferentes tipos de neoplasias malignas exibam características muito heterogêneas, esses tumores apresentam em comum, a propriedade de crescer além dos limites impostos às células normais. Para que ocorra a expansão clonal de uma célula transformada, deve haver um descontrole da sua capacidade proliferativa e a perda da capacidade, destas células anômalas, evoluírem para apoptose. Portanto, apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências demonstram que a resistência à apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos (227). De fato, a análise do processo de evolução tumoral revela que a capacidade de resistir à morte pode ser adquirida por diferentes mecanismos e acontecer em vários momentos do desenvolvimento tumoral, entre estes, a resistência à morte por apoptose em células que escaparam ao controle do crescimento e da diferenciação normais, exercidos por fatores solúveis ou por contatos célula-célula ou célula-matriz extracelular, até aquela induzida por lesões no DNA, por hipóxia ou por espécies reativas do oxigênio (228). A apoptose, na prática clínica, é alvo para um potencial uso terapêutico da morte celular programada ou para a compreensão dos mecanismos de resistência à terapêutica antineoplásica (208,229). A elucidação de alguns dos mecanismos moleculares da apoptose abriram perspectivas de modulação desses processos.

Os resultados, em conjunto, do presente estudo demonstraram que o Amblyomin-X tem a capacidade de induzir a morte celular em RENCA, pela via apoptótica.

A atividade citotóxica do Amblyomin-X foi avaliada pela porcentagem de viabilidade celular das células RENCA ao composto, determinado-se, desta forma a IC50%. O Amblyomin-X mostrou-se citotóxico em células RENCA exibindo uma IC50% de 105 nM, demonstrando a eficácia da proteína estudada em concentrações extremamente baixas.

A utilização de sondas fluorescentes vem ganhando importância por sua característica de marcar estruturas específicas das células, detectar integridade estrutural, além de possibilitar a avaliação de vários compartimentos celulares em conjunto. O uso do iodeto de Propídeo (PI) permite avaliar a integridade da membrana plasmática devido às suas características moleculares, e de maneira a avaliar o transporte e difusão pela membrana celular intacta. O fluorocromo PI somente penetra através de células que contenham membrana plasmática lesada, tendo afinidade pelo DNA e corando o núcleo da célula em vermelho, assim sendo, através desta metodologia, podemos distinguir células que sofreram necrose ou apoptose. Em relação a porcentagem de células RENCA em apoptose, observou-se aumento significativo ($p < 0.001$), após 24 h de tratamento, nas populações de células aderentes e presentes no sobrenadante. Não houve diferença significativa na proporção de células em necrose em comparação aos grupos controle e tratado, como também nas populações de células presentes no sobrenadante e aderentes.

As células tumorais e normais se dividem mais rapidamente quando os volumes teciduais ou tumorais são menores. Sua fração proliferativa diminui à proporção que o volume celular cresce, aumentando seu tempo de duplicação. Assim, um tumor apresenta tempos diferentes de duplicação em momentos diferentes de seu crescimento ou estágio (227). O tratamento das células RENCA com o Amblyomin-X evidenciou um efeito inibitório na capacidade de proliferação e um aumento na proporção de células com DNA fragmentado, características correlacionadas com a via de sinalização Bcl-2 e a oligomerização do complexo de proteínas mitocondriais Bad e Bax, sugerindo morte celular por apoptose. Observou-se também um aumento na proporção da ativação e fosforilação da caspase 3 nas células RENCA, tratadas por 24 h, com Amblyomin-X.

Houve aumento na proporção de células na fase G0/G1 do ciclo celular, ou seja, a fase do controle da proliferação celular (sobretudo G1) e células quiescentes, em repouso ou de crescimento celular reversível (G0). A saída do ciclo celular para o estado G0 é um processo ativo que envolve a expressão e atividade de produtos de genes de parada de crescimento (230). Este processo é reversível, e quando a célula é estimulada a entrar no ciclo celular, ocorre uma regulação negativa dos genes de parada de crescimento (231). Em células tumorais há uma independência de estímulos externos de crescimento, e estas podem entrar novamente no ciclo celular, independente da presença de estímulos externos positivos ou negativos

(232). Desta forma, a proliferação celular é um processo regulado por fatores promotores de crescimento celular e supressores de crescimento, estes últimos relacionados a manutenção da célula em estado quiescente (233). O Amblyomin-X demonstrou modulação antiproliferativa deste equilíbrio induzindo a manutenção das células em estado quiescente. É oportuno salientar que parte das células em G0 podem estar em estado de senescência. A senescência é um processo de morte celular não apoptótica que ocorre quando, após um período de proliferação, os telômeros encurtam até um limite mínimo, após o qual a célula não mais se divide (morte em vida); se houver estímulo para tal, ocorre um processo de crise e morte celular por mitose catastrófica (227). É possível que o Amblyomin-X exerça um papel na indução da morte celular por senescência, estratégia a ser explorada em terapêutica antineoplásica.

A associação da hiper-expressão de Bcl-2 e câncer é bem estabelecida; em modelo de linfoma, o gene Bcl-2 foi translocado tornando-se ativo e levando a sobrevivência das células tumorais, assim como induziu linfomagenese MYC dependente *in vivo* (neste caso a função proliferativa de MYC estava inalterada indicando que Bcl-2 pode inibir a apoptose induzida por MYC). Bcl-2 pode bloquear a perda de nucleotídeos terminais dos telômeros elevando a taxa de proliferação celular (234,235). Itoi et al. (236) observaram que Bcl-2 está expresso em cerca de 71,3% de produtos de nefrectomia por CCR não metastático e estaria mais associado a tumores iniciais (pT1 e pT2) e graus I ou II. Inesperadamente, a expressão de Bcl-2 foi correlacionada com maior índice apoptótico e menor índice proliferativo, em CCR não metastático. Em uma análise multivariada, a expressão de Bcl-2 poderia ser fator independente de risco prognóstico, associada a maior sobrevida. Em estudo posterior, realizado por Maruyama et al. (237), foram avaliados pacientes com CCRm. Observou-se que aqueles tumores com elevada expressão de Bcl-2 não responderam à imunoterapia e apresentaram prognóstico reservado, enquanto os Bcl-2 negativos, não só apresentaram resposta à imunoterapia, com o também um melhor prognóstico e maior sobrevida específica, com impacto prognóstico.

Diversos estudos, clínicos e pré-clínicos, com drogas que têm por alvo membros da família Bcl-2 estão em andamento (238-240). A redução da atividade do Bcl-2 e Bcl-XL é suficiente para induzir a célula à apoptose. O *Oblimersen* (G3139, *Genasense*, *Genta*, *Berkeley Heights*, NJ) é um oligonucleotídeo anti-Bcl-2 que está

sendo testado em estudos clínicos de fase III, tendo demonstrado alguns resultados positivos (238,241). Outro agente promissor é o ABT737, uma pequena molécula que inibe as proteínas Bcl-2, Bcl-XL e Bcl-w. Em estudo pré-clínico, utilizando um modelo xenográfico, o ABT737 levou à completa regressão de tumor de pulmão de pequenas células (239).

Os dados obtidos no presente estudo, demonstraram diminuição estatisticamente significativa, da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e aumento das proteínas pró-apoptóticas Bad e Bax. O mecanismo pelo qual o Amblyomin-X modulou a atividade destas proteínas não está claro, mas esta atividade é suficiente para induzir morte celular apoptótica (238,239). A avaliação da expressão gênica de Bcl-2, B-XL, Bad e Bax pela técnica de PCR em tempo real poderia contribuir para elucidação do mecanismo regulatório do Amblyomin-X sobre estas proteínas.

As ciclinas são importantes mediadores da atividade das quinases ciclina-dependente (Cdks) e seus níveis são variáveis durante as fases do ciclo celular. A ciclina D1 é uma das proteínas envolvidas na transição celular da fase do ciclo de G1, para a fase de síntese, tanto em células normais como em células neoplásicas, sendo um indicador da resposta proliferativa. No CCR, é conhecido o envolvimento da via PI3K-AKT-mTOR na proliferação tumoral mediada por ciclina D1 (138), e o uso de inibidores de mTOR é definido como tratamento do CCRm, demonstrando diminuição de proliferação celular e angiogênese (14,156,164). Houve significativa diminuição da expressão de ciclina D1 nas células RENCA tratadas com Amblyomin-X sugerindo que possa existir uma modulação da via do PI3K-AKT-mTOR pela proteína estudada. A exploração desta via e seus reguladores poderá precisar o nível de atuação do Amblyomin-X, e está sendo realizada em estudos paralelos do grupo. É importante salientar que o Amblyomin-X exerce inibição do proteassoma, o que pode diretamente interferir na expressão de ciclina D1 (224).

A expressão da proteína Ki-67 no ser humano, é estritamente associada a proliferação celular. Durante a interfase, o antígeno pode ser detectado exclusivamente dentro do núcleo, enquanto na mitose, a maioria da proteína é transferida para a superfície dos cromossomos. A proteína Ki-67 está presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2, e mitose), mas está ausente em repouso células G0 devido a processos de fosforilação (64). Torna-se portanto, um excelente marcador para a determinação da fração de crescimento de

uma população de determinada célula. O anticorpo monoclonal Ki-67 é uma proteína nuclear, de 345-395 KDa, sendo largamente empregada como marcador de proliferação. Para avaliar a atividade antiproliferativa do Amblyomin-X, pesquisamos a expressão de Ki-67, que além de ser um clássico marcador de proliferação celular, também está relacionado como marcador prognóstico em CCR. A maior expressão de Ki-67 está associada a um pior prognóstico em CCRcc, e demonstra ser um marcador independente para sobrevida livre de doença em CCRcc localizado (55). Nossos resultados demonstram uma expressiva redução, cerca de 4 vezes, na expressão de Ki-67 em células RENCA tratadas com Amblyomin-X, corroborando com dados que demonstram efeito antiproliferativo da proteína em questão. Nos fibroblastos normais NIH/3T3, o Amblyomin-X não exerceu efeito antiproliferativo impactado por Ki-67, resultado desejável no contexto de terapia antineoplásica e sugerindo seletividade câncer específica.

A estratégia atual de combate ao CCRm está baseada em terapia alvo molecular, fundamentalmente antiangiogênica. O CCR é um tumor altamente vascularizado, razão pela qual desencadeou-se uma série de estudos que contemplavam o micro ambiente tumoral. Como resultado destes estudos, o paradigma do tratamento do CCRm foi modificado com a utilização de drogas antiangiogênicas e os inibidores de múltiplas quinases na chamada terapia alvo molecular. O Amblyomin-X demonstrou indícios de atividade antiangiogênica. Estudos iniciais em colaboração entre o grupo da Dra. Ana Marisa Chudzinski-Tavassi do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan e da Dra. Sandra Farsky, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, tem demonstrado que a aplicação tópica de Amblyomin-X, em modelo de câmara dorsal (microscopia intra-vital) reduziu a rede microcirculatória inibindo a angiogênese *in vivo* na vigência ou ausência de células tumorais de melanoma (B16-F10) (242).

O VEGF é um dímero protéico, formado pela interação de duas proteínas, com ação autócrina e parácrina, que ativa receptores transmembranares expressos, principalmente, em células endoteliais. Esta proteína se caracteriza como um dos membros da superfamília de fatores de crescimento que possuem um nó de cistina (*cystine knot growth superfamily of signaling proteins*), formado por oito resíduos de cisteínas ligados por pontes dissulfeto. Em humanos, foram identificados seis membros desta família: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e PlGF (*Placental Growth Factor*), tendo VEGF-A um papel mais ativo no processo

angiogênico (106-107-110). Cada um dos fatores pode ativar um ou mais dos receptores, VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3, além do domínio extracelular do VEGFR-1 (*Flt-1 like, tyrosine-kinase receptor-1*), o qual é expresso como uma proteína solúvel (110). O VEGFR-1 localiza-se na superfície de células hematopoiéticas do tecido, macrófagos e monócitos, bem como endotélio vascular, já o VEGFR-2 (*KDR, kinase domain receptor; Flk-1*) por sua vez, é encontrado em ambos os endotélis vascular e linfático, enquanto o VEGFR-3 se localiza, predominantemente, no endotélio linfático (111,112). Os VEGFRs têm alta identidade entre si, principalmente nos domínios extracelular e quinase, e são intimamente relacionados com a família de receptores dos fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFR), incluindo o receptor 1 do fator estimulador de colônias (CSF-1 ou c-Fms), receptores de células estaminais (SCF, c-Kit), e a classe 3 de receptores tirosina-quinases (Flt3). Pesquisamos a expressão de VEGFR-1 em células RENCA, tratadas ou não, com Amblyomin-X. Escolhemos VEGFR-1 por tratar-se, segundo Klatte (55), do único marcador de angiogênese relacionado com prognóstico em CCR. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de VEGFR-1, nas células RENCA tratadas com Amblyomin-X. É possível que ocorra modulação de VEGF, ou outras quinases associadas à angiogênese, ou outros receptores de fatores de crescimento.

Os genes supressores tumorais desempenham papel na regulação do ciclo celular e na progressão tumoral. O p53, “guardião do genoma”, localizado no locus 17p13, codifica uma proteína de 53 KDa e 393 aminoácidos, que se acumula na célula quando o gene sofre mutação, em razão da estabilização (217,218). A proteína p53 selvagem tem um efeito inibitório na proliferação e transformação celular, e este efeito parece ser devido a habilidade de manter as células na fase G1 do ciclo celular. Adicionalmente à sua função na regulação celular, o p53 tem sido implicado na síntese e reparo do DNA, manutenção da estabilidade genômica, diferenciação celular e apoptose. O Amblyomin-X não demonstrou alterar a expressão de p53, indicando que a indução de apoptose exercida é independente da via de p53. O “guardião do genoma”, p53, é um dos principais reguladores do processo de apoptose e encontra-se inativado em cerca de 50% dos tumores malignos humanos (243) sendo considerado marcador prognóstico de diferentes linhagens tumorais. No CCR entretanto, a expressão do p53 está raramente alterada (244), sugerindo que os alvos da terapêutica deste tumor devam ser independentes

do status de p53. Carecem informações que demonstrem a interferência da proteína reguladora de p53, Mdm-2, que poderia ser responsável por uma atividade diminuída de p53, mesmo no fenótipo selvagem, em CCR.

O citocromo c, possui aproximadamente 13 kDa e 105 aminoácidos, é um componente da cadeia respiratória. Somando-se ao papel do citocromo c na fosforilação oxidativa, a sua liberação para o espaço mitocondrial intermembrana e para o citosol resulta em apoptose nuclear. O citocromo c está ligado à membrana interna da mitocôndria, intimamente relacionada com o processo de apoptose. Há evidências que durante a apoptose, é formado um “megaporo” que abrange as membranas interna e externa da mitocôndria liberando o citocromo c para o citosol (245). Quando no citosol, o citocromo c forma um complexo com a APAF-1 e a caspase-9, levando a clivagem da pró-caspase-9 e liberando a caspase-9 ativa que, por sua vez, ativa a caspase-3 (246), iniciando o processo de apoptose (204,247,248). A significativa expressão de citocromo c no citosol das células RENCA tratadas com Amblyomin-X corrobora com os demais dados obtidos, indicando que a morte celular por apoptose foi induzida pela proteína estudada.

A resolução do microscópio eletrônico de varredura (Scanning Electron Microscope) é de 10 nanômetros, constituindo-se em uma ferramenta bastante importante em diversos estudos que incluem desde estudo de organismos inteiros, tecidos e órgãos, até em certos casos, visualização *in situ* de organelas sub-celulares. A MEV usa elétrons que se dispersam ou são emitidos a partir da superfície da amostra. O feixe de elétrons é localizado dentro de uma pequena sonda que passa rapidamente para frente e para trás sobre a amostra. O rastreamento completo, de cima abaixo, geralmente leva apenas alguns segundos. As diferenças na superfície da amostra afetam o padrão com o qual os elétrons são dispersos a partir deste. Buracos ou fissuras aparecem escuros, as protuberâncias e saliências aparecem claras, resultando em uma imagem tridimensional. A grande vantagem deste instrumento é a elevada profundidade de campo, da ordem de 10 µm para aumentos de cerca de 10.000 X, chegando a 1 cm para aumentos de 20 X. Esta característica possibilita obter imagens estereoscópicas e bem focadas com espécimes até macroscópicos. Além disso, na MEV, a amostra pode ser inclinada e rotacionada sob o feixe eletrônico em todas as orientações, logo precisa estar bem preservada nas três dimensões. A MEV registra claramente que o Amblyomin-X influencia no processo de morte celular por apoptose em células RENCA. A

eletromicrografia obtida deixa explícito o mecanismo de apoptose envolvido, com formação de corpos apoptóticos, redução das microvilosidades, perda de adesão à matriz e formação de *blebbing* na membrana, enquanto os fibroblastos normais NIH/3T3 não sofreram modificações estruturais.

Resistência a múltiplas drogas é o termo utilizado para um fenômeno inicialmente descrito para células tumorais, caracterizado pela resistência cruzada a uma ampla variedade de drogas não relacionadas estrutural e funcionalmente, sendo um dos principais obstáculos para o sucesso de regimes quimioterápicos (249). Diferentes fatores podem interferir no resultado de um tratamento quimioterápico, intrínsecos à própria terapêutica, e aqueles que progressivamente podem ocorrer ao longo de um tratamento. Os mecanismos de resistência aos antineoplásicos são múltiplos, mas o que tem suscitado maior atenção são os casos de resistência associados à presença de grande quantidade da P-gp na membrana plasmática de células tumorais.

A P-gp é uma proteína transmembrana, que funciona como uma bomba ATP-dependente, transportando ativamente compostos de diferentes naturezas para fora das células e impedindo assim, no caso de quimioterápicos, a sua ação citotóxica. O mecanismo de ação da P-gp foi chamado de "aspirador hidrofóbico" por Gottesman e Pastan em 1993 (250).

É importante salientar que essa proteína é expressa normalmente em diversos tecidos, mesmo em condições não patológicas (adrenocortical, hepático, intestinal e barreiras hemato-encefálicas e hemato-testiculares) exercendo funções fisiológicas de transporte, secreção e proteção, sendo detectada na maioria dos tipos de tumores (3).

As células RENCA, sabidamente apresentando histologia análoga ao CCR células claras humano, foram testadas no presente estudo, para a expressão da P-gp, e demonstraram que, assim como no CCR humano, apresentam superexpressão da mesma, conferindo resistência à múltiplas drogas.

O tratamento com Amblyomin-X diminuiu significativamente a expressão desta proteína, entretanto a sensibilidade e efetividade da proteína se mostrou eficaz na indução significativa de apoptose, ou mesmo dos efeitos citotóxicos, independentemente da expressão da P-gp, já que esta, embora diminuída, manteve-se expressa. Esta constatação abre possibilidades de explorar a associação de

Amblyomin-X com outros fármacos antineoplásicos no tratamento de CCR, o que possibilitaria resultados terapêuticos ainda mais eficientes.

Finalmente, devemos salientar que a toxicidade associada ao tratamento antineoplásico é um dos maiores obstáculos à manutenção da terapia. Toxicidade graus 3 e 4, que indicam a interrupção do tratamento, são freqüentes e cumulativos, portanto a terapia do câncer deve buscar a preservação das células saudáveis, como fundamento de efetividade. O Amblyomin-X foi testado em células normais, refletindo a citotoxicidade e a possível seletividade tumor específica. Os dados obtidos em fibrolastos normais NIH/3T3 tratados com Amblyomin-X, ou não (controle), quando pareados aos mesmos ensaios realizados em células RENCA, sob as mesmas condições, demonstraram que não houve diferença estatística, em nenhum dos testes realizados, quando comparados ao controle em fibroblastos normais. Não houve, portanto, toxicidade associada ao tratamento com Amblyomin-X em fibroblastos normais. Dados semelhantes, já haviam sido reportados previamente pelo grupo de Chudzinski-Tavassi (195), que submeteram fibroblastos tratados com Amblyomin-X ao ensaio colorimétrico de MTT, não sendo observada toxicidade. Estes dados, embora necessitando de estudos futuros que os confirmem, demonstram indícios de uma droga eficaz na terapêutica antitumoral e com expressiva seletividade a células neoplásicas.

Estes resultados obtidos até o presente momento, são estimulantes e abrem a perspectiva de desenvolvimento de um novo agente antineoplásico.

6 CONCLUSÃO

O Amblyomin-X, proteína recombinante classificada como inibidor de serinoprotease tipo Kunitz, demonstrou atividade antiproliferativa e indutora de apoptose em CCR murino, linhagem RENCA, nos estudos *in vitro* realizados. A atividade citotóxica sobre células RENCA foi independente da presença de VHL aberrante ou da expressão da P-gp. A capacidade desta molécula de interferir no processo de angiogênese, e fundamentalmente, não exercer efeito citotóxico em células normais, demonstrando seletividade às células neoplásicas, sugere um possível potencial terapêutico no tratamento do CCR metastático.

REFERÊNCIAS *

1. Finley D S, Pantuck A J, Belldegrun A S. Tumor Biology and Prognostic Factors in Renal Cell Carcinoma. *The Oncologist*. 2011;16(suppl 2):4-13.
2. Surveillance Epidemiology and end Results (SEER) Stat Fact Sheets. Kidney and renal Pélvis. Available from <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/kidrp.html> [2011/may/16th].
3. Fojo AT, Shen DW, Mickley LA, et al. Intrinsic drug resistance to human kidney cancer associated with espression of a human multi drug resistance gene. *J Clin Oncol*. 1987;5(12):1922-7.
4. Roisean EF, Sharon MJ, Anthea JS, et al. Intrinsic chemotherapy resistance to the tubulin-binding antimitotic agents in renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2005;115:155-63.
5. McLaughlin JK, Lipworth L. Epidemiologic aspects of renal cell cancer. *Semin Oncol*. 2000;27(2):115-23.
6. American Cancer Society (ACS) Detalled Guide: Kidney Cancer. Availiabile from <http://www.cancer.org> [2011/may/05th].
7. National Cancer Institute (NCI). Renal Cell Cancer Treatment PDQ. Available from <http://www.cancer.gov> [2011/apr/9th].
8. Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol*. 2010;7(5):245-57.
9. Sun M, Thuret R, Abdollah F, et al. Age-Adjusted Incidence, Mortality, and Survival Rates of Stage-Specific Renal Cell Carcinoma in North America: A Trend Analysis. *European Urology*. 2011;59:135-41.
10. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med*. 1987;316(15): 889-97.
11. Eble JN, et al. World Health Organization (WHO) Classification of Tumours. International Agency for Research on Cancer (IARC), Geneve:WHO;2004.
12. Motzer RJ, Bukowski RM. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006;24:5601-8.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007May22].

13. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1982;6:655-63.
14. Facchini G, Perri F, Caraglia M, et al. New treatment approaches in renal cell carcinoma. *Anti Cancer Drugs*. 2009;20(10):893-900.
15. Brugarolas JB, Vazquez F, Reddy A, et al. TSC2 regulates VEGF through mTOR dependent and independent pathways. *Cancer Cell*. 2003;4:147-58.
16. Linehan WM. Genetic basis of bilateral renal cancer: Implications for evaluation and management. *J Clin Oncol*. 2009;27:3731-33.
17. Karsdorp N, Elderson A, Wittebol-Post D, et al. Von Hippel-Lindau disease: new strategies in early detection and treatment. *Am J Med*. 1994;97(2):158-68.
18. Maher ER, Yates JRW, Harries R, et al. Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. *Q J Med*. 1990;77:1151-63.
19. Latif F, Tory K, Gnarr J, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science (Washington DC)*. 1993;260:1317-20.
20. Nelson JB, Oyasu R, Dalton DP. The clinical and pathological manifestations of renal tumors in von Hippel-Lindau disease. *J Urol*. 1994;152(6 pt 2):2221-6.
21. Choyke PL, Glenn GM, Walther MM, et al. Von-Hippel-Lindau disease: genetic, clinical, and imaging features. *Radiology*. 1995;194(3):629-42.
22. Choyke PL, Glenn GM, Walther MM, et al. The natural history of renal lesions in von Hippel-Lindau disease: a serial CT study in 28 patients. *Am J Roentgenol*. 1992;159(6):1229-34.
23. Van den Berg A, Buys CHCM. Involvement of multiple loci on chromosome 3 in renal cell cancer development. *Genes Chromosome Cancer*. 1997;19:59-76.
24. 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*. 2000;19:1392-9.
25. 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*. 2001;11:1861-70.
26. Linehan WM, Srinivasan R, Schmidt LS. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nature Reviews Urology*. 2010;7:277-85.
27. Everitt JI, Goldsworthy TL, Wolf DC, et al. Hereditary renal cell carcinoma in the Eker rat: A rodent familial cancer syndrome. *J Urol*. 1992;148:1932-36.

28. Kobayashi T, Minowa O, Kuno J, et al. Renal carcinogenesis, hepatic hemangiomatosis, and embryonic lethality caused by a germ-line Tsc2 mutation in mice. *Cancer Res.* 1999;59:1206-11.
29. Kwiatkowski DJ, Hongbing Zhang, Jennifer L, et al. A mouse model of TSC1 reveals sex-dependent lethality from liver hemangiomas, and up-regulation of p70S6 kinase activity in Tsc1 null cells. *Hum Mol Genet.* 2002;11(5):525-34.
30. Wilson C, Idziaszczyk S, Parry L, et al. A mouse model of tuberous sclerosis 1 showing background specific early post-natal mortality and metastatic renal cell carcinoma. *Human Molecular Genetics.* 2005;14:1839-50.
31. Velickovic M, Delahunt B, McIver B, et al. Intragenic PTEN/MMAC1 loss of heterozygosity in conventional (clear-cell) renal cell carcinoma is associated with poor patient prognosis. *Mod Pathol.* 2002;15:479-85.
32. Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol.* 1969;101(3):297-301.
33. Gonçalves PD, Srougi M, Dall'Oglio MF, et al. Low clinical stage renal cell carcinoma: relevance of microvascular tumor invasion as a prognostic parameter. *J Urol.* 2004;172:470-4.
34. Ficarra V, Prayer-Galetti T, Novara G, et al. Tumor-size breakpoint for prognostic stratification of localized renal cell carcinoma. *Urology.* 2004;63:235-40.
35. Delahunt B, Kittelson JM, McCredie MR, et al. Prognostic importance of tumor size for localized conventional (clear cell) renal cell carcinoma: assessment of TNM T1 and T2 tumor categories and comparison with other prognostic parameters. *Cancer.* 2002;94:658-64.
36. Kontak JA, Campbell SC. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am.* 2003;30:467-80.
37. Marshall FF, Stewart AK, Menck HR. The National Cancer Data Base: report on kidney cancers. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer.* 1997;80:2167-74.
38. Flint A, Grossman HB, Liebert M, et al. DNA and PCNA content of renal cell carcinoma and prognosis. *AM J Clin Pathol.* 1995;103(1):14-9.
39. Associação Médica Brasileira, Conselho Federal de Medicina, Sociedade Brasileira de Urologia. Projeto Diretrizes – Cancer Renal: Prognóstico; AMB/CFM–SBU. Disponível em http://www.projetodiretrizes.org.br/6_volume/10-CancerRenalProgn.pdf; [2011/jan/10th].
40. Elmore JM, Kadesky KT, Koeneman KS, et al. Reassessment of the 1997 TNM classification system for renal cell carcinoma. *Cancer.* 2003;98:2329-34.

41. Di Silverio F, Sciarra A, Flammia GP, et al. Surgical enucleation for renal cell carcinoma (RCC). Prognostic significance of tumour stage, grade and DNA ploidy. *Scand J Urol Nephrol*. 1997;31:123-8.
42. Rini BI. Current status and future directions of molecular markers in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urology*. 2006;16:332-6.
43. Bui MH, Seligson D, Han KR, et al. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: Implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res*. 2003;9:802-11.
44. Atkins MB, Regan M, McDermott D, et al. Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome in interleukin-2 therapy of renal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:3714–21.
45. Choueiri TK, Regan M, Oh W, et al. Prognostic and predictive values of carbonic anhydrase IX (CAIX) and pathologic features in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma receiving targeted therapy. *J Clin Oncol*. 2009;27(Suppl e):16067.
46. Jacobsen J, Rasmuson T, Grankvist K, et al. Vascular endothelial growth factor as prognostic factor in renal cell carcinoma. *J Urol*. 2000;163:343-47.
47. Phuoc NB, Ehara H, Gotoh T, et al. Prognostic value of the co-expression of carbonic anhydrase IX and vascular endothelial growth factor in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2008;20:525-30.
48. Choueiri TK, Vaziri SA, Rini BI, et al. Use of Von-Hippel Lindau (VHL) mutation status to predict objective response to vascular endothelial growth factor (VEGF)-targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma (RCC). *J Clin Oncol*. 2007;25:Abstract 5012.
49. Schraml P, Struckmann K, Hatz F, et al. VHL mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear-cell renal-cell carcinoma. *J Pathol*. 2002;196:186-93.
50. Klatte T, Seligson DB, Riggs SB, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13:7388-93.
51. Zamparese R, Pannone G, Santoro A, et al. Survivin expression in renal cell carcinoma. *Cancer Invest*. 2008;26:929-35.
52. Baytekin F, Tuna B, Mungan U, et al. Significance of P-glycoprotein, P53, and survivin expression in renal cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2009;Nov26:Epub ahead of print.
53. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, et al. Tumor B7–H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res*. 2006;66:3381-85.
54. Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions. *J Cell Mol Med*. 2005;9:360-72.

55. Klatte T, Seligson D, LaRoche J, et al. Molecular signatures of localized clear cell renal cell carcinoma to predict disease-free survival after nephrectomy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18:894-900.
56. Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, et al. Interferon- α as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2002;20:289-96.
57. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, et al. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 1999;17:2530-40.
58. Kattan MW, Reuter V, Motzer RJ, et al. A postoperative prognostic nomogram for renal cell carcinoma. *J Urol*. 2001;166:63-67.
59. Frank I, Blute ML, Cheville JC, et al. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: The SSIGN score. *J Urol*. 2002;168:2395-400.
60. Zisman A, Pantuck AJ, Dorey F, et al. Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. *J Clin Oncol*. 2001;19:1649-57.
61. Mekhail TM, Abou-Jawde RM, BouMerhi G, et al. Validation and extension of the Memorial Sloan-Kettering prognostic factors model for survival in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2005;23:832-41.
62. Choueiri T, Garcia JA, Elson P, et al. Clinical factors associated with outcome in patients with metastatic clear-cell renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Cancer*. 2007;110:543–50.
63. Kim HL, Seligson D, Liu X, et al. Using protein expressions to predict survival in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5464-71.
64. Parker AS, Leibovich BC, Lohse CM, et al. Development and evaluation of BioScore: A biomarker panel to enhance prognostic algorithms for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*. 2009;115:2092-2103.
65. Yaycioglu O, Roberts WW, Chan T, et al. Prognostic assessment of nonmetastatic renal cell carcinoma: A clinically based model. *Urology*. 2001;58:141-45.
66. Karakiewicz PI, Briganti A, Chun FK, et al. Multi-institutional validation of a new renal cancer-specific survival nomogram. *J Clin Oncol*. 2007;25:1316-22.
67. Motzer RJ, Bukowski RM, Figlin RA, et al. Prognostic nomogram for sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*. 2008;113:1552-58.
68. Heng DY, Xie W, Regan MM, et al. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial

- growth factor-targeted agents: Results from a large, multicenter study. *J Clin Oncol*. 2009;27:5794-99.
69. Fossa SD. Interferon in metastatic renal cell carcinoma. *Semin Oncol* Apr. 2000;27(2):187-93.
 70. Minasian LM, Motzer RJ, Gluck L, et al. Interferon alfa-2a in advanced renal cell carcinoma: treatment results and survival in 159 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol*. 1993;11(7):1368-75.
 71. Negrier S, Escudier B, Lasset C, et al. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. Groupe Francais d'Immunotherapie. *N Engl J Med*. 1998;338(18):1272-8.
 72. Pyrhonen S, Salminen E, Ruutu M, et al. Prospective randomized trial of interferon alfa-2a plus vinblastine versus vinblastine alone in patients with advanced renal cell cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17(9):2859-67.
 73. Margolin KA. Interleukin-2 in the treatment of renal cancer. *Semin Oncol*. 2000; 27(2):194-203.
 74. Simon JW, Marshall FF. Kidney and Ureter In: Abeloff MD, et al, eds. *Clinical Oncology*. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone;2000:1784-99.
 75. Stadler WM, Vogelzang NJ. Low-dose interleukin-2 in the treatment of metastatic renal-cell carcinoma. *Semin Oncol*. 1995;22(1):67-73.
 76. Law TM, Motzer RJ, Mazumdar M, et al. Phase III randomized trial of interleukin-2 with or without lymphokine-activated killer cells in the treatment of patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer*. 1995;76(5):824-32.
 77. Bukowski RM. Cytokine combinations: therapeutic use in patients with advanced renal cell carcinoma. *Semin Oncol*. 2000;27(2):204-12.
 78. Parkinson DR, Sznol M. High-dose interleukin-2 in the therapy of metastatic renal-cell carcinoma. *Semin Oncol*. 1995;22(1):61-6.
 79. Holland JF, Frei E. *Cancer Medicine*. 6th ed. Hamilton (ON): BC Decker;2003.
 80. Culine S, Bekradda M, Kramar A, et al. Prognostic factors for survival in patients with brain metastases from renal cell carcinoma. *Cancer*. 1998;83(12): 2548-53.
 81. Montie JE, Stewart BH. The role of adjunctive nephrectomy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* .1997;117-272.
 82. Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*.1996;335:865-75.

83. Oliver RT, Nethersell AB, Bottomley JM: Unexplained spontaneous regression and alpha-interferon as treatment for metastatic renal carcinoma. *Br J Urol.* 1989;63(2):128-31.
84. Barbuto J, et al. Complete response of metastatic renal cancer with dendritic cell vaccine. *Int Braz J Urol.* 2003;29:517-19.
85. Barbuto J. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53(12):1111-8.
86. Holtl L, Rieser C, Papesh C, et al. CD83+ blood dendritic cells as a vaccine for immunotherapy of metastatic renal-cell cancer. *Lancet.* 1998;1352(9137)-1358.
87. Jocham D, Richter A, Hoffmann L, et al. Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: Phase III, randomised controlled trial. *Lancet* 2004;363:594-99.
88. Hernández J, Bui MH, Han KR, et al. Novel kidney cancer immunotherapy based on the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and carbonic anhydrase IX fusion gene. *Clin Cancer Res.* 2003;9:1906-16.
89. Tso CL, Zisman A, Pantuck A, et al. Induction of G250-targeted and T-cell mediated antitumor activity against renal cell carcinoma using a chimeric fusion protein consisting of G250 and granulocyte/monocyte-colony stimulating factor. *Cancer Res.* 2001;61:7925-33.
90. Oudard S, Rixe O, Beuselinck B, et al. A phase II study of the cancer vaccine TG4010 alone and in combination with cytokines in patients with metastatic renal clear-cell carcinoma: Clinical and immunological findings. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60:261-71.
91. deKernion JB, Sarna G, Figlin R, et al. The treatment of renal cell carcinoma with human leukocyte alpha-interferon. *J Urol.* 1983;130:1063-6.
92. Quesada JR, Swanson DA, Trindade A, et al. Renal cell carcinoma: Antitumor effects of leukocyte interferon. *Cancer Res.* 1983;43:940-47.
93. Medical Research Council Renal Cancer Collaborators. Interferon-alpha and survival in metastatic renal cell carcinoma: early results of a randomized controlled trial. *Lancet.* 1999;353:14-7.
94. Fyfe G, Fisher RI, Rosenberg SA, et al. Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol.* 1995;13:88-96.
95. McDermott D, Ghebremichael S, Signoretti S, et al. The high-dose aldesleukin (HD IL-2) Select trial in patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC): Preliminary assessment of clinical benefit. In: *Proceedings of Genitourinary American Society of Clinical Oncology Meeting; San Francisco; 2010. Abstracts...* San Francisco: Genitourinary Cancers Symposium; 2010. abstract 321.

96. Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer*. 1989;81:116-24.
97. Linehan WM, Pinto PA, Srinivasan R, et al. Identification of the genes for kidney cancer: opportunity for disease-specific targeted therapeutics. *Clin Cancer Res*. 2007;13:671-79.
98. Algaba F. How does pathology guides treatment decisions. Conference of Renal Carcinoma Experts [Audio-visual plenary session]. Istanbul (Turkey): (CORE event Annals); 2010.
99. Patel PH, Chaganti RS, Motzer RJ. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2006;94:614-19.
100. Gnarr JR, Tory K, Weng Y, et al. Mutations of the VHL tumor suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet*. 1994;7:85-90.
101. Huang, LE, Arany, et al. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit. *J Biol Chem*. 1996;271:32253-59.
102. Powis G, Kirkpatrick L. Hypoxia inducible factor-1 alpha as a cancer drug target. *Mol Cancer Ther*. 2004;3:647-54.
103. Vaupel P. The Role of Hypoxia-Induced Factors in Tumor Progression. *Oncologist*. 2004;9:10-17.
104. Patel PH, Chadalavada RS, Chaganti RS, et al. Targeting von Hippel-Lindau pathway in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2006;12:7215-20.
105. Kirkali Z, Tuzel E. Systemic Therapy of Kidney Cancer: Tyrosine Kinase Inhibitors, Antiangiogenesis or IL-2? *Future Oncology*. 2009;5(6):871-88.
106. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995;146:1029-39.
107. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997;18:4-25.
108. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, et al. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest*. 1999;103:159-65.
109. Watanabe Y, Lee SW, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) delays and induces escape from senescence in human dermal microvascular endothelial cells. *Oncogene*. 1997;14:2025-32.
110. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*. 2002;20:4368-80.

111. de Vries C, Escobedo JS, Ueno H, et al. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*. 1992;255:989-91.
112. Millauer B, Witzigmann-Voos S, Schnurch H, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggests flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*. 1993;72:835-46.
113. Rini BI, Small EJ. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2005;23:1028-43.
114. Caldwell MC, Hough C, Furer S, et al. Serial analysis of gene expression in renal carcinoma cells reveals VHL-dependent sensitivity to TNF- α cytotoxicity. *Oncogene*. 2002;21:929-36.
115. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med*. 1995;333:1757-63.
116. Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): Mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem*. 1998;31:335-40.
117. Sehgal SN. Sirolimus: Its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc*. 2003;35:7S-14S.
118. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004;18:1926-45.
119. Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): An integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*. 2004;23:3151-71.
120. Abraham RT. Mammalian target of rapamycin: Immunosuppressive drugs uncover a novel pathway of cytokine receptor signaling. *Curr Opin Immunol*. 1998;10:330-6.
121. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002;110:163-75.
122. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*. 2004;14:1296-1302.
123. Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. mTOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006;124:471-84.
124. Lieberthal W, Levine JS. The Role of the Mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) in Renal Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:2493-2502.

125. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 2004;6:1122-28.
126. Arsham AM, Neufeld TP. Thinking globally and acting locally with mTOR. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18:589-97.
127. Lee CH, Inoki K, Guan KL. mTOR pathway as a target in tissue hypertrophy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:443-67.
128. Dickson LM, Lingohr MK, McCuaig J, et al. Differential activation of protein kinase B and p70(S6)K by glucose and insulin-like growth factor 1 in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem.* 2001;276:21110-20.
129. Avruch J, Lin Y, Long X, et al. Recent advances in the regulation of the TOR pathway by insulin and nutrients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2005;8:67-72
130. Chiu T, Santiskulvong, Rosengurt E. EGF receptor transactivation mediates ANGII stimulated mitogenesis in intestinal epithelial cells through the PI3-kinase/Akt/mTOR/p70S6K1 signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288:G182-G94.
131. Navolanic PM, Steelman LS, McCubrey JA: EGFR family signaling and its association with breast cancer development and resistance to chemotherapy. *Int J Oncol.* 2003;22:237-52.
132. Beugnet A, Tee AR, Taylor PM, et al. Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signalling by intracellular amino acid availability. *Biochem J.* 2003;372:555-66.
133. Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, et al. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:14238-43.
134. Hardie DG, Carling D, Carlson M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: Metabolic sensors of the eukaryotic cell?. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:821-55.
135. Hardie DG. AMP-activated protein kinase: The guardian of cardiac energy status. *J Clin Invest.* 2004;114:465–68.
136. Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. AMPactivated protein kinase: Development of the energy sensor concept. *J Physiol.* 2006;574:7-15.
137. Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, et al. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1and 4EBP1/eukaryotic translation factor 4E. *Mol Cell Biol.* 2004;24:200-16.
138. Hudes GR. Targeting mTOR in Renal Cell Carcinoma. *Cancer.* 2009;115(Suppl. 10):2313-20.

139. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, et al. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: Implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* . 2001;17:615-75.
140. Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem Sci*. 2005;30:35-42.
141. Fresno-Vara JA, Casado E, de Castro J, et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*. 2004;30:193-204.
142. Dancey J. Therapeutic targets: mTOR and related pathways. *Cancer Biol Ther*. 2006;5:1065-73.
143. Porta C, Figlin RA. Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling pathway and kidney cancer, and the therapeutic potential of phosphatidylinositol-3-kinase/Akt inhibitors. *J Urol*. 2009;182:2569-77.
144. Inoki K, Li Y, Zhu T, et al. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* . 2002;4:648-57.
145. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* . 2003;115:577-90.
146. Inoki K, Li Y, Xu T, et al. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev*. 2003;17:1829-34.
147. Tee AR, Anjum R, Blenis J. Inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products occurs by phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and -independent phosphorylation of tuberin. *J Biol Chem*. 2003;278:37288-96.
148. Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*. 2004;29:233-42.
149. Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating TSC2. *Nat Cell Biol*. 2002;4:658-65.
150. Kondo K, Yao M, Kobayashi K, et al. PTEN/ MMAC1/TEP1 mutations in human primary renal-cell carcinomas and renal carcinoma cell lines. *Int J Cancer*. 2001;91:219-24.
151. Kenerson HL, Aicher LD, True LD, et al. Activated mammalian target of rapamycin pathway in the pathogenesis of tuberous sclerosis complex renal tumors. *Cancer Res* . 2002;62:5645-50.
152. Prenen H, Gil T, Awada A. New therapeutic developments in renal cell cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009;69:56-63.
153. Board RE, Thistlethwaite FC, Hawkins RE. Anti-angiogenic therapy in the treatment of advanced renal cell cancer. *Cancer Treat Rev*. 2007;33:1-8.
154. Ma WW, Jimeno A. Temsirolimus. *Drugs Today (Barc)*. 2007;43:659-69.

155. Del Bufalo D, Ciuffreda L, Trisciuglio D, et al. Antiangiogenic potential of the mammalian target of rapamycin inhibitor temsirolimus. *Cancer Res.* 2006;66:5549-54.
156. Lee M, Hwang JT, Lee HJ, et al. AMP-activated protein kinase activity is critical for hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activity and its target gene expression under hypoxic conditions in DU145 cells. *J Biol Chem.* 2003;278:39653-61.
157. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, et al. Sunitinib in advanced clear-cell renal cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2007;356:125-34.
158. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2007;356:115-24.
159. Sternberg CN, Szczylik C, Lee E, et al. A randomized, double-blind phase III study of pazopanib in treatment-naïve and cytokine-pretreated patients with advanced renal cell carcinoma (RCC). *J Clin Oncol.* 2009;27(Suppl. 15):abstr 5021.
160. Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, et al. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol.* 2010;28(6):1061-8.
161. Rixe O, Bukowski RM, Michaelson MD, et al. Axitinib treatment in patients with cytokine-refractory metastatic renal-cell cancer: a phase II study. *Lancet.* 2007;8:975-84.
162. Escudier B, Koralewski P, Pluzanska A, et al. A randomized, controlled, double-blind phase III study (AVOREN) of bevacizumab/interferon-alfa2a vs placebo/interferon-alfa2a as first-line therapy in metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2007;25(Suppl. 18):3.
163. Rini BI, Halabi S, Rosenberg JE, et al. Bevacizumab Plus Interferon Alfa Compared With Interferon Alfa Monotherapy in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma: CALGB 90206. *Jour of Clin Onco.* 2008;26(33):5422-28.
164. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, et al. For the Global ARCC Trial*. Temsirolimus, Interferon Alfa, or Both for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2007;356:22.
165. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, et al. for the RECORD-1 Study Group. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III Trial. *The Lancet.* 2008;372,9637:449 - 56,9.
166. Dawson NA, Guo C, Zak R, et al. A phase II Trial of gefitinib (Iressa, ZD1839) in stage IV and recurrent renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:7812-19.

167. Hainsworth JD, Sosman JA, Spigel DR, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with a combination of bevacizumab and erlotinib. *J Clin Oncol.* 2005; 23:7889-96.
168. Bukowski RM, Kabbinavar FF, Figlin RA, et al. Randomized phase II study of erlotinib combined treatment of renal cell carcinoma with bevacizumab compared with bevacizumab alone in metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:4536-41.
169. Ravaud A, Hawkins R, Gardner JP, et al. Lapatinib versus hormone therapy in patients with advanced renal cell carcinoma: a randomized phase III clinical trial. *J Clin Oncol.* 2008;26:2285-91.
170. Rini BI. Metastatic Renal Cell Carcinoma: Many Treatment Options, One Patient. *J Clin Oncol.* 2009;27:3225-34.
171. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Kidney Cancer-v.2.2011;Available from www.nccn.org. [2011/may/11th].
172. Hutson TE, Figlin RA. Novel therapeutics for metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2008;26(Suppl):5046.
173. Motzer RJ et al. Updated data from a phase III randomized trial of everolimus (RAD001) versus PBO in metastatic renal cell carcinoma (mRCC). In: Proceedings of American Society of Clinical Oncology (ASCO) Meeting; Orlando; 2009. Abstracts... Orlando: ASCO-Genitourinary cancer; 2009. abstract 278.
174. Rini BI, Atkins MB. Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma. *Lancet Oncol.* 2009;10:992-1000.
175. Woodward JKL, Holen I, Coleman RD, et al. The roles of proteolytic enzymes in the development of tumor-induced bone disease in breast and prostate cancer. *Bone.* 2007;41(6):912-27.
176. Skrzydlewska E, Sulkowska M, Koda M, et al. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J Gastroenterology.* 2005;11:1251-66.
177. Levine MN. New antithrombotic drugs: potential for use in oncology. *J Clin Oncol.* 2009;27(29):4912-8.
178. Greene CM, McElvaney NG. Proteases and antiproteases in chronic neutrophilic lung disease - relevance to drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2009;158(4):1048-58.
179. Laskowski M Jr, Kato I. Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem.* 1980;49:593-626.
180. Otlewski J, Jelen F, Zakrzewska M, et al. The many faces of protease-protein inhibitor interaction. *EMBO J.* 2005;24(7):1303-10.

181. Corral-Rodriguez MA, Macedo-Ribeiro S, BarbosaPereira PJ, et al. Tick-derived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors. *Insect Biochem Mol Biol.* 2009; 39:579-95.
182. Ribeiro MS, Almeida C, Calisto MC, et al. Isolation, Cloning and Structural Characterisation of Boophilin, a Multifunctional Kunitz-type proteinase. *Plos One.* 2008;2:e1624.
183. Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Kisiel W. The role of tissue factor pathway inhibitor-2 in cancer biology. *Seminars in Trombosis and Hemostasis.* 2007;7:635-39.
184. Batista IF, Ramos OH, Ventura JS, et al. A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. *Arch Biochem Biophys.* 2010;493:151-6.
185. Chand HS, Schmidt AE, Bajal SP, et al. Structure-function analysis of the reactive site in the first Kunitz-type domain of human tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biol Chem.* 2004;279:17500-7.
186. Kobayashi H, Suzuki M, Tanaka Y, et al. A Kunitz-Type Protease Inhibitor, Bikunin, Inhibits Ovarian Câncer Cell Invasion By Blocking The Calcium-dependent Transforming Growth Factor-1 Signaling Cascade. *The Journal of Biological Chemistry.* 2003;10:7790-99.
187. Kanayama S, Yamada Y, Onogi A, et al. Bikunin suppresses expression of pro-inflammatory cytokines induced by lipopolysaccharide in neutrophils. *Journal of endotoxin research.* 2007;13:369-76.
188. Matsuzaki H, Kobayashi H, Yagyu T, et al. Bikunin inhibits lipopolysaccharine-induced tumor necrosis factor alpha induction in macrophages. *Clinical and Diagnostic Laboratory immunology.* 2004;6:1140-7.
189. Francischetti IMB, Sá-Nunes A, Mans BJ, et al. The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci.* 2009;14:2051-88.
190. Guedes E, Leite RC, Prata MC, et al. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100:841-5.
191. Mans BJ, Ribeiro JM. Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of tick lipocalins. *Insect Biochem Mol Biol.* 2008;38:841-52.
192. Mans BJ, Ribeiro JM. A novel Clade of cysteinyl leukotriene scavengers in soft tick. *Insect Biochem Mol Biol.* 2008b;38:862-70.
193. Horta, MC, Labruna, MB, et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever –endemic área in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia* and another spotted fever group *Rickettsia*. *AM J Trop Med Hyg.* 2004;71:93-97.

194. Batista IF, Chudzinski-Tavassi AM, Faria F, et al. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Toxicon*. 2008;51:823-34.
195. Chudzinski-Tavassi AM, de-Sá-Junior PL, Simons SM, et al. 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;56(7):1145-54.
196. Coux O, Nothwang HG, Silva Pereira I, et al. Phylogenic relationships of the amino acid sequences of prosome (proteasome, MCP) subunits. *Mol Gen Genet*. 1994;245(6):769-80.
197. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*. 2002;82(2):373-428.
198. Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, et al. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene*. 2008;27(3):285-99.
199. Kostova Z, Wolf DH. For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J*. 2003;22(10):2309-17.
200. Tsai RT, Leu WM, Chen LY, et al. A reversibly dissociable ternary complex formed by XpsL, XpsM and XpsN of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion apparatus. *Biochem J*. 2002;367:865-71.
201. Fribley A, Zeng Q, Wang CY. Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress-reactive oxygen species in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Cell Biol*. 2004;24(22):9695-704.
202. Nawrocki AR, Scherer PE. The delicate balance between fat and muscle: adipokines in metabolic disease and musculoskeletal inflammation. *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4(3):281-9.
203. Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:739-89.
204. Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Apoptosis: Programmed Cell Death. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007;53(3):335-43.
205. Ranganath RM, Nagashree NR. Role of programmed cell death in development. *Int Rev Cytol*. 2001;202:159-242.
206. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*. 2004;19:124-28.
207. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000;45:528-37.

208. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*. 2000;407:810-6.
209. Jäättelä M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res*. 1999;248(1):30-43.
210. Valen G. The basic biology of apoptosis and its implications for cardiac function and viability. *Ann Thorac Surg*. 2003;75(2):S656-60.
211. Joza N, Susin SA, Daugas E, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001;410(6828):549-54.
212. Ashe PC, Berry MD. Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27(2):199-214.
213. Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(5):259-64.
214. Dlamini Z, Mbita Z, Zungu M. Genealogy, expression and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacol Ther*. 2004;101(1):1-15.
215. Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000;102(1):33-42.
216. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 2000;102(1):43-53.
217. Slee EA, O'Connor DJ, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene*. 2004;23(13):2809-18.
218. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(4):177-81.
219. Murphy GP, Hrushesky WJ. A murine renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1973;50(4):1013-25.
220. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
221. Bucchieri F, Puddicombe SM, Lordan JL, et al. Asthmatic bronchial epithelium is more susceptible to oxidant-induced apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;27(2):179-85.
222. Ahn KS, Jung YS, Kim J, et al. Behavior of murine renal carcinoma cells grown in ectopic or orthotopic sites in syngeneic mice. *Tumour Biol*. 2001;22:146-53.

223. Murphy GP. Murine renal cell carcinoma: a suitable human model. *Prog Clin Biol Res.* 1982;100:175-206.
224. Vaziri, S A J, Grabowski, et al. Inhibition of Proteasome Activity by Bortezomib in Renal Cancer Cells Is p53 Dependent and VHL Independent. *Anticancer Research.* 2009;29:2961-70.
225. Kondagunta GV, Drucker B, Schwartz L, et al. Phase II Trial of Bortezomib for Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology.* 2004; 22(18):3720-25.
226. BB-mib-mab trial. USC/Norris Comprehensive Cancer Center, Clinical Trials.gov Identifier: NCT00184015. Available from <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00184015>. [2011/Jan/13th].
227. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. *Nature Reviews Cancer.* 2004;4(8):592-603.
228. Zornig M, Hueber A, Baum W, et al. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1551:F1-37.
229. Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53:153-59.
230. Cowled PA, Evdokiou A. Growth-regulatory activity of the growth arrest-specific gene, GAS 1, in NIH-3T3 fibroblasts. *Experimental Cell Research.* 1998;240:359-367.
231. Stebel M, Vatta P, Ruaro ME, et al. The growth suppressing gas1 product is a GPI-linked protein. *FEBS Letters.* 2000;481:152-8.
232. Del-Sal G, Collavin L, Ruaro ME, et al. Structure, function, and chromosome mapping of the growth-suppressing human homologue of the murine gas1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:1848-52.
233. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science.* 1991;254:1138-46.
234. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science.* 1984;226:1097-9.
235. Tsujimoto Y. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science.* 1984;224:1403-6.
236. Itoi T, Yamana K, Bilim V, et al. Impact of frequent Bcl-2 expression on better prognosis in renal cell carcinoma patients. *British Journal of Cancer.* 2004;90:200-5.
237. Maruyama R, Yamana K, Itoi T, et al. Absence of Bcl-2 and Fas/CD95/APO-1 predicts the response to immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2006;95(9):1244-9.

238. Kim R, Emi M, Matsuura K, et al. Antisense and nonantisense effects of antisense Bcl-2 on multiple roles of Bcl-2 as a chemosensitizer in cancer therapy. *Cancer Gene Ther.* 2006;14:1-11.
239. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature.* 2005;435:677-81.
240. Xu K, Ding Q, Fang Z, et al. Silencing of HIF-1 α suppresses tumorigenicity of renal cell carcinoma through induction of apoptosis. *Cancer Gene Ther.* 2010;17(3):212-22.
241. Papadopoulos K. Targeting the Bcl-2 family in cancer therapy. *Semin Oncol.* 2006;33:449-56.
242. Dias RYS, Drewes CC, Hebeda CB, et al. Role of Amblyomin-X on microcirculatory vessels, endothelial cell migration and tumor growth. In: *Proceedings of XII International Congress of Toxicology; Barcelona; 2010. Abstract Book / Toxicology letters. Barcelona: [s.n.]; 2010. p. 22.*
243. Vikhanskaya F, et al. Inactivation of p53 in a human ovarian cancer cell line increases the sensitivity to paclitaxel by inducing G2/M arrest and apoptosis. *Exp. Cell Res.* 1998;24:96-101.
244. Gurova KV, Hill JE, Razorenova OV, et al. p53 pathway in renal cell carcinoma is repressed by a dominant mechanism. *Cancer Res.* 2004;64(6):1951-8.
245. Wetzel EB, Green DR. Apoptosis: checkpoint at the mitochondria frontier. *Mut Res.* 1999;434:243-51.
246. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:269-90.
247. Rupnarain C, Dlamini Z, Naicker S, et al. Colon cancer: genetics and apoptotic events. *Biol Chem.* 2004;385:449-64.
248. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1644:83-94.
249. Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glicoprotein mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem.* 1989;58:137-71.
250. Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* 1993;v62:385-427.