

Mario Thiego Fernandes Pacheco

**Estudo do papel da dineína no mecanismo de ação
antitumoral do Amblyomin-X em células de melanoma
e adenocarcinoma de pâncreas**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências do
Instituto Butantan, para obtenção
do título de Doutor em Ciências

São Paulo 2015

Mario Thiego Fernandes Pacheco

**Estudo do papel da dineína no mecanismo de ação
antitumoral do Amblyomin-X em células de melanoma
e adenocarcinoma de pâncreas**

Tese apresentada ao
Programa de Pós-graduação
em Ciências do Instituto
Butantan, para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Orientador: Ana Marisa
Chudzinski-Tavassi

São Paulo 2015

Pacheco, Mario Thiego Fernandes

Estudo do papel da dineína no mecanismo de ação antitumoral do Amblyomin-X em células de melanoma e adenocarcinoma de pâncreas / Mario Thiego Fernandes Pacheco; Ana Marisa Chudzinski-Tavassi - São Paulo, 2015.

217 folhas. : il. color. ; 30 cm.

Tese – Programa de Pós-Graduação em Ciências, Instituto Butantan, 2014.

1. *Amblyomma cajennense*. 2. Inibição de câncer. 3. Inibidor de Fator X ativado. 4. Dineína. 5. Proteassomo. I. Chudzinski-Tavassi, Ana Marisa. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências. Instituto Butantan. III. Título.

CDD 615.9

Aos meus pais, família e aos amigos
Marcos Varella, Sergio Marucci
e Evandro Theodoro, pelo incentivo,
apoio, paciência e carinho que
foram fundamentais
para meu desenvolvimento
pessoal, profissional e para o meu
direcionamento e conclusão
deste trabalho.
Obrigado!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Ana Marisa Chudzinski-Tavassi pelo apoio, confiança e direcionamento profissional.

Às minhas "mães" do laboratório de Bioquímica: Rosemary Viola Bosch, Carolina Maria Berra, Kátia Luciano Pereira de Moraes, Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto e Juliana Mozer Sciani pelas conversas, conselhos, apoio e direcionamento.

Ao Dr. Eduardo Angles-Cano, Dra. Norma Yamanouye, Dr. Roger Chammas, Dra. Marilene Demasi e Dra. Isabel de Fátima Correia Batista pelos ensinamentos.

Aos amigos de laboratório: Vânia Goulart Branco, Cícilia de Carvalho, Pamela Boufler, Tathiane Schiabel Scicchitano, Yacov Raphael e Marcelo Ferreira pela agradável convivência dentro e fora do laboratório e troca de conhecimento.

Aos amigos que fizeram parte do laboratório de Bioquímica: Nicole Caroline Mambelli, Karla de Quequi Roedel, Tainá Barros Hand, Janaína de Souza Ventura e Maria Fernanda Pistori pela agradável convivência e troca de conhecimento.

Aos membros dos laboratórios de Biologia Celular do Instituto Butantan, Biologia Celular do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) / Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), Parasitologia do Instituto Butantan, Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), Centro de Toxinologia Aplicada (CAT) do Instituto Butantan e os demais membros do laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan onde foram realizados experimentos, pela ajuda, discussões e agradável convivência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP).

À todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

"Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), processo número: 2011/05969-4"

"Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo".

Martin Luther King

RESUMO

Pacheco, Mario Thiego Fernandes. Estudo do papel da dineína no mecanismo de ação antitumoral do Amblyomin-X em células de melanoma e adenocarcinoma de pâncreas. 2015. 217 f. Tese (Ciências). Instituto Butantan, São Paulo, 2015.

Animais hematófagos são fontes de anticoagulantes naturais, visto que, para se alimentarem, necessitam manter o sangue fluido no seu trato digestivo e assim, podem conter uma série de moléculas fisiologicamente ativas. A partir da construção de uma biblioteca de cDNA da glândula salivar do carrapato-estrela *Amblyomma cajennense*, foi identificado um transcrito que codifica um inibidor de serino protease com um domínio tipo Kunitz semelhante ao inibidor endógeno TFPI. A proteína apresentou efeito inibidor sobre o fator FXa da coagulação e foi isolada e produzida na sua forma recombinante, sendo denominada Amblyomin-X. Além disso, a proteína recombinante exerceu efeitos pró-apoptóticos em células tumorais e também atividade anti-angiogênica, regressão da massa tumoral e diminuição de metástases. Até o momento, não foi identificado efeitos citotóxicos do Amblyomin-X em linhagens celulares não-tumorais ou normais, como por exemplo, fibroblastos. Dentre as atividades descritas desta nova molécula, destaca-se sua capacidade de inibição do sistema proteassomo e indução do aumento de expressão gênica da cadeia leve-intermediária 2 da dineína citoplasmática 1 em análise de *microarray* em células de melanoma (SK-MEL-28) e adenocarcinoma de pâncreas (MIA PaCa-2) humano. A dineína é um motor molecular que desempenha um papel importante em todas as células eucarióticas no transporte de proteínas, vesículas e organelas e também no posicionamento do núcleo, do fuso mitótico e dos microtúbulos. O presente trabalho é proposto para investigar o papel da dineína no mecanismo de ação antitumoral do Amblyomin-X, desde sua entrada na célula até o seu alvo e os efeitos biológicos desencadeados por esta nova molécula relacionados à inibição proteassomal.

Palavras-chave: *Amblyomma cajennense*, inibição de câncer, inibidor do Fator X ativado, dineína, proteassomo.

ABSTRACT

Pacheco, Mario Thiego Fernandes. Study of the role of dynein in the antitumor mechanism of action of Amblyomin X in melanoma and pancreas adenocarcinoma cells. 2015. 217 p. Thesis (Sciences). Instituto Butantan, São Paulo, 2015.

Hematophagous animals are sources of natural anticoagulants, since, for feeding, they need to maintain fluid blood in their digestive tract and therefore may contain a series of physiologically active molecules. From the construction of a cDNA library from the salivary glands of the *Amblyomma cajennense* tick, it was identified a transcript that encodes a serine protease inhibitor with a Kunitz-type domain similar to the endogenous TFPI inhibitor. The protein showed an inhibitory effect on the coagulation factor FXa and was isolated and produced in recombinant form, being named Amblyomin-X. Furthermore, the recombinant protein exerted pro-apoptotic effects in tumor cells as well as anti-angiogenic activity, tumor regression and decreased metastasis. Until now, it was not identified cytotoxic effects of Amblyomin-X in non-malignant or normal cells, such as fibroblasts. Among the activities described in this new molecule, we emphasize its ability to inhibit the proteasome system and to induce an increase in gene expression of the dynein cytoplasmic 1 light-intermediate chain 2 in microarray analysis in melanoma (SK-MEL-28) and pancreatic adenocarcinoma (MIA PaCa-2) human cells. The dynein is a molecular motor that plays an important role in all eukaryotic cells in transport of proteins, organelles and vesicles, and also the positioning of the nucleus, and the mitotic spindle pole and microtubules. This study is proposed to investigate the role of dynein in the antitumor mechanism of action of Amblyomin-X, from its uptake by the cell towards to its target as well as the biological effects triggered by this novel molecule linked to the proteasome inhibition.

Keywords: *Amblyomma cajennense*, cancer inhibition, activated Factor X inhibitor, dynein, proteasome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação de Richardson da estrutura tridimensional do Amblyomin-X baseado nas coordenadas cartesianas da bicunina humana.....	26
Figura 2. Representação da interface coagulação-câncer.....	27
Figura 3. Representação do <i>fold</i> ing e destino do polipeptídeo dentro do ER.....	32
Figura 4. Representação das possibilidades de ubiquitinação relacionados à eventos intracelulares.....	35
Figura 5. Representação das subunidades do proteassomo 26S.....	36
Figura 6. Representação das vias de formação de agregossomos.....	39
Figura 7. Representação da depuração autofágica.....	42
Figura 8. Representação do movimento dos motores moleculares dentro da célula.....	45
Figura 9. Representação da estrutura da dineína citoplasmática 1.....	47
Figura 10. Representação da estrutura da dinactina.....	49
Figura 11. Representação dos mecanismos de endocitose.....	51
Figura 12. Representação do envolvimento das Rabs e da dineína na endocitose.....	53
Figura 13. Estrutura química dos principais inibidores do proteassomo.....	54
Figura 14. Padronização da quantidade de cDNA.....	82
Figura 15. Análise da expressão gênica da dineína e outros alvos nas células tumorais.....	85 a 87
Figura 16. Análise da expressão gênica da dineína e outros alvos em fibroblastos.....	88
Figura 17. Análise da expressão proteica de dineína nas células tumorais.....	89 e 90
Figura 18. Análise da expressão proteica de dineína em fibroblastos.....	91
Figura 19. Análise da expressão proteica de NFkB1 e β -actina em células tumorais.....	92 e 93
Figura 20. Análise da expressão proteica de NFkB1 e β -actina em fibroblastos.....	93 e 94
Figura 21. Visualização e quantificação de agregossomos nas células tumorais.....	96 a 98

Figura 22. Visualização e quantificação de agregossomos em fibroblastos.....	98 e 99
Figura 23. Caracterização dos agregossomos e a via envolvida nas células tumorais	101 e 102
Figura 24. Caracterização dos agregossomos e a via envolvida em fibroblastos...	103
Figura 25. Visualização da autofagia nas células tumorais.....	105 a 107
Figura 26. Visualização da autofagia em fibroblastos.....	109 e 110
Figura 27. Análise da expressão proteica de alvos autofágicos nas células tumorais.....	111 e 112
Figura 28. Análise da expressão proteica de alvos autofágicos em fibroblastos.....	113
Figura 29. Co-localização da dineína e alvos autofágicos nas células tumorais.....	115 e 116
Figura 30. Co-localização da dineína e alvos autofágicos em fibroblastos.....	117
Figura 31. <i>K-linkage</i> nas células tumorais.....	119
Figura 32. <i>K-linkage</i> em fibroblastos.....	120
Figura 33. Papel da dineína na endocitose do Amblyomin-X nas células tumorais.....	122 e 123
Figura 34. Influência da dineína na inibição proteassomal induzida pelo Amblyomin-X.....	125 e 126
Figura 35. Perfil dos ligantes da dineína nas células tumorais estimuladas com Amblyomin-X.....	127 e 128
Figura 36. Análise da interação dos ligantes comuns de dineína entre as linhagens tumorais tratadas com Amblyomin-X por 24 h.....	134
Figura 37. Mecanismo de ação comum proposto para o Amblyomin-X nas células tumorais SK-MEL-28 e MIA PaCa-2.....	177

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência nucleotídica dos pares de <i>primers</i> de cada proteína a ser codificada.....	63 e 64
Tabela 2. Eficiência de cada par de <i>primers</i>	84
Tabela 3. Ligantes de dineína após 24 h de tratamento com Amblyomin-X nas linhagens tumorais.....	128 a 130
Tabela 4. Descrição de cada ligante de dineína encontrado.....	131 a 133

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(NH₄)₂CO₃ (*amonium bicarbonate*)
ΔRn (*normalized reporter*)
AAA (*ATPases associated with diverse cellular activities*)
AC (*adenylyl cyclase*)
ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*)
ADAMTS3 (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3*)
AIF (*apoptosis-inducing factor*)
Akt (*protein kinase B*)
Amblyomin-X (*Amblyomma cajennense inibidor do FXa*)
AMBRA1 (*activating molecule in Beclin-1-regulated atophagy*)
ANOVA (*analysis of variance*)
APF (*aggresome propensity factor*)
APP (*amyloid precursor protein*)
Arf6 (*ADP-rybosition factor 6*)
Arp1 (*actin-related protein 1*)
Arp11 (*actin-related protein 11*)
ATCC (*American Type Culture Collection*)
Atg (*autophagy related genes*)
ATP (*adenosine triphosphate*)
BACE2 (*beta-secretase 2*)
BCA (*bicinchoninic acid assay*)
Bag3 (*Bcl-2 associated athanogene 3*)
Bak (*Bcl-2 homologous antagonist killer*)
Bax (*Bcl-2-associated X protein*)
Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*)
Beclin-1 (*coiled-coil myosin-like Bcl-2 interacting protein*)
BH3 (*Bcl-2 homology domain 3*)
Bim (*Bcl-2-like protein 11*)
BSA (*bovine serum albumin*)
BTZ (*bortezomib*)

C₂₄H₃₉NaO₄ (*sodium deoxycholate*)
CA (*ciliobrevin A*)
Ca²⁺ (*cálcio*)
cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*)
CaRF (*calcium-responsive transcription factor*)
CasZ1 (*zinc finger protein castor homolog 1*)
CAT (*Centro de Toxinologia Aplicada*)
cDNA (*complementary deoxyribonucleic acid*)
CFZ (*carlfizomib*)
cGK2 (*cGMP-dependent protein kinase 2*)
cGMP (*cyclic guanosine monophosphate*)
CHIP (*carboxy terminus of Hsp70-interacting protein*)
ChT-L (*chymotrypsin-like*)
CHX (*cicloheximide*)
CIVD (*coagulação intravascular disseminada*)
CO₂ (*carbon dioxide*)
Co-IP (*complex-immunoprecipitation*)
Ct (*ciclo threshold*)
DAG (*diacylglycerol*)
DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*)
DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
DMSO (*dimethyl sulfoxide*)
DNA (*deoxyribonucleic acid*)
DPEC (*diethylpyrocarbonate*)
DSC (*differential scanning calorimetry*)
Dsel (*dermatan-sulfate epimerase-like protein*)
DTT (*dithiothreitol*)
DUB (*deubiquitinase*)
E (*eficiência*)
EDTA (*etylenediamine tetraacetic acid*)
EE (*early endosome*)
EGF (*epidermal growth factor*)
EGFL6 (*epidermal growth factor-like protein 6*)

EGFR (*epidermal growth factor receptor*)
EGTA (*ethylene glycol tetraacetic acid*)
ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
ER (*endoplasmic reticulum*)
ERAD (*Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation*)
FAD (*flavin adenine dinucleotide*)
FBS (*fetal bovine serum*)
FBXL13 (*F-box and leucine-rich repeat protein 13*)
FDA (*Food and Drug Administration*)
FIP3 (*Rab11-family interacting protein 3*)
FMUSP (*Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*)
Fox (*forkhead box*)
FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*)
FVIIa (*activated coagulation factor VII*)
Fw (*forward*)
FXa (*activated coagulation factor X*)
GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)
GAPs (*GTPase activating proteins*)
GDP (*guanosine diphosphate*)
GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*)
gp130 (*glycoprotein 130*)
GPCR (*G protein-coupled receptor*)
GTP (*guanosine triphosphate*)
H1e (*histone cluster 1, H1e*)
H₂O₂ (*hydrogen peroxide*)
HC1 (*dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1*)
HCl (*chloridric acid*)
HDAC6 (*histone deacetylase 6*)
HEPES (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)
HRP (*horseradish peroxidase*)
Hsp70 (*70-kDa heat-shock protein*)
HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*)
IκBα (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor,*

alpha)

IB (Instituto de Biociências)

IC1 (*dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 1*)

IC2 (*dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 2*)

ICB (Instituto de Ciências Biomédicas)

ICESP (Instituto do Câncer do Estado de São Paulo)

IF (*intermediate filament*)

IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*)

IGF-1R (*insulin-like growth factor receptor-1*)

IKK (*IκB Kinase*)

IL-6 (*interleukin-6*)

IL-6ST (*interleukin-6 signal transducer*)

IMF (intensidade média de fluorescência)

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

IP₃ (*inositol 1,4,5-trisphosphate*)

K⁺ (potássio)

JAK (*janus kinase*)

JAK2 (*janus kinase 2*)

KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*)

LC8-1 (*dynein light chain LC8-type 1*)

LC8-2 (*dynein light chain LC8-type 2*)

LCMS -IT-TOF (*liquid chromatograph mass spectrometer-ion trap-time of flight*)

LE (*late endosome*)

LIC1 (*dynein cytoplasmic 1 light-intermediate chain 1*)

LIC2 (*dynein cytoplasmic 1 light-intermediate chain 2*)

LR (*lipid raft*)

LIS1 (*lissencephaly-1*)

LysRS (*lysine-tRNA ligase*)

MAP (*microtubule associated protein*)

MAPK (*mitogen activated protein kinase*)

ME2GLYDH (*dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial*)

MEC (matriz extracelular)

MEKK1 (*MAPK/ERK kinase kinase 1*)
MG-132 (*carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal*)
MgCl₂ (*magnesium chloridre*)
MHC (*major histocompatibility complex*)
Misu (*tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase*)
MOPS (*3-(N-morpholino) propanesulfonic acid*)
mRNA (*messenger ribonucleic acid*)
MT (*microtúbulos*)
MTBD (*microtubule binding domain*)
mTOR (*mammalian target of rapamycin*)
MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*)
N-CoR2 (*nuclear receptor corepressor 2*)
Na₃VO₄ (*sodium orthovanadate*)
NaCl (*sodium chloridre*)
NAD⁺ (*nicotinamide adenine dinucleotide*)
NaF (*sodium fluoride*)
NaHCO₃ (*sodium bicarbonate*)
NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)
NDUFV1 (*NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial*)
NEMO (*NF-κB essential modulator*)
NF-κB (*nuclear factor kappa B*)
NH₄OH (*amonium hydroxide*)
NIH (*National Institute of Health*)
NUDE (*nucear distribution protein E*)
NUDEL (*nuclear distribution protein nudeE-like*)
p62 (*nucleoporin p62*)
PAR2 (*protease activated receptor 2*)
PARD3 (*partitioning defective 3*)
PBS (*phosphate buffer saline*)
PC (*phosphatidylcoline*)
PCCase-β (*propionyl CoA carboxylase beta subunit*)
PCT (*Patent Cooperation Treaty*)
PE (*phosphatidylethanolamine*)

PI3K (*phosphatidylinositide 3-kinase*)
PIP₂ (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)
PKA (*protein kinase A*)
PKC- α (*protein kinase C alpha*)
PLC- β (*phospholipase C- β*)
PLC- ϵ (*phospholipase C- ϵ*)
PLC- γ (*phospholipase C- γ*)
PMSF (*phenylmethanesulfonyl fluoride*)
PS (*phosphatidylserine*)
PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10*)
PVDF (*polyvinylidene fluoride*)
qPCR (*real-time polymerase chain reaction*)
QR (*quantificação relativa*)
Rab (*Ras superfamily of monomeric G proteins*)
Rab11A (*Ras-related protein Rab-11A*)
Rab20 (*Ras-related protein Rab-20*)
Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*)
Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*)
RE (*recycling endosome*)
RhoA (*Ras homolog gene family, member A*)
RhoGEF18 (*Rho guanine nucleotide exchange factor 18*)
Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*)
RIP1 (*receptor-interacting protein 1*)
RIPA (*radio immunoprecipitation assay*)
RNA (*ribonucleic acid*)
Roadblock1 (*dynein light chain roadblock type 1*)
Roadblock2 (*dynein light chain roadblock type 2*)
ROCK (*Rho-associated coiled coil-containing protein kinase*)
ROD (*rough deal*)
ROS (*reactive oxygen species*)
RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)
Rpn (*regulatory particle non-ATPase*)
Rpn10 (*26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10*)

Rpn11 (*26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11*)
Rpn13 (*26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13*)
Rpt (*regulatory particle triple-A ATPase*)
RTK (*receptor tyrosine kinase*)
Rv (*reverse*)
SCF (*Skp, Cullin, F-box containing complex*)
SDS (*sodium dodecyl sulfate*)
SDS-PAGE (*SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*)
SE (*sorting endosome*)
SHMT1 (*cytosolic serine hydroxymethyltransferase*)
sIL-6R (*soluble interleukin-6 receptor*)
SNIP (*SRC kinase signaling inhibitor 1*)
SRC (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase*)
STAT (*signal transducer and activator of transcription*)
STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*)
String (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*)
TBS-T (*tris-buffered saline with tween 20*)
TcTex1 (*dynein light chain TcTex type 1*)
TcTex3 (*dynein light chain TcTex type 3*)
TFP (*tetrafluorophenyl ester*)
TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*)
TF (*tissue factor*)
TGN (*trans-Golgi network*)
T-L (*trypsin-like*)
Tm (*melting temperature*)
TMEM26 (*transmembrane protein 26*)
TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*)
TNFR (*tumor necrosis factor receptor*)
TNFR-1 (*tumor necrosis factor receptor-1*)
TNFR-2 (*tumor necrosis factor receptor-2*)
TRAF4 (*TNF receptor-associated factor 4*)
Tris (*2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol*)
tRNA (*transfer ribonucleic acid*).

Ubc13 (*ubiquitin-conjugating enzyme E2N*),
Ubp6 (*ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 6*)
Uev1a (*enzyme variant 1a*)
ULK1 (*autophagy-related protein 1 homolog*)
Uniprot (*Universal Protein Resource*)
UPR (*Unfolded Protein Response*)
UPS (*Ubiquitin-Proteasome System*)
USP (Universidade de São Paulo)
UV (ultravioleta)
Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*)
ZDHHC14 (*zinc finger, DHHC-type containing 14*)
ZW10 (*zeste white 10*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Hematófagos e Amblyomin-X.....	25
1.2 Propriedades e estudos do Amblyomin-X.....	26
1.3 O proteassomo e o controle de qualidade proteico intracelular.....	30
1.4 A formação de agregossomos e a depuração autofágica.....	37
1.5 O citoesqueleto e os motores moleculares.....	42
1.6 A dineína citoplasmática 1 e seus reguladores.....	45
1.7 LIC2 X endocitose.....	49
1.8 Os inibidores do proteassomo e o desenvolvimento biofarmacêutico do Amblyomin-X.....	53
2. OBJETIVOS.....	58
2.1 Objetivos gerais.....	58
2.2 Objetivos específicos.....	58
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3.1 Obtenção do Amblyomin-X.....	59
3.2 Cultura de células.....	59
3.3 Dosagem de Amblyomin-X pelo método de Bradford.....	60
3.4 Análise de expressão gênica por <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> (qPCR).....	61
3.5 Viabilidade celular.....	65
3.6 Investigação da sinalização específica de ubiquitina.....	65
3.7 Ensaio de agregossomos.....	67
3.8 Visualização da autofagia.....	69
3.9 Análise da expressão de proteínas intracelulares por <i>western blotting</i>	71
3.10 Microscopia confocal.....	73
3.11 Ensaio de inibição da dineína e internalização do Amblyomin-X.....	75
3.12 Ensaio de inibição da dineína e atividade do proteassomo.....	75
3.13 Avaliação dos ligantes de dineína por <i>complex-immunoprecipitation</i> (Co-IP) e espectrometria de massa.....	77
3.14 Análise estatística.....	80

4. RESULTADOS	81
4.1 Avaliação da expressão gênica da dineína e outros alvos em células tratadas com Amblyomin-X.....	81
4.2 Avaliação da expressão proteica da dineína, β -actina e NFKB1 em células tratadas com Amblyomin-X.....	89
4.3 Investigação da formação de agregossomos relacionados com a dineína em células tratadas com Amblyomin-X.....	94
4.4 Estudo do papel da dineína na via autofágica em células tratadas com Amblyomin-X.....	103
4.5 Sinalização <i>K-linkage</i> relacionada com a dineína em células tratadas com Amblyomin-X.....	118
4.6 Estudo do papel da dineína na endocitose do Amblyomin-X e na inibição do proteassomo nas células tumorais SK-MEL-28 e MIA PaCa2.....	121
4.7 Investigação do ligantes de dineína nas células tumorais SK-MEL-28 e MIA PaCa2 tratadas com Amblyomin-X.....	126
5. DISCUSSÃO	136
5.1 O Amblyomin-X modulou diferentemente os níveis de mRNA das cadeias de dineína, alvos do controle proteico e NF- κ B entre as linhagens tumorais e fibroblastos.....	136
5.2 O Amblyomin-X induziu aumento na expressão proteica de dineína e bloqueio da ativação de NF- κ B nas células tumorais mas não em fibroblastos.....	141
5.3 O Amblyomin-X induziu a formação de agregossomos de morfologia diferentes nas linhagens tumorais que foram transportados pela dineína pela via não-exclusiva de ubiquitinação.....	144
5.4 O Amblyomin-X induziu o bloqueio da ativação autofágica nas células tumorais envolvendo a participação da dineína na sinalização intracelular....	147
5.5 O Amblyomin-X induziu um aumento de proteínas poliubiquitinadas via K63 relacionadas a vias diferentes auxiliadas pela dineína entre as células tumorais e fibroblastos.....	151
5.6 A dineína é necessária para a inibição do proteassomo e internalização do Amblyomin-X que é transportado até o ERC.....	154

5.7 Os ligantes da dineína induzidos pelo tratamento com Amblyomin-X confirmaram hipóteses e revelaram possíveis vias intracelulares envolvidas no seu mecanismo de ação.....	158
6.	
CONCLUSÕES.....	174
REFERÊNCIAS.....	178
ANEXO I: Artigo "Dynein Function and Protein Clearance Changes in Tumor Cells Induced by a Kunitz-Type Molecule, Amblyomin-X"	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hematófagos e Amblyomin-X

Os hematófagos (carrapatos, sanguessugas, piolhos e etc) são animais que se alimentam de sangue e por isso necessitam inibir as reações locais do hospedeiro, do qual se alimentam, para manter o sangue fluido no seu próprio trato digestivo. Devido a essa necessidade eles desenvolveram em sua trajetória evolutiva uma diversidade de moléculas bioativas, presentes na saliva, com potencial uso terapêutico em doenças cardiovasculares, coagulação, fibrinólise e angiogênese (FRANCISCHETTI *et al.* 2009; HOVIUS *et al.* 2008).

O *Amblyomma cajennense*, conhecido como carrapato-estrela, pertence a família Ixodidae e é transmissor da febre maculosa provocada pela bactéria *Rickettsia rickettsi* (Principles and practice of infectious diseases, 4). Este pequeno artrópode hematófago tem sido investigado pelo nosso grupo de pesquisa. A partir da construção de uma biblioteca de *complementary deoxyribonucleic acid* (cDNA) de sua glândula salivar, foi identificado e expresso um transcrito (BATISTA *et al.* 2008) que codifica uma proteína caracterizada como inibidora de serino protease com um domínio tipo-Kunitz e propriedade anticoagulante, inibindo o *activated coagulation factor X* (FXa) na presença de fosfolípidos (BATISTA *et al.* 2010). Esta proteína de massa molecular de 13,5 kDa foi então denominada de ***Amblyomma cajennense*** inibidor do FXa (Amblyomin-X) (BATISTA *et al.* 2010).

O domínio Kunitz representa estruturas funcionais constituídas por resíduos de aminoácidos ligados por pontes dissulfeto que inibem a atividade enzimática das proteínas (BROZE JR e GIRARD 2013). Exemplos de inibidores de proteases tipo-Kunitz incluem proteínas como a aprotinina e o inibidor da coagulação endógeno humano *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) (BROZE JR e GIRARD 2013). Domínios Kunitz são estáveis e capazes de reconhecer estruturas protéicas específicas, funcionando como inibidores de proteases competitivos (BROZE JR e GIRARD 2013). Devido à essas características, são alvos de estudo para o desenvolvimento de drogas biofarmacêuticas. Um exemplo bem-sucedido é a molécula inibidora da caliceína, ecalantide, utilizada no tratamento de angioedema

hereditário (LEHMANN 2008).

Estruturalmente, o domínio tipo-Kunitz do Amblyomin-X, se assemelha ao do TFPI humano com aproximadamente 40% de similaridade (BATISTA *et al.* 2010). A representação da estrutura do Amblyomin-X recombinante e dos resíduos relevantes para a inibição do FXa está esquematizada na **Figura 1**.

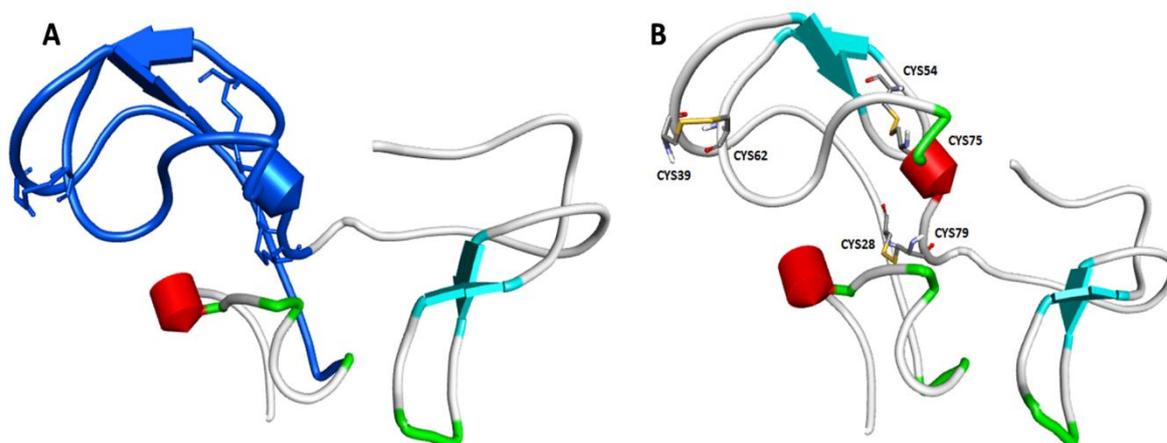


Figura 1 – Representação de Richardson da estrutura tridimensional do Amblyomin-X baseado nas coordenadas cartesianas da biconina humana. Código PDB 1BIK; resolução de 2,5Å: α -hélices em cilindros vermelhos, folhas- β em setas azul ciano e loops em tubos cinza e verde. **(A)** Região com similaridade pelo domínio tipo-Kunitz (azul escuro); **(B)** Resíduos de cisteína que estabelecem pontes dissulfeto estão demonstradas no modelo palito (átomos de enxofre em amarelo, oxigênio em vermelho e átomos de carbono em cinza; átomos de hidrogênio não estão demonstrados) (Discovery Studio v. 3.1; Accelrys Software Inc., 2005-2011).

1.2 Propriedades e estudos do Amblyomin-X

O Amblyomin-X descrito como inibidor do FXa (BATISTA *et al.* 2010), também apresentou inibição do complexo tenase *tissue factor/activated coagulation factor VII* (TF/FVIIa) (dados não publicados). Além disso, os efeitos na coagulação do Amblyomin-X são consideravelmente melhores na presença de fosfolípídeos (dados não publicados). Sabendo-se que o Amblyomin-X apresenta propriedades anticoagulantes, foi necessário levantar hipóteses de aplicações biofarmacêuticas dessa molécula em um possível uso clínico no futuro, não só em doenças relacionadas com distúrbios de coagulação, mas também em outras patologias que se relacionam com elas.

É de conhecimento científico que o câncer é uma doença com evolução duradoura e se caracteriza pelo desenvolvimento de uma massa tumoral que

representa a perturbação do processo normal e ordenado das células perdendo a capacidade de limitar e controlar seu próprio crescimento e assim, passam a se multiplicar sem nenhum controle (ANAND *et al.* 2008).

Dentre as diversas situações que podem gerar essa proliferação desenfreada, onde um fragmento dessa massa celular pode se deslocar para outra região do corpo, num processo denominado metástase; estão os fatores hereditários, químicos (ex: poluentes), físicos (radiação ultravioleta - UV) e biológicos (vírus), por exemplo (ANAND *et al.* 2008).

Neste cenário, sabe-se que pacientes com câncer apresentam pré-disposição ao fenômeno do estado de hipercoagulabilidade, levando à trombose e à coagulação intravascular disseminada (CIVD) (KASTHURI *et al.* 2009). Este fator é ocasionado principalmente pela liberação de TF dando início à ativação da cascata de coagulação e liberação de micropartículas contendo TF, além de desencadear uma sinalização intracelular mediada por um receptor do tipo *G protein-coupled receptor* (GPCR), o *protease activated receptor 2* (PAR2), que contribui para o crescimento tumoral e metástase (KASTHURI *et al.* 2009). A **Figura 2** a seguir, esquematiza alguns aspectos da relação entre câncer e coagulação.

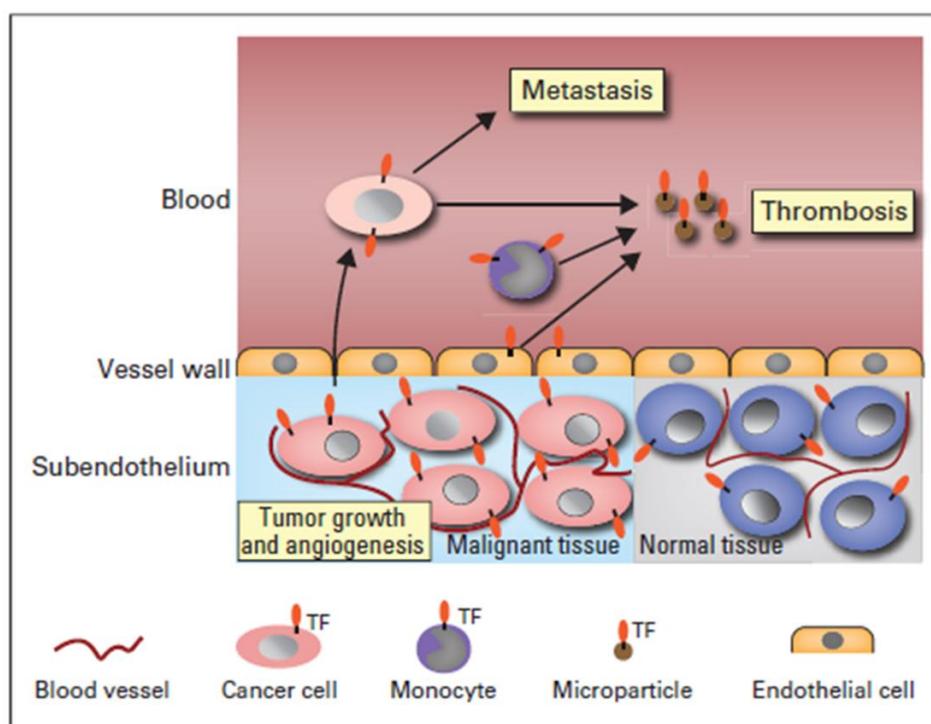


Figura 2 – Representação da interface coagulação-câncer. A interação entre os dois processos está ligada principalmente pela liberação de TF dos tumores. Fonte: KASTHURI *et al.* 2009.

Tendo em vista a interface entre coagulação e câncer e as propriedades anticoagulantes do Amblyomin-X, a proteína recombinante foi testada em diversas linhagens tumorais e normais. Foi demonstrado a habilidade desta molécula de exercer efeitos pró-apoptóticos em células tumorais humanas e murinas, não exercendo efeito citotóxico em linhagens normais ou não tumorais como por exemplo, fibroblastos humanos e murinos (NIH3T3) (AKAGI *et al.* 2012; CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010; VENTURA *et al.* 2013), *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs), melanócitos e células do sistema imune (dados não publicados). A proteína recombinante não apresentou toxicidade em órgãos como coração, cérebro e cerebelo, baço, rim, fígado e pulmão, em exames histopatológicos nos ensaios não clínicos (dados não publicados).

Além disso, a molécula apresentou atividade anti-angiogênica (DREWES *et al.* 2012) e regressão da massa tumoral e de metástases pulmonares em modelos de estudo de melanoma *in vivo* (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010; VENTURA *et al.* 2013). Em outro estudo, o Amblyomin-X foi ainda capaz de induzir produção de *reactive oxygen species* (ROS), *stress* no retículo endoplasmático ou *endoplasmic reticulum* (ER) e disfunção na mitocôndria em células de carcinoma renal murino (RENCA) (MARIA *et al.* 2013).

Foi realizado também, um estudo para avaliar se o Amblyomin-X poderia induzir a modulação da expressão de diversos genes, a fim de se obter um direcionamento para a investigação mais aprofundada de vias de sinalização intracelular desencadeadas pela molécula (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). Neste estudo, em análise por *microarray*, sobrepondo-se os dados entre as linhagens tumorais humanas: melanoma humano (SK-MEL-28) e adenocarcinoma de pâncreas humano (MIA PaCa-2), foi identificada a alteração de 24 genes comuns entre elas (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). Verificou-se com maior destaque o aumento da expressão do gene DYNC1LI2 que codifica a cadeia leve-intermediária 2 da dineína citoplasmática 1 ou *dynein cytoplasmic 1 light-intermediate chain 2* (LIC2) tanto na linhagem de melanoma quanto na linhagem de adenocarcinoma de pâncreas; e outro aumento significativo de expressão da subunidade catalítica $\beta 2$ do proteassomo 26S (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010).

A partir disso, foi analisado se a proteína recombinante poderia exercer alguma ação sobre o proteassomo e, de fato, comprovou-se uma inibição do

proteassomo através da modulação de suas atividades tipo tripsina ou *trypsin-like* (T-L) (preferencialmente) e tipo quimotripsina ou *chymotrypsin-like* (ChT-L) em ambas as linhagens tumorais, porém não ocorreu inibição de nenhuma atividade do proteassomo em fibroblastos normais humanos (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010).

A técnica de *microarray* é uma técnica de biologia molecular muito utilizada na genômica funcional em situações fisiológicas ou patológicas, que permite a análise de uma quantidade muito grande de genes de modo simultâneo. Esta técnica ocorre com a extração do *ribonucleic acid* (RNA) total da amostra que é convertido em cDNA com o auxílio da enzima transcriptase reversa, servindo de molde para a amplificação do alvo na presença de nucleotídeos marcados com fluoróforos, que é então hibridizado com o *deoxyribonucleic acid* (DNA) fixado nas lâminas de *microarray*. Ocorre então a ligação ou não às sondas dos *chips* se as sequências forem complementares e o sinal é quantificado através de um *scanner* com o auxílio de um *software* (GUINDALINE *et al.* 2007).

Considerando as duas linhagens tumorais citadas no estudo de *microarray*, sabe-se que o melanoma cutâneo é um tipo de tumor maligno sólido e origina-se nos melanócitos, que são células responsáveis pela produção de melanina, dando a pigmentação da pele. Estas células estão localizadas no tecido epitelial e o tumor relacionado caracteriza-se pela propensão à metástases e resistência aos tratamentos disponíveis atualmente, sendo o mais grave entre os tipos de câncer de pele (BOSCH *et al.* 2010; COCHRAN *et al.* 1997). Os fatores de risco envolvem a exposição aos raios UV, sendo o subtipo mais comum e menos agressivo de melanoma, o superficial, enquanto que o menos comum e mais agressivo é o acral lentiginoso (BOSCH *et al.* 2010; COCHRAN *et al.* 1997). Outros subtipos incluem o nodular, lentigo maligno e amelanocítico, diferindo nas características das lesões, malignidade e agressividade (BOSCH *et al.* 2010; COCHRAN *et al.* 1997).

O adenocarcinoma de pâncreas é o segundo tipo de tumor mais comum do trato gastrointestinal e o tipo de tumor maligno sólido mais comum do pâncreas, sendo uma doença letal, geralmente diagnosticada em uma fase avançada. Devido a sua resistência à quimioterapia e radioterapia, o tratamento é realizado através de remoção cirúrgica do tumor, aumentando a expectativa de vida de três a seis meses somente (NAWROCKI *et al.* 2004; SEUFFERLEN *et al.* 2012). Os fatores de risco incluem principalmente o tabagismo, além da obesidade e, geralmente, mas não

exclusivamente, ocorre na cabeça do órgão, sendo classificado de acordo com a histologia em: ductais (mais comum), papilares mucosos intraductais, cistoadenocarcinomas ou carcinoma de células acinares (NAWROCKI *et al.* 2004; SEUFFERLEN *et al.* 2012).

Recentemente, verificou-se que o Amblyomin-X foi internalizado pelo processo de endocitose a partir de 2 h de tratamento com maior intensidade após 24 h de tratamento pelas linhagens tumorais SK-MEL-28 e MIA PaCa-2, mas não em fibroblastos normais humanos (MORAIS 2014). A ocorrência da endocitose foi sugerida pela região de *lipid raft* (LR) (MORAIS 2014). Além disso, a proteína recombinante induziu *stress* no ER, aumento de cálcio (Ca^{2+}) intracelular e foi verificado a sua co-localização com a fração catalítica 20S do proteassomo, mas não foi identificado sua co-localização com lisossomos (MORAIS 2014). Além disso, o Amblyomin-X interagiu com o fosfolípido, *phosphatidylserine* (PS), e esta interação poderia possivelmente ocorrer por interações eletrostáticas entre as cargas positivas expostas o Amblyomin-X com as cargas negativas expostas da PS (dados não publicados). A proteína recombinante apresentou efeito citotóxico em fibroblastos somente quando microinjetada, sugerindo uma seleção pela membrana celular (MORAIS 2014).

A molécula já se encontra na fase de ensaios não-clínicos e possui patente depositada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), licenciada para a empresa União Química Farmacêutica Nacional, com o depósito protegido pelo *Patent Cooperation Treaty* (PCT). A sequência nucleotídica da proteína recombinante está depositada no *Genbank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sob o número de acesso AAT68575. Com base no histórico apresentado desta proteína, pode-se verificar que é, portanto, inicialmente, uma molécula candidata promissora ao tratamento de tumores malignos sendo supostamente o seu alvo principal, o sistema proteassomo (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010).

1.3 O proteassomo e o controle de qualidade proteico intracelular

A célula tumoral apresenta diversas estruturas e vias de sinalização para manter a massa tumoral e a capacidade de proliferação, sobrevivência e metástase.

Essas propriedades são alcançadas por uma diversidade de fatores, que incluem por exemplo, supressão de receptores de morte (DEBATIN e KRAMMER 2004), indução de sinalização envolvendo fatores de crescimento (VENERE *et al.* 2013), propriedades pró-coagulantes (DONATI e SEMERARO 1984), ativação da via *nuclear factor kappa B* (NF-κB) (HOESEL e SCHMID 2013), e aumento da atividade proteassomal (CHEN e MADURA 2005; REN *et al.* 2000). O proteassomo se tornou um alvo potencial para agentes quimioterápicos (ALMOND e COHEN 2002) devido a sua capacidade de regular diversos processos intracelulares como o ciclo celular (BASSERMANN *et al.* 2014) e a proteólise de componentes da via NF-κB (COHEN *et al.* 2006).

Sendo o Amblyomin-X atuante no sistema proteassomo, é necessário o correto entendimento desse sistema no controle de qualidade proteico intracelular. Proteínas intracelulares necessitam de um 'dobramento' (*foldings*) correto para atingir uma conformação ideal que garanta a sua atividade biológica e esse processo é realizado por outras proteínas denominadas chaperonas e proteínas adaptadoras denominadas chaperoninas (EVSTIGNEEVA *et al.* 2001). Proteínas que não foram dobradas (*unfolded*), proteínas dobradas incorretamente (*misfolded*), proteínas nascentes defeituosas, proteína 'velhas', proteínas biologicamente ativas que necessitam ser recicladas e proteínas reguladas em processos celulares são destinadas à degradação intracelular (RODRIGUEZ-GONZALEZ *et al.* 2008).

Os polipeptídeos nascentes do ER, caso não sejam dobrados corretamente ou a capacidade de *foldings* do ER por chaperonas e chaperoninas esteja excedida, podem se acumular na própria organela ativando um mecanismo de resposta denominado *Unfolded Protein Response* (UPR) que é executado por proteínas de degradação associadas ao ER - *Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation* (ERAD) para degradação proteica (RODRIGUEZ-GONZALEZ, *et al.* 2008). Esta ação realizada pela organela é uma medida protetora e resulta em atenuação da tradução de proteínas e *upregulation* de chaperonas e de enzimas que realizam o *foldings* e são atuantes na degradação ERAD (LEE 2007).

Caso as proteínas não consigam ser reparadas pelo UPR ou o ER esteja sofrendo *stress* por algum estímulo, elas são submetidas à degradação proteassomal (RODRIGUEZ-GONZALEZ *et al.* 2008). No entanto, o *stress* do ER também pode ser causado por uma prévia inibição proteassomal e caso o *stress* do

ER seja prolongado, a célula inicia o processo de morte celular programada ou apoptose. (FRIBLEY *et al.* 2004). O esquema da **Figura 3** a seguir, exemplifica o destino do polipeptídeo dentro do ER.

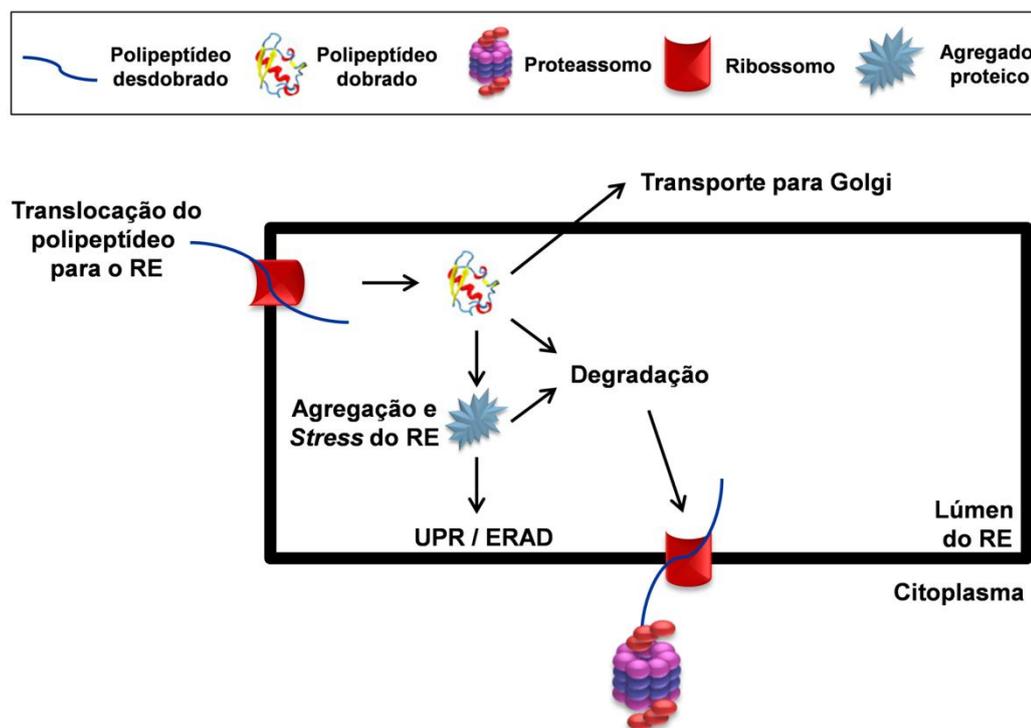


Figura 3 – Representação do *fold*ing e destino do polipeptídeo dentro do ER. O polipeptídeo nascente, caso alcance um *fold*ing correto proporcionado pelas chaperonas e chaperoninas, é transportado em vesículas para o Golgi. Caso ele não alcance a conformação ideal (*unfolded e misfolded*), é destinado à degradação, ativando o UPR através de ERADs, que caso não seja suficiente, é dirigido ao proteassomo.

O sistema celular *adenosine triphosphate* (ATP)-dependente ubiquitina-proteassomo - *Ubiquitin-Proteasome System* (UPS), é responsável pela degradação da maioria das proteínas intracelulares. (CHEN e MADURA 2005; GLICKMAN *et al.* 2002; REN *et al.* 2000). Esse sistema além de regular o controle de qualidade proteico intracelular, tem participação ativa em outros processos, como no ciclo celular, por exemplo, regulando a degradação das proteínas componentes dessa via (BASSERMANN *et al.* 2014; GLICKMAN *et al.* 2002) e também na ativação, por exemplo, da subunidade NFκB1 (proteólise de p105 em p50) do fator de transcrição NF-κB (COHEN *et al.* 2006; LIN *et al.* 1998), além da degradação do seu inibidor natural, o *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, alpha* (IκBα) (ALKALAY *et al.* 1995).

O NF-κB é um fator de transcrição composto por cinco subunidades: (i)

NFKB1 (p105/p50), (ii) NFKB2 (p100/p52), (iii) RelA (p65), (iv) RelB e (v) c-Rel. Para exercer sua atividade, é necessário a união de 2 subunidades em dímeros, sendo que o heterodímero composto pela fração ativa de NFKB1 (p50), gerada pelo proteassomo (COHEN *et al.* 2006; LIN *et al.* 1998), e a subunidade p65, é o mais abundante e envolvido no maior número de funções em quase todos os tipos celulares (BALDWIN JR 1996).

O proteassomo é um complexo proteico multimérico com diversas subunidades e a forma mais abundante é o proteassomo 26S que pode representar cerca de até 1% das proteínas intracelulares totais e ser responsável pela proteólise de até 80% delas (GLICKMAN *et al.* 2002; RUSCHAK *et al.* 2011). O 26S reconhece proteínas ubiquitinadas e é formado pela fração catalítica 20S e as frações regulatórias 19S, que formam a 'tampa' e a 'base' do complexo, e está presente tanto no núcleo quanto no citoplasma das células eucariontes (GLICKMAN *et al.* 2002).

Este complexo sistema apresenta diferentes atividades peptidásicas (quebra da ligação peptídica) através de subunidades específicas e são classificadas em: ChT-L, T-L e tipo pós-glutamil hidrolase ou caspase (GLICKMAN *et al.* 2002). A fração catalítica 20S é composta por 7 anéis α e sete anéis β , onde a atividade peptidásica se dá por 3 subunidades β que possuem resíduos proteolíticos de treonina N-terminal que são considerados como sítio ativo (GLICKMAN *et al.* 2002). A atividade ChT-L da subunidade β 5, cliva após resíduos de aminoácidos hidrofóbicos; a atividade T-L (β 2), cliva após resíduos básicos; e a tipo pós-glutamil hidrolase ou caspase (β 1) cliva após resíduos ácidos (RUSCHAK *et al.* 2011).

A proteólise no proteassomo, então, ocorre pela ligação de moléculas de ubiquitina ao substrato proteico, sinalizando a degradação pelo UPS. A ubiquitina é uma proteína presente em todas as células eucariontes e é codificada na forma de precursores por diversos genes. O processo conhecido por ubiquitinação ocorre pela atuação de enzimas específicas denominadas: ativadoras (E1), conjugadoras (E2) e ligases (E3) (GLICKMAN *et al.* 2002). O primeiro passo da ubiquitinação ocorre quando uma enzima E1 forma uma ligação tio-éster com a glicina (G76) no C-terminal da ubiquitina num processo ATP-dependente (GLICKMAN *et al.* 2002, WONG *et al.* 2010). No próximo passo, enzimas E2 recebem a ubiquitina ativada de E1 através de uma reação de transtilação. Posteriormente, uma enzima E3 liga-se

diretamente à E2 e transfere a ubiquitina ativada da E2 para o substrato, que tem como consequência, a formação de uma ligação peptídica entre uma lisina (K) da proteína-alvo e o C-terminal da ubiquitina (GLICKMAN *et al.* 2002; WONG *et al.* 2010).

A ubiquitinação assim como o processo de fosforilação é uma importante via de sinalização e ocorre através dos resíduos K expostos (*K linkage*) nas posições 6, 11, 27, 29, 33, 48, 63 (mono ou poliubiquitinação homogênea) da molécula de ubiquitina. Esta sinalização também se dá por cadeias lineares ou também ubiquitinação heterogênea por ligação misturada ou ramificada (GARCIA-MATA *et al.* 2002; WONG *et al.* 2010).

A poliubiquitinação homogênea, é amplamente estudada, sendo que a sinalização K48 (*K48 linkage*), por exemplo, é específica para a degradação proteossomal, enquanto que a sinalização K63 ocorre de maneira não-específica e sinaliza para a via de formação de agregossomos, via autofágica, endocitose, reparo de DNA e também sinalização intracelular, por exemplo, da via NF- κ B e *I κ B Kinase* (IKK), (GARCIA-MATA *et al.* 2002; LAPLANTINE *et al.* 2009; WONG *et al.* 2010). Nessa via, componentes da cascata NF- κ B são ativados pela sinalização K63 como a quinase *receptor-interacting protein 1* (RIP1) e a fração γ do complexo IKK (IKK γ), também denominada *NF- κ B essential modulator* (NEMO) a fim de ativar o complexo NF- κ B (LAPLANTINE *et al.* 2009). A **Figura 4** esquematiza as possibilidades de ubiquitinação.

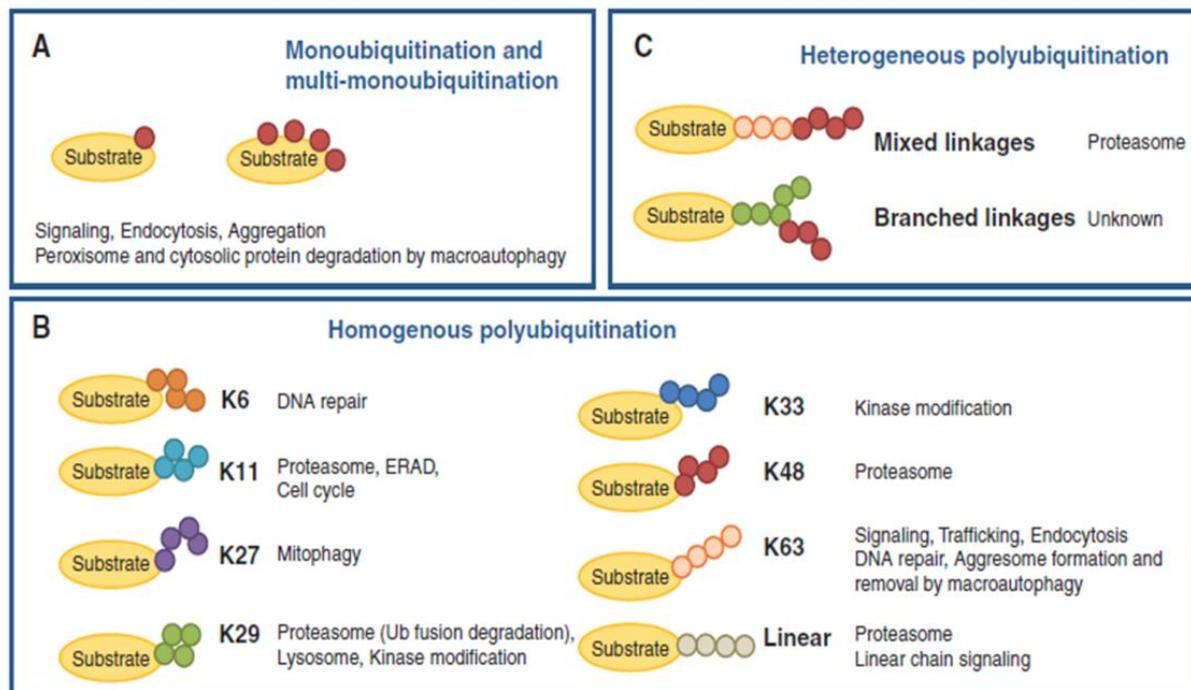


Figura 4 – Representação das possibilidades de ubiquitinação relacionados à eventos intracelulares. (A) Mono e multi-mono ubiquitinação; (B) Poliubiquitinação homogênea e (C) Poliubiquitinação heterogênea. Fonte: GARCIA-MATA *et al.* 2002.

A fração 19S do proteassomo 26S é composto por diversas subunidades regulatórias denominadas *Regulatory particle non-ATPase* (Rpn) (1 a 3, 5 a 13 e 15) e *Regulatory particle triple-A ATPase* (Rpt) - membro da família de proteínas *ATPases associated with diverse cellular activities* (AAA) (WONG *et al.* 2010). As subunidades *26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10* (Rpn10) e *26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13* (Rpn13) atuam como receptores de ubiquitina e a subunidade *26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11* (Rpn11) é uma enzima *deubiquitinase* (DUB) com atividade essencial que atua na remoção de ubiquitina via resíduo de lisina na posição 48 da molécula de ubiquitina (K48) (LANDER *et al.* 2012). Enzimas que catalisam a retirada de ubiquitina das proteínas, interrompendo a sinalização, são denominadas DUBs e atuam de forma específica através da ligação de moléculas de ubiquitina por resíduos de lisina em posições específicas (*K-linkage*) e domínios proteicos específicos (KOMANDER *et al.* 2009).

Assim, um mínimo de 4 moléculas de ubiquitina ligados via K48 é necessário para a degradação eficiente do substrato e uma segunda enzima DUB, não-essencial, denominada *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 6* (Ubp6), pode ser recrutada para a base e se localizar no poro central para a remoção de moléculas de

ubiquitina que estão em excesso (LANDER *et al.* 2012). As *regulatory particle triple-A ATPase* (Rpt) atuam no desdobramento (*unfolding*) do substrato e translocação para a poro central (LANDER *et al.* 2012). A estrutura completa do proteassomo 26S encontra-se esquematizada na **Figura 5**.

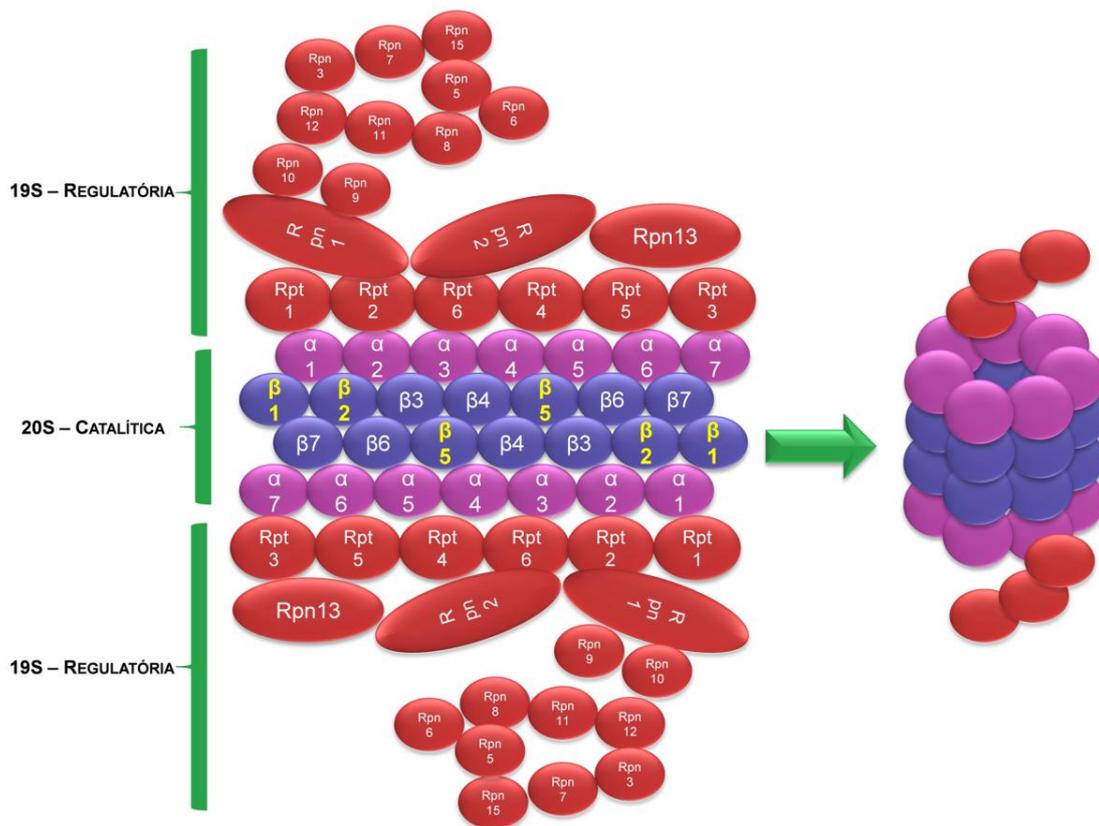


Figura 5 – Representação das subunidades do proteassomo 26S. As porções contendo subunidades em vermelho são regulatórias, enquanto que a porção contendo subunidades α (pink) e β (azul) é catalítica. Em amarelo estão destacadas as subunidades com atividade peptidásicas.

No entanto, caso o proteassomo esteja inibido por algum estímulo, ocorre a formação de agregados proteicos no citoplasma que são então organizados em estruturas dinâmicas denominados agregossomos e transportados até uma região perinuclear denominada *Microtubule Organizing Center* (MTOC), também conhecido como centrossomo (GARCIA-MATA *et al.* 2002; YAO *et al.* 2010). Este transporte é realizado por um motor molecular que é um complexo proteico denominado dineína, sendo o transporte realizado através de uma rede de microtúbulos (MT) (GARCIA-MATA *et al.* 2002; YAO *et al.* 2010).

A célula possui outro mecanismo especializado de depuração das proteínas no caso de inibição proteassomal, denominado autofagia. Posteriormente à

formação de agregossomos, ocorre recrutamento de membrana autofágica através de uma série de reações que incluem a família das proteínas *autophagy related genes* (Atg) e da proteína *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (LC3) que é uma *microtubule associated protein* (MAP) (YAO *et al.* 2010). Esta membrana pode ser proveniente da membrana plasmática, ER, Golgi, mitocôndria ou até mesmo de endossomos e lisossomos. Uma vez recrutada, a membrana autofágica dá origem aos autofagossomos, que por sua vez também são transportados pela dineína (YAO *et al.* 2010). O próximo passo envolve a fusão dos autofagossomos contendo os agregossomos, com os lisossomos, que mais uma vez, são transportados pela dineína para eliminação do conteúdo proteico não necessário à célula, pela via da autofagia (YAO *et al.* 2010).

Vários estudos tem demonstrado que o sistema ubiquitina-proteassomo tem ligação tanto com a morte celular por apoptose quanto com a ativação das caspases (DREXLER *et al.* 2000). Sendo assim, muitas drogas relacionadas com o controle de qualidade proteico intracelular se tornaram auxiliares no estudo de mecanismo de ação de novas moléculas, principalmente antitumorais.

Essas drogas auxiliares incluem: (i) *carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal* (MG-132), que é um inibidor de proteassomo 26S, pela inibição da atividade tipo quimotripsina (CHEN *et al.* 2011), (ii) cicloheximide (CHX), que é um inibidor de síntese proteica em eucariotos (DENIAUD *et al.* 2008), que bloqueia a tradução do *messenger ribonucleic acid* (mRNA) no ribossomo 80S citosólico (OBRIG *et al.* 1971) e (iii) rapamicina, que é um inibidor do complexo quinase *mammalian target of rapamycin* (mTOR), responsável pela regulação negativa (*feedback* negativo) da autofagia (BROWN *et al.* 1994).

1.4 A formação de agregossomos e a depuração autofágica

Em um cenário envolvendo uma inibição proteassomal, a agregação proteica formada e não depurada promove desorganização do citoesqueleto, *stress* do ER e ativação de vias de apoptose (LEE 2007). O ER quando estressado por um estímulo, libera cálcio (Ca^{2+}) de seus compartimentos e acumula Ca^{2+} mitocondrial, que ativa uma cascata de eventos pró-apoptóticos como transição de permeabilidade, dissipação do potencial eletroquímico, expansão da matriz,

relocalização de *Bcl-2-associated X protein* (Bax), que é uma proteína pro-apoptótica; e liberação de citocromo C e de *apoptosis-inducing factor* (AIF) da mitocôndria (DENIAUD *et al.* 2008). Sendo assim a morte celular programada é desencadeada.

A principal via de formação de agregossomos ocorre através de ubiquitinação pelo K63 *linkage* (via exclusiva de ubiquitinação), onde a enzima ubiquitinante E2, *ubiquitin-conjugating enzyme E2N* (Ubc13), em conjunto com a enzima variante E2, *enzyme variant 1a* (Uev1a) e a E3, *carboxy terminus of Hsp70-interacting protein* (CHIP), por exemplo, realizam a poliubiquitinação pelo resíduo de lisina na posição 63 da molécula de ubiquitina (BEDFORD *et al.* 2010). O substrato ubiquitinado desta forma é ligado a molécula *histone deacetylase 6* (HDAC6) que irá ser reconhecida e transportada pelo complexo de dineína para o MTOC, onde as partículas de agregados proteicos ligadas ao complexo, se acumulam formando o agregossomo (RODRIGUEZ-GONZALEZ *et al.* 2008). O HDAC6 é a única molécula do grupo das histonas que deacetila outras moléculas além das próprias histonas, como a tubulina, por exemplo (RODRIGUEZ-GONZALEZ *et al.* 2008).

A outra via de formação de agregossomos (via não-exclusiva de ubiquitinação) ocorre com o auxílio da proteína *Bcl-2 associated athanogene 3* (Bag3), molécula descrita como proteína com atividade anti-apoptótica, em uma via independente de ubiquitinação (GAMERDINGER *et al.* 2010). Esta molécula direciona substratos da chaperona da família das *heat shock proteins*, preferencialmente da *70-kDa heat-shock protein* (Hsp70), que podem ou não estar ubiquitinados, e assim, interagindo com o motor molecular de dineína para o transporte até o MTOC (GAMERDINGER *et al.* 2010). A **Figura 6**, esquematiza as duas vias de formação de agregossomos após inibição proteassomal.

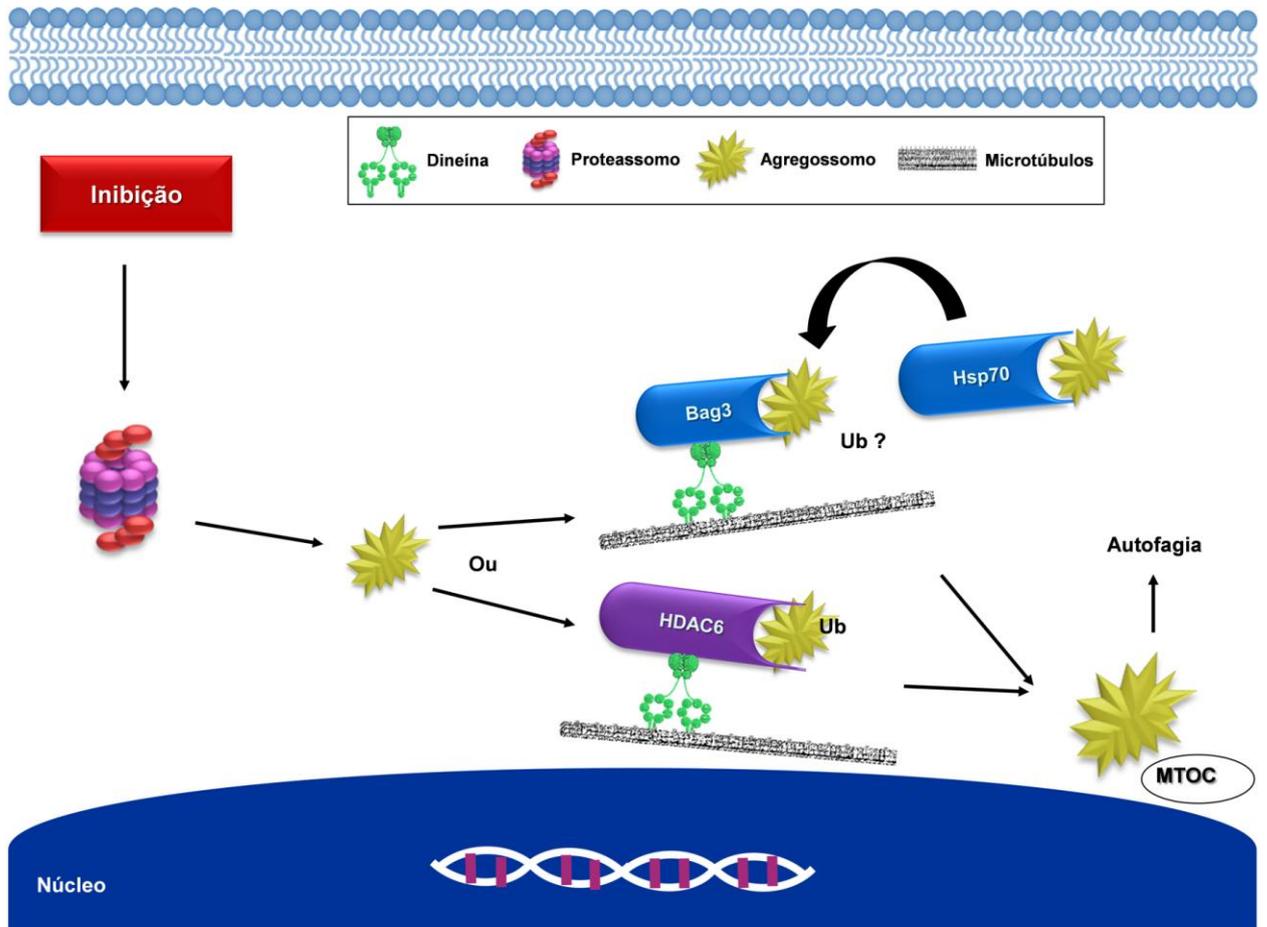


Figura 6 – Representação das vias de formação de agregossomos. Após a inibição proteassomal, os agregossomos formados são transportados pela via exclusiva de ubiquitinação mediada pela proteína HDAC6 ou pela via não-exclusiva de ubiquitinação mediada pela transferência do substrato da Hsp70 para a proteína Bag3, até o MTOC, pela dineína. Ub representa a molécula de ubiquitina.

Além disso, uma proteína da família *mitogen activated protein kinase* (MAPK), a *MAPK/ERK kinase kinase 1* (MEKK1), foi descrita como uma molécula de atuação importante na sinalização de agregossomo transportado pela dineína ao contribuir no recrutamento das partículas contendo agregados proteicos em um mecanismo ainda não elucidado, porém, independente de sua ação fosforilante (GARCIA-MATA *et al.* 2002).

De modo interessante, os agregossomos possuem diferenças quanto à sua forma. Eles podem apresentar um formato do tipo esférico ou um formato do tipo em fitas (GARCIA-MATA *et al.* 2002). Ambos podem ser compostos por diferentes substratos como, proteínas transmembrana, proteínas citosólicas e proteínas secretórias. A estrutura, portanto, varia em função da composição proteica do agregossomo formado e do tipo celular (GARCIA-MATA *et al.* 2002).

Uma vez formado o agregossomo, o passo posterior é a depuração dessas estruturas pela via da autofagia. Nesse processo, o primeiro evento é a iniciação, onde ocorre a formação de autofagossomo, gerado a partir de uma membrana preexistente que se inicia pelo desprendimento da molécula LC3 do MT, que é convertida à sua forma ativa (LC3-I em LC3-II) (FIMIA *et al.* 2011; MIZUSHIMA *et al.* 2004; YAO *et al.* 2010). Essa ativação se dá pela conjugação de *phosphatidylethanolamine* (PE) da forma não conjugada LC3-I a fim de formar a molécula ativa conjugada com PE (LC3-II) (FIMIA *et al.* 2011; MIZUSHIMA *et al.* 2004; YAO *et al.* 2010). A conjugação ocorre com o auxílio de moléculas da família *autophagy related genes* (Atg) a fim de promover a iniciação e alongação da membrana autofágica (FIMIA *et al.* 2011; MIZUSHIMA *et al.* 2004; YAO *et al.* 2010).

Durante este processo também ocorre a participação de importantes proteínas como *activating molecule in Beclin-1-regulated atophagy* (AMBRA1), *coiled-coil myosin-like Bcl-2 interacting protein* (Beclin-1) e *vacuolar protein sorting 34* (Vps34) (FIMIA *et al.* 2011; MIZUSHIMA *et al.* 2004). O Vps34 é também a única proteína *phosphatidylinositide 3-kinase* (PI3K) de classe III conhecida (FOSTER *et al.* 2003). Estas moléculas estão envolvidas na formação de um complexo organizado denominado *core* (AMBRA 1-Beclin 1-VPS34), que deve se desprender da dineína, onde normalmente fica retido no citoplasma ou núcleo pelas cadeias *dynein light chain LC8-type 1* (LC8-1) e *dynein light chain LC8-type 2* (LC8-2), através de AMBRA1, para a geração da dupla membrana autofágica nos eventos de iniciação e alongação da membrana (FIMIA *et al.* 2011).

Este desprendimento ocorre através de diversas reações de fosforilação, onde um complexo serina/treonina quinase, *autophagy-related protein 1 homolog* (ULK1), realiza a reação de fosforilação do *core*, desprendendo o complexo da dineína (FIMIA *et al.* 2011). O complexo ULK1 também pode ser inibido pela porção mTORC1 do complexo mTOR, quando a autofagia não está induzida (FIMIA *et al.* 2011).

A proteína serina/treonina quinase, mTOR, é altamente conservada em eucariotos, atuando na regulação da homeostasia celular através da coordenação do metabolismo, autofagia e dos processos de transcrição gênica e tradução de proteínas, quando há disponibilidade de aminoácidos, fatores de crescimento, ATP e oxigênio (PARKHITKO *et al.* 2014; THOREEN *et al.* 2009). Dois complexos

compõem mTOR quinase; o mTORC1 e mTORC2 (PARKHITKO *et al.* 2014; THOREEN *et al.* 2009). Ambos os complexos contém a proteína mTOR mas diferem em algumas outras proteínas componentes de cada complexo, como por exemplo, *regulatory-associated protein of mTOR* (Raptor), componente de mTORC1 e, *rapamycin-insensitive companion of mTOR* (Rictor), componente de mTORC2 (PARKHITKO *et al.* 2014; THOREEN *et al.* 2009).

Enquanto que, mTORC1 está relacionado à autofagia, metabolismo, transcrição e tradução; mTORC2 está relacionado à apoptose e organização do citoesqueleto, através da estimulação de F-actina e outras proteínas envolvidas na transdução de sinal intracelular (PARKHITKO *et al.* 2014; THOREEN *et al.* 2009).

Além disso, outro estudo demonstrou que o complexo dineína pode transportar o complexo mTOR até sua localização intracelular ideal para exercer a sua atividade e consequente regulação negativa da autofagia (CLIPPINGER e ALWINE 2012). O mTOR ainda, pode ser encontrado no citoplasma ou próximo a membrana celular, mas também no núcleo das células, atuando na regulação da transcrição gênica (TSANG *et al.* 2010).

Após os eventos de iniciação e alongação, o autofagossomo passa pelo evento do fechamento e passa a conter somente as moléculas LC3 e é então recrutado pela molécula *nucleoporin p62* (p62), sendo também transportado até o MTOC pela dineína (FIMIA *et al.* 2011).

Curiosamente, as cadeias leves LC8-1 e LC8-2 da dineína podem ainda ligar o fator pró-apoptótico *Bcl-2-like protein 11* (Bim) da família BCL-2 de proteínas com domínio *Bcl-2 homology domain 3* (BH3). Esta proteína apresenta também uma função inibitória da autofagia, recrutando a molécula Beclin-1 e por sua vez o core AMBRA 1-Beclin 1-VPS34 à dineína (LUO *et al.* 2012) ligando AMBRA1 também às cadeias LC8-1 e LC8-2 (DI BARTOLOMEO *et al.* 2010), revelando um *crosstalk* entre os processos de autofagia e apoptose. Assim, uma vez ligada à dineína (DAY *et al.* 2004), permanece sequestrada e, portanto, inativa com relação à sua função pró-apoptótica que induziria a apoptose iniciada na mitocôndria de uma maneira dependente da ativação de Bax e *Bcl-2 homologous antagonist killer* (Bak) (LUO e RUBINSZTEIN 2013).

O passo final da autofagia é a fusão do lisossomo com o autofagossomo, que ocorre com o auxílio de citoesqueleto de F-actina (forma filamentosa de diversas

actinas globulares – actina G) (LEE *et al.* 2010), além do auxílio de p62 que facilitou o recrutamento de membrana autofágica previamente (SU *et al.* 2007). As actinas G (globulares) e F (filamentosas) são formas citoplasmáticas da β -actina em células não musculares (SU *et al.* 2007).

Para ocorrer o encontro do autofagossomo com o lisossomo, o complexo dineína transporta, através dos MT, tanto o autofagossomo (livre ou envolvendo os agregossomos) quanto o lisossomo até o MTOC, onde ocorrerá a fusão com o auxílio do citoesqueleto de F-actina (KIMURA *et al.* 2008). O processo autofágico está representado na **Figura 7**.

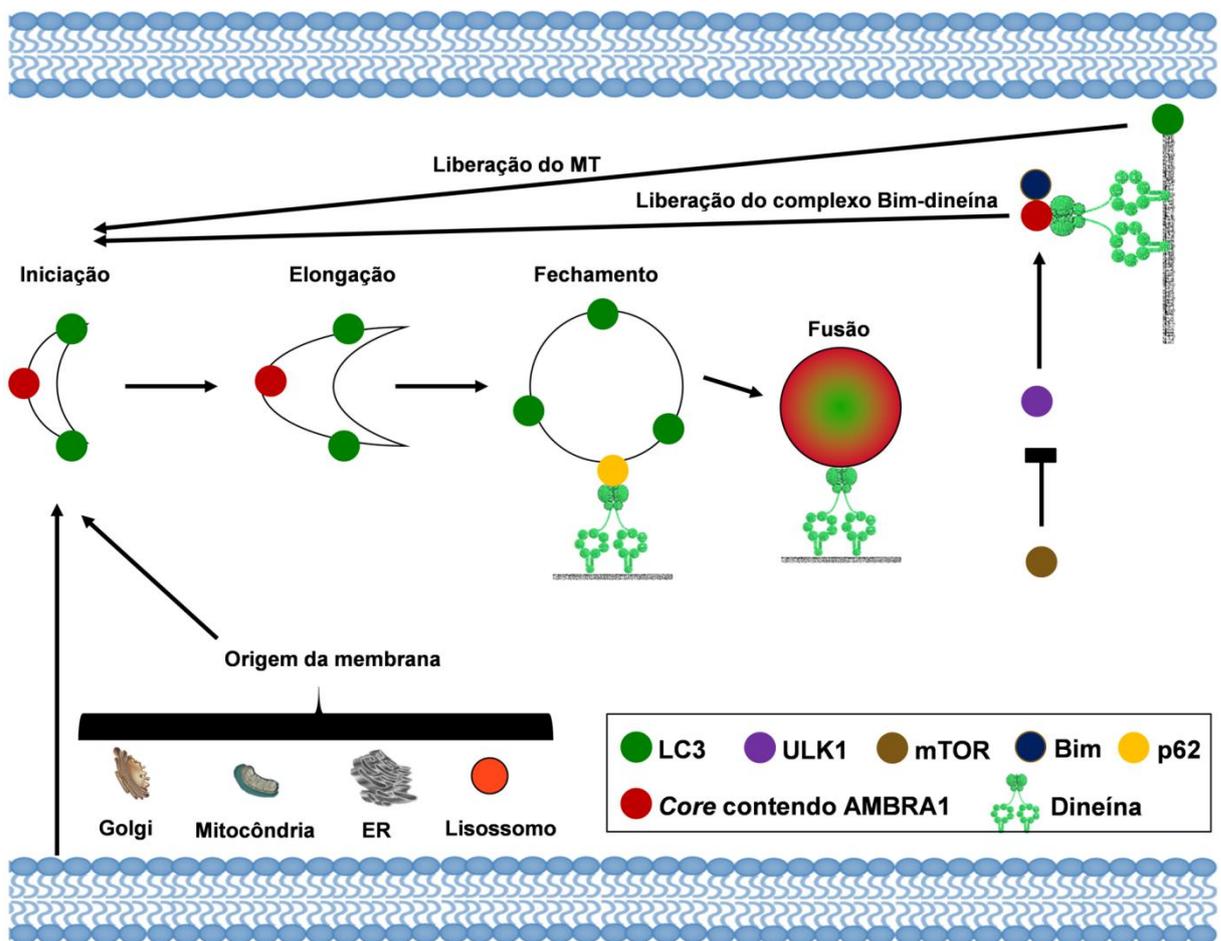


Figura 7 – Representação da depuração autofágica. O desprendimento do core da dineína, regulado por ULK1 e o de LC3 dos MT, dá início à formação da membrana autofágica que, após seu fechamento é recrutada por p62 e transportada pela dineína para o encontro com o lisossomo, também transportado pela dineína. mTOR realiza a regulação negativa do processo.

1.5 O citoesqueleto e os motores moleculares

Para que os processos de transporte de organelas, vesículas e proteínas ocorram, a célula se utiliza de proteínas motoras ou motores moleculares que se deslocam através de 'trilhos' celulares, presentes no citoesqueleto da célula composto por: MT, microfilamentos de actina, filamentos intermediários ou *intermediate filaments* (IF) e os motores moleculares (AMOS *et al.* 1999; SCHLIWA e WOEHLKE, 2003). O primeiro desses artefatos é uma rede composta de MT. Os MT são estruturas dispersas pelo citoplasma e possuem suas paredes formadas por proteínas globulares, as tubulinas, que são heterodímeros compostas pelas subunidades α e β , além de proteínas microtubulares associadas, MAP. Os MT também constituem estruturas como centríolos e o fuso mitótico sendo lábeis e transitórios, mas também constituintes de cílios e flagelos, sendo muito estáveis nessas estruturas (AMOS *et al.* 1999). Além disso, os MT apresentam polaridade, possuindo uma extremidade denominada mais e outra menos (AMOS *et al.* 1999).

A extremidade mais aponta para a periferia da célula, no sentido do núcleo para a membrana plasmática. A extremidade menos parte de uma região que a estabiliza, o MTOC (ou sentido do núcleo) para a membrana plasmática. Esses centros (MTOC) são centrossomas, correspondentes ao local do citoplasma que contém os centríolos (envolvidos na formação do fuso) (AMOS *et al.* 1999). Para que ocorra a movimentação bidirecional pelos microtúbulos, as tubulinas se polimerizam ou despolimerizam (AMOS *et al.* 1999).

As proteínas motoras envolvidas no transporte de carga celular pela rede de MT são as dineínas e a cinesinas, que são ATP-dependente (VALE *et al.* 2003). Elas transportam organelas, proteínas e vesículas ao longo dos microtúbulos sendo que, as dineínas se deslocam no sentido menos (MTOC) e a cinesinas no sentido mais (membrana plasmática) dos MT (REESE *et al.* 2000; SCHLIWA e WOEHLKE, 2003; VALE *et al.* 2003). Sendo assim, o transporte realizado pelas dineínas é chamado de retrógrado, enquanto que o das cinesinas é denominado de anterógrado (REESE *et al.* 2000; SCHLIWA e WOEHLKE, 2003; VALE *et al.* 2003).

As dineínas são grandes complexos proteicos direcionados à extremidade menos dos MT, com diversos polipeptídeos associados e são classificadas em axonemal e citoplasmática. A dineína axonemal está presente em cílios e flagelos, contribuindo no batimento dos mesmos, enquanto que a dineína citoplasmática é dividida em 1 e 2. (VALE *et al.* 2003). A dineína citoplasmática 2 está presente dentro

e em volta da base de cílios e flagelos, envolvida no transporte intraflagelar, enquanto que a dineína citoplasmática 1 é a mais abundante, encontrada em todas as células que possuem MT e envolvida em um grande número de processos intracelulares (VALE *et al.* 2003).

As cinesinas são motores moleculares direcionados à extremidade mais dos MT, sendo nos mamíferos, cerca de 40 proteínas divididas em 14 famílias, denominadas cinesina-1 até cinesina-14 (HIROKAWA *et al.* 2009; SCHLIWA e WOEHLKE, 2003). A cinesina-1, por exemplo, está envolvida no transporte de organelas, enquanto que a cinesina-2 está envolvida no transporte de complexos proteicos no axonema durante a biogênese ciliar (HIROKAWA *et al.* 2009; SCHLIWA e WOEHLKE, 2003).

O segundo artefato celular para o transporte de cargas, é uma rede composta por microfilamentos de actina (LEE *et al.* 2010; SELLERS 2000; SU *et al.* 2007). A actina é uma proteína globular, componente do citoesqueleto e também do aparato contrátil em células musculares (LEE *et al.* 2010; SELLERS 2000; SU *et al.* 2007). A isoforma da actina componente do citoesqueleto pode ser tanto a β -actina quanto a γ -actina, sendo a β -actina envolvida em maior número de funções celulares (SU *et al.* 2007). Nesse caso, a forma citoplasmática globular (G) da actina do citoesqueleto (β ou γ) se polimeriza para formar a actina filamentosa (F) e, assim, os microfilamentos de actina (SU *et al.* 2007). Existe ainda, a isoforma α da actina (α -actina), sendo esta, encontrada em tecidos musculares e componente do do aparato contrátil (SU *et al.* 2007).

Os motores moleculares envolvidos no transporte de carga celular ao longo de microfilamentos de actina são as proteínas ATP-dependente, miosinas (SELLERS 2000; SCHLIWA e WOEHLKE, 2003). A família das proteínas miosinas está dividida em 15 classes, sendo a IV e a XII, compostas de apenas um membro (SELLERS 2000; SCHLIWA e WOEHLKE, 2003). A miosinas I, por exemplo, estão envolvidas no transporte de vesículas, enquanto que as miosinas II ou miosinas convencionais, são responsáveis pela contração do músculo nas células musculares (SELLERS 2000; SCHLIWA e WOEHLKE, 2003).

O último componente do citoesqueleto são os IF. Eles São estruturas filamentosas compostas de proteínas α -hélice presentes no citoplasma e núcleo das células eucariontes, insolúveis, conectando as organelas, membrana plasmática e o

núcleo (COULOMB e WONG 2004). São divididos em 6 classes, onde por exemplo, na classe III, se encontra a proteína vimentina (COULOMB e WONG 2004), que auxilia, por exemplo, na sustentação de agregossomos (GARCIA-MATA *et al.* 2002). Os motores moleculares, portanto, podem se 'comunicar' entre os MT, IF e microfilamentos de actina para o transporte de cargas intracelulares (SCHLIWA e WOEHLKE, 2003). A **Figura 8**, a seguir, esquematiza o movimento dos motores moleculares dentro da célula e as interações entre eles.

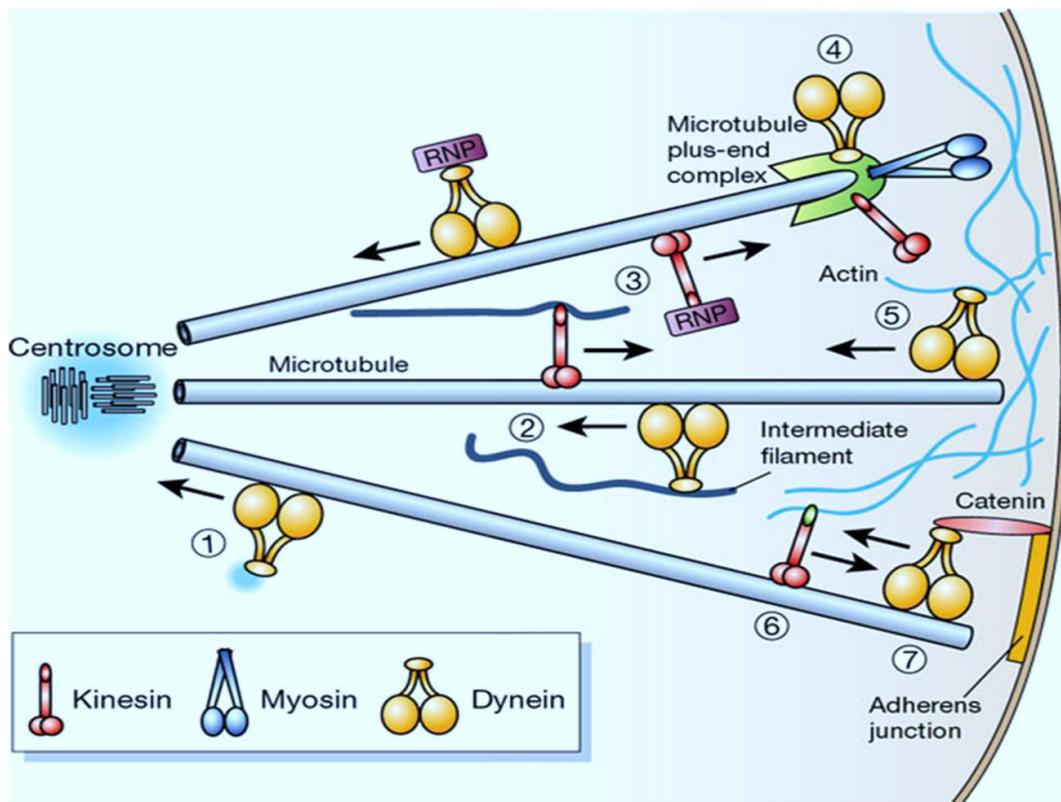


Figura 8 – Representação do movimento dos motores moleculares dentro da célula. As dineínas se deslocam no sentido menos do MT e as cinesinas no sentido mais, enquanto que as miosinas se deslocam pelos microfilamentos de actina. Fonte: SCHLIWA e WOEHLKE, 2003.

1.6 A dineína citoplasmática 1 e seus reguladores

A dineína citoplasmática 1, forma mais abundante das dineínas, é uma enorme proteína constituída de duas cadeias pesadas idênticas e uma variedade de cadeias leves, leves-intermediárias e intermediárias. A cadeia pesada *dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1* (HC1), forma uma cabeça globular grande que atua como força motriz (VALE *et al.* 2003). Esta proteína é um agente gerador de forças

no posicionamento do núcleo, do fuso mitótico e movimento dos cromossomos na mitose (PFISTER *et al.* 2006). É também um motor direcionado à extremidade menos do microtúbulo para o posicionamento do complexo de Golgi (YADAV *et al.* 2012) e ER (ALLAN 1995) e movimento de vesículas como endossomos (TAN *et al.* 2010), lisossomos (PFISTER *et al.* 2006), agregossomos e autofagossomos (GARCIA-MATA *et al.* 2002).

Além disso, atua na translocação do NF- κ B, do citoplasma para o núcleo (SHRUM *et al.* 2008); na regulação negativa de NF- κ B por uma interação redox-dependente ativadora de cadeias LC8 com o inibidor natural I κ B α (JUNG *et al.* 2008); transporte do complexo mTOR (CLIPPINGER e ALWINE 2012); interação com AMBRA1 por LC8-1 e LC8-2 (DI BARTOLOMEO *et al.* 2010); interação com Bim por LC8-1 e LC8-2 (DAY *et al.* 2004) e; com a proteína envolvida na polaridade celular, *partitioning defective homolog 3* (PARD3), através da cadeia de dineína LIC2 (SCHMORANZER *et al.* 2009), por exemplo.

O complexo da dineína é distribuído em 'cabeça', 'haste' e 'ligante' (*linker*), que compõem o domínio motor e 'cauda'. A 'cabeça' que é a porção C-terminal da cadeia pesada dimerizada HC1, apresenta cabeça globular composta de um anel de 7 porções densas que circundam a cavidade central sendo 6 dessas porções domínios AAA. Proteínas AAA estão envolvidas em diversos processos como degradação de outras proteínas, fusão de membranas, separação dos microtúbulos, biogênese de peroxissomos, transdução de sinal e regulação da expressão gênica (PFISTER *et al.* 2006).

O domínio de ligação (*linker*) com o microtúbulo parte da projeção ('haste') encontrada no lado oposto do anel entre os domínios 4 e 5. A haste é composta por 2 cadeias α -hélices anti-paralelas e o domínio de ligação ao microtúbulo - *microtubule binding domain* (MTBD) é composto de um *fold* de α -hélices (PFISTER *et al.* 2006). O N-terminal é a 'cauda' do complexo, correspondendo a aproximadamente 30% da massa total da cadeia pesada (QIU *et al.* 2012).

Na 'cauda', as demais subunidades proteicas são acopladas ao complexo e, sendo assim, as subunidades da dineína citoplasmática 1 são classificadas em: (i) 1 cadeia pesada dimerizada, DYNC1H1 (gene) / HC1 (proteína); (ii) 2 cadeias intermediárias envolvidas na ligação de cargas e a um outro complexo regulador ligante da dineína, *i.e.*, dinactina, DYNC111 e DYNC112 (genes) / *dynein cytoplasmic*

1 intermediate chain 1 (IC1) e *dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 1* (IC2) (proteínas); (iii) 2 cadeias leve-intermediárias, DYNC1LI1 e DYNC1LI2 (genes) / *dynein cytoplasmic 1 light-intermediate chain 1* (LIC1) e LIC2 (proteínas) e; (iv) 6 cadeias leves que se acoplam nas cadeias intermediárias: LC8-1 e LC8-2, *dynein light chain roadblock type 1 e 2* (Roadblock1 e Roadblock2), *dynein light chain TcTex type 1 e 3* (TcTex1 e TcTex3); sendo os genes codificadores das cadeias leves, respectivamente: DYNLL1 e DYNLL2, DYNLRB1 e DYNLRB2, DYNLT1 e DYNLT3 (VARMA *et al.* 2009).

As cadeias leve-intermediárias e leves estão envolvidas em diversas outras funções celulares, interagindo também com organelas como endossomos, mas também com outras proteínas, fatores de transcrição, RNA e proteínas virais (VARMA *et al.* 2009). A estrutura da dineína citoplasmática 1 está representada na **Figura 9**, a seguir.

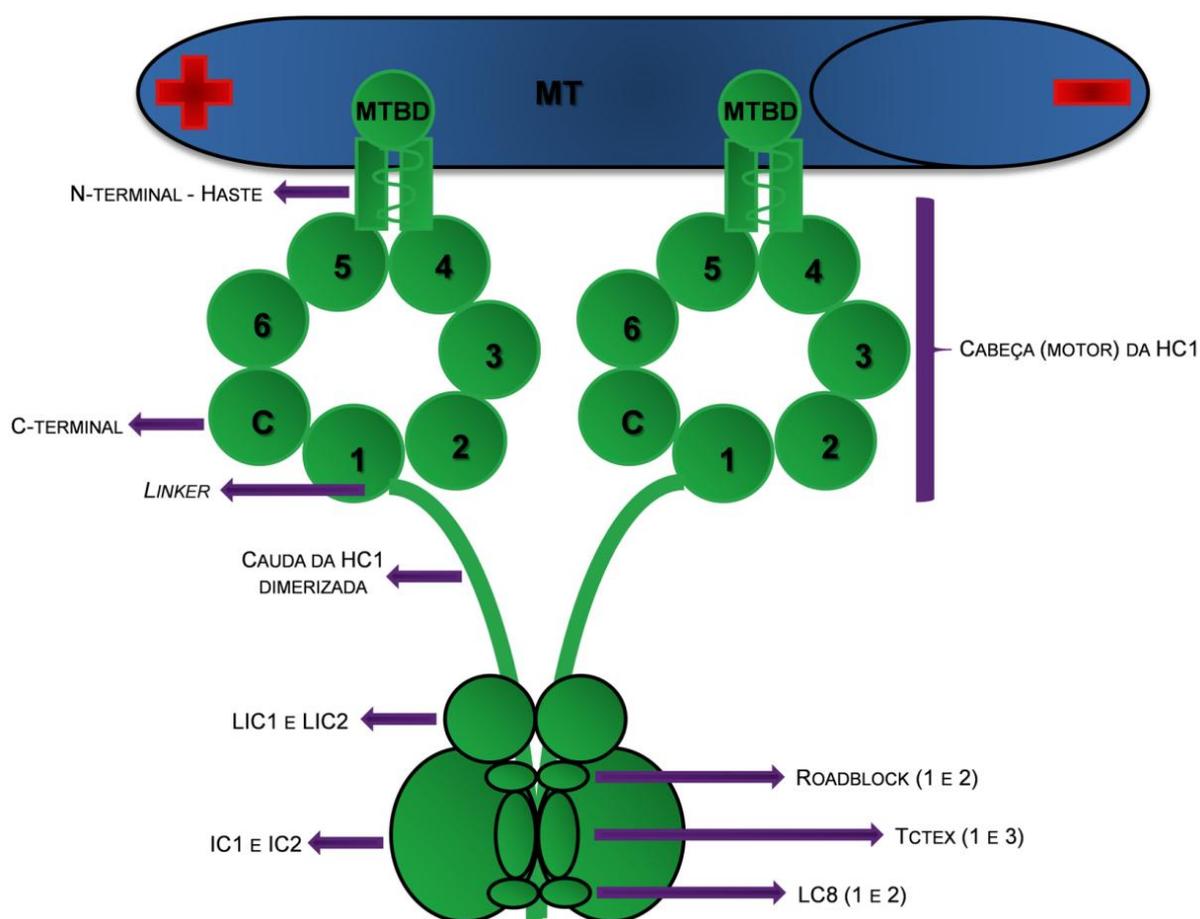


Figura 9 – Representação da estrutura da dineína citoplasmática 1. A cadeia dimerizada se liga através do domínio MTBD aos MT e nela se apoiam as cadeias leve-intermediárias e intermediárias, sendo que as intermediárias acoplam as cadeias leves.

As cadeias da dineína ainda, podem também ser fosforiladas por quinases (CHEUNG *et al.* 2004; KARKI *et al.* 1996) e assim ter sua atividade motora regulada (WHYTE *et al.* 2008). O complexo de dineína também é regulado por proteínas associadas (KARDON *et al.* 2009). Esses reguladores geralmente também são complexos proteicos que auxiliam e regulam o acoplamento de cargas (proteínas, vesículas, organelas e posicionamento do fuso mitótico) (KARDON *et al.* 2009). Dentre os reguladores estão o complexo dinactina, *lissencephaly-1* (LIS1), *nuclear distribution protein E* (NUDE), *nuclear distribution protein nudE-like* (NUDEL), bicaudal D, *rough deal* (ROD)-*zeste white 10* (ZW10)-Zwilch (complexo RZZ) e Spindly (KARDON *et al.* 2009).

O complexo dinactina frequentemente encontra-se associado ao complexo dineína, regulando e auxiliando, principalmente o acoplamento de cargas como proteínas, vesículas e organelas (HODGKINSON *et al.* 2005). A dinactina é composta de diversas subunidades, sendo a maior delas a p150Glued, além de, dinamitina (p50), p24, p62, p25, p27, *actin-related protein 11* (Arp11), *actin-related protein 1* (Arp1), e CaPZ, onde a subunidade p150Glued se acopla tanto às cadeias intermediárias da dineína quanto aos MT, realizando movimentos de deslizamento sobre eles, de maneira coordenada com a dineína (HODGKINSON *et al.* 2005).

A maior subunidade da dinactina, a p150Glued, se liga à cadeia IC1 de dineína e, em muitos casos, acopla as cargas para que a dineína transporte todo o complexo. A subunidade dinamitina é particularmente importante para o transporte de cargas, uma vez que, diversos estudos evidenciam que sua superexpressão rompe a ligação entre os complexos dineína-dinactina e o consequente transporte de cargas (BURKHARDT *et al.* 1997). A **Figura 10** representa a estrutura esquematizada do complexo dinactina.

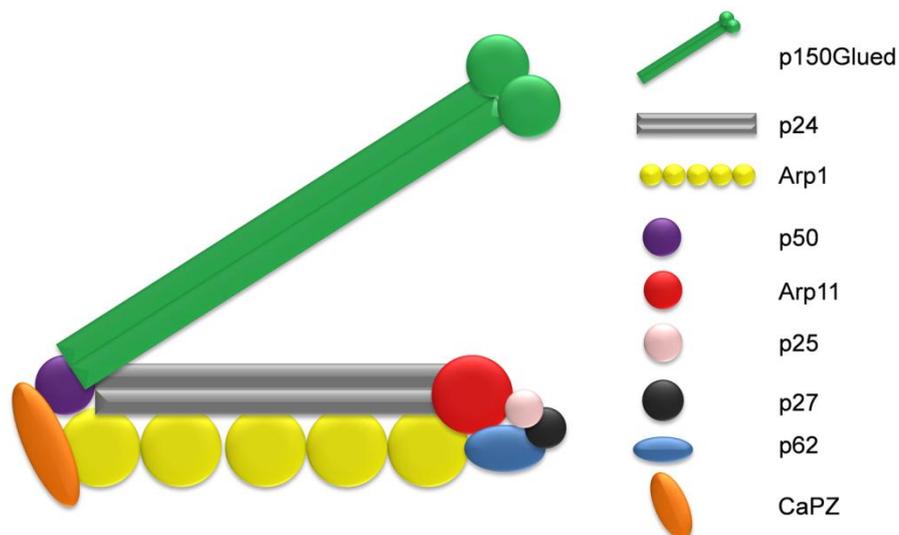


Figura 10 – Representação da estrutura da dinactina. Este complexo regulador da dineína se liga à ela por meio de sua maior subunidade, a p150Glued, representada em verde.

Para auxiliar no estudo de transporte intracelular envolvendo a dineína, algumas moléculas denominadas ciliobrevinas em especial as ciliobrevinas A e D, estão sendo atualmente utilizadas (FIRESTONE *et al.* 2012). O mecanismo de ação delas envolvem a inibição da atividade ATPásica da cadeia motora da dineína (FIRESTONE *et al.* 2012). No entanto, essas moléculas também podem bloquear outras estruturas que dependam da utilização de ATP (FIRESTONE *et al.* 2012), como por exemplo, o proteassomo (GLICKMAN *et al.* 2002).

Além disso, essas moléculas bloqueiam a sinalização de uma via, particularmente importante em estudos de câncer, denominada via Hedgehog (FIRESTONE *et al.* 2012). A via Hedgehog, é uma via de sinalização específica contendo diversas proteínas atuantes na transdução de sinal e está envolvida principalmente no desenvolvimento e homeostase de diversos órgãos (AMAKYE *et al.* 2013). Além disso, frequentemente se encontra muito ativada no ambiente tumoral e está relacionada à muitos tipos de tumores malignos, como os pancreáticos, gástricos e de próstata, por exemplo (AMAKYE *et al.* 2013).

1.7 LIC2 X endocitose

Sabe-se que dentre as muitas funções da dineína, destaca-se também a sua função de transporte de endossomos (TAN *et al.* 2010) e lisossomos (PFISTER *et al.* 2006), portanto, desempenhando um papel relevante nos processos de endocitose.

A endocitose é o englobamento de moléculas, partículas, lipídeos de membrana, proteínas integrais e microorganismos, por exemplo, por uma célula, através de sua membrana celular (DOHERTY e MCMAHON 2009; MARSH e MCMAHON 1999; MAXFIELD e MCGRAW 2004).

Atualmente, diversos processos diferentes de endocitose foram identificados, diferindo no tipo e tamanho do material englobado, morfologia, carga implicada, participação ou não de dinamina (uma GTPase) ou outras proteínas e dependência de pequenas proteínas G (DOHERTY e MCMAHON 2009; MARSH e MCMAHON 1999; MAXFIELD e MCGRAW 2004; STENMARK 2009). As proteínas G estão envolvidas na transdução de sinal intracelular e possuem a habilidade de ligar e hidrolisar *guanosine triphosphate* (GTP) em *guanosine diphosphate* (GDP) (DOHERTY e MCMAHON 2009; MAXFIELD e MCGRAW 2004; STENMARK 2009; Structure and function in cell signaling 2008). Existem 2 classes de proteínas G: as heterotriméricas e as monoméricas (Structure and function in cell signaling 2008).

As proteínas G heterotriméricas são compostas de 3 subunidades (α , β e γ) e são ativadas em resposta à uma mudança conformacional em receptores GPCR (Structure and function in cell signaling 2008). Geralmente, após ativação, a subunidade α se dissocia de $\beta\gamma$ para efetuar a sinalização, no entanto, $\beta\gamma$ também pode desencadear uma sinalização, como por exemplo, ativação de *phospholipase C- β* (PLC- β), ativação de canais de potássio (K^+) e inibição de canais de Ca^{2+} (Structure and function in cell signaling 2008). A subunidade α também é dividida em classes: (i) G_s , que estimula a enzima *adenylyl cyclase* (AC), (ii) G_i , que inibe AC, com exceção de G_{iat} que ativa a enzima fosfodiesterase; (iii) G_q , que estimula a PLC- β e (iv) G_{12} , que estimula a *phospholipase C- ϵ* (PLC- ϵ) (Structure and function in cell signaling 2008).

As proteínas G monoméricas são homólogas à subunidade α das proteínas G heterotriméricas, mas ao contrário delas, funcionam de forma independente como uma enzima hidrolase, quebrando GTP em GDP (Structure and function in cell signaling 2008). O GTP deixa a proteína G ativada e após sua hidrólise, fica ligada ao GDP e assim, inativa. No entanto, essas proteínas podem novamente ligar o GTP se tornando ativas novamente (Structure and function in cell signaling 2008). Essa hidrólise é acelerada por *GTPase activating proteins* (GAPs) e a troca por GTP é catalisada por *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) (Structure and function in

cell signaling 2008). As proteínas G monoméricas estão envolvidas em crescimento celular, diferenciação, movimento celular e, principalmente, na endocitose de vesículas lipídicas (DOHERTY e MCMAHON 2009; MAXFIELD e MCGRAW 2004; STENMARK 2009; Structure and function in cell signaling 2008).

Os diferentes mecanismos de endocitose incluem: (i) mediados pela proteína clatrina, envolvido na endocitose de receptores GPCR, transferrina e *receptor tyrosine kinases* (RTKs); (ii) formação de cavéola, contendo muitas proteínas de sinalização; (iii) dependentes de *ADP-ribosilation factor 6* (Arf6), envolvido na endocitose de molécula do *major histocompatibility complex* (MHC) classe I; (iv) dependentes de flotilina, envolvido na endocitose de proteoglicanos; (v) LR, que são regiões contendo diversos receptores como GPCRs e RTKs, ricas em colesterol e enriquecidos com esfingolipídeos e esfingomiélinina; (vi) fagocitose, envolvido na endocitose de patógenos; (vii) macropinocitose, envolvido na endocitose de marcadores fluidos; dentre outros menos compreendidos (DOHERTY e MCMAHON 2009; MARSH e MCMAHON 1999; MAXFIELD e MCGRAW 2004). A **Figura 11**, a seguir, exemplifica alguns dos mecanismos de endocitose.

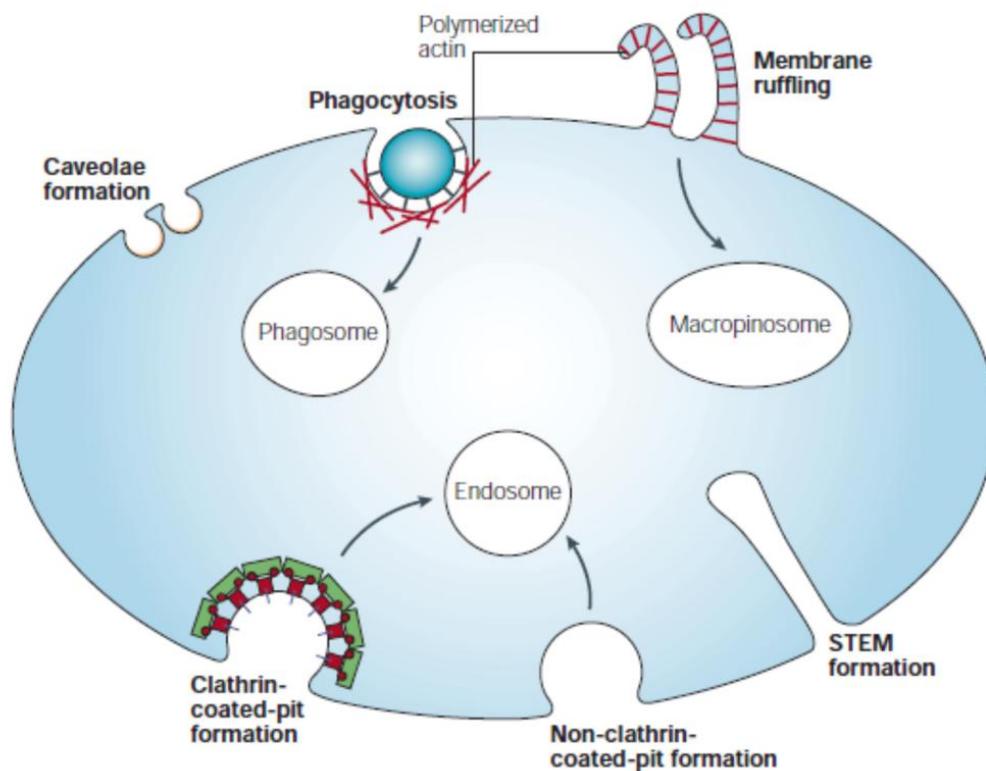


Figura 11 – Representação dos mecanismos de endocitose. A endocitose de material extracelular pode ocorrer por diversas vias. Quando a endocitose é de microorganismos, o processo

é chamado de fagocitose e forma o fagossomo. Quando a endocitose é de fluidos, o processo é chamado de macropinocitose e forma o macropinosomo. Quando a endocitose é de macromoléculas, o processo é denominado endocitose também e forma o endossomo. A formação de endossomo pode ocorrer por LR (planar ou cavéola) ou por processos dependentes ou independentes de clatrina, por exemplo. Fonte: MAXFIELD e MCGRAW, 2004.

A endocitose de moléculas e partículas na superfície celular, após ser endocitada por um desses processos, leva à formação de endossomos chamados *sorting endosomes* (SE) que podem ser destinados à degradação ou reciclagem de estruturas da membrana (DOHERTY e MCMAHON 2009; MAXFIELD e MCGRAW 2004). A degradação ocorre após maturação do SE, agora denominado *early endosome* (EE) em *late endosome* (LE) e então em lisossomo, com queda progressiva do pH tornando a vesícula mais ácida a cada maturação e alterando o conteúdo enzimático, que é muito mais rico nas vesículas lisossomais (DOHERTY e MCMAHON 2009; MAXFIELD e MCGRAW 2004, MUKHERJEE *et al.* 1997).

A reciclagem, por sua vez, pode ocorrer por uma via rápida e direta para a membrana plasmática ou uma via lenta direcionando o *sorting endosome*, agora denominado *recycling endosome* (RE), para a região perinuclear denominada *endosomal recycling compartment* (ERC), que então poderá direcionar para a membrana plasmática, para a rede *trans-Golgi network* (TGN) ou para maturação em LE (MAXFIELD e MCGRAW 2004). Vale notar, que todos os transportes que direcionam as vesículas para o sentido do núcleo, são transportados pela dineína (MAXFIELD e MCGRAW 2004).

Sabe-se que a proteína G monomérica Rab11 regula o transporte de moléculas e estruturas de membrana internalizadas na forma de endossomos (SE) para o ERC (MAXFIELD e MCGRAW 2004; STENMARK 2009). O ERC é uma coleção de organelas tubulares associadas aos microtúbulos e condensadas principalmente em torno do MTOC e pode direcionar moléculas para vários destinos como a membrana plasmática e a TGN ou direcionar os endossomos para maturação em LE (MAXFIELD e MCGRAW 2004; STENMARK 2009).

A cadeia LIC2 de dineína, alterada nos estudos de *microarray* do Amblyomin-X (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010), desempenha outra importante função; a literatura demonstra que a cadeia LIC2 interage especificamente com a proteína *ras-related protein Rab11* (Rab11) por meio de uma molécula adaptadora *Rab11-family interacting protein 3* (FIP3) auxiliando no transporte de endossomos até o ERC

(HORGAN *et al.* 2010). A **Figura 12**, esquematiza as possíveis rotas dos endossomos e sua relação com as proteínas G monoméricas e a dineína.

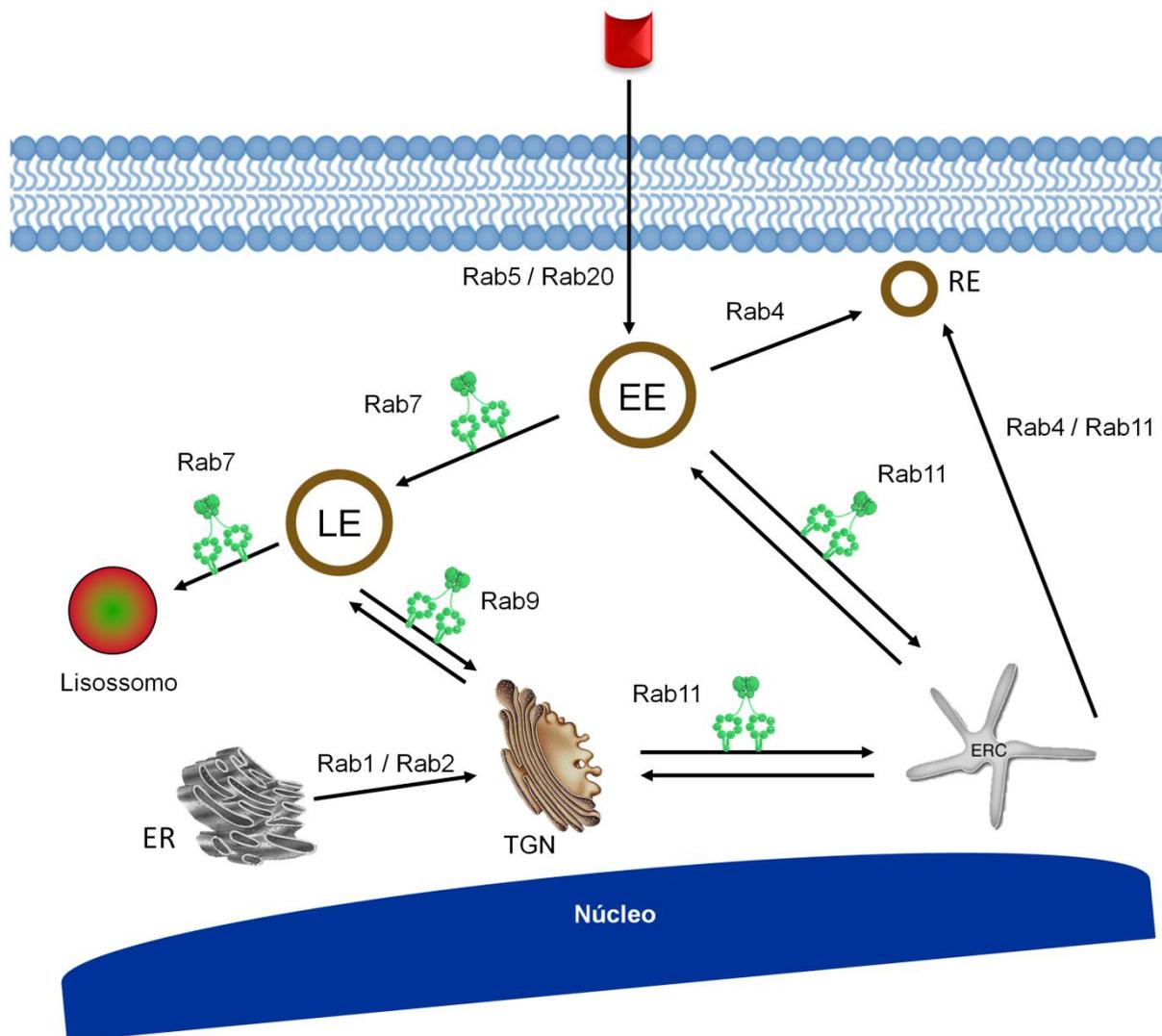


Figura 12 – Representação do envolvimento das Rabs e da dineína na endocitose. EE indica *early endosomes*, LE indica *late endosomes*, RE indica o *recycling endosome*, ER indica o retículo endoplasmático, TGN indica *trans-Golgi network*, ERC indica *endocytic recycling compartment* e as estruturas em verde representam a dineína, estrutura em vermelho representa uma macromolécula e a estrutura em marrom representa o endossomo. O núcleo e o lisossomo estão destacados na figura. As rotas que transportam o endossomo para uma região perinuclear são sempre transportadas pela dineína. A figura mostra a Rab que interage com a dineína nas rotas possíveis.

1.8 Os inibidores do proteassomo e o desenvolvimento biofarmacêutico do Amblyomin-X

O Amblyomin-X tem sido descrito como uma nova molécula, atuando

primariamente como uma proteína inibidora do proteassomo (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). Os inibidores do proteassomo dividem-se basicamente em: peptídeos aldeídos (Ex: MG-132); metabólito de *Streptomyces* (Ex: lactacistina); ácido dipeptidil borônico (Ex: bortezomib (BTZ)); tetrapeptídeo epoxicetona (Ex: carlfizomib, que é análogo à epoxomicina); e produtos naturais (Ex: epoxomicina) (ALMOND e COHEN 2002). Novos medicamentos que possuem como alvo o proteassomo estão em fases distintas de desenvolvimento farmacêutico (ALMOND e COHEN 2002; JAIN *et al.* 2011; RUSCHAK *et al.* 2011).

Todos estes inibidores do proteassomo são pequenas moléculas ou peptídeos permeáveis à célula (ALMOND e COHEN 2002; CRAWFORD *et al.* 2011), dispensando um mecanismo especializado de entrada através da membrana celular. Como consequência, não se encontram dados na literatura sobre uma possível interação entre esses inibidores com a dineína; no que se refere ao processo de endocitose. A **Figura 13** representa a estrutura química dos principais inibidores de proteassomo conhecidos atualmente.

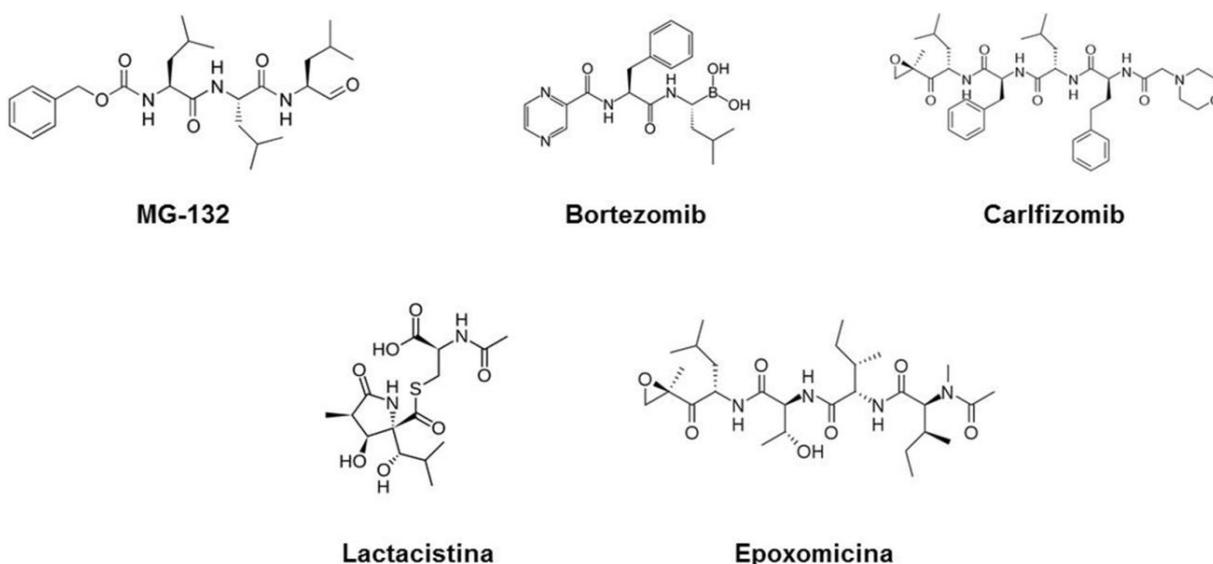


Figura 13 – Estrutura química dos principais inibidores do proteassomo. A figura mostra a estrutura molecular dos principais inibidores do proteassomo descritos na literatura. O representa o átomo de oxigênio, N representa o átomo de nitrogênio, H representa o átomo de hidrogênio, S representa o átomo de enxofre e B representa o átomo de boro. Cada vértice da estrutura onde não há uma letra, indica a presença de um átomo de carbono. O MG-132 é um peptídeo aldeído, o bortezomib é um ácido dipeptidil borônico, o carlfizomib é um tetrapeptídeo epoxicetona, a lactacistina é um metabólito do *Streptomyces* e a epoxomicina é um produto natural.

Os agregossomos formados em consequência da inibição proteassomal

induzida por estes agentes farmacológicos, são transportados pela dineína, preferencialmente pela via exclusiva de ubiquitinação (HDAC6) (CRAWFORD *et al.* 2011). Outro fato interessante, é que a formação de agregossomos ocorre de uma maneira dependente da síntese de polipeptídeos-nascentes nos ribossomos (CENCI *et al.* 2012). Além disso, os inibidores do proteassomo são conhecidos indutores da autofagia (ALMOND e COHEN 2002; CRAWFORD *et al.* 2011; ZHU *et al.* 2010).

Os peptídeos aldeídos se ligam de maneira reversível ao proteassomo e também inibem outras proteases como as catepsinas, não possuindo assim, alta especificidade pelo proteassomo (TSUBUKI *et al.* 1993). A lactacistina atua de maneira semelhante aos peptídeos aldeídos, porém em uma ligação irreversível além de também inibir proteases como as catepsinas (DICK *et al.* 1996). A epoxomicina é outro agente permeável à célula, porém muito mais seletivo para o proteassomo, inibindo suas três atividades catalíticas e, no entanto, é inviável como fármaco devido ao seu núcleo farmacofórico instável (KIM e CREWS 2013).

O agente mais conhecido e o primeiro a ser aprovado (2003) pelo *Food and Drug Administration* (FDA), órgão regulador dos Estados Unidos da América; atuante no proteassomo, é o BTZ (RUSCHAK *et al.* 2011). Este fármaco tem sido utilizado no tratamento de um tipo de malignidade do sangue, o mieloma múltiplo (CRAWFORD *et al.*, 2006; RUSCHAK *et al.* 2011).

O mecanismo de ação do BTZ envolve a inibição da subunidade $\beta 5$ do proteassomo (atividade ChT-L) e a subunidade $\beta 1$ (atividade tipo-caspase), tendo a subunidade $\beta 5$ como alvo predominante (ALMOND e COHEN 2002; CRAWFORD *et al.*, 2006; DORSEY *et al.* 2008) em uma reação reversível através do átomo de boro com um resíduo de treonina da subunidade catalítica do proteassomo (ALMOND e COHEN 2002; CRAWFORD *et al.*, 2006; DORSEY *et al.* 2008). O BTZ, no entanto, já apresenta efeitos citotóxicos em células não-tumorais ou normais (ERIKSSON *et al.* 2012), além de resistência tumoral (LU e WANG 2013; RUSCHAK *et al.* 2011).

Recentemente, em 2012, o FDA também aprovou o uso clínico de outro inibidor do proteassomo, o carfilzomib (CFZ), que assim como o BTZ, é indicado para o tratamento de mieloma múltiplo e é utilizado na clínica com outros agentes quimioterápicos e outras drogas auxiliares como lenalidomida e dexametasona (SHEN *et al.* 2011). O CFZ é um potente inibidor irreversível do proteassomo, inibindo principalmente sua atividade tipo quimotripsina e é derivado do produto

natural epoxomicina (JAIN *et al.* 2011; MENG *et al.* 1999). No entanto, a sua seletividade, como outros inibidores do proteassomo, é estritamente relacionada à sua ligação à subunidade catalítica do proteassomo, no caso, preferencialmente a $\beta 5$ (atividade tipo-quimiotripsina) (JAIN *et al.* 2011; MENG *et al.* 1999).

O mieloma múltiplo é um tipo de câncer relacionado aos plasmócitos do sangue (RAAB *et al.* 2009). Neste caso, os plasmócitos anormais se acumulam na medula óssea, interferindo na produção de células sanguíneas normais (RAAB *et al.* 2009). Os tratamentos disponíveis incluem o uso de inibidores do proteassomo, lenalidomida, talidomida, esteróides e transplantes de células-tronco (RAAB *et al.* 2009). Os sintomas mais comuns envolvem, por exemplo, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas (RAAB *et al.* 2009). Corresponde a 1% dos casos de câncer e os tratamentos oferecem uma sobrevida média de 3 a 4 anos (RAAB *et al.* 2009).

Apesar dos grandes avanços no tratamento do câncer é notório que muitos medicamentos, *e.g.*, os inibidores do proteassomo, em muitos casos apenas aumentam a sobrevida dos pacientes. Os quimioterápicos são muitas vezes utilizados em conjunto com diversas drogas ou em combinações com radioterapia, produzindo efeitos colaterais indesejáveis; além de não apresentarem uma seletividade pelas células tumorais que reduza drasticamente ou elimine efeitos citotóxicos em células e tecidos não-tumorais ou normais. Essas observações reforçam ainda, a necessidade de se buscar fármacos mais seletivos para células tumorais, menos tóxicos, mais efetivos e com espectro de ação maior em diferentes células malignas.

O Amblyomin-X, desenvolvido e estudado pelo nosso grupo de pesquisa, apresentou como alvo primário, o proteassomo; pela modulação preferencial da atividade T-L ($\beta 2$) (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). Além disso, a proteína recombinante induziu a superexpressão de uma das cadeias da dineína em estudo de *microarray* (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). Com a falta de dados que relacionem a atividade da dineína com a inibição proteassomal dos agentes conhecidos, limitados à formação de agregossomos e autofagia (ALMOND e COHEN 2002; CRAWFORD *et al.* 2011; GARCIA-MATA *et al.* 2002; ZHU *et al.* 2010); e a possível relação do Amblyomin-X com a dineína; este estudo pode revelar consequências biológicas importantes no âmbito do microambiente tumoral relacionados ao mecanismo de ação antitumoral do Amblyomin-X.

A investigação da ação pró-apoptótica desta molécula e os mecanismos moleculares envolvidos, podem diferenciar o Amblyomin-X de outros inibidores do proteassomo utilizados na terapia. Somando este fato à ação desta proteína em linhagens celulares de origem em tumores sólidos (AKAGI *et al.* 2012; CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010; MARIA *et al.* 2013; VENTURA *et al.* 2013) e ausência de efeitos citotóxicos em linhagens normais, até o momento (AKAGI *et al.* 2012; CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010; VENTURA *et al.* 2013); o desenvolvimento racional da molécula em biofármaco, na tentativa de busca de novos tratamentos de tipos de câncer, é plenamente justificável.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Investigar o possível papel da dineína no mecanismo de ação antitumoral do Amblyomin-X, através de ensaios que relacionem a função deste motor molecular com os efeitos do estímulo da proteína recombinante em duas linhagens tumorais (SK-MEL-28 e MIA PaCa-2) e uma linhagem não-tumoral ou normal (fibroblastos).

2.2 Objetivos específicos

a. Investigação da expressão gênica e proteica das cadeias da dineína e alvos relacionados ao controle de qualidade proteico intracelular, sob influência do tratamento com Amblyomin-X.

b. Caracterização da via proteassomo-agregossomo-autofagia e sua relação com a dineína, sob influência do tratamento com Amblyomin-X.

c. Verificação da sinalização celular e ubiquitinação específica relacionada às cadeias da dineína, sob influência do tratamento com Amblyomin-X.

d. Estudo do auxílio da dineína no transporte e entrada ou não do Amblyomin-X na célula e, na atividade do proteassomo, sob influência do tratamento com Amblyomin-X.

e. Investigação de ligantes e componentes acoplados à dineína sob influência de tratamento com Amblyomin-X.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do Amblyomin-X

A proteína recombinante foi gentilmente cedida, após ser preparada pela Dra. Juliana Mozer Sciani, do nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan; conforme metodologia estabelecida no laboratório. Esta metodologia envolve a clonagem, a partir da biblioteca de cDNA da glândula salivar do *Amblyomma cajennense*.

A proteína recombinante era anteriormente expressa em sistema procarioto (BATISTA *et al.* 2008), *Escherichia coli*, e passou a ser expressa em sistema eucarioto, *Pichia pastoris* (dados não-publicados), a fim de eliminar a cauda de histidina proveniente do método de expressão em *E. coli* (BATISTA *et al.* 2008). O fragmento codificante do Amblyomin-X foi amplificado por *polymerase chain reaction* (PCR) a partir do clone pAE, presente na biblioteca de cDNA, purificado e subclonado em vetor p-GEM-T-Easy (Promega, Madison, WI, USA). O produto foi digerido e ligado ao vetor pPIC9K (Invitrogen™ Life Technologies Inc., USA), linearizado e utilizado para a transformação de *Pichia pastoris* GS115 por eletroporação. Esta proteína é obtida na forma glicosilada passando de 13,5 kDa para 35 kDa.

A molécula foi purificada por cromatografia líquida, *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) em cromatógrafo AKTA Purifier (GE Health Care, USA), utilizando-se uma coluna de troca iônica Resource Q 15 50 mL (GE Health Care). As amostras foram liofilizadas, ressuspendidas e dialisadas contra *sodium chloride* (NaCl) 3 mM por 72 h a 10°C, liofilizados e mantidos a -20°C.

Todo lote foi esterilizado em filtro de 0,22 µm e submetido à testes de inibição do FXa e viabilidade celular (SK-MEL-28, MIA PaCa-2 e fibroblastos). Além disso, testes de atividade com a proteína deglicosilada foram realizados e garantiram a mesma atividade biológica (dados não-publicados)

3.2 Cultura de células

As células humanas de fibroblastos de pele foram gentilmente cedidas pela Dra. Mayana Zatz do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências (IB) da Universidade de São Paulo (USP); e armazenadas em criotubos em nitrogênio líquido. As células em cultura foram mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) com *sodium bicarbonate* (NaHCO₃) (3,7 g/L), pH= 7,4 e suplementado com 15% de *fetal bovine serum* (FBS) (Gibco, Grand Island, NY, USA).

As linhagens tumorais humanas de melanoma (SK-MEL-28) e de adenocarcinoma de pâncreas (MIA PaCa-2), foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA) e cultivadas segundo as recomendações do fornecedor. As células em cultura foram mantidas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 com NaHCO₃ (2 g/L) e *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid* (HEPES) (5,9 g/L), pH= 7,4 e suplementado com 10% de FBS em ambas as linhagens tumorais e 2,5% de soro equino (Gibco) na linhagem tumoral MIA PaCa-2.

Em todas as linhagens utilizou-se 1% de solução de antibióticos, penicilina/estreptomicina (10 mg/mL) no meio de cultura e as células foram mantidas em estufa de 5% de *carbon dioxide* (CO₂) a 37°C. Além disso os soros utilizados foram previamente inativados por aquecimento e alíquotados.

3.3 Dosagem do Amblyomin-X pelo método de Bradford

Cada lote de Amblyomin-X utilizado, foi ressuspendido e homogeneizado em 1 mL de 1X *phosphate buffer saline* (PBS). A molécula foi pipetada em triplicata em uma placa de 96 poços contra um branco pela reação com reagente de Bradford diluído no momento de uso (1:5). A placa foi incubada no espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices, USA) a 37°C por 5' e a leitura foi realizada no comprimento de onda $\lambda = 595$ nm.

Uma curva-padrão com diluições de *bovine serum albumin* (BSA) foi utilizada para a realização dos cálculos de concentração. Após a leitura, o cálculo da concentração da proteína recombinante foi realizado pela equação de reta obtida, em µg/mL. Sabendo-se que o número de átomos em 1 mol é o número de Avogrado

($6,023 \cdot 10^{23}$) contido em 1 g, portanto, g/mol; e que 1 Da ou unidade de massa atômica (definido como 1/12 do peso do átomo de carbono-12), equivale a 1 g/mol; a concentração molar ou molaridade (μ), foi calculada de acordo com a fórmula:

$$M = n / V$$

Onde, V é o volume em litros (L) e n é o número de mols calculado pela fórmula:

$$n = m / M$$

Onde, m é a massa em gramas (g) e M é a massa molecular do composto em gramas/mol (g/mol).

Obteve-se então, o valor da μ em mol/L ou molar (M) do Amblyomin-X que foi então convertida para micromol/L ou micromolar (μ M).

O volume da molécula a ser utilizado em cada experimento foi devidamente calculado pela fórmula:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Onde, C_i e C_f é a concentração inicial e final, respectivamente, em μ M e; V_i e V_f é o volume inicial e final, respectivamente, em mililitros (mL).

Cada lote foi separado em alíquotas e congelado em *freezer* -20°C após ser esterilizado em filtro de $0,2 \mu\text{m}$.

3.4 Análise de expressão gênica por *quantitative real-time polymerase chain reaction* (qPCR)

Células tumorais e fibroblastos foram cultivadas em garrafas de 25 cm^2 até uma confluência de 80-90% e submetidas a tratamentos com o composto de interesse pelo período de tempo desejado. Após tratamento, o sobrenadante e as células foram coletadas com *etylenediamine tetraacetic acid* (EDTA) (5 mM), centrifugadas por 5' a 1000 rpm e o *pellet* estocado a -80°C , após lavagem com 1X PBS.

As amostras foram então submetidas à lise celular e extração de RNA total, que foi realizado com o kit de extração RNeasy® Mini (Qiagen N.V. Netherlands). O material extraído foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific, USA), obedecendo-se a relação de 1 O.D = 40 $\mu\text{g/mL}$ de RNA. Além disso, as razões entre as absorvâncias (A) nos comprimentos de onda $\lambda = 230 \text{ nm}$,

260 nm e 280 nm; $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$, que indicam amostra relativamente livre de proteínas e sais e solventes, respectivamente, quando $A_{260/280} \geq 2$ e $A_{260/230} \geq 1,8$; foram respeitadas.

A integridade do RNA foi verificada por 2% gel de agarose com 10X 3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) e água tratada com diethylpyrocarbonate (DPEC) para eliminar enzimas RNases. A seguir, o gel foi polimerizado com 37% formaldeído e revelado com ethidium bromide (1 mg/mL) utilizando um transiluminador, após corrida a 100 V com migração da amostra de aproximadamente 10 cm.

O RNA total extraído foi tratado com uma DNase para eliminação de DNA genômico através do kit DNase I Amplification Grade (Invitrogen™ Life Technologies Inc). A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada através do kit SuperScript® III First-Strand Synthesis (Invitrogen™ Life Technologies Inc.), que foi estocado a -20°C até o uso.

O método de escolha para quantificação da expressão de mRNA foi a quantificação relativa com correção pela eficiência dos *primers* descrito no método de Pfaffl (PFAFFL, 2001). A escolha dos *primers* se deu a partir da sequência nucleotídica de cada alvo obtida através do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), sendo que, para os genes de interesse que apresentavam isoformas, foi realizado o alinhamento das sequências no *Universal Protein Resource* (Uniprot) (<http://www.uniprot.org/>).

Os *primers* foram desenhados em uma região que compreende todas as isoformas. Todos os *primers* foram desenhados com o uso do software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com critérios de *melting temperature* (T_m) entre 57 e 64°C; % de pares de base entre guanina e citosina (%GC) entre 40 e 70; tamanho de *amplicon* de 80 a 120 bp e; tamanho do *primer* entre 17 a 24 bp.

Os *primers* então foram submetidos a uma validação para verificar as respectivas eficiências de reação de cada par de *primers* para cada alvo selecionado. Sendo assim, uma análise por regressão linear foi realizada com 4 pontos de curva nas diluições (1:1, 1:5, 1:25, 1:125) em triplicata para cada par de *primer*.

Foi obtida uma equação da reta para cada alvo e o coeficiente de

determinação que deve ser $R^2 \geq 0,95$. O cálculo da eficiência (E) foi realizado pela fórmula:

$$E = 10^{-1 / slope}$$

Onde o *slope* equivale ao coeficiente angular (x) da equação de reta.

A E obtida foi utilizada nos cálculos para determinação dos níveis de mRNA, porém, também foi expressa em % para melhor compreensão, pela fórmula:

$$E (\%) = (E - 1) \times 100$$

A **Tabela 1** a seguir, fornece as sequências dos pares de *primers* para cada alvo analisado.

Tabela 1 - Sequência nucleotídica dos pares de *primers* de cada proteína a ser codificada

Proteína codificada	Isoformas	Fw 5'→3'	Rv 5'→3'
GAPDH	0	CAAGGCTGTGGGCAAGGT	GGAAGGCCATGCCAGTGA
β-actina	0	CCAGCTCACCATGGATGATG	ATGCCGGAGCCGTTGTC
HC1	0	GTCCCACTGGCGATTGTGA	CGAACGCTCTCGATCAGTGA
IC1	3	AGTGGCCTTGGTTTGAACAT	CCGACATCACAGAGGACTGACA
IC2	0	CAAATCTGTGAGCACTCCAAGTG	CCCAATGCAGCGTCCTAGA
LIC1	0	GTTTTACCTCTGGGTGCGGATA	ATGGCATCACACTTTGTGCAA
LIC2	0	CCCTGCCTCTGGGTGACA	ACACTCACCGCATCACACTTTG
LC8-1	3	GGACATTGCGGCTCATATCA	CGAAGTTCCTCCCCACGAT
LC8-2	0	CACACACGAGACAAAGCACTTCA	TGGCCACCTAGCCTGACTTG
TcTex1	0	ACTCACCAAGCTGGGAAAACC	CTGTGTGTAATCCAGCTCCATTCT
TcTex3	0	AGTGGTCCAGAAGAGCGCATA	ACGGTACAGGTTCCATCAGATGT
Roadblock1	0	TTGGCTCCCTGTGTCATTCC	TGCCATGTGCTAGTCCACTGA
Roadblock2	0	ATCCGAACAACCTTGGACAACCT	GTGCTTTTGGCTTTTCATTGTCA
p150Glued	6	CCAGGAGACGGTTGCAGACT	CCCGATTACATCCTGTAGATG
dinamitina	0	TTGCCAGGAATGAGCCAGAT	TTGTGCAAACGCATCGAACT
NFKB1	2	GGATCACAGCTGCTTTCTGTTG	TGGCGACCGTGATACCTTTAA
Hsp70	0	CACCATCCCCACCAAGCA	GCCCTCGTACACCTGGATCA
Ubc13	0	CCAGTTCCTGGCATCAAAGC	GAATCCTGAGGGCCAGCAAT

conclusão **Tabela 1** - Sequência nucleotídica dos pares de *primers* de cada proteína a ser codificada

MEKK1	0	GAATCACACCACCCCGAAGA	GTTAACACGGCGGTTTGTTC
-------	---	----------------------	----------------------

As sequências nucleotídicas dos pares de *primers*, *forward* (Fw) e *reverse* (Rv), representados na direção 5'→3', são formadas pelas bases nitrogenadas púricas, adenina (A) e guanina (G) e as bases nitrogenadas pirimidinas, citosina (C) e timina (T), indicadas na tabela

Utilizou-se para a reação de qPCR, o reagente SYBR® green do kit comercial SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) em uma reação final de 25µL. A quantidade inicial de cDNA utilizada foi padronizada após ensaios-testes de verificação da expressão dos genes de interesse nas 3 linhagens. Tanto na validação quanto na reação de qPCR, foram realizadas triplicatas com desvio-padrão aceitável ≤ 0,3. O cálculo da Quantificação Relativa (QR) dos níveis de mRNA foi realizado pelo método de Pfaffl (PFAFFL, 2001), com a nomenclatura adaptada para este trabalho, se dá pela equação:

$$QR = (E_{\text{alvo}})^{\Delta CP_{\text{alvo}}(\text{controle-amostra})} / (E_{\text{referência}})^{\Delta CP_{\text{referência}}(\text{controle-amostra})}$$

Sendo:

$$\Delta CP = Ct_{\text{controle}} - Ct_{\text{tratado}}$$

Onde, Ct é o ciclo *threshold*, que é a reta que corta o gráfico em log e indica em qual ciclo ocorre crescimento exponencial da amplificação e; E é a eficiência do par de *primers*.

O gene de referência (controle endógeno) utilizado foi o *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), após ensaios-teste comparando o mesmo com a β-actina, que por sua vez se mostrou alterada. O *threshold* foi ajustado em uma região onde se percebe claramente a amplificação exponencial, igual para controle e tratado em cada gene, para todos os genes analisados. O *baseline* (ciclos iniciais com pequena alteração na fluorescência) foi ajustado automaticamente segundo as configurações do software do termociclador Step One Plus® (Applied Biosystems) do Centro de Toxinologia Aplicada (CAT) do Instituto Butantan.

Foi realizada também a curva de *melt* de cada gene para verificar e assegurar a amplificação de um único produto, além da inclusão do controle negativo onde todos os componentes da reação estão presentes exceto o cDNA do alvo, também com sua respectiva curva de *melt*, a fim de assegurar a não amplificação de qualquer produto contaminante.

Nos ensaios de qPCR não foram utilizados controles positivos, como

inibidores do proteassomo, por exemplo, devido à falta de dados na literatura sobre a ação dessas drogas na expressão gênica das cadeias de dineína e demais alvos selecionados. A comparação é, portanto, entre células tratadas com Amblyomin-X e não-tratadas (tratadas com veículo, PBS).

3.5 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi analisada por meio do ensaio de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Este ensaio avalia a capacidade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase em reduzir o sal de MTT. As células que permanecem viáveis produzem sais de formazan através do metabolismo mitocondrial, que são diluídos no *dimethyl sulfoxide* (DMSO). O teste foi empregado em todos os lotes de Amblyomin-X, experimentos realizados com a molécula e também nos agentes farmacológicos utilizados no auxílio da investigação científica.

Células tumorais e fibroblastos em cultura em garrafas de 25 cm² foram tripsinizadas com tripsina/EDTA (0,25% / 0,53 M), contadas em câmara de Neubauer com 0,4% azul de tripan, na diluição 1:5, e plaqueadas em placa de 96 poços em uma concentração de 0,5.10⁴ célula/poço para as células tumorais e 1.10⁴ célula/poço para os fibroblastos, em triplicata onde permaneceram em cultivo por um período de 48 h. As células foram tratadas com o composto de interesse e incubadas pelo período de tempo desejado. Nos ensaios foram utilizados os diferentes veículos onde se diluem os respectivos agentes para comparação.

Após cultivo e tratamento, o meio de cultura foi retirado e então adicionado o MTT na concentração de 0,5 mg/mL. As células foram incubadas por 3 h em estufa de 5% de CO₂ a 37°C no escuro. O MTT foi removido e então adicionado DMSO, misturando com a pipeta. A leitura foi realizada imediatamente utilizando-se o DMSO como branco em espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices) no comprimento de onda $\lambda = 540$ nm. A viabilidade foi calculada com as absorbâncias (A) obtidas da seguinte forma:

$$\text{Viabilidade (\%)} = (A_{\text{tratado}} / A_{\text{controle}}) \times 100$$

3.6 Investigação da sinalização específica de ubiquitina

A sinalização específica de ubiquitina K48 e K63 foi verificada através de citometria de fluxo em células tumorais e fibroblastos cultivadas em garrafas de 25 cm². As células foram tripsinizadas com tripsina/EDTA (0,25% / 0,53 M), contadas em câmara de Neubauer com 0,4% *tripan blue*, na diluição 1:5, e plaqueadas em placa de 12 poços até confluência entre 80-90%. As células foram tratadas com o composto de interesse e incubadas pelo período de tempo desejado e coletadas com tripsina/EDTA (0,25% / 0,53 M).

Após a coleta, as células foram centrifugadas por 5' a 1000 rpm. O sobrenadante foi então descartado e as células, ressuspendidas em solução de 4% paraformaldeído e incubadas por 30' em gelo. As amostras foram centrifugadas por 10' a 1200 rpm, lavadas em 1X PBS gelado, ressuspendidas em solução permeabilizante (0,5% Triton X-100 / 0,6% EDTA 0,5 M pH= 8 em 1X PBS) e incubadas por 30' em gelo. As células foram então centrifugadas e lavadas novamente e ressuspendidas em solução com os respectivos anticorpos em tampão FACS (EDTA 2 mM, 2% SFB em 1X PBS).

Os anticorpos conjugados utilizados foram: Milli-Mark™ anti-Ubiquitin Lys63-specific-Alexa Fluor®647 clone Apu3 IgG1 *rabbit anti-human* (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) e Milli-Mark™ anti-Ubiquitin Lys48-specific-FITC clone Apu2 IgG *rabbit anti-human* (Merck Millipore) na diluição 1:5. Como controle isotipo foram utilizados os anticorpos Fluorescein *goat anti-rabbit* IgG (H+L) (Invitrogen™ Life Technologies Inc.) e AlexaFluor® 647 *goat anti-rabbit* IgG (H+L) (Invitrogen™ Life Technologies Inc.) em uma concentração final de 0,5 µg/mL.

O valor de fluorescência obtido dos anticorpos de controle isotipo foi descontado do valor final dos anticorpos específicos K48 e K63. A aquisição das imagens das amostras se deu no citômetro BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) nos canais FITC e APC pelo software FACSDiva 6.1.3 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) para captação de imagens no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan e a edição dos histogramas foi realizada no software FlowJo™ (Trestar, CA, USA), obtendo-se a intensidade média de fluorescência (IMF) que foi também convertida em um gráfico de barras.

Nos ensaios de ubiquitina não foram utilizados controles positivos, como inibidores do proteassomo, por exemplo, devido à falta de dados na literatura sobre

a ação dessas drogas no aumento ou diminuição da quantidade de ubiquitina específica K48 ou K63. A comparação é, portanto, entre células tratadas com Amblyomin-X e não-tratadas (tratadas com veículo, PBS).

3.7 Ensaio de agregossomos

A análise foi dividida em quatro passos: visualização, quantificação, caracterização e análise da via. Os agregossomos foram visualizados utilizando-se a técnica de microscopia de fluorescência segundo as recomendações do fabricante do kit ProteoStat® Aggresome Detection kit (Enzo Life Science Inc., Farmingdale, NY, USA).

Células tumorais e fibroblastos em cultura em garrafas de 25 cm² foram coletadas com tripsina/EDTA (0,25% / 0,53 M), contadas em câmara de Neubauer com solução de 0,4% *tripan blue* e então plaqueadas e cultivadas sobre lamínulas de 15x15 mm estéreis em placa de 6 poços até confluência entre 80-90%. Após esse período as células foram tratadas com o composto de interesse e incubadas pelo período de tempo desejado.

Ao final do protocolo do fabricante, as lamínulas foram retiradas e então se aplicou 1 gota de solução de montagem e *anti-fade* VectaShield® (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) na lâmina e a lamínula foi colocada sobre ela com as células viradas para baixo e então selado com esmalte de unha incolor e analisadas em microscópio de fluorescência Olympus BX51 com câmera Olympus XM10 (Olympus, Japan), utilizando-se uma magnificação de 60X. O *merge* das fluorescências foi realizado pelo software Cell F (Olympus) do mesmo microscópio, do CAT do Instituto Butantan.

Utilizando-se o mesmo kit de agregossomos citado acima, a quantificação se deu pela metodologia de citometria de fluxo. Após estabelecimento de cultura de células tumorais e fibroblastos em placa de 12 poços com confluência entre 80-90%, as células foram tratadas com o composto de interesse e incubadas pelo período de tempo desejado.

As células foram coletadas com tripsina/EDTA (0,25% / 0,53 M) e o procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante do mesmo kit. As células foram analisadas pelo canal PerCp Cy5 do citômetro BD FACSCanto II e

FACSDiva 6.1.3 (BD Biosciences) para captação de imagens, no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan. O software FlowJo™ (Trestar) foi utilizado para se obter os histogramas e a IMF, calculando-se o fator de propensão para agregossomos, *aggresome propensity factor* (APF) pela equação:

$$\text{APF} = 100 \times (\text{IMF}_{\text{tratado}} - \text{IMF}_{\text{controle}}) / \text{IMF}_{\text{tratado}}$$

Onde, segundo o kit, o APF esperado para MG-132 deve ser maior que 25 (valor de referência do kit) e a formação de agregossomos deve ser considerada acima deste valor.

A próxima etapa foi caracterizar os agregossomos quanto à sua forma pelo método de microscopia eletrônica de transmissão. As linhagens tumorais e fibroblastos foram cultivadas em garrafas de 25 cm² até confluência entre 80-90% e tratadas com o composto de interesse e incubadas pelo período de tempo desejado.

As células foram então centrifugadas a 1500 rpm por 10' e o pellet lavado com 1X PBS. As células foram fixadas em 2,5% *glutaraldehyde* pH= 7,0 (fixação primária) e então pós-fixadas com 1% *osmium tetroxide* por 2 h a 4°C. As amostras foram lavadas com água destilada e coradas com solução aquosa de 2% *uranyl acetate* por 2 h a 4°C no escuro. As amostras foram desidratadas da seguinte forma: 30% *acetone* 15', 50% *acetone* 15', 70% *acetone* 15', 90% *acetone* 15', 100% *acetone* 30' (3X). Após essa etapa as amostras foram embebidas em resina da seguinte forma: *propylene oxide* 15' (2X), óxido de propileno:resina 2:1 1 h, *propylene oxide*:resina 1:1 1 h, *propylene oxide*:resina 1:2 1 h, 100% resina *overnight* e troca em resina fresca por 1 h. A polimerização ocorreu em 24 h a 70°C.

As resinas foram então seccionadas em ultramicrótomo e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão LEO 906 E (Zeiss, Germany) com câmera Mega View III e software de captura de imagem ITEM Olympus Soft Imaging Solutions GmbH do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan. As etapas entre pós-fixação e ultramicrotomia ocorreram com o auxílio do Sr. Gaspar Ferreira de Lima do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP e a interpretação das imagens obtidas ocorreu com o auxílio Dra. Sylvia Carneiro do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

A última etapa envolveu a análise da via de formação de agregossomos com a quantificação de proteínas relacionadas à formação de agregossomo pela via não

exclusiva e exclusiva de ubiquitinação (Bag3 e HDAC6, respectivamente). As análises foram realizadas através do ensaio de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) do tipo 'sandwich', segundo as recomendações do fabricante dos kits BAG3 ELISA kit e HDAC6 ELISA kit (USCN Life Science Inc., Wuhan, China).

Células tumorais e fibroblastos foram cultivadas em garrafas de 25 cm², foram coletadas com tripsina/EDTA (0,25% / 0,53 M), contadas em câmara de Neubauer com solução de 0,4% *tripan blue* e então plaqueadas e cultivadas placas de 6 poços até confluência entre 80-90%. As amostras foram tratadas com o composto de interesse e incubadas pelo período de tempo desejado. As células foram coletadas com EDTA 5 mM e contadas em câmara de Neubauer utilizando-se 0,4% azul de tripan. A concentração de 1,5.10⁶ células/mL foi utilizada nos passos posteriores.

As células foram então centrifugadas a 1800 rpm por 10' e lavadas 3 vezes com 1X PBS. As células foram então ressuspensas com um tablete de inibidor de proteases e fosfatases (Roche Applied Science, Germany) diluído em 1X PBS e lisadas por 3 ciclos de congelamento em gelo seco e descongelamento a 37°C segundo as recomendações do fabricante. Foram então centrifugadas a 2100 rpm por 10' a 4°C para remoção de debris e então utilizadas no ensaio. Para quantificação, em cada kit foi realizada uma curva de calibração com 7 pontos de diluições de acordo com a concentração do padrão inicial do kit.

As células foram analisadas por regressão linear, obtendo-se a equação de reta para o cálculo e o coeficiente de determinação que deve ser $R^2 \geq 0,95$. Os pontos da curva, branco e amostras foram pipetados em duplicata. A leitura foi realizada em $\lambda = 450$ nm em espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices).

Nos passos de visualização, quantificação e caracterização foi utilizado como controle positivo, o MG-132. No passo de análise da via por ELISA, não foram utilizados controles positivos, como inibidores do proteassomo, por exemplo, devido à falta de dados na literatura sobre a ação dessas drogas no aumento ou diminuição da concentração intracelular de HDAC6 ou Bag3, sendo restrito apenas à identificação da via. A comparação é, portanto, entre células tratadas com Amblyomin-X e não-tratadas (tratadas com veículo, PBS).

3.8 Visualização da autofagia

Os ensaios de visualização da autofagia foram realizados em dois passos (inicial e final). O passo inicial da autofagia foi verificado por imunofluorescência marcando-se a molécula LC3. Células tumorais e fibroblastos foram cultivados em garrafas de 25 cm² com coleta por tripsina/EDTA (0,25% / 0,53 M), contadas em câmara de Neubauer com solução de 0,4% *tripan blue* e então plaqueadas e cultivadas sobre as lamínulas de 15x15 mm estéreis em placa de 6 poços até confluência entre 80-90%. Após esse período as células foram tratadas com o composto de interesse e incubadas pelo período de tempo desejado.

As células em cultura sobre as lamínulas foram lavadas 2x com 1X PBS e fixadas com 4% paraformaldeído por 15' a temperatura ambiente. O mesmo passo de lavagem se repetiu e as células foram permeabilizadas com solução permeabilizante (0,5% Triton X-100 / 0,6% EDTA 0,5 M pH= 8 em 1X PBS) por 15' a temperatura ambiente. As amostras foram lavadas novamente e incubadas com solução de bloqueio 1% BSA por 30' a temperatura ambiente.

O excesso foi removido e adicionado o anticorpo primário *rabbit anti-human-LC3* (I e II) (Abcam, Cambridge, UK) na diluição 1:500, que foi incubado *overnight* a 4°C. Nova lavagem foi realizada e as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário FITC *goat anti-rabbit* (InvitrogenTM Life Technologies Inc.) na diluição 1:200 por 1 h a temperatura ambiente no escuro. As células foram lavadas e então se aplicou 1 gota de solução de montagem e *anti-fade* VectaShield® (Vecta Labs), contendo o marcador de núcleo *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI), na lâmina com a lamínula contendo as células viradas para baixo e então selado com esmalte de unha incolor. A análise ocorreu em microscópio de fluorescência Zeiss LSMS10 (Zeiss) nos filtros 1 (DAPI) e 2 (FITC) com captação de imagens e o *merge* realizado pelo software Zeiss LSMS10 3.2.1 (Zeiss), do CAT do Instituto Butantan, com magnificação de 40X.

O passo final da autofagia foi analisado por microscopia de fluorescência baseado na utilização do corante laranja de acridina que fluoresce em verde no citoplasma e núcleo e em vermelho brilhante na presença de vesículas ácidas como os lisossomos. Os passos de cultivo foram realizados da mesma maneira citados na marcação da molécula LC3.

Posteriormente, as células então foram incubadas com solução de *acridine*

orange 1 µg/mL por 15' a temperatura ambiente no escuro e o excesso então removido e adicionado 4% *paraformaldeyde* por 15' a temperatura ambiente. A lamínula foi retirada e se aplicou 1 gota de solução de montagem e *anti-fade* VectaShield® (Vecta Labs), na lâmina com a lamínula contendo as células viradas para baixo e então selado com esmalte de unha incolor.

A análise ocorreu em microscópio de fluorescência Zeiss LSMS10 (Zeiss) no filtro 3 (LS3) sob irradiação do laser de $\lambda = 488$ nm, com captação de imagens realizado pelo software Zeiss LSMS10 3.2.1 (Zeiss), do CAT do Instituto Butantan, com magnificação de 40X.

Nos dois passos foram utilizados como controles positivos, o MG-132 e a rapamicina. Além disso, o período de tratamento com Amblyomin-X foi estendido até 48 h no passo inicial e até 72 h no passo final a fim de se assegurar a ocorrência ou não do evento celular analisado. No primeiro passo, testes preliminares com o anticorpo secundário, sozinho, foram realizados para garantir a ausência de autofluorescência.

3.9 Análise da expressão de proteínas intracelulares por *western blotting*

A expressão proteica de algumas cadeias da dineína e os alvos NFKB1, β -actina, LC3, Rab11A, mTOR, AMBRA1 e Bim foram analisados utilizando-se lisados totais de culturas das linhagens tumorais e fibroblastos. As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² até confluência entre 80-90%. As células foram tratadas com o composto de interesse e incubadas pelo período de tempo desejado e coletadas com tripsina/EDTA (0,25% / 0,53 M), centrifugadas por 5' a 1000 rpm, lavadas com 1X PBS, centrifugadas novamente e o *pellet* estocado a -80°C até o uso.

As células então foram lisadas em gelo utilizando o tampão *radio immunoprecipitation assay* (RIPA) (1% *sodium deoxycholate* (C₂₄H₃₉NaO₄), NaCl 150 mM, 1% *sodium dodecyl sulfate* (SDS), 1% TritonX-100, 2-*amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol - chloridric acid* (Tris-HCl) 50 mM), contendo os inibidores de protease aprotinina 2 µg/ml, leupeptina 5 µg/ml, pepstatina A 1 µg/ml, *phenilmethanesulfonyl fluoride* (PMSF) 1 mM, EDTA 5 mM, *ethylene glycol*

tetraacetic acid (EGTA) 1 mM, *sodium fluoride* (NaF) 10 mM e o inibidor de fosfatase, *sodium orthovanadate* (Na₃VO₄) 1 mM que foram adicionados à fresco.

As amostras foram incubadas no gelo por um período de 20' e as proteínas quantificadas pelo método do *bicinchoninic acid assay* (BCA) através do kit comercial Kit Pierce® Microplate BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). A quantidade de 30 µg de proteína de cada amostra foi submetida à eletroforese em 7,5% gel *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) para HC1 e mTOR, 10% para a cadeia LIC2 de dineína, NFKB1, AMBRA1 e β-actina e de 12,5% para LC3, Rab11A e Bim. Foi utilizado o tampão 5X Laemmli (5% SDS, 12,5% β-mercaptoethanol, 45% glycerol, 0,25% bromophenol blue, Tris-HCl 0,5 M pH= 6,8; em água destilada); para ressuspender as amostras, que foram submetidas à desnaturação proteica por aquecimento por 5' a 100°C.

A corrida se deu com a voltagem constante de 200 V e amperagem de 40 mA, para cada gel, em 1X tampão de corrida diluído a partir de 10X (Tris base 25 mM, licina 190 mM, 0,1% SDS; em água destilada). As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de *polyvinylidene fluoride* (PVDF), utilizando tampão de transferência (Tris-HCl 0,48 M, glicina 0,39 M, 0,04% SDS e 20% metanol – exceção para HC1 e mTOR: 0,1% SDS apenas; em água destilada) sob voltagem constante de 100 V e corrente de 400 mA durante 1h para 4 transferências.

A membrana foi bloqueada em solução de 5% BSA em tampão *tris-buffered saline with tween 20* (TBS-T) (Tris-HCl 20 mM pH= 7,4, NaCl 0,15 M e 0,1% Tween20) sob agitação. A membrana foi lavada 3x por 10' com TBS-T. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo primário *rabbit anti-human-HC1* 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), *rabbit anti-human-LIC2* 1:200 (Abcam), *rabbit anti-human-LC8-1/2* 1:50 (Santa Cruz Biotechnology), *rabbit anti-human-NFKB1* 1:1000 (Abcam, Cambridge), *rabbit anti-human-β-actina* 1:500 (Abcam, Cambridge), *rabbit anti-human-LC3* 1:1000 (Abcam, Cambridge), *mouse anti-human-Rab11A* 1:300 (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), *mouse anti-human-mTOR* 1:50 (Santa Cruz Biotechnology), *rabbit anti-human-AMBRA1* 1:50 (Santa Cruz Biotechnology) e *mouse anti-human-Bim* 1:100 (Santa Cruz Biotechnology), utilizando como controle interno *rabbit anti-human-GAPDH* 1:5000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

A membrana foi lavada 3x por 10' com TBS-T. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo secundário *horseradish peroxidase* (HRP) *goat anti-rabbit* 1:10000 (Abcam, Cambridge) ou *goat anti-mouse* 1:3000 (Abcam). A revelação foi realizada com receita caseira (Tris 1,5 M pH= 8,9, *paracoumaric acid* 20 mM, luminol 125 mM e 30% *hydrogen peroxide* (H₂O₂) em água) e as imagens adquiridas por quimioluminescência no equipamento ImageQuant® LAS 4000 (GE Healthcare).

A posição das bandas foi comparada com o marcador de peso molecular Colorburst® (Sigma-Aldrich), que foi aplicado no mesmo gel, para determinação da massa molecular aproximada das bandas observadas. As imagens foram minimamente processadas, igualmente para todas as amostras utilizando-se o *software* Windows Live para Windows 7® (Microsoft, Redmond, WA, USA), ajustando-se o contraste para +20%, para melhor visualização. As imagens também foram submetidas à análise densitométrica através do *software* ImageJ® do *National Institute of Health* (NIH) (NIH, USA), disponível no site (<http://imagej.nih.gov/ij/download.html>), para posterior análise estatística.

Nos ensaios de *western blotting* das cadeias de dineína e do alvo Rab11, não foram utilizados controles positivos, como inibidores do proteassomo, por exemplo, devido à falta de dados na literatura sobre a ação dessas drogas no aumento ou diminuição da expressão proteica dessas cadeias. A comparação é, portanto, entre células tratadas com Amblyomin-X e não-tratadas (tratadas com veículo, PBS). No experimentos com os alvos NFkB1, β -actina e Bim, foi utilizado como controle positivo, o MG-132. Nos ensaios com os alvos mTOR, AMBRA1 e LC3, foram utilizados dois controles positivos, o MG-132 e a rapamicina.

3.10 Microscopia confocal

O estudo da co-localização das moléculas de dineína com outras proteínas foi avaliado através de microscopia confocal. As células tumorais e fibroblastos foram cultivadas em garrafas de 25 cm² até confluência entre 80-90%. As células foram coletadas com tripsina/EDTA (0,25% / 0,53 M), sob centrifugação por 5' a 1000 rpm, contadas em câmara de Neubauer com solução de 0,4% *tripan blue* e então plaqueadas e cultivadas sobre as lamínulas de 15x15 mm estéreis em placa de 6

poços até confluência entre 80-90%. Após esse período as células foram tratadas com o composto de interesse e incubadas pelo período de tempo desejado.

As células foram então lavadas 2x com 1X PBS e fixadas com 4% paraformaldeído por 15' a temperatura ambiente. O mesmo passo de lavagem se repetiu e as células foram permeabilizadas com solução permeabilizante (0,5% Triton X-100 / 0,6% EDTA 0,5 M pH= 8 em 1X PBS) por 15' a temperatura ambiente. As amostras foram lavadas novamente e incubadas com solução de bloqueio 1% BSA por 30' a temperatura ambiente.

O excesso foi removido e a mistura de anticorpos primários produzidos em organismos diferentes foi adicionada na combinação desejada ou com nova incubação no caso de ser produzidos em organismos iguais: (i) *rabbit anti-human-HC1* (Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:50, (ii) *rabbit anti-human-LIC2* (Abcam, Cambridge) na diluição 1:50, (iii) *rabbit anti-human-LC8-1/2* (Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:50, (iv) *mouse anti-human-Rab11A* (EMD Millipore) na diluição 1:100, (v) *mouse anti-human-mTOR* (Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:50, (vi) *mouse anti-human-Bim* (Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:50, (vii) *rabbit anti-human-AMBRA1* (Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:50.

Os anticorpos foram incubados *overnight* a 4°C, ou realizada nova incubação com primário e depois secundário (no caso dos alvos LC8-1/2 / AMBRA1). Nova lavagem foi realizada e as amostras foram incubadas com o a mistura de anticorpos secundários Alexa® Fluor 488 *goat anti-mouse* (Invitrogen™ Life Technologies Inc.) na diluição 1:200, Alexa® Fluor 532 *goat anti-rabbit* (Invitrogen™ Life Technologies Inc.) na diluição 1:200 e Alexa® Fluor 647 *goat anti-rabbit* (Invitrogen™ Life Technologies Inc.) na diluição 1:200 por 1 h a temperatura ambiente no escuro.

As células foram lavadas e então se aplicou 1 gota de solução de montagem e *anti-fade* VectaShield® (Vecta Labs) na lâmina com a lamínula contendo as células viradas para baixo e então selado com esmalte de unha incolor. A análise ocorreu em microscópio confocal Zeiss LSMS 510 (Zeiss) do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, com magnificação de 40X e resolução nos eixos x, y e z.

Nos ensaios de confocal não foram utilizados controles positivos, como inibidores do proteassomo, por exemplo, devido à falta de dados na literatura sobre a ação dessas drogas na indução da co-localização da dineína com outros. A comparação é, portanto, entre células tratadas com Amblyomin-X e não-tratadas

(tratadas com veículo, PBS). Testes preliminares com o anticorpo secundário, sozinho, foram realizados para garantir a ausência de autofluorescência.

3.11 Ensaio de inibição da dineína e internalização do Amblyomin-X

O Amblyomin-X foi previamente conjugado com um fluoróforo impermeável à célula, segundo as recomendações do kit Alexa® Fluor 488 Microscale Protein Labeling Kit (Invitrogen™ Life Technologies Inc.). O corante reativo, contém uma porção *tetrafluorophenyl ester* (TFP), que é mais estável em solução do que outros corantes. A conjugação envolve a reação eficiente entre os ésteres TFP com as aminas primárias das proteínas, formando o conjugado estável proteína-corante. A proteína foi então denominada 488-Amblyomin-X.

Posteriormente, células tumorais e fibroblastos foram cultivadas em garrafas de 25cm², coletadas com tripsina/EDTA (0,25% / 0,53 M) e contadas na câmara de Neubauer com solução de 0,4% *tripan blue*. As células foram então plaqueadas em discos de 35 mm e submetidas aos tratamentos com o 488-Ambly sozinho ou, incluindo inibição prévia da dineína pelo agente ciliobrevin A (CA), em culturas com confluência entre 80-90%.

A seguir, o meio foi removido, seguido da adição de Syto59 5 µM (Invitrogen™ Life Technologies Inc.), diluído em meio de cultura, para a marcação do núcleo. O meio foi removido e as células vivas foram lavadas 2x com meio de cultura respectivo de cada linhagem e analisadas por microscopia confocal em microscópio Zeiss LSMS 510 (Zeiss) do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, com magnificação de 40X e resolução nos eixos x, y e z. Testes preliminares com o fluoróforo 488, sozinho, foram realizados para garantir a ausência de autofluorescência.

Nos ensaios de internalização não foi utilizado a linhagem de fibroblastos devido à não internalização do Amblyomin-X nessa linhagem (MORAIS 2014). A comparação é, portanto, entre ambas as linhagens tumorais (SK-MEL-28 e MIA PaCa-2) e os tratamentos Amblyomin-X / Ambly/CA.

3.12 Ensaio de inibição da dineína e atividade do proteassomo

Células tumorais e fibroblastos foram cultivadas em garrafas de 25cm² com o mesmo número de células contadas na câmara de Neubauer com solução de 0,4% *tripan blue* e submetidas aos tratamentos com o composto de interesse, incluindo inibição da dineína pelo CA, em culturas com confluência de 80-90%. As células foram então coletadas com tripsina/EDTA (0,25% / 0,53 M), centrifugadas por 5' a 1000 rpm e o *pellet* estocado a -80°C até o uso, após lavagem com 1X PBS.

No momento do uso, foi adicionado ao *pellet* o tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH= 7,4, NaCl 150 nM, EGTA 1 mM, *magnesium chloride* (MgCl₂) 1 mM, 10% *glycerol*, 0,5% *nonidet*), que foi vortexado e incubado por 10' em gelo. Para garantir a lise, a solução contendo o *pellet* foi passada na seringa de insulina de 8 x 0,3 mm, com cuidado para não formar espuma, por 12x, com posterior incubação por 20' em gelo.

As amostras foram então centrifugadas a 13000 rpm por 30' a 4°C e o sobrenadante foi submetido à dosagem de proteínas pelo método de Bradford, utilizando-se 1 mL do reagente e 2 µL de amostra, em duplicata. A concentração de proteínas foi calculada a partir de uma equação de reta realizada com diluições de BSA e a média foi dividida por 2 (fator de diluição). A leitura se deu em espectrofotômetro Spectra Max Gemini XPS (Molecular Devices) em comprimento de onda $\lambda = 595$ nm.

A seguir, as amostras foram submetidas à cinética enzimática. Para isso, foram utilizados dois substratos cromogênicos para acessar as atividades tipo-tripsina e tipo-quimotripsina, respectivamente: z-ARR-AMC e Suc-LLVY-AMC (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Foi então, pipetado em uma placa apropriada de 96 poços: solução tampão (Tris 20 mM pH= 7,5), 50 µg de amostra e o substrato desejado (z-ARR-AMC 10 mM e Suc-LLVY-AMC 2,5 mM), em um volume final de reação de 100 µL.

A cinética foi realizada com os parâmetros: excitação $\lambda = 365$ nm, emissão $\lambda = 440$ nm, por 45' a 37°C com *automix before* e *between*; e com leituras a cada 5' em espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices). As velocidades médias (V_m) de reação foram obtidas e utilizadas no cálculo de atividade do proteassomo (AP), relativos ao controle (células tratadas com veículo, PBS no caso do Amblyomin-X e; DMSO no caso do BTZ, CA e MG-132) expresso em %, segundo a

fórmula a seguir:

$$AP (\%) = (V_{m_{\text{tratado}}} \times 100) / V_{m_{\text{controle}}}$$

Nos ensaios do proteassomo foram utilizados como controles positivos, o MG-132 e o BTZ, além dos tratamentos com o Amblyomin-X sozinho ou, incluindo inibição prévia da dineína pelo CA. Além disso, não foi utilizado a linhagem de fibroblastos devido à não inibição do proteassomo pelo Amblyomin-X nessa linhagem (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). A comparação é, portanto, entre ambas as linhagens tumorais (SK-MEL-28 e MIA PaCa-2) e os tratamentos Ambly / Ambly/CA.

3.13 Avaliação dos ligantes de dineína por *complex-immunoprecipitation* (Co-IP) e espectrometria de massa

Células tumorais e fibroblastos foram cultivadas em garrafas de 25 cm² até confluência entre 80-90%, tratadas com o composto de interesse e incubadas pelo período de tempo desejado. As células foram coletadas por tripsina/EDTA (0,25% / 0,53 M) após lavagem com 1X PBS e o *pellet*, estocado a -80°C até o uso.

O experimento foi dividido em cinco passos: acoplamento do anticorpo *rabbit anti-human-HC1* (Santa Cruz Biotechnology) à *bead* magnética; Co-IP; separação eletroforética; digestão das bandas proteicas e; aplicação no espectrômetro de massa. O anticorpo foi previamente centrifugado a 2500 rpm a 4°C por 10', para desagregação. O acoplamento do anticorpo anti-HC1, foi realizado segundo as instruções do fabricante do kit Dynabeads® Antibody Coupling Kit (Invitrogen™ Life Technologies Inc.) com o auxílio da estante magnética Dynamag®-2 (Invitrogen™ Life Technologies Inc.). Foi utilizado uma quantidade de 7 µg de anticorpo por 1 mg de *bead*. O conjugado *bead*-anticorpo foi armazenado a 4°C em solução fornecida pelo kit, até o momento do uso.

A Co-IP, foi realizada seguindo as instruções do kit Dynabeads® Co-Immunoprecipitation Kit (Invitrogen™ Life Technologies Inc.) com o auxílio da estante magnética Dynamag®-2 (Invitrogen™ Life Technologies Inc.). Foi utilizado uma quantidade de 5 mg do conjugado *bead*-anticorpo anti-HC1 para o procedimento. Os *pellets* foram lisados após padronização do tampão de extração fresco, segundo as recomendações do kit (1x IP (fornecido no kit), NaCl 100 mM,

MgCl₂ 2 mM, *dithiothreitol* (DTT) 1 mM, PMSF 0,1 M na diluição 1:200; em água destilada).

Os *pellets* foram pesados e ressuspensos em tampão de extração na proporção de 1:9 e incubados por 15' em gelo. A seguir os lisados foram centrifugados a 1000 rpm por 5' a 4°C para remoção de *debris* celular. O sobrenadante foi utilizado imediatamente na Co-IP seguindo as instruções do kit, sendo, ao final do protocolo, utilizado o tampão HPH EB sugerido pelo kit (*amonium hydroxide* (NH₄OH) 0,5 M, EDTA 0,5 mM em água destilada), utilizando-se a estante magnética, para o recolhimento do eluato.

O eluato foi posteriormente submetido, *overnight*, ao processo de liofilização. As amostras liofilizadas foram ressuspensas em 20 µL de 5X tampão Laemmli e submetidas à desnaturação proteica por aquecimento por 5' a 100°C. As proteínas foram separadas por eletroforese em 10% gel SDS-PAGE utilizando-se o marcador de peso molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific), para comparação das bandas obtidas. A corrida se deu com a voltagem constante de 200 V e amperagem de 40 mA, para cada gel, em 1X tampão de corrida. A seguir, o gel foi corado com solução de Coomassie por 30' sob agitação, lavado com água destilada e descorado com solução descorante (5% ácido acético, 5% metanol em água destilada) *overnight* a temperatura ambiente sob agitação.

As bandas com maior intensidade foram submetidas ao processo de digestão após o recorte com o auxílio de uma espátula metálica previamente limpa. Cada banda cortada e separada em tubos *ependorf* de 1,5 mL foram descorados com solução *destain* (5% *acetic acid*, 50% *methanol* e água destilada) por 2 h a temperatura ambiente. A solução foi trocada por uma nova e incubada por mais 1 h a temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram desidratadas com 100% *acetonitrile* por 5' por 2 vezes seguidas e, evaporadas em capela de exaustão por 5'.

As amostras foram reduzidas com DTT 10 mM por 30' a temperatura ambiente, alquiladas com *iodoacetamide* 50 mM por 30' a temperatura ambiente e lavadas com *amonium bicarbonate* ((NH₄)₂CO₃) 100 mM por 10' a temperatura ambiente. As amostras foram desidratadas novamente com 100% *acetonitrile* por 5', rehidratadas com (NH₄)₂CO₃ 100 mM por 10' e desidratadas com 100% *acetonitrile* por 5' por 2 vezes seguidas e, por fim, evaporadas em capela de exaustão por 5'.

Após esse processo, as amostras foram digeridas com tripsina 20 ng/μL em (NH₄)₂CO₃ 50 mM por 30' em gelo. O excesso foi removido e as amostras foram incubadas *overnight* a 37°C, com (NH₄)₂CO₃ 50 mM. No dia seguinte, foi adicionado o tampão de extração 1 (5% ácido fórmico em água destilada) por 10' seguido da adição do tampão de extração 2 (5% *formic acid*, 50% *acetonitrile* em água destilada) por 10'. As amostras foram evaporadas em um concentrador à vácuo, *speed vac*, AVC 2-18 CD Plus (Christ, Germany), sob rotação de 1300 min⁻¹.

As amostras foram estocadas a -20°C até o momento da aplicação no espectrômetro de massa. Antes da aplicação, as amostras foram ressuspendidas em tampão de extração 1, pipetadas em uma placa de 96 poços e injetadas no espectrômetro de massa do tipo *liquid chromatograph mass spectrometer-ion trap-time of flight* (LCMS-IT-TOF).

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se a plataforma *online* MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) através da pesquisa de fragmentos de íons (MS/MS *ion search*), utilizando as bases de dados NCBI nr e SwissProt. Os parâmetros utilizados incluíram a clivagem pela enzima tripsina; busca em *Homo sapiens* e em todas as entradas (para procura do Amblyomin-X); *carbamidomethyl* (C) como modificação fixa; *oxidation* (M) como modificação variável; tolerância de peptídeo de ± 0,5 Da e; carga do peptídeo +1, +2 e +3.

A ferramenta *online Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* (String) (<http://string-db.org>) (FRANCESCHINI *et al.* 2013) foi utilizada para a visualização do relacionamento entre as proteínas ligadas à dineína após a análise por MASCOT, como interações diretas proteína-proteína conhecidas e preditas. A análise pela ferramenta String também incluiu os termos *curated pathway* da plataforma Reactome (<http://www.reactome.org>) e *annotated pathway* da plataforma *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg>), sugerindo assim, possíveis vias envolvidas (ativadas ou inibidas) com as proteínas analisadas, sendo a interação delas de maneira direta ou indireta.

Nos ensaios de Co-IP/massa não foram utilizados controles positivos, como inibidores do proteassomo, por exemplo, devido à falta de dados na literatura sobre a ação dessas drogas na indução de interação entre dineína e proteínas intracelulares. A comparação é, portanto, entre ambas as linhagens tumorais (SK-

MEL-28 e MIA PaCa-2) tratadas com Amblyomin-X por 24 h, para se encontrar ligantes comuns entre as linhagens, em cada período.

3.14 Análise estatística

Os estudos de inferência foram realizados pelo método global do *analysis of variance* (ANOVA) 1 fator, com intervalo de confiança de 95% onde p valor < 0,05 revela indícios de diferença estatística significativa entre as médias. O pós-teste do ANOVA realizado para comparação entre as variáveis foi realizada pelo método de Bonferroni's *post-hoc test*.

As estatísticas básicas (média, desvio-padrão e erro-padrão) pelo *software* GraphPad Prism® (GraphPad, San Diego, CA, USA). As análises e curvas de regressão linear foram realizadas pelo *software* Excel 2010 (Microsoft).

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da expressão gênica da dineína e outros alvos em células tratadas com Amblyomin-X

Primeiramente, antes de se avaliar a expressão gênica das diferentes cadeias da dineína e alvos relacionados ao controle de qualidade proteico intracelular, o ensaio de qPCR foi padronizado. O primeiro passo foi validar a quantidade de cDNA ideal para ser utilizada nos experimentos.

Foram realizados testes com as linhagens tumorais para verificação da expressão gênica das cadeias de dineína e outros alvos, com uma quantidade inicial de 100 ng de cDNA e verificou-se que alguns genes são pouco expressos constitutivamente, principalmente na linhagem SK-MEL-28 e, que sua quantificação por essa metodologia se torna imprecisa uma vez que o crescimento exponencial se inicia próximo do final dos 40 ciclos de amplificação.

Sendo assim, foram realizados testes com 250 ng de cDNA na linhagem SK-MEL-28, por ser a linhagem com maior número de alvos pouco expressos. Verificou-se que alguns dos genes com baixa amplificação, passaram a amplificar mais cedo, porém, ainda de uma forma muito discreta.

Conseqüentemente, a curva em log foi deslocada para a esquerda, assim como a do controle endógeno utilizado, GAPDH, iniciando sua amplificação muito cedo e tornando mais impreciso o cálculo de expressão gênica desses alvos. A **Figura 14** mostra o deslocamento da amplificação dos alvos e do controle endógeno na padronização da quantidade utilizada de cDNA.

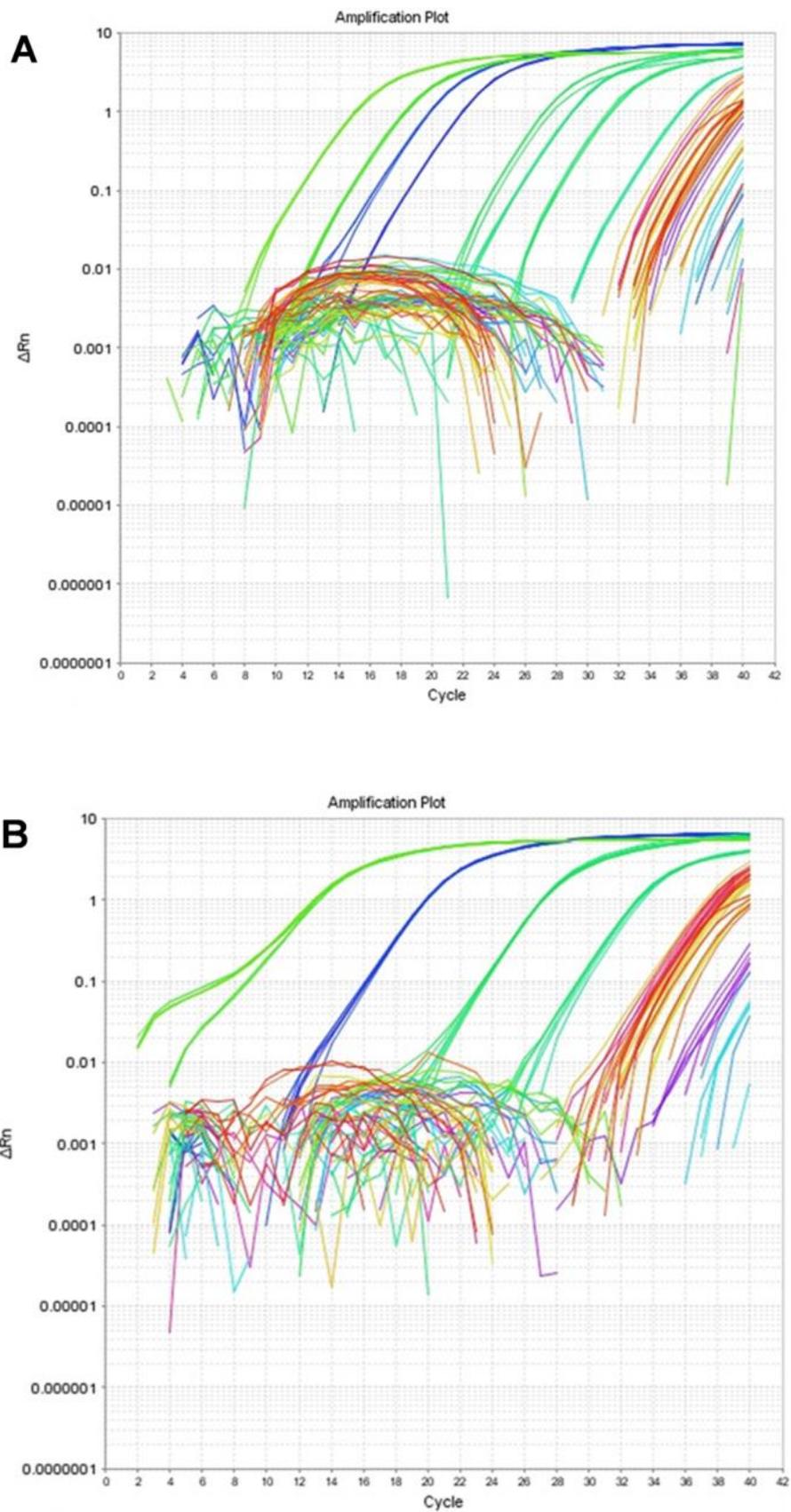


Figura 14 – Padronização da quantidade de cDNA. O gráfico mostra diversas curvas de amplificação de diversos alvos em células SK-MEL-28, sendo a quantidade de cDNA utilizada de 100 ng (A) e de 250 ng (B). A primeira curva, em ambos os gráficos, em

verde claro; se refere ao controle endógeno GAPDH. No eixo Y, encontra-se o ΔRn (*normalized reporter*), que é a normalização da intensidade de fluorescência do corante repórter pela do corante de referência passiva. No eixo X, encontra-se os ciclos de amplificação. A reta *threshold*, foi ajustada em uma região que se vê claramente o crescimento exponencial da amplificação.

Sendo assim, foi determinado para as linhagens tumorais SK-MEL-28 e MIA PaCa-2, a utilização da quantidade de 100 ng de cDNA e, os genes pouco expressos, foram excluídos da análise. Os alvos que apresentaram baixa amplificação ou amplificação tardia em SK-MEL-28 correspondem às proteínas codificadas: HC1, IC1, IC2, LIC1, LC8-1, TcTex1, TcTex3, Roadblock1 e Roadblock2 (cadeias da dineína), MEKK1 e NFKB1.

Apenas um alvo apresentou baixa amplificação nas células MIA PaCa-2. Este alvo foi aquele que codifica a proteína Roadblock2 (cadeia leve de dineína). Sendo assim, a análise por qPCR também não foi possível.

A padronização da quantidade de cDNA na linhagem de fibroblasto se deu inicialmente com 50 ng e verificou-se que todos os genes de interesse foram expressos significativamente. Sendo assim, todos os genes foram incluídos na análise.

O próximo passo foi submeter cada par de *primers* a uma validação com uma curva de 4 pontos de diluição diferentes e calculados por regressão linear como citado na metodologia. Essa validação permitiu que fosse possível calcular a E de reação de cada par de *primers*. Os números obtidos foram então aplicados no cálculo da expressão gênica de cada um dos alvos selecionados para análise, corrigindo assim, os níveis finais de mRNA.

Sendo assim, além de todas as cadeias da dineína citoplasmática 1 e de duas subunidades da dinactina (p150Glued e dinamitina); foram ainda selecionados outros alvo para análise por qPCR: a chaperona Hsp70, envolvida na via não-exclusiva de ubiquitinação (GAMERDINGER *et al.* 2010); a enzima conjugadora E2 de ubiquitina via K63 (BEDFORD *et al.* 2010) e; a MAPK, MEKK1, envolvida no recrutamento de agregossomos (GARCIA-MATA *et al.* 2002). Além disso, a subunidade NFKB1 do fator de transcrição NF- κ B (BALDWIN JR 1996) e a β -actina foram incluídos como alvos.

Os dados da **Tabela 2** abaixo foram utilizados para correção de eficiência em todas as análises para o cálculo da expressão gênica.

Tabela 2 - Eficiência de cada par de *primers*

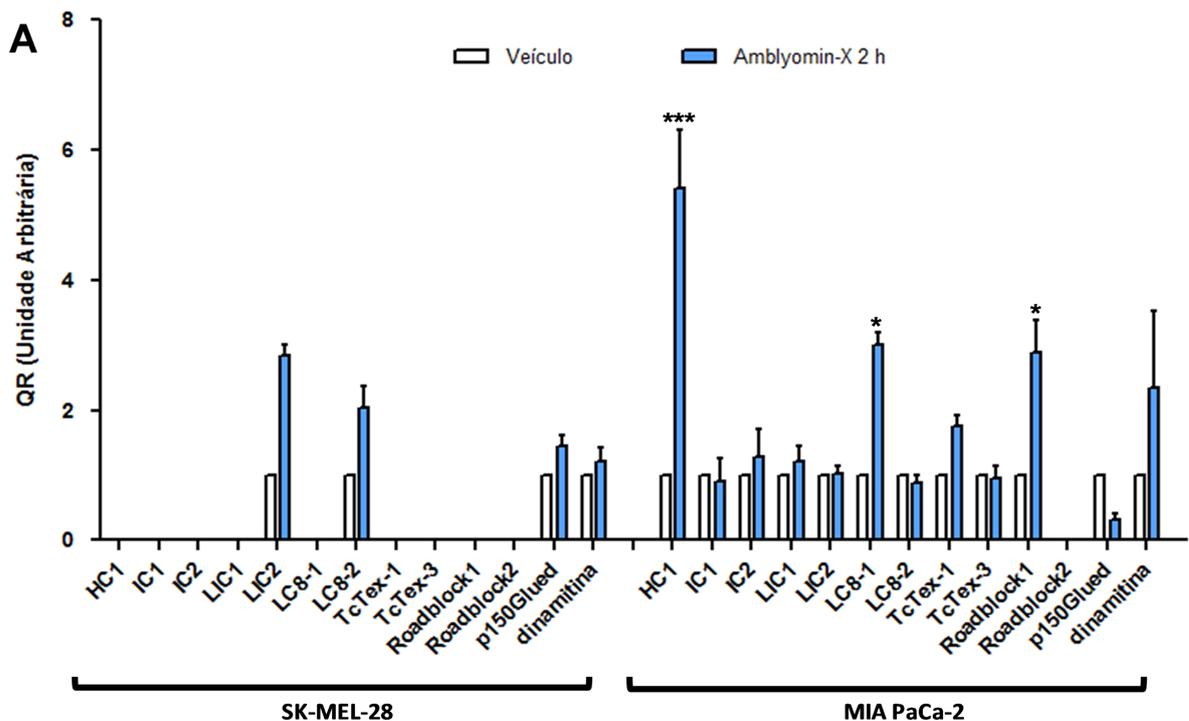
Alvo	R ²	Slope	E	E (%)
GAPDH	0,9936	-3,5514	1,91	91,240
β -actina	0,9987	-2,9487	2,18	118,340
HC1	0,9831	-2,9698	2,17	117,132
IC1	0,9979	-3,0888	2,11	110,742
IC2	0,9877	-3,9101	1,80	80,197
LIC1	0,9842	-4,1499	1,74	74,169
LIC2	0,9928	-3,6549	1,88	87,761
LC8-1	0,9976	-3,6853	1,87	86,788
LC8-2	0,9945	-3,7605	1,84	84,468
TcTex1	0,9967	-3,7675	1,84	84,259
TcTex3	0,9999	-3,6212	1,89	88,865
Roadblock1	0,9971	-3,6362	1,88	88,370
Roadblock2	0,9967	-3,0744	2,11	111,479
p150Glued	0,9911	-3,0049	2,15	115,174
dinamitina	0,9991	-3,2342	2,04	103,796
NFKB1	0,9893	-3,6298	1,89	88,581
Hsp70	0,9998	-3,0319	2,14	113,711
Ubc13	0,9974	-3,0078	2,15	115,015
MEKK1	0,9821	-3,0387	2,13	113,348

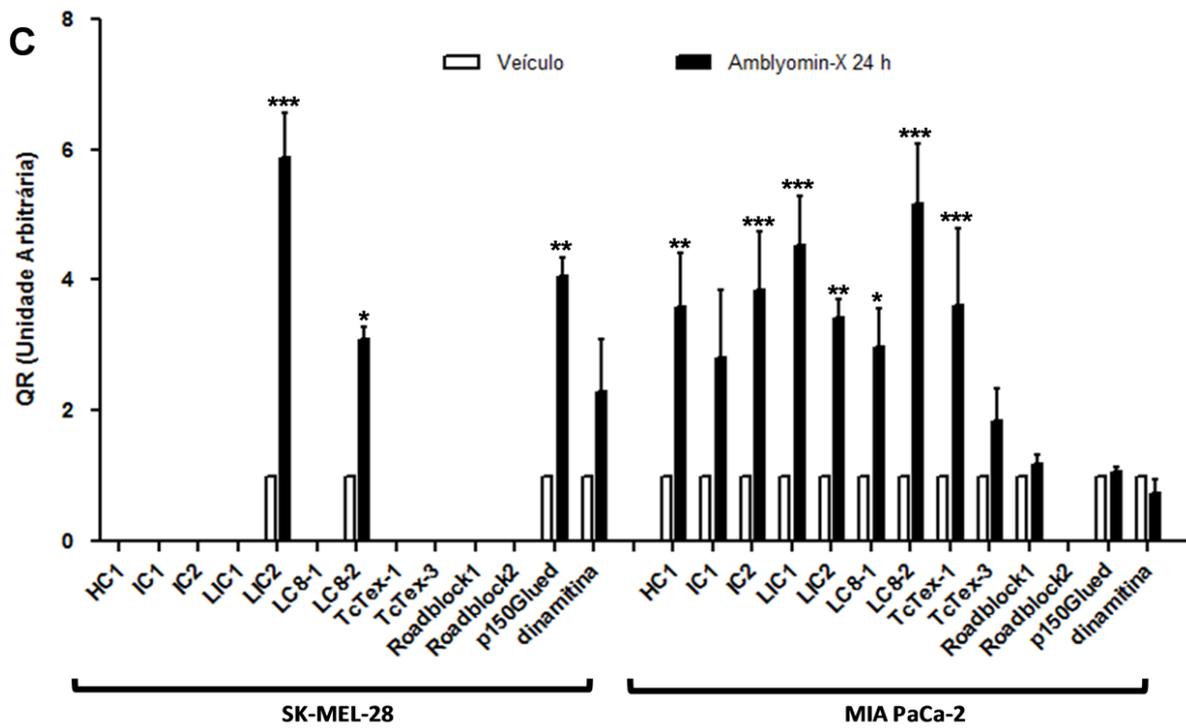
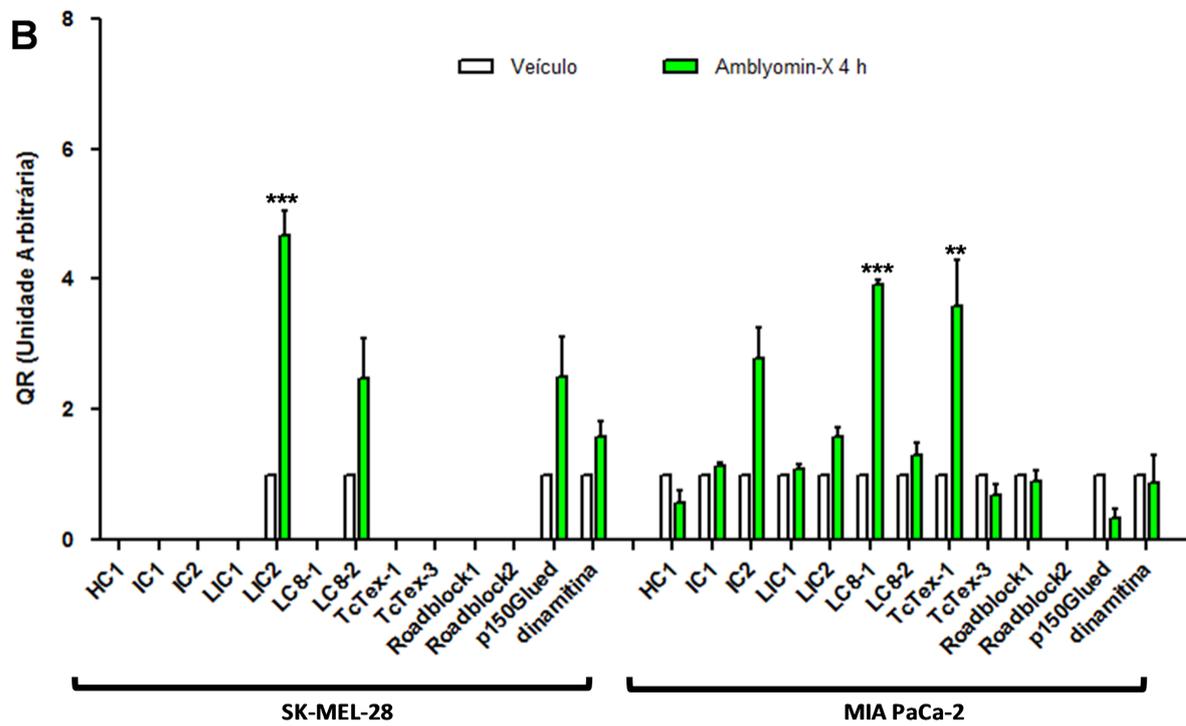
A eficiência em número absoluto (E) de cada par de *primers* de cada alvo foi utilizada em todos os ensaios de qPCR para cálculo de correção dos níveis de mRNA. A E também foi expressa em % para melhor compreensão. O R² foi aceito somente se $\geq 0,95$. O slope equivale ao coeficiente angular (x) da equação de reta obtida

A partir desses dados, os ensaios de qPCR foram realizados e a análise da expressão gênica das cadeias de dineína e dinactina na linhagem SK-MEL-28, revelou que a cadeia de dineína LIC2 apresentou um aumento nos níveis de mRNA a partir de 4 h e 24 h de tratamento com Amblyomin-X, enquanto que LC8-2 revelou um aumento a partir de 24 h de tratamento (**Figura 15A, 15B e 15C**). O gene que codifica a subunidade dinamitina da dinactina não apresentou alterações

importantes em nenhum dos tempos de tratamento (**Figura 15A, 15B e 15C**), ao contrário da subunidade p150Glued, que apresentou aumento nos níveis de mRNA (**Figura 15A, 15B e 15C**). Nas células SK-MEL-28, o Amblyomin-X induziu a superexpressão dos genes que codificam Hsp70 e Ubc13 a partir de 2 h e dos alvos β -actina e Ubc13 a partir de 24 h de tratamento (**Figura 15D**).

Com relação à linhagem MIA PaCa-2, os ensaios de qPCR revelaram que a expressão das cadeias de dineína sofreu um aumento significativo, principalmente a partir de 24 h de tratamento, em praticamente todas as cadeias (HC1, IC2, LIC1, LIC2, LC8-1, LC8-2 e TcTex1) (**Figura 15A, 15B e 15C**). O mesmo não ocorreu em nenhuma das cadeias de dinactina em nenhum tempo de tratamento (**Figura 15A, 15B e 15C**). Observou-se também aumento das cadeias HC1, LC8-1 e Roadblock1 a partir de 2 h de tratamento e da cadeia LC8-1 a partir de 4 h de tratamento com Amblyomin-X (**Figura 15A, 15B e 15C**). Nesta mesma linhagem celular, observou-se um aumento expressivo do gene que codifica NFKB1 e do gene que codifica a enzima Ubc13 após 24 h de tratamento com Amblyomin-X e em Ubc13 após 2 h (**Figura 15D**). Nenhuma diferença foi observada nos alvos Hsp70, β -actina e MEKK1 (**Figura 15D**).





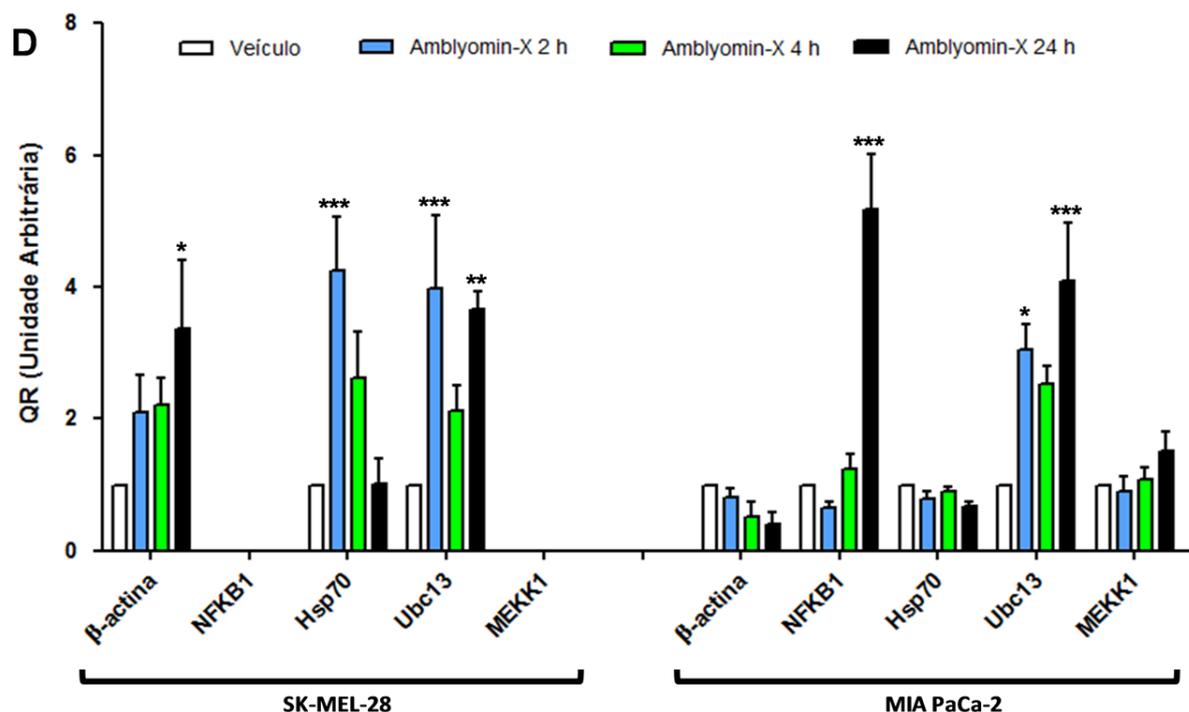


Figura 15 – Análise da expressão gênica da dineína e outros alvos nas células tumorais. qPCR de cadeias de dineína e duas subunidades da dinactina nas células SK-MEL-28 e MIA PaCa-2, após indução com Amblyomin-X por (A) 2 h, (B) 4 h e (C) 24 h. qPCR de alvos relacionados ao controle de qualidade proteico intracelular nas células SK-MEL-28 e MIA PaCa-2, após indução com Amblyomin-X por (D) 2 h, 4 h e 24 h. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou Amblyomin-X 0,5 μM. Os resultados foram calculados relativos ao controle (veículo) e são expressos em média ± erro padrão do aumento do *fold* de mRNA sobre o controle (considerado como 1) em unidades arbitrárias. Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001.

As análises de qPCR em fibroblastos humanos revelaram que a expressão de muitas cadeias de dineína foi aumentada após 4 h de tratamento com Amblyomin-X (HC1, IC1, LIC1, LC8-2, TcTex1, TcTex3 e Roadblock1) e apenas de Roadblock2 após 2 h de tratamento (**Figura 16A**). Não houve diferença na expressão de nenhuma das duas subunidades da dinactina estudadas em nenhum tempo de tratamento (**Figura 16A**). No entanto, observou-se uma notável normalização da expressão de todas as cadeias de dineína no após 24 h de tratamento com Amblyomin-X (**Figura 16A**).

O estudo revelou também, em fibroblastos, que não houve diferenças nos níveis de mRNA de β-actina e MEKK1 (**Figura 16B**). No entanto, os genes que codificam Hsp70, Ubc13 e NFKB1 apresentaram um aumento após 4 h de tratamento, sendo normalizados após 24 h de tratamento com a proteína recombinante (**Figura 16B**).

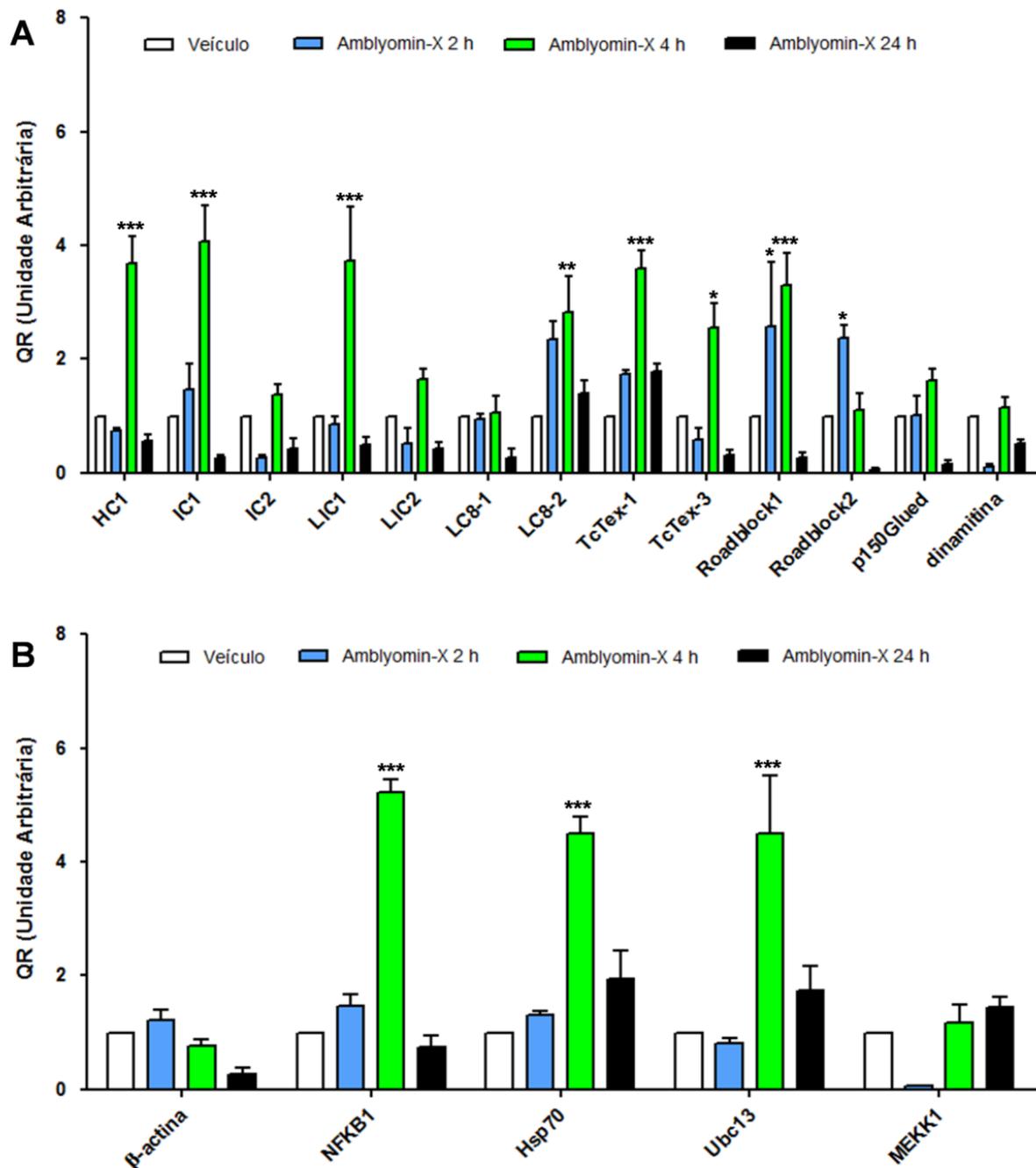
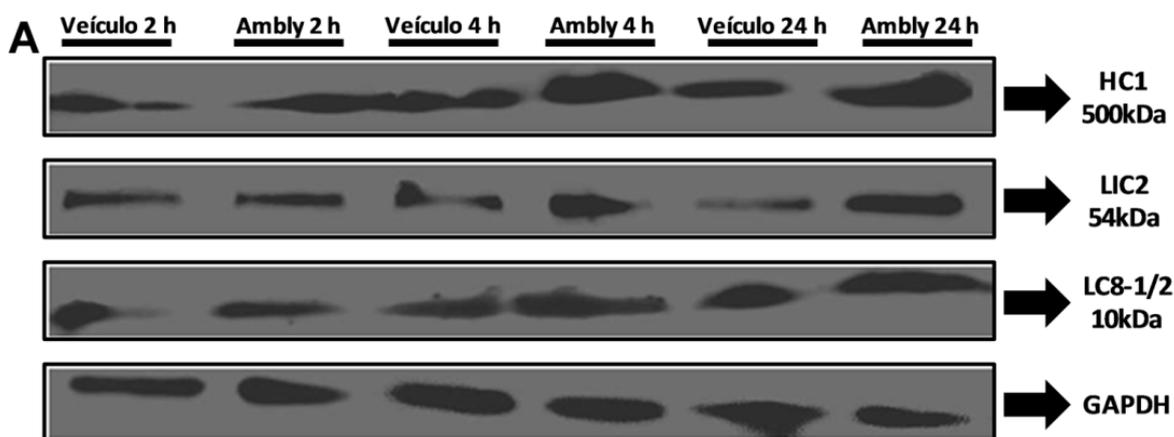


Figura 16 – Análise da expressão gênica da dineína e outros alvos em fibroblatos. (A) qPCR de cadeias de dineína e duas subunidades da dinactina em fibroblatos, após indução com Amblyomin-X por 2 h, 4 h e 24 h. **(B)** qPCR de alvos relacionados ao controle de qualidade proteico intracelular em fibroblatos, após indução com Amblyomin-X por 2 h, 4 h e 24 h. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou Amblyomin-X 0,5 μ M. Os resultados foram calculados relativos ao controle (veículo) e são expressos em média \pm erro padrão do aumento do *fold* de mRNA sobre o controle (considerado como 1) em unidades arbitrárias. Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

4.2 Avaliação da expressão proteica da dineína, β -actina e NFKB1 em células tratadas com Amblyomin-X

O próximo passo foi avaliar a expressão proteica da dineína, para correlacionar com os dados de qPCR. Para isso, foram selecionadas três cadeias para análise da expressão proteica: HC1 por ser a cadeia motora (PFISTER *et al.* 2006); LIC2 por estar superexpressa em estudos de *microarray* (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010) e nos dados apresentados de qPCR (**Figura 15B e 15C**) e; LC8-1/2, através de um anticorpo que reconhece as duas cadeias, por estarem alteradas nos ensaios de qPCR.

A avaliação por *western blotting*, em SK-MEL-28, revelou um aumento da expressão proteica das três cadeias da dineína após 24 h de tratamento com Amblyomin-X; das cadeias HC1 e LIC2 após 4 h e de HC1 após 2 h (**Figura 17A e 17C**). Na linhagem MIA PaCa-2, o aumento das três cadeias também foi observado após 24 h de tratamento, mas também após 4 h e; apenas de HC1 e LC8-1/2 após 2 h de tratamento com Amblyomin-X (**Figura 17B e 17C**).



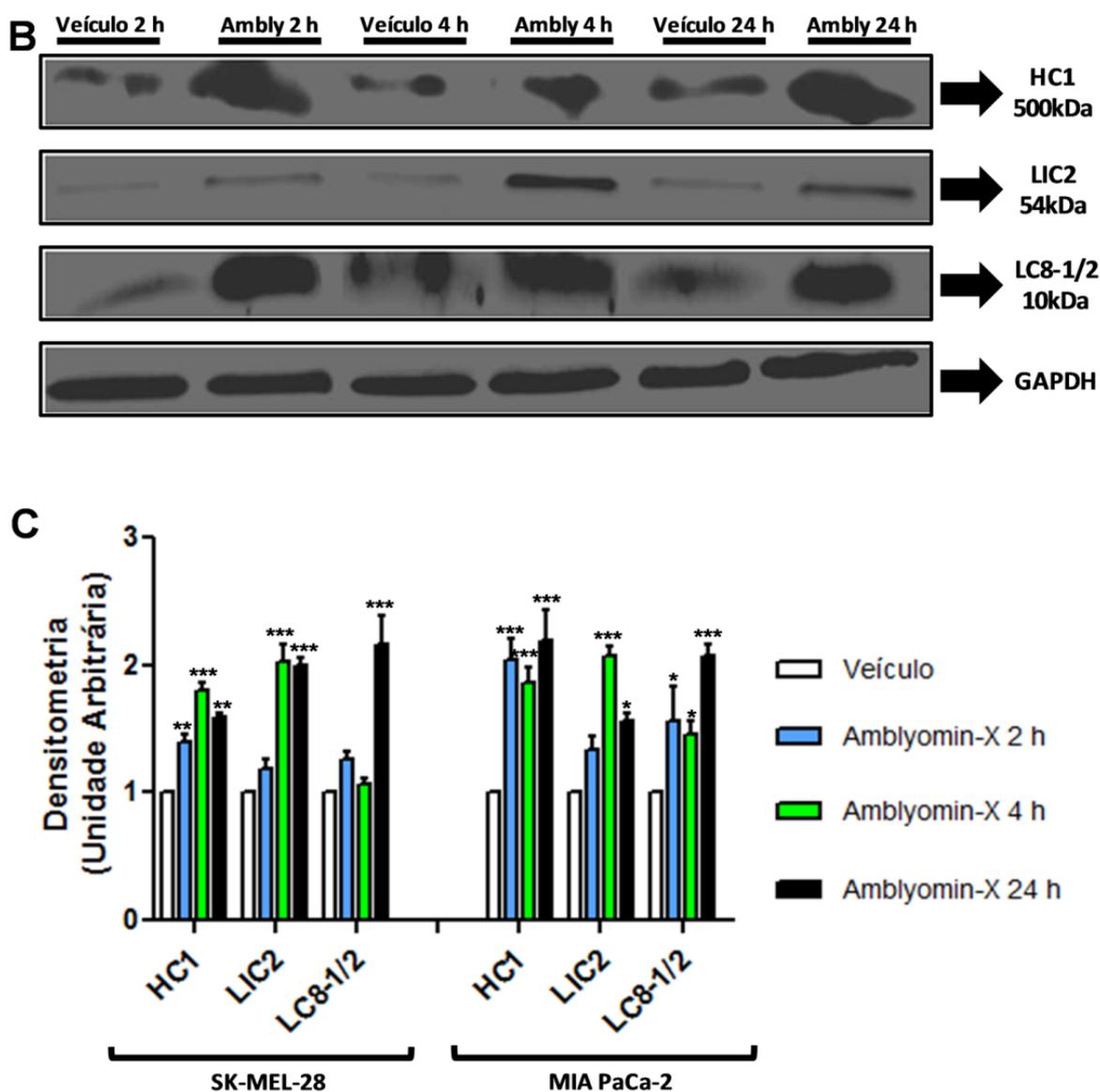


Figura 17 – Análise da expressão proteica de dineína nas células tumorais. *Western blotting* representativo das cadeias de dineína em **(A)** SK-MEL-28 e **(B)** MIA PaCa-2. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μ M por 2 h, 4 h ou 24 h. As imagens são representativas de três experimentos independentes. **(C)** Densitometria das bandas observadas nas linhagens SK-MEL-28 e MIA PaCa-2. Os resultados foram calculados relativos ao controle (veículo) e são expressos em média \pm erro padrão do aumento do *fold* da expressão proteica sobre o controle (considerado como 1) em unidades arbitrárias. Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

A mesma análise em fibroblastos mostrou que praticamente nenhuma alteração na expressão proteica desses alvos foi observada, com exceção do tempo de 4 h de tratamento com Amblyomin-X, onde ocorre aumento da cadeia LC8-1/2 de dineína (**Figura 18A e 18B**). No entanto, este aumento observado foi normalizado após 24 h de tratamento com a proteína recombinante (**Figura 18A e 18B**).

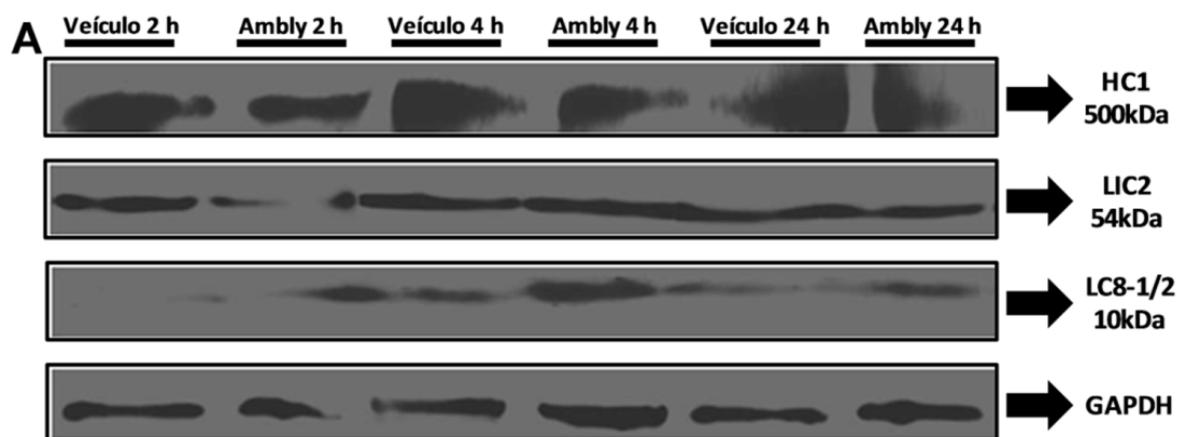
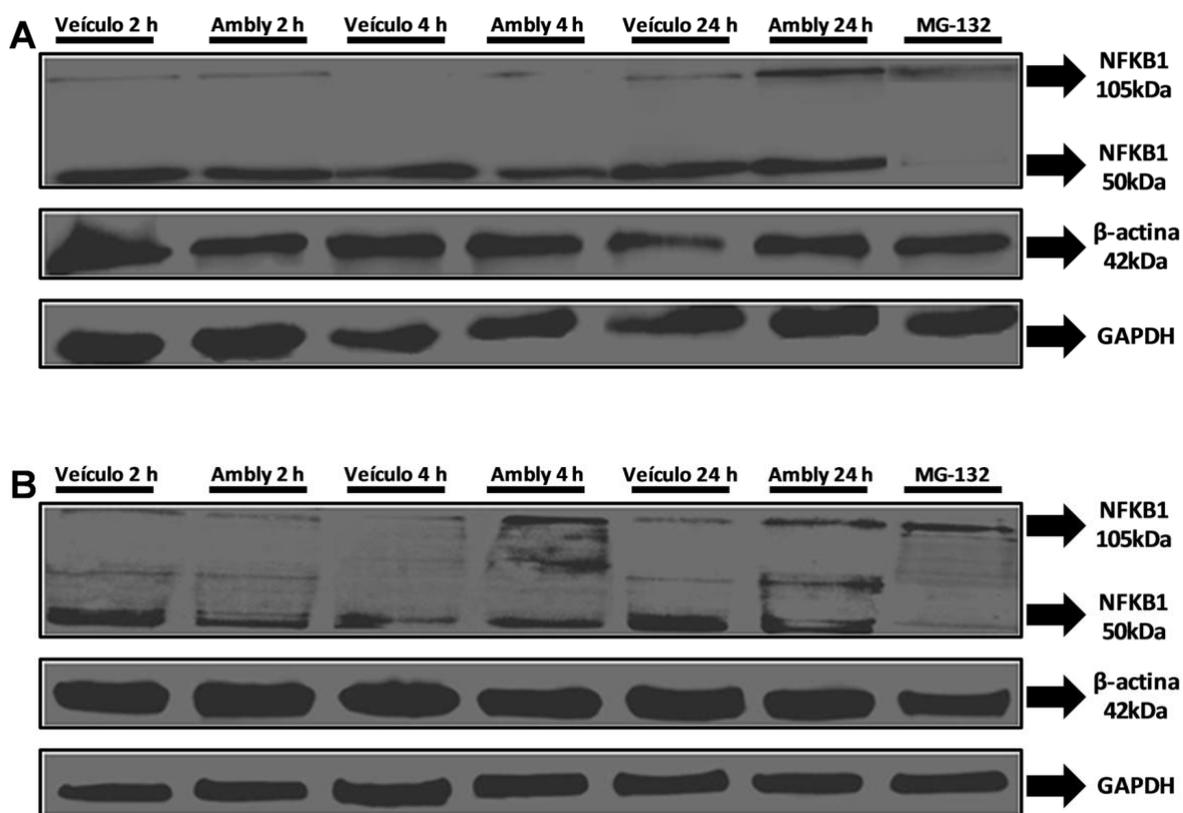


Figura 18 – Análise da expressão proteica de dineína em fibroblastos. (A) *Western blotting* representativo das cadeias de dineína em fibroblastos. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μ M por 2 h, 4 h ou 24 h. As imagens são representativas de três experimentos independentes. **(B)** Densitometria das bandas observadas nas linhagens SK-MEL-28 e MIA PaCa-2. Os resultados foram calculados relativos ao controle (veículo) e são expressos em média \pm erro padrão do aumento do *fold* da expressão proteica sobre o controle (considerado como 1) em unidades arbitrárias. Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

A seguir, foi avaliado a proteólise da subunidade NFKB1 do NF- κ B, uma vez que o proteassomo degrada a fração p105 na fração ativa p50 para atuar na forma do dímero mais abundante NFKB1(p50)/RelA (BALDWIN JR 1996; COHEN *et al.* 2006; LIN *et al.* 1998) e; pelo fato do NF- κ B ser translocado para o núcleo com o auxílio da dineína (SHRUM *et al.* 2008). Além disso, o NFKB1 se mostrou alterado nos ensaios de qPCR em MIA-PACA-2 após 24 h de tratamento com Amblyomin-X

(Figura 15D) e em fibroblastos após 4 h (Figura 16B). A expressão proteica de β -actina também foi avaliada por estar alterada em ensaios de qPCR nas células SK-MEL-28 (Figura 15D).

Em SK-MEL-28, o Amblyomin-X induziu um bloqueio na proteólise de NFKB1, evidenciado pelo aumento da fração p105 após 24 h de tratamento; a proteólise também foi bloqueada no controle positivo MG-132 (Figura 19A e 19C). Nesta mesma linhagem, foi observado um aumento na expressão proteica da β -actina após 24h de tratamento com Amblyomin-X (Figura 19A e 19C). Em MIA PaCa-2, o Amblyomin-X induziu um bloqueio na proteólise de NFKB1, evidenciado pelo aumento da fração p105 após 4 h e 24 h de tratamento e diminuição da fração p50 após 24 h de tratamento; a proteólise também foi bloqueada no controle positivo MG-132 (Figura 19B e 19C). Nesta mesma linhagem, nenhuma alteração foi observada na expressão proteica da β -actina (Figura 19B e 19C).



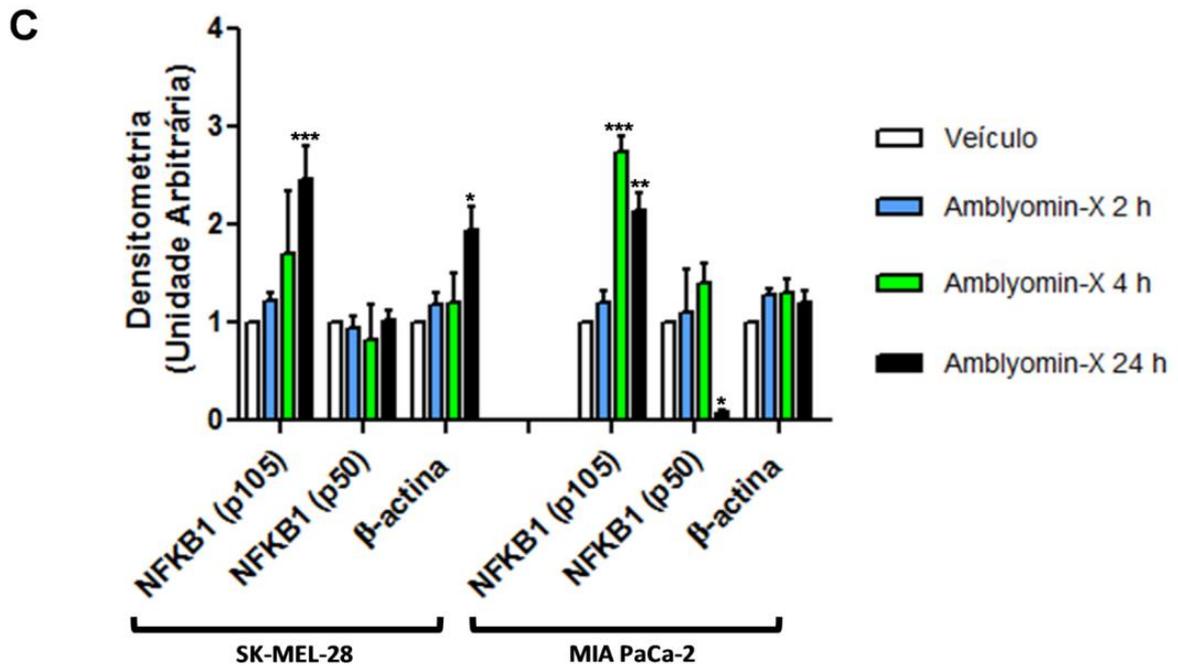
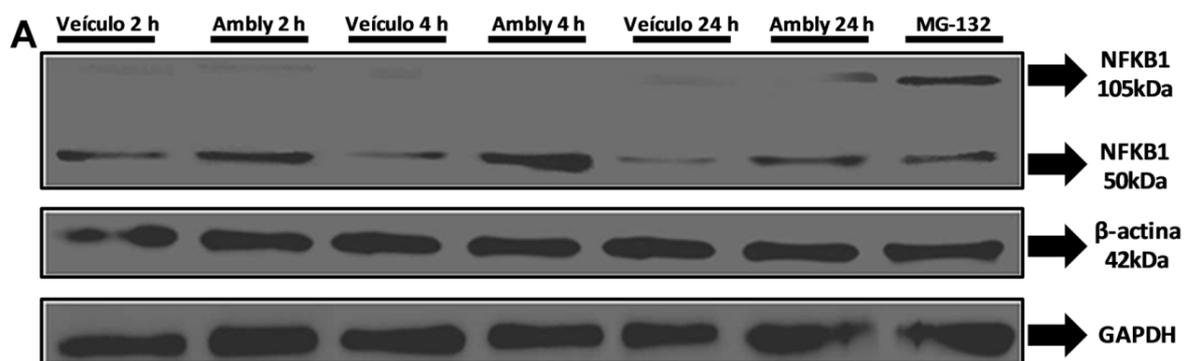


Figura 19 – Análise da expressão proteica de NFKB1 e β -actina em células tumorais. *Western blotting* representativo em (A) SK-MEL-28 e (B) MIA PaCa-2. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μ M por 2 h, 4 h ou 24 h ou; MG-132 5 μ M por 24 h. As imagens são representativas de três experimentos independentes. (C) Densitometria das bandas observadas nas linhagens SK-MEL-28 e MIA PaCa-2. Os resultados foram calculados relativos ao controle (veículo) e são expressos em média \pm erro padrão do aumento do *fold* da expressão proteica sobre o controle (considerado como 1) em unidades arbitrárias. Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

A mesma análise foi realizada em fibroblastos e os dados revelaram que o Amblyomin-X induziu a ativação da proteólise de NFKB1, evidenciado pelo aumento da fração p50 após 2 h e 4 h de tratamento e pela diminuição da fração p50 após 4 h de tratamento; a proteólise foi bloqueada no controle positivo MG-132 (Figura 20A e 20B). Nesta mesma linhagem, nenhuma alteração foi observada nem no perfil de expressão proteica da β -actina (Figura 20A e 20B).



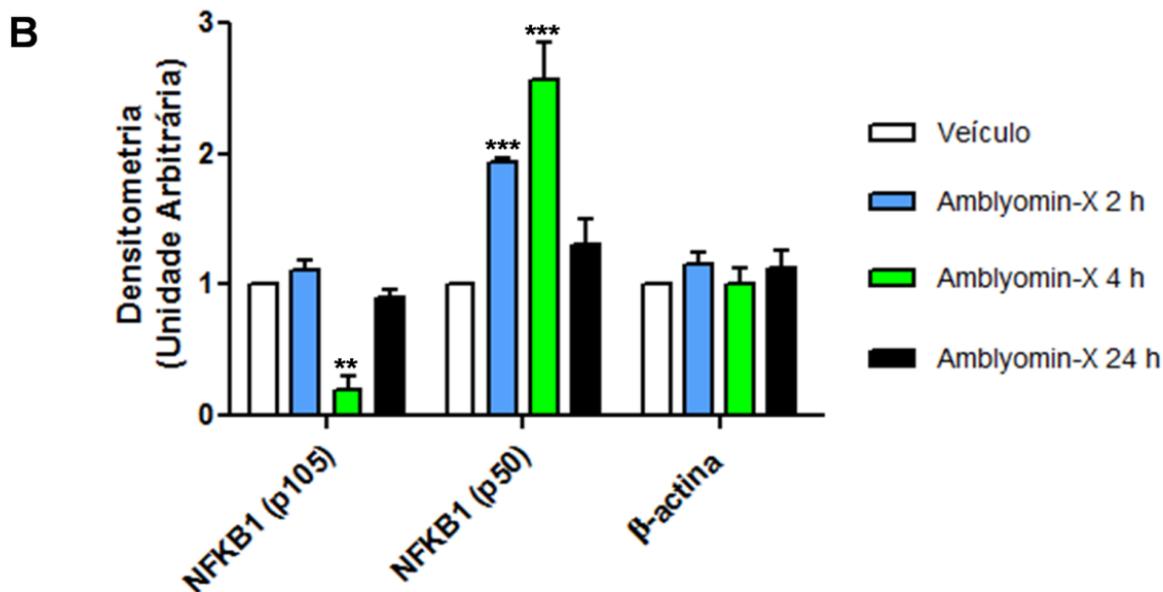


Figura 20 – Análise da expressão proteica de NFKB1 e β -actina em fibroblastos. (A) *Western blotting* representativo em fibroblastos. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μ M por 2 h, 4 h ou 24 h ou; MG-132 5 μ M por 24 h. As imagens são representativas de três experimentos independentes. **(B)** Densitometria das bandas observadas nas linhagens SK-MEL-28 e MIA PaCa-2. Os resultados foram calculados relativos ao controle (veículo) e são expressos em média \pm erro padrão do aumento do *fold* da expressão proteica sobre o controle (considerado como 1) em unidades arbitrárias. Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

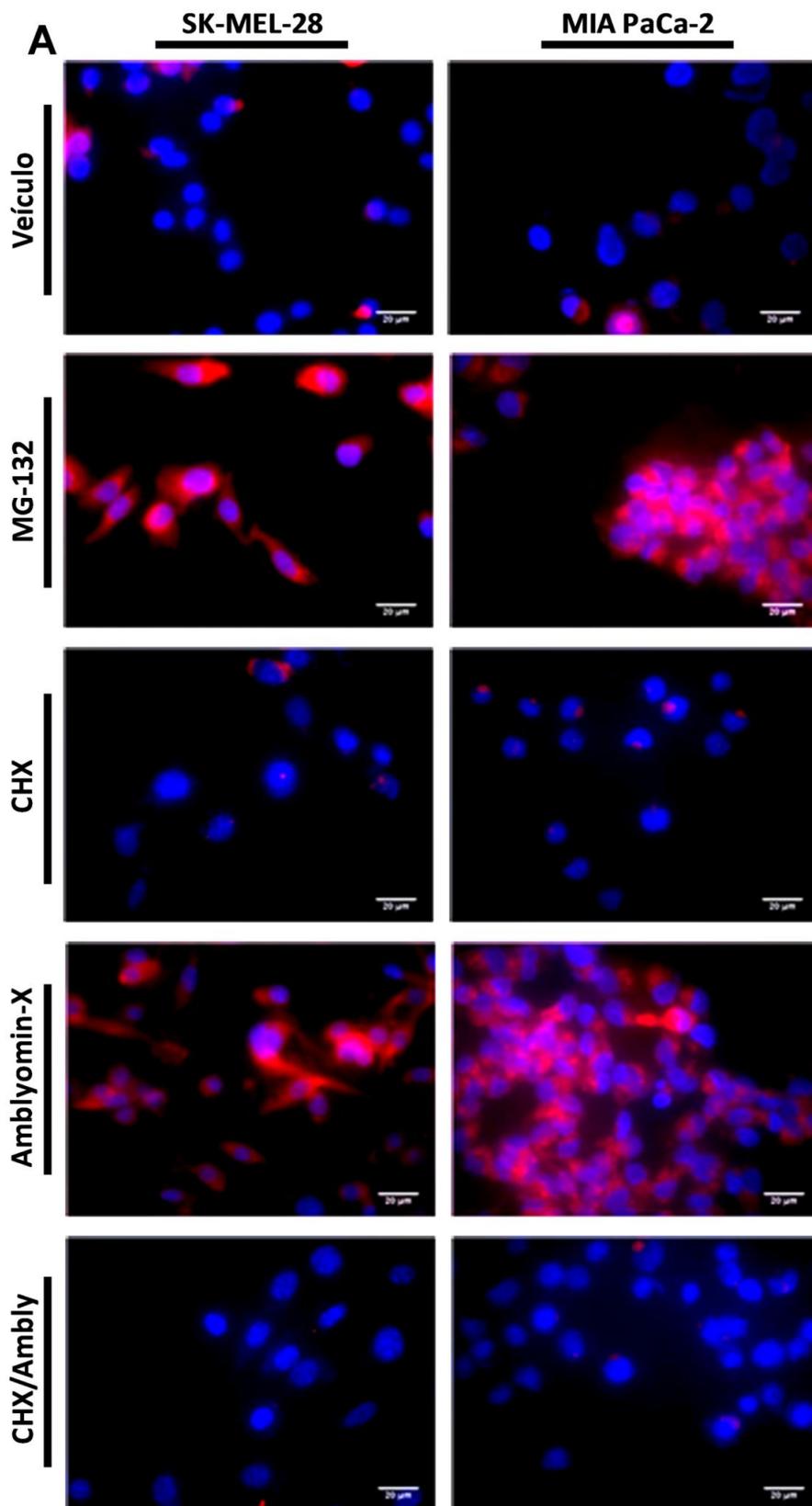
4.3 Investigação da formação de agregossomos relacionados com a dineína em células tratadas com Amblyomin-X

Estudos anteriores revelaram que o Amblyomin-X induziu a inibição proteossomal preferencialmente da atividade T-L mas também da atividade ChT-L nas linhagens SK-MEL-28 e MIA PaCa-2 (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). A partir desses dados, o próximo passo foi verificar a formação de agregossomos. O tempo de tratamento escolhido foi de 24 h devido à observação da maior alteração na expressão de genes e proteínas das cadeias de dineína nesse período. Além do tratamento com Amblyomin-X, foi utilizado o CHX para investigação da formação de agregossomos após a inibição da síntese de proteínas.

Os agregossomos foram primeiramente visualizados por microscopia de fluorescência e quantificados por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que o Amblyomin-X induziu a formação de agregossomos em ambas as linhagens tumorais estudadas (SK-Mel-28 e MIA PaCa-2) após 24 h de tratamento; assim

como ocorreu com o controle positivo MG-132 (**Figura 21A e 21B**). A formação de agregossomos foi bloqueada em tratamento prévio com CHX por 2 h seguido por Amblyomin-X por 24 h (CHX/Ambly) nas duas linhagens celulares (**Figura 21A e 21B**). Não se observou a formação de agregossomos em células tratadas com CHX sozinho (**Figura 21A e 21B**), que apresentou uma diminuição em MIA PaCa-2 quando comparado ao controle (veículo) (**Figura 21B**). Obsevou-se também uma diminuição da formação de agregossomos em ambas as linhagens tratadas com CHX/Ambly quando comparadas ao tratamento com CHX sozinho (**Figura 21B**).

Foi avaliado também a viabilidade celular dos compostos utilizados na visualização e quantificação de agregossomos. Os dados revelaram que o Amblyomin-X induziu uma diminuição na viabilidade celular de SK-MEL-28 e MIA PaCa-2 após 24 h de tratamento, bem como quando tratadas com MG-132 por 24 h (**Figura 21C**). Não foi observado nenhuma alteração na viabilidade celular nas linhagens tratadas com CHX sozinho ou CHX/Ambly quando comparados ao controle (veículo); nem na comparação entre CHX/Ambly e CHX sozinho (**Figura 21C**).



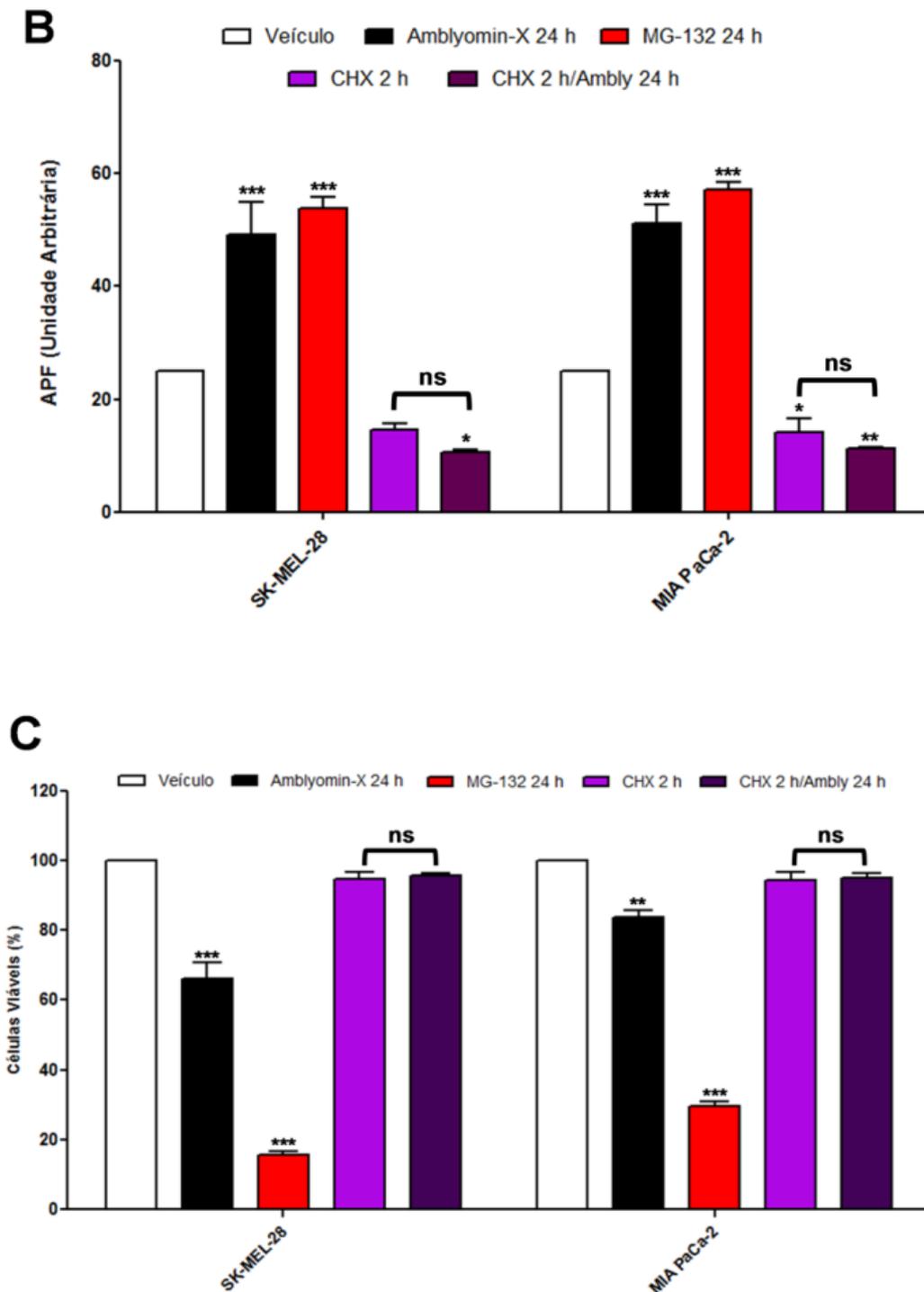
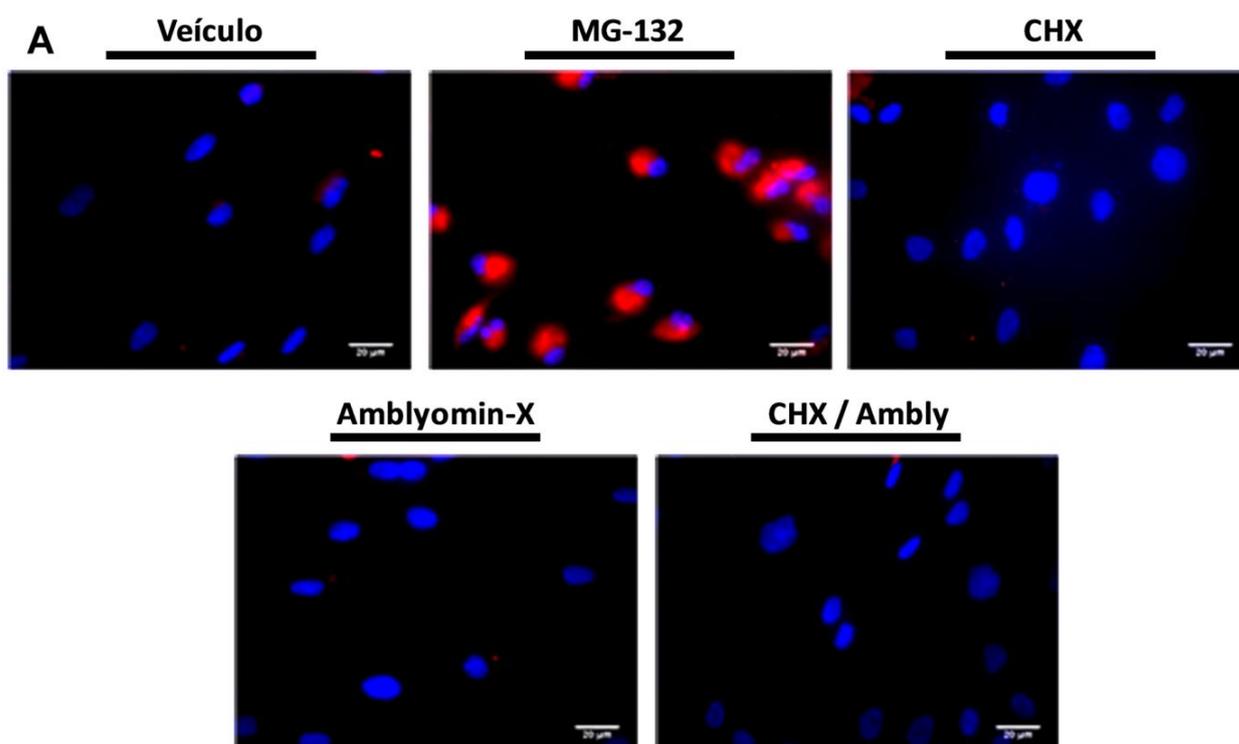


Figura 21 – Visualização e quantificação de agregossomos nas células tumorais. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μ M por 24 h ou; MG-132 5 μ M por 24 h ou; CHX 3,5 μ M por 2 h ou; CHX 3,5 μ M por 2 h seguido de Amblyomin-X 0,5 μ M por 24 h (CHX/Ambly). **(A)** Microscopia de fluorescência. Agregossomos foram marcados em vermelho através de um kit comercial. Em azul, foi marcado o núcleo da célula com Hoechst 33342. As imagens são representativas de cinco campos de cada experimento (n= 3), sendo a figura final, o *merge* das fluorescências. **(B)** IMF obtida dos histogramas convertidas em APF em unidades arbitrárias, calculado de acordo com o fabricante do kit comercial. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão relativos ao controle (veículo) (considerado como 25). Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância

estatística foi definido como * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, ns (não-significativo). **(C)** Viabilidade celular com os compostos utilizados nessa análise. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão relativos ao controle (veículo). Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ ou ns (não-significativo).

Nesta mesma análise em fibroblastos, os resultados mostraram que o Amblyomin-X não induziu a formação de agregossomos após 24 h de tratamento; ao contrário do que ocorreu com o controle positivo MG-132 (**Figura 22A e 22B**). A formação de agregossomos não ocorreu também em tratamento prévio com CHX por 2 h seguido por Amblyomin-X por 24 h (CHX/Ambly) (**Figura 22A e 22B**). Não se observou a formação de agregossomos em células tratadas com CHX sozinho (**Figura 22A e 22B**). Também não foi observada nenhuma alteração na formação de agregossomos nas células tratadas com CHX/Ambly quando comparadas ao tratamento com CHX sozinho (**Figura 22B**).

Com relação a viabilidade celular nesta mesma linhagem, os dados revelaram que o Amblyomin-X não induziu nenhuma alteração na viabilidade celular após 24 h de tratamento, ao contrário das células tratadas com MG-132 (**Figura 22C**). Não foi observado nenhuma alteração na viabilidade celular nas células tratadas com CHX sozinho ou CHX/Ambly quando comparados ao controle (veículo); nem na comparação entre CHX/Ambly e CHX sozinho (**Figura 22C**).



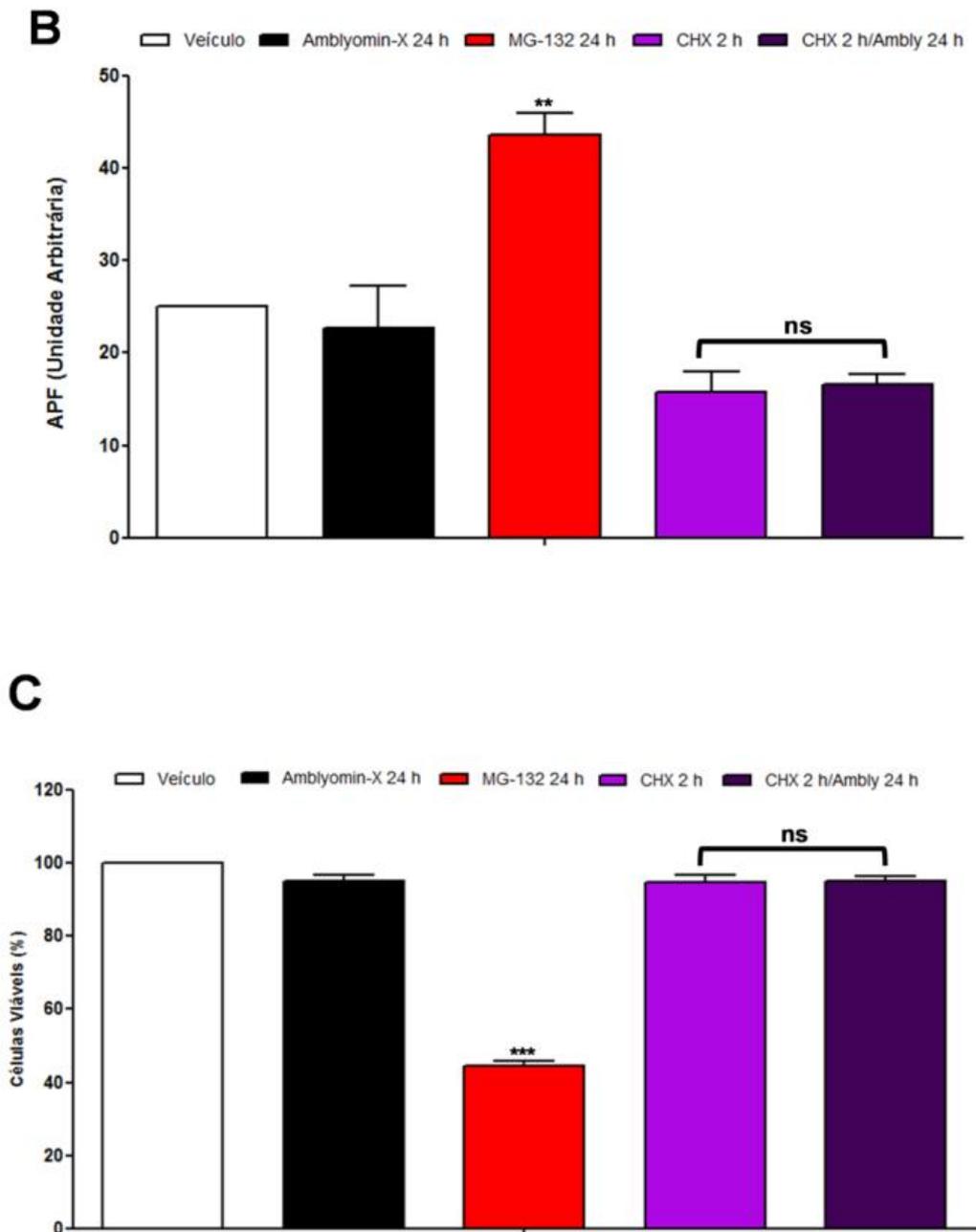
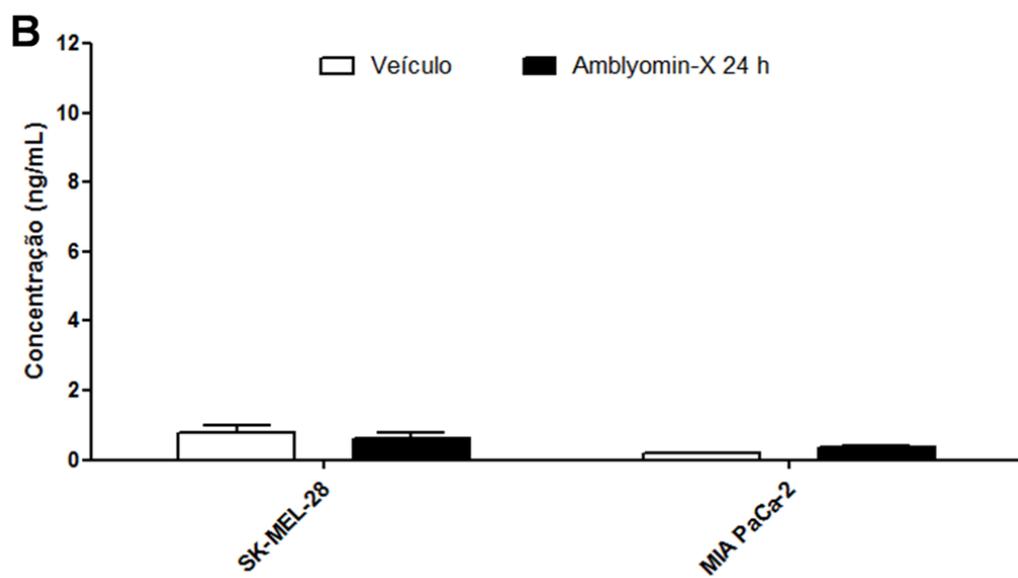
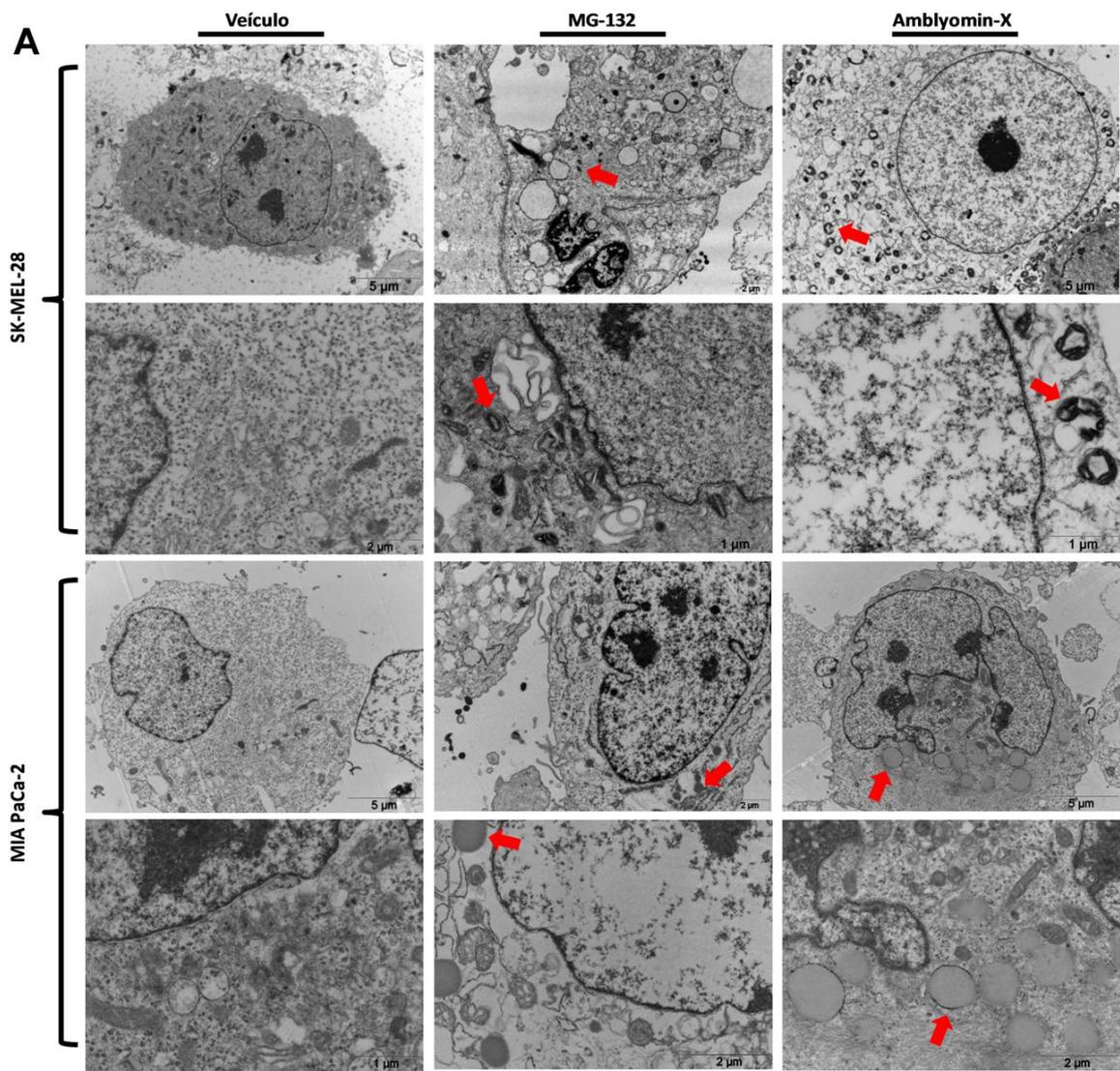


Figura 22 – Visualização e quantificação de agregossomos em fibroblastos. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μ M por 24 h ou; MG-132 5 μ M por 24 h ou; CHX 3,5 μ M por 2 h ou; CHX 3,5 μ M por 2 h seguido de Amblyomin-X 0,5 μ M por 24 h (CHX/Ambly). **(A)** Microscopia de fluorescência. Agregossomos foram marcados em vermelho através de um kit comercial. Em azul, foi marcado o núcleo da célula com Hoechst 33342. As imagens são representativas de cinco campos de cada experimento (n= 3), sendo a figura final, o *merge* das fluorescências. **(B)** IMF obtida dos histogramas convertidas em APF em unidades arbitrárias, calculado de acordo com o fabricante do kit comercial. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão relativos ao controle (veículo) (considerado como 25). Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001, ns (não-significativo). **(C)** Viabilidade celular com os compostos utilizados nessa análise. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão relativos ao controle (veículo). Três experimentos independentes foram

realizados. O critério de significância estatística foi definido como *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001 ou ns (não-significativo).

A formação de agregossomos observada foi caracterizada através de uma análise por microscopia eletrônica de transmissão e posteriormente, foram quantificadas por ELISA, as proteínas intracelulares HDAC6 e Bag3; por estarem envolvidas nas vias de formação de agregossomos pela via exclusiva de ubiquitina (RODRIGUEZ-GONZALEZ *et al.* 2008) e pela via não-exclusiva de ubiquitina (GAMERDINGER *et al.* 2010), respectivamente. Os resultados demonstraram que o Amblyomin-X induziu a formação de agregossomos do tipo em fitas nas células SK-MEL-28 e do tipo esféricos nas células MIA PaCa-2; assim como no controle positivo, MG-132 (**Figura 23A**).

Além disso, o Amblyomin-X não induziu nenhuma alteração na concentração intracelular de HDAC6 em nenhuma das linhagens tumorais (**Figura 23B**). No entanto, a proteína recombinante induziu um aumento na concentração intracelular de Bag3 tanto em SK-MEL-28 quanto em MIA PaCa-2 (**Figura 23C**). Além disso, foi possível notar que a concentração constitutiva de Bag3 nas células SK-MEL-28 e MIA PaCa-2 já é maior do que a concentração constitutiva de HDAC6 (**Figura 23B e 23C**).



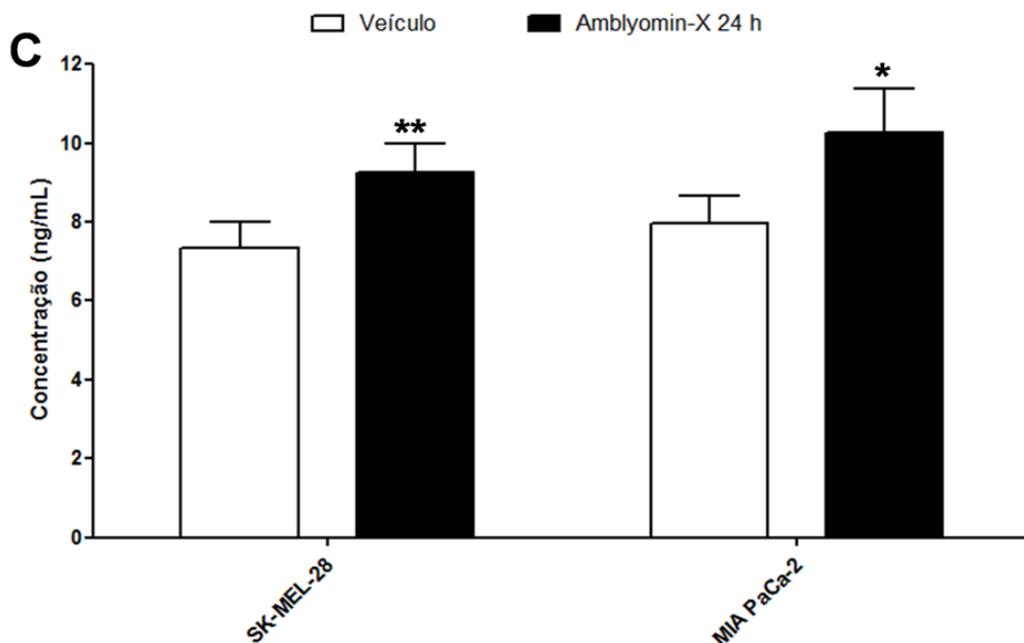


Figura 23 – Caracterização dos agregossomos e a via envolvida nas células tumorais. (A) Microscopia eletrônica de transmissão. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μ M por 24 h ou; MG-132 5 μ M por 24 h. Agregossomos estão indicados por setas vermelhas. As imagens são representativas de cinco campos de cada experimento (n= 3). **(B)** Quantificação de HDAC6 intracelular. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μ M por 24 h. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão relativos ao controle (veículo). Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001. **(C)** Quantificação de Bag3 intracelular. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μ M por 24 h. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão relativos ao controle (veículo). Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001.

A mesma análise foi realizada em fibroblastos e os resultados demonstraram que o Amblyomin-X não induziu a formação de agregossomos, ao contrário do controle positivo, MG-132 (**Figura 24A**). Além disso, o Amblyomin-X não induziu nenhuma alteração na concentração intracelular de HDAC6 nem de Bag3 (**Figura 24B**). Foi possível notar também que a concentração constitutiva de Bag3 em fibroblastos é discretamente maior do que a concentração constitutiva de HDAC6 (**Figura 23B e 23C**).

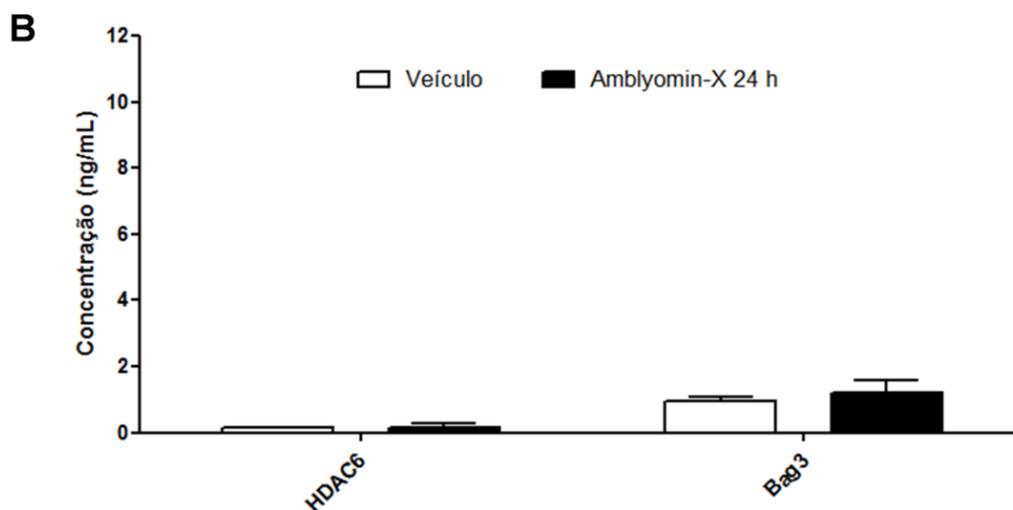
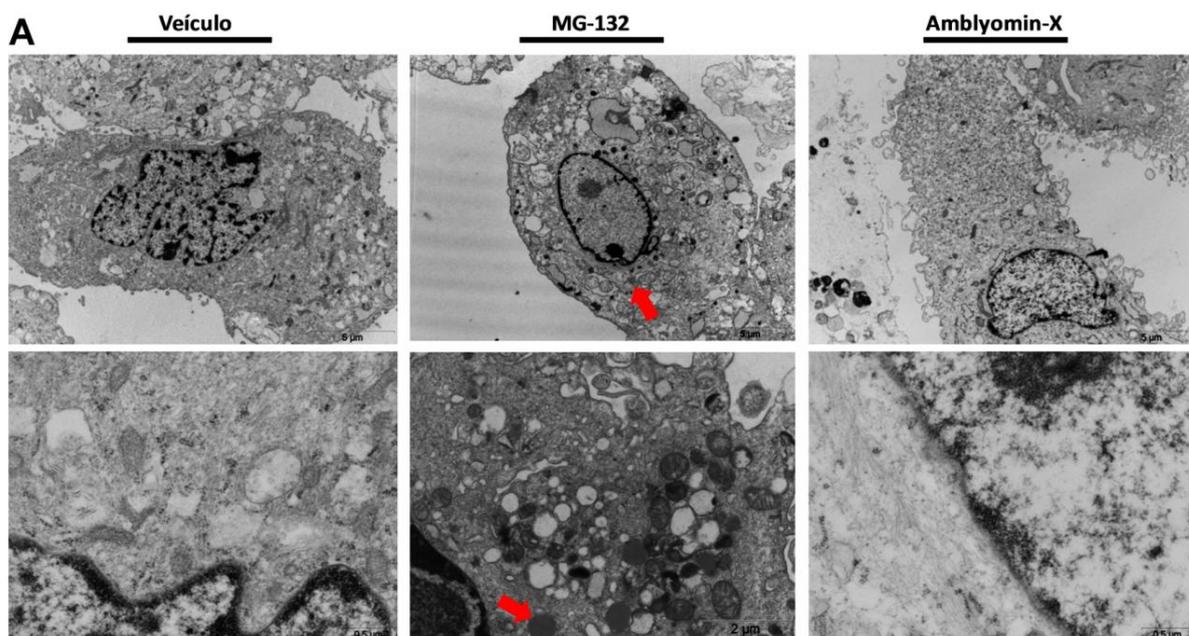


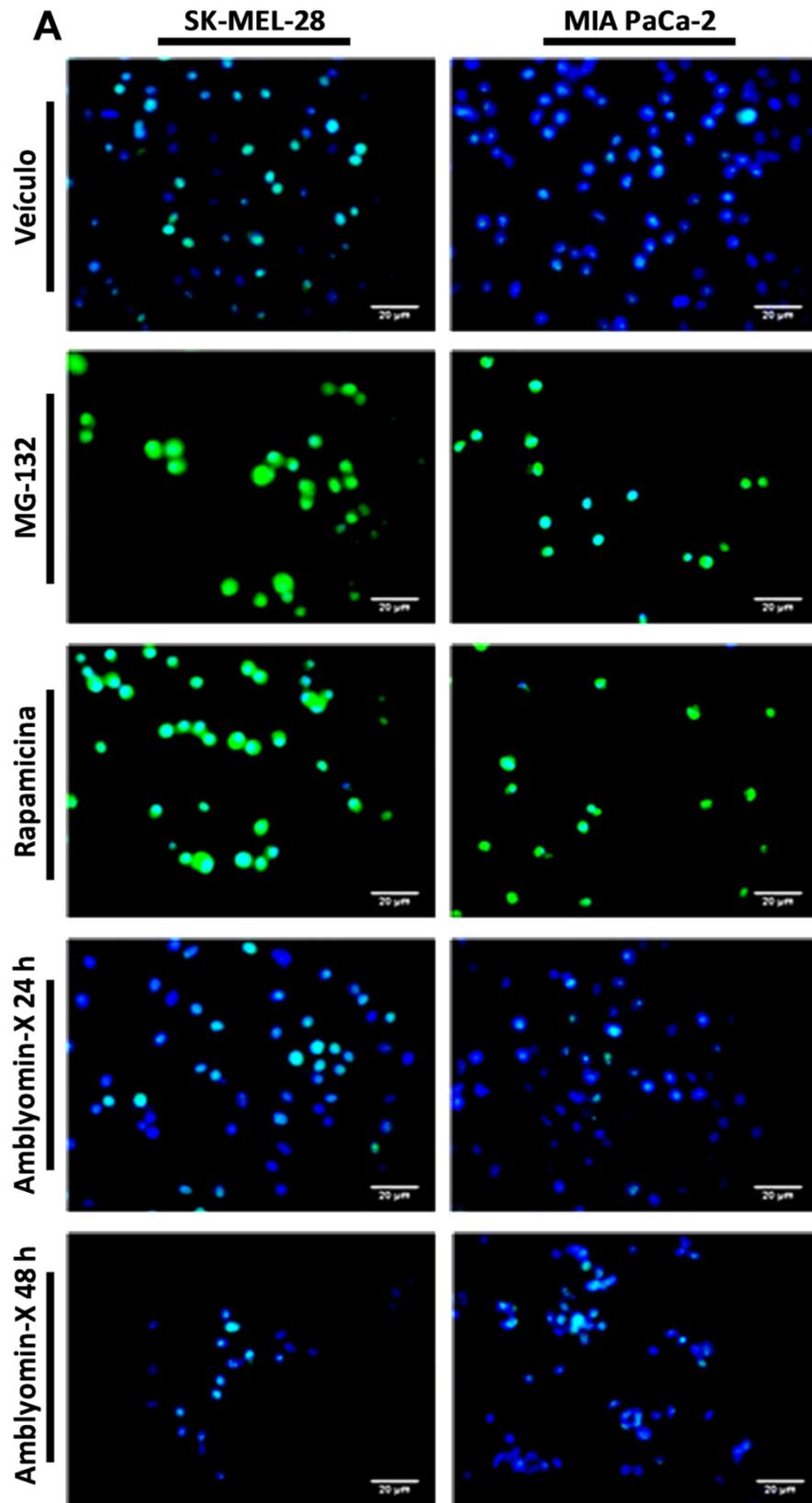
Figura 24 – Caracterização dos agregossomos e a via envolvida em fibroblastos. (A) Microscopia eletrônica de transmissão. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μM por 24 h ou; MG-132 5 μM por 24 h. Agregossomos estão indicados por setas vermelhas. As imagens são representativas de cinco campos de cada experimento (n= 3). **(B)** Quantificação de HDAC6 intracelular. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μM por 24 h. Os resultados são expressos em média ± erro padrão relativos ao controle (veículo). Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001. **(C)** Quantificação de Bag3 intracelular. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μM por 24 h. Os resultados são expressos em média ± erro padrão relativos ao controle (veículo). Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001.

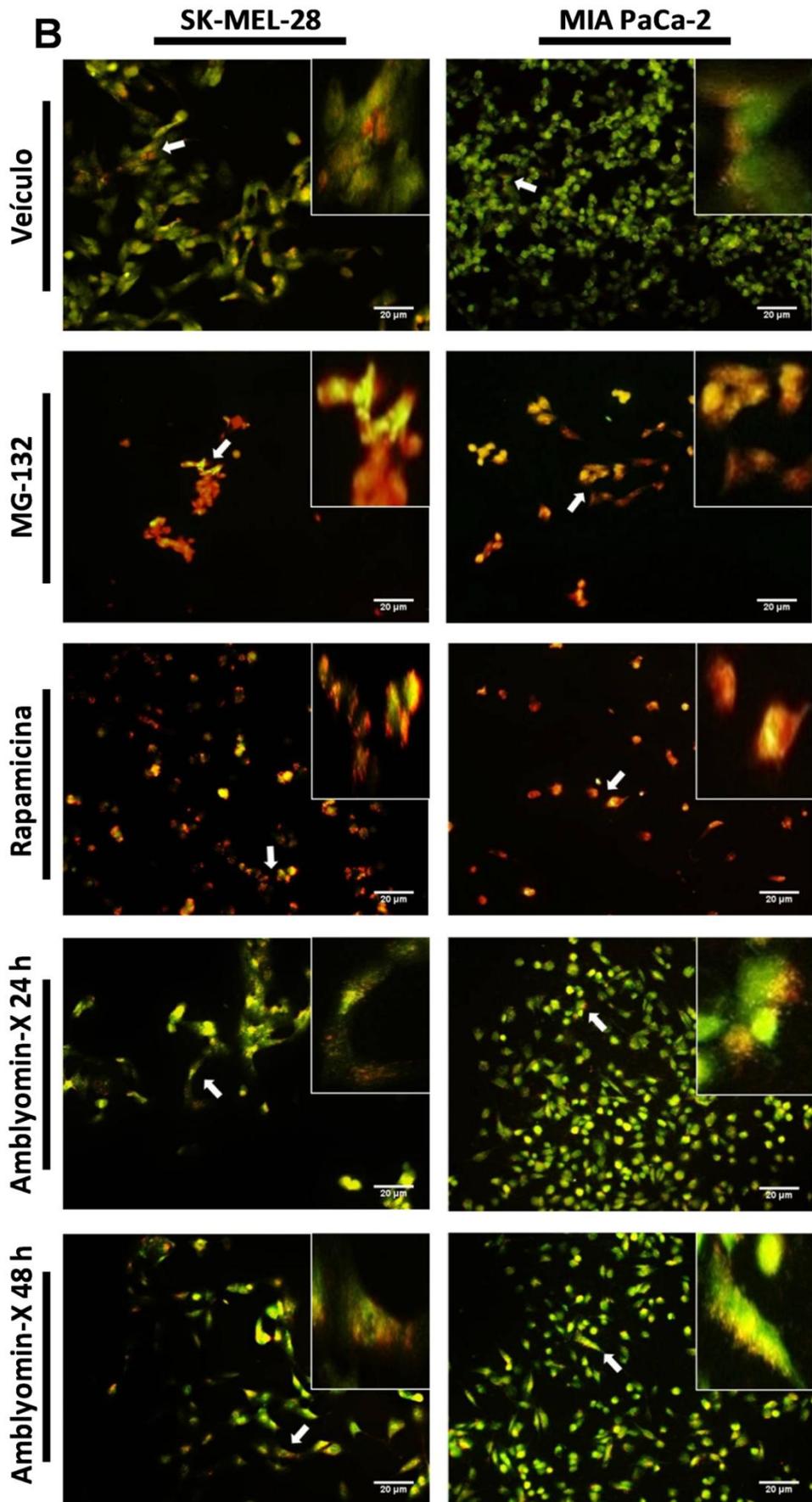
4.4 Estudo do papel da dineína na via autofágica em células tratadas com Amblyomin-X

Inibidores do proteassomo são conhecidos indutores da autofagia (ALMOND e COHEN 2002; CRAWFORD *et al.* 2011; ZHU *et al.* 2010). Visto a inibição proteassomal do Amblyomin-X (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010) e a formação de agregossomos; o próximo passo foi investigar a via autofágica e sua relação com a dineína. O primeiro passo foi visualizar a formação de membrana autofágica através da marcação da proteína intracelular, LC3, por imunofluorescência. Este evento, quando ativado, é caracterizado por um aumento da fluorescência difusa dessa proteína marcada. O Amblyomin-X não induziu a difusão da fluorescência, de LC3, como ocorreu nos controles positivos rapamicina e MG-132, após 24 h e mesmo após 48 h de tratamento, em nenhuma das linhagens tumorais (SK-MEL-28 e MIA PaCa-2) (**Figura 25A**).

O passo final da autofagia é caracterizado pela formação de lisossomos, que são vesículas ácidas (HUOTARI e HELENIUS 2011; TRAGANOS *et al.* 1994). Este evento foi verificado por microscopia de fluorescência utilizando-se a laranja de acridina como corante. Este composto não-específico fluoresce em verde no citoplasma e núcleo e em vermelho na presença de vesículas ácidas. O Amblyomin-X não induziu aumento na formação vesículas ácidas, visualizado por uma maior intensidade na fluorescência vermelha, como nos controles positivos rapamicina e MG-132, após 24 h, 48 h e mesmo após 72 h de tratamento (**Figura 25B**). Neste ensaio foi possível observar ainda que o tratamento com rapamicina e posterior tratamento com Amblyomin-X (Rapa/Ambly) também não induziu aumento na formação de vesículas ácidas, em nenhuma das linhagens tumorais (**Figura 25B**).

Foi realizado também um ensaio de viabilidade celular com os compostos utilizados na visualização da autofagia. Os resultados mostraram que o Amblyomin-X induziu uma diminuição na viabilidade celular após 24 h, 48 h e 72 h de tratamento, de maneira tempo-dependente, em ambas as linhagens tumorais (**Figura 25C**). Esta redução também foi observada em ambas as células tratadas com MG-132, rapamicina e Rapa/Ambly (**Figura 25C**). Não foi observado nenhuma alteração na viabilidade celular nas células tratadas com Rapa/Ambly quando comparados com o tratamento com rapamicina sozinha, nas duas linhagens tumorais (**Figura 25C**).





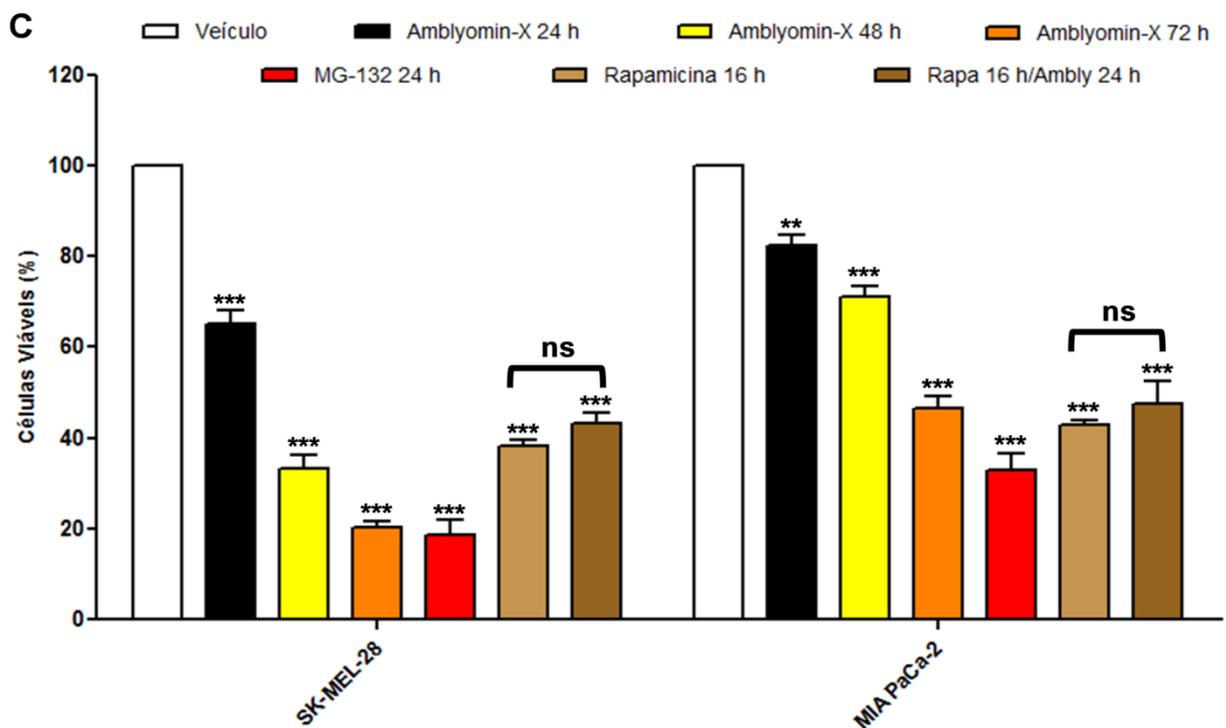
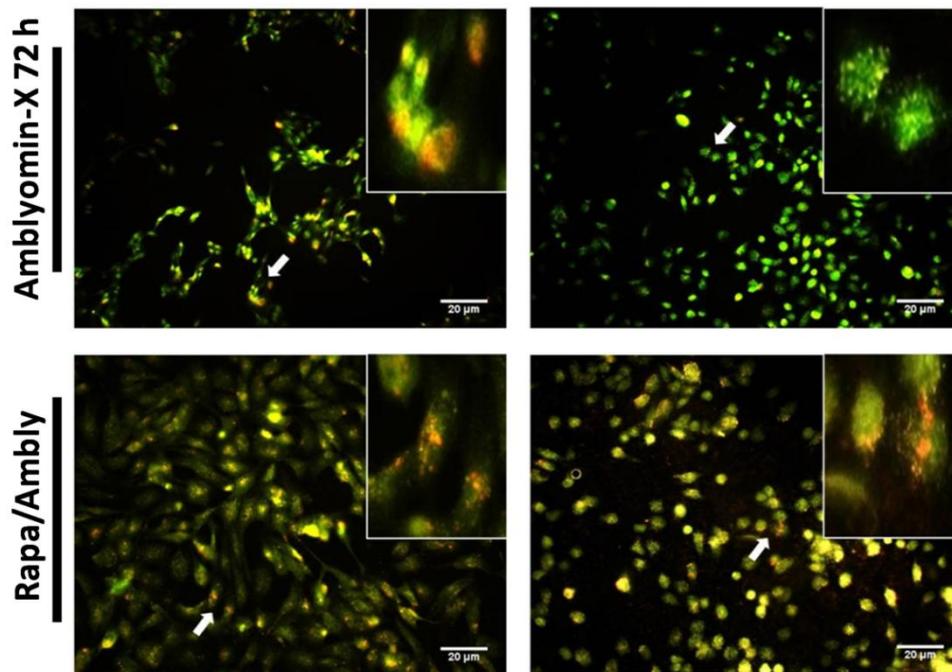


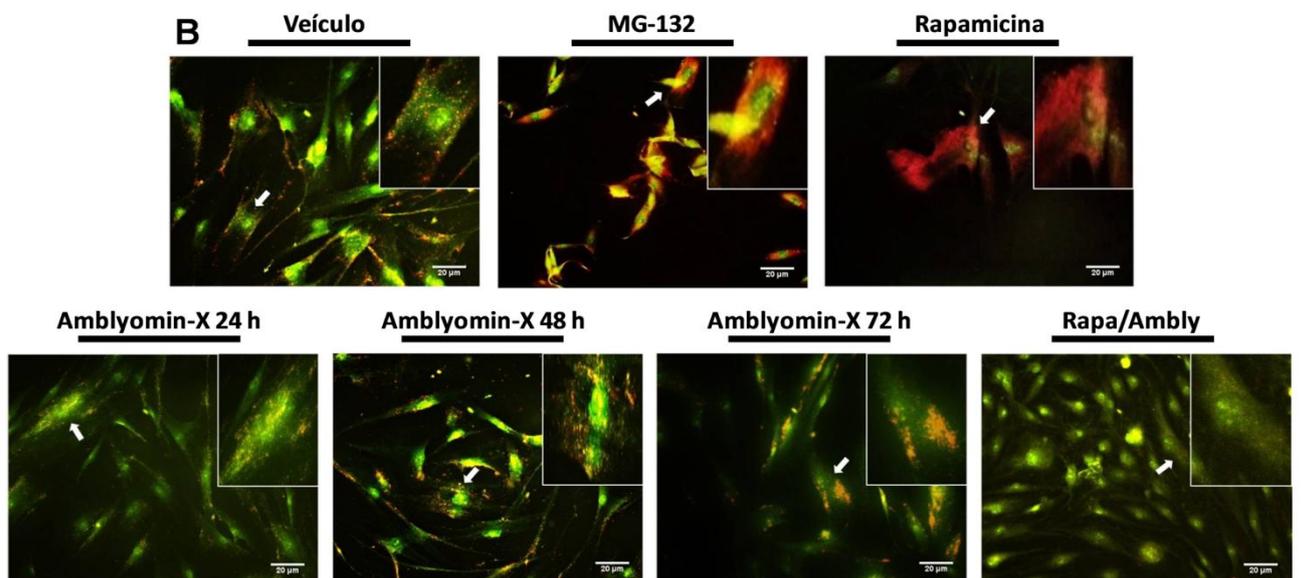
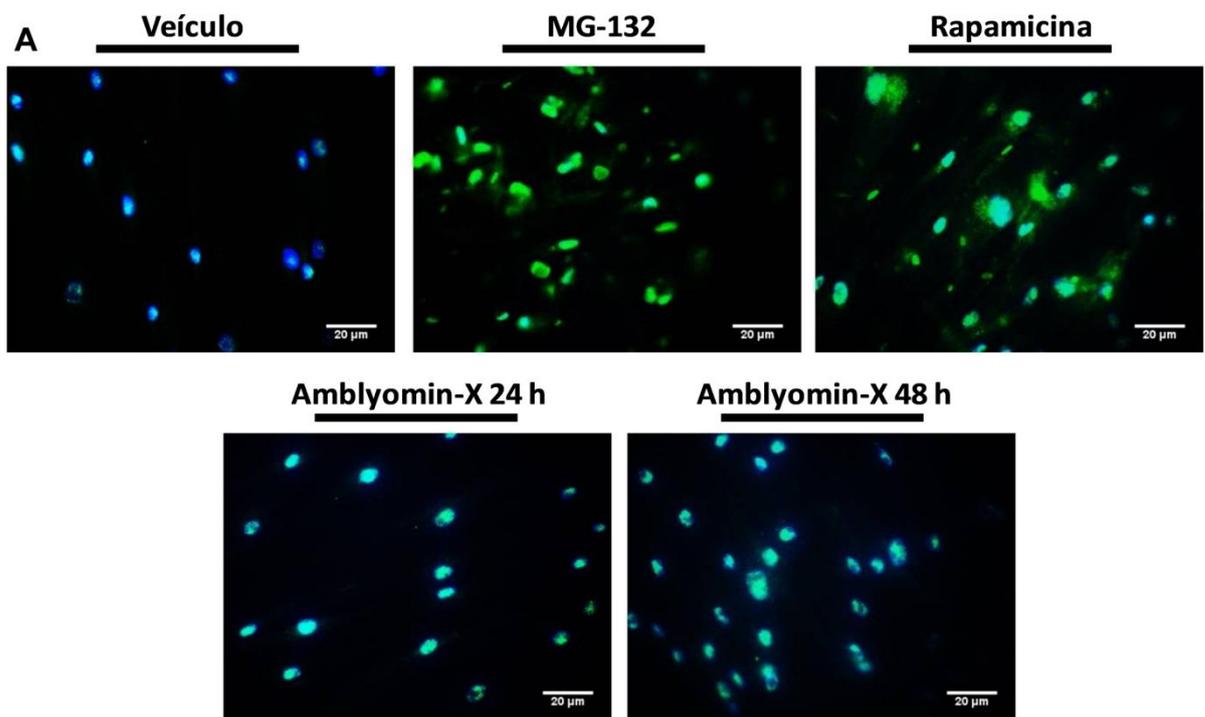
Figura 25 – Visualização da autofagia nas células tumorais. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μ M por 24 h ou; MG-132 5 μ M por 24 h ou; rapamicina 0,2 μ M por 16 h ou; rapamicina 0,2 μ M por 16 h seguido de Amblyomin-X 0,5 μ M por 24 h (Rapa/Ambly). **(A)** Imunofluorescência. A molécula LC3 foi marcada em verde. Em azul, foi marcado o núcleo da célula com DAPI. As imagens são representativas de cinco campos de cada experimento (n= 3), sendo a figura final, o *merge* das fluorescências. **(B)** Microscopia de fluorescência. Foi utilizado o corante laranja de acridina que fluoresce em verde no citoplasma e núcleo e em vermelho na presença de vesículas ácidas. As imagens são representativas de cinco campos de cada

experimento (n= 3). **(C)** Viabilidade celular com os compostos utilizados nessa análise. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão relativos ao controle (veículo). Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001 ou ns (não-significativo).

Esta mesma análise foi realizada em fibroblastos e os resultados mostraram que o Amblyomin-X não induziu a difusão da fluorescência, de LC3, como ocorreu nos controles positivos rapamicina e MG-132, após 24 h e mesmo após 48 h de tratamento (**Figura 26A**).

Além disso, o Amblyomin-X não induziu aumento na formação vesículas ácidas, como nos controles positivos rapamicina e MG-132, após 24 h, 48 h e mesmo após 72 h de tratamento (**Figura 26B**). Neste ensaio foi possível observar ainda que o tratamento com rapamicina e posterior tratamento com Amblyomin-X (Rapa/Ambly) também não induziu aumento na formação de vesículas ácidas (**Figura 26B**).

Os resultados de viabilidade celular nesta mesma linhagem, mostraram que o Amblyomin-X não induziu uma diminuição na viabilidade celular após 24 h, 48 h e 72 h de tratamento (**Figura 26C**). Observou-se uma redução na viabilidade celular apenas nas células tratadas com MG-132 e rapamicina (**Figura 26C**). Além disso, observou-se um aumento na viabilidade celular das células tratadas com Rapa/Ambly quando comparados com o tratamento com rapamicina sozinha (**Figura 26C**).



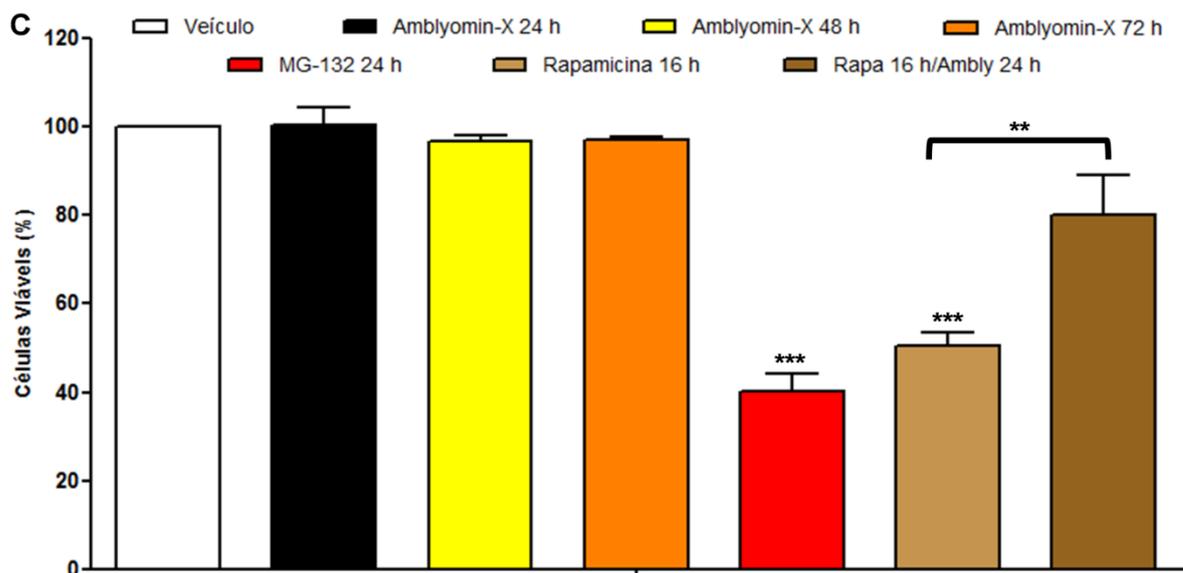


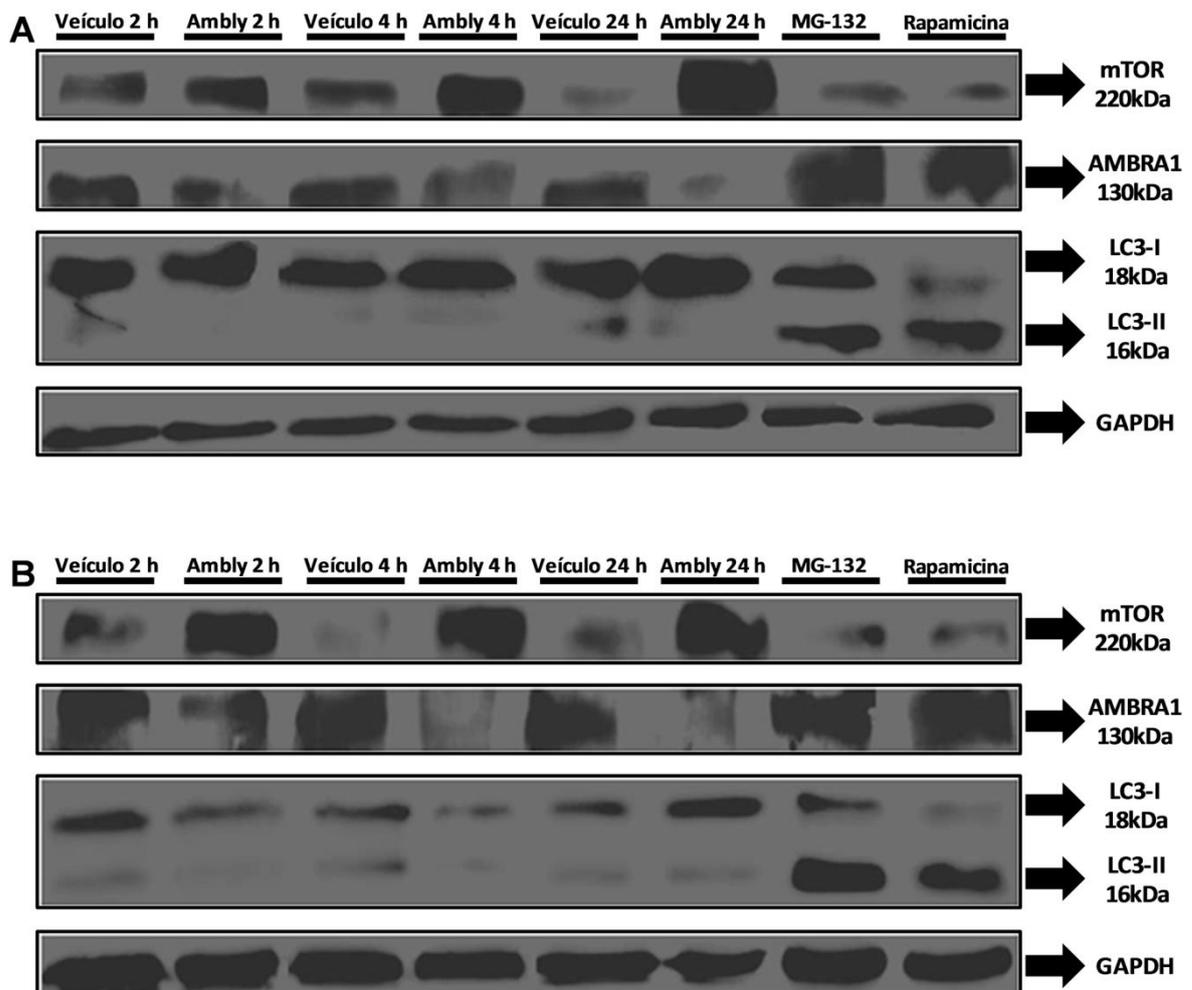
Figura 26 – Visualização da autofagia em fibroblastos. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μ M por 24 h ou; MG-132 5 μ M por 24 h ou; rapamicina 0,2 μ M por 16 h ou; rapamicina 0,2 μ M por 16 h seguido de Amblyomin-X 0,5 μ M por 24 h (Rapa/Ambly). **(A)** Imunofluorescência. A molécula LC3 foi marcada em verde. Em azul, foi marcado o núcleo da célula com DAPI. As imagens são representativas de cinco campos de cada experimento (n= 3), sendo a figura final, o *merge* das fluorescências. **(B)** Microscopia de fluorescência. Foi utilizado o corante laranja de acridina que fluoresce em verde no citoplasma e núcleo e em vermelho na presença de vesículas ácidas. As imagens são representativas de cinco campos de cada experimento (n= 3). **(C)** Viabilidade celular com os compostos utilizados nessa análise. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão relativos ao controle (veículo). Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001 ou ns (não-significativo).

Para confirmar os resultados observados de autofagia, foi realizado uma investigação da sinalização autofágica e sua relação com a dineína. Primeiro, ensaios de *western blotting* foram realizados com os alvos LC3, mTOR, AMBRA1 e Bim. A proteína LC3 quando ativada (LC3-I em LC3-II), inicia a formação de membrana autofágica (FIMIA *et al.* 2011; MIZUSHIMA *et al.* 2004; YAO *et al.* 2010). A proteína mTOR é conhecida por regular negativamente a autofagia (PARKHITKO *et al.* 2014; THOREEN *et al.* 2009). AMBRA1 contribui na ativação da autofagia, mas se torna inativa quando sequestrada pela dineína através das cadeias leves LC8-1 e LC8-2 (DI BARTOLOMEO *et al.* 2010). Por fim, o fator pró-apoptótico Bim também atua como um inibidor da autofagia recrutando Beclin-1-AMBRA1 a dineína (DAY *et al.* 2004); porém se torna inativa para exercer seus efeitos apoptóticos quando ligada a dineína (LUO *et al.* 2012).

Em SK-MEL-28, o Amblyomin-X não induziu a conversão de LC3-I em LC3-II, como nos controles positivos MG-132 e rapamicina (**Figura 27A**). Nesta mesma

linhagem, foi observado um aumento na expressão proteica de mTOR após 4 h e 24 h e uma diminuição na expressão proteica de AMBRA1 após 4 h e 24 h de tratamento com Amblyomin-X (**Figura 27A e 27E**). Nenhuma alteração foi observada no alvo Bim (**Figura 27C e 27E**).

Em MIA PaCa-2, o Amblyomin-X não induziu a conversão de LC3-I em LC3-II, como nos controles positivos MG-132 e rapamicina (**Figura 27B**). Nesta mesma linhagem, foi observado um aumento na expressão proteica de mTOR após 4 h e 24 h e uma diminuição na expressão proteica de AMBRA1 após 2 h, 4 h e 24 h de tratamento com Amblyomin-X (**Figura 27B e 27E**). Nenhuma alteração foi observada no alvo Bim (**Figura 27D e 27E**).



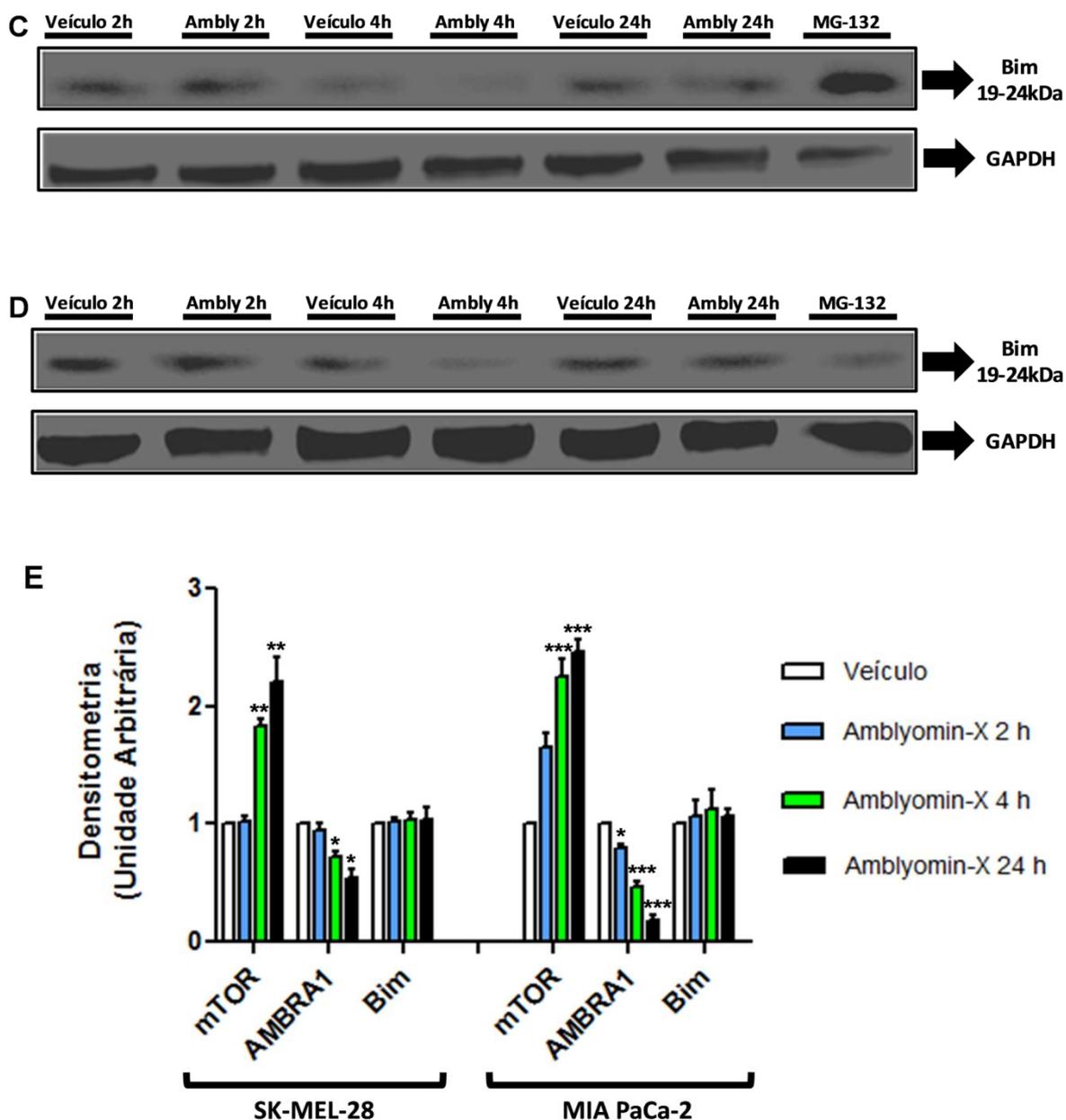


Figura 27 – Análise da expressão proteica de alvos autofágicos nas células tumorais. *Western blotting* representativo dos alvos LC3, mTOR e AMBRA1 em (A) SK-MEL-28 e (B) MIA PaCa-2. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μ M por 2 h, 4 h ou 24 h ou; MG-132 5 μ M por 24 h ou; rapamicina 0,2 μ M por 16 h. As imagens são representativas de três experimentos independentes. *Western blotting* representativo do alvo Bim em (C) SK-MEL-28 e (D) MIA PaCa-2. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μ M por 2 h, 4 h ou 24 h ou; MG-132 5 μ M por 24 h. As imagens são representativas de três experimentos independentes. (C) Densitometria das bandas observadas nas linhagens SK-MEL-28 e MIA PaCa-2. Os resultados foram calculados relativos ao controle (veículo) e são expressos em média \pm erro padrão do aumento do *fold* da expressão proteica sobre o controle (considerado como 1) em unidades arbitrárias. Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

A mesma análise foi realizada em fibroblastos. Os resultados mostraram que

o Amblyomin-X não induziu a conversão de LC3-I em LC3-II, como nos controles positivos MG-132 e rapamicina (**Figura 28A**). Nenhuma alteração foi observada nos alvos mTOR, AMBRA1 e Bim em nenhum tempo de tratamento com Amblyomin-X (**Figura 28A, 28B e 28C**).

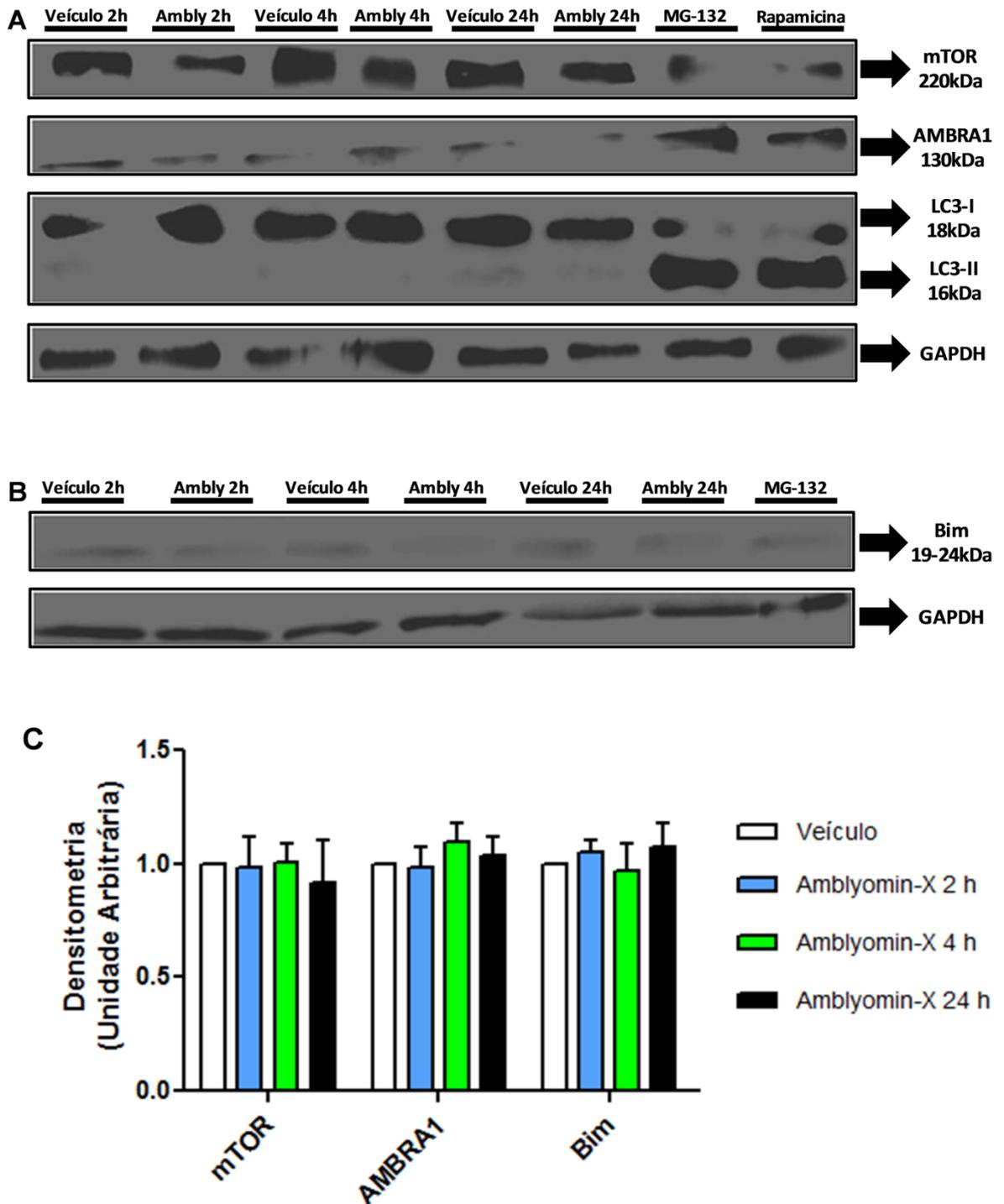
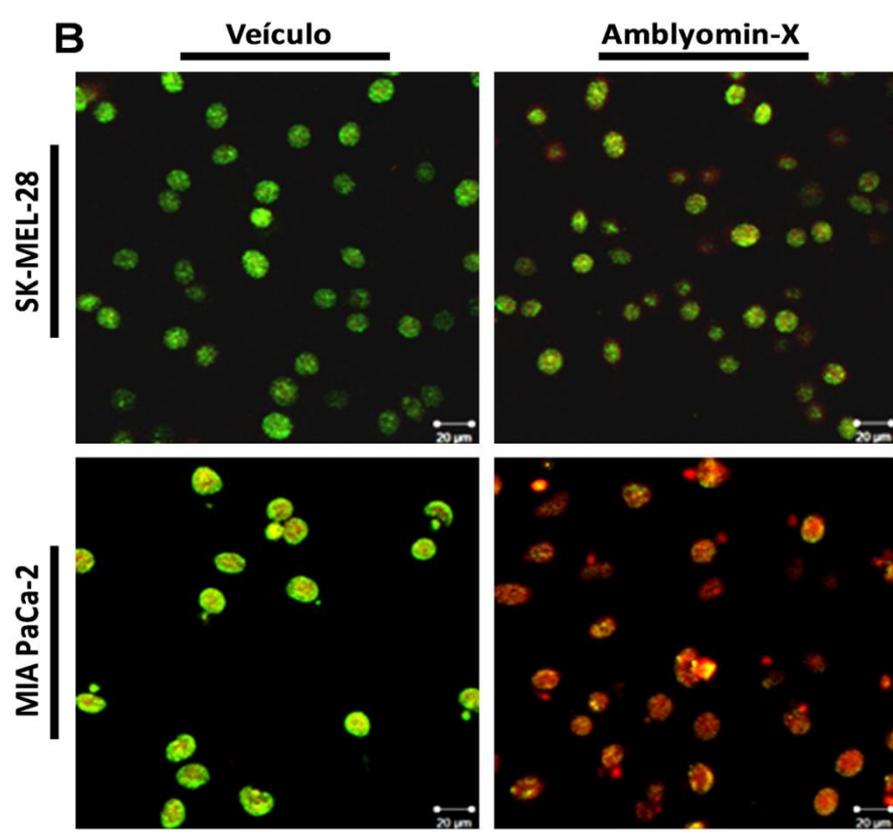
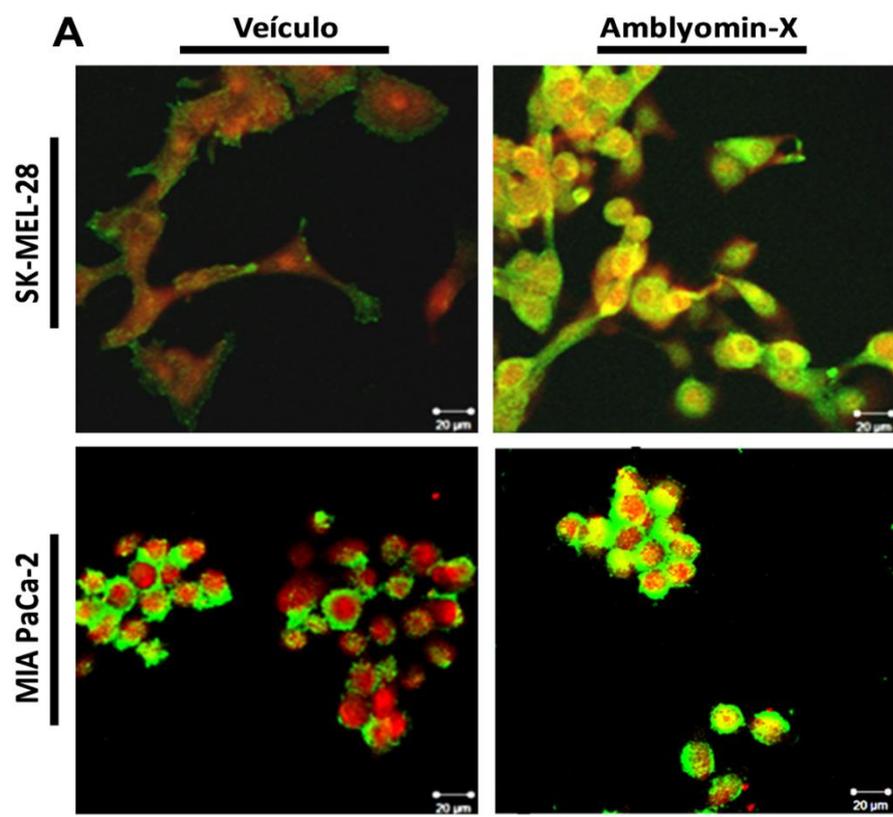


Figura 28 – Análise da expressão proteica de alvos autofágicos em fibroblastos. *Western*

blotting representativo dos alvos **(A)** LC3, mTOR e AMBRA1 e **(B)** Bim. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μ M por 2 h, 4 h ou 24 h ou; MG-132 5 μ M por 24 h ou; rapamicina 0,2 μ M por 16 h (com exceção do alvo Bim). As imagens são representativas de três experimentos independentes. **(C)** Densitometria das bandas observadas nas linhagens SK-MEL-28 e MIA PaCa-2. Os resultados foram calculados relativos ao controle (veículo) e são expressos em média \pm erro padrão do aumento do *fold* da expressão proteica sobre o controle (considerado como 1) em unidades arbitrárias. Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Devido a interação entre as cadeias da dineína e os alvos autofágicos mTOR (CLIPPINGER e ALWINE 2012), AMBRA1 (DI BARTOLOMEO *et al.* 2010) e Bim (DAY *et al.* 2004; LUO *et al.* 2012), foi avaliado essa interação por meio da técnica de microscopia confocal em células estimuladas com Amblyomin-X. Sendo assim, as interações HC1/mTOR, LC8-1/2/AMBRA1 e LC8-1/2/Bim foram avaliadas.

A análise confocal revelou que o Amblyomin-X induziu um aumento na co-localização de HC1/mTOR comparando-se o controle (veículo) e tratado com Amblyomin-X, nas duas linhagens tumorais, SK-MEL-28 e MIA PaCa-2 (**Figura 29A**). O Amblyomin-X induziu um aumento na co-localização de LC8-1/2/AMBRA1 em MIA PaCa-2 mas não em SK-MEL-28 (**Figura 29B**). Nenhuma alteração na co-localização de LC8-1/2/Bim foi alterada em nenhuma das linhagens tumorais (**Figura 29C**).



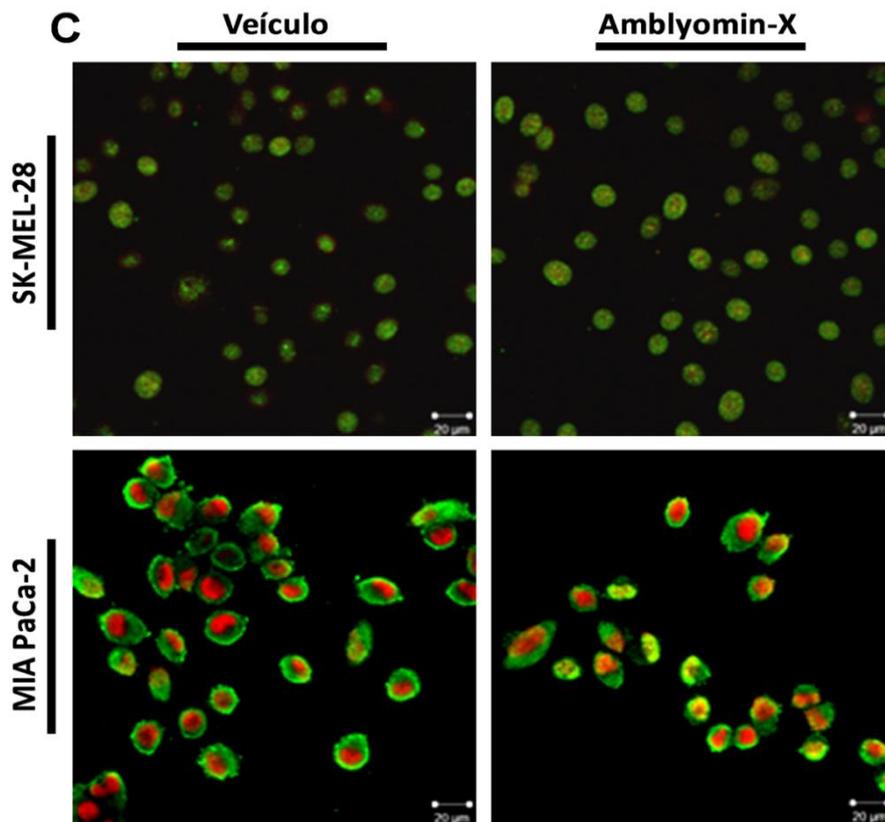


Figura 29 – Co-localização da dineína e alvos autofágicos nas células tumorais. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μM por 24 h. As imagens são representativas de cinco campos de cada experimento (n= 3), sendo a figura final, o *merge* das fluorescências, onde a fluorescência amarela representa a co-localização dos dois alvos. **(A)** HC1/mTOR, onde a fluorescência vermelha representa HC1 e a verde representa mTOR; **(B)** LC8-1/2/AMBRA1, onde a fluorescência vermelha representa LC8-1/2 e a verde representa AMBRA1 (neste caso a fluorescência original era amarela e foi colorida artificialmente para o verde utilizando o software do microscópio); **(C)** LC8-1/2/Bim, onde a fluorescência vermelha representa LC8-1/2 e a verde representa Bim.

A mesma análise foi realizada em fibroblastos. Os dados revelaram que o Amblyomin-X não induziu nenhuma alteração na co-localização de HC1/mTOR e LC8-1/2/AMBRA1 (**Figura 30A e 30B**). No entanto, o Amblyomin-X induziu um aumento na co-localização de LC8-1/2/Bim no núcleo da célula (**Figura 30C**).

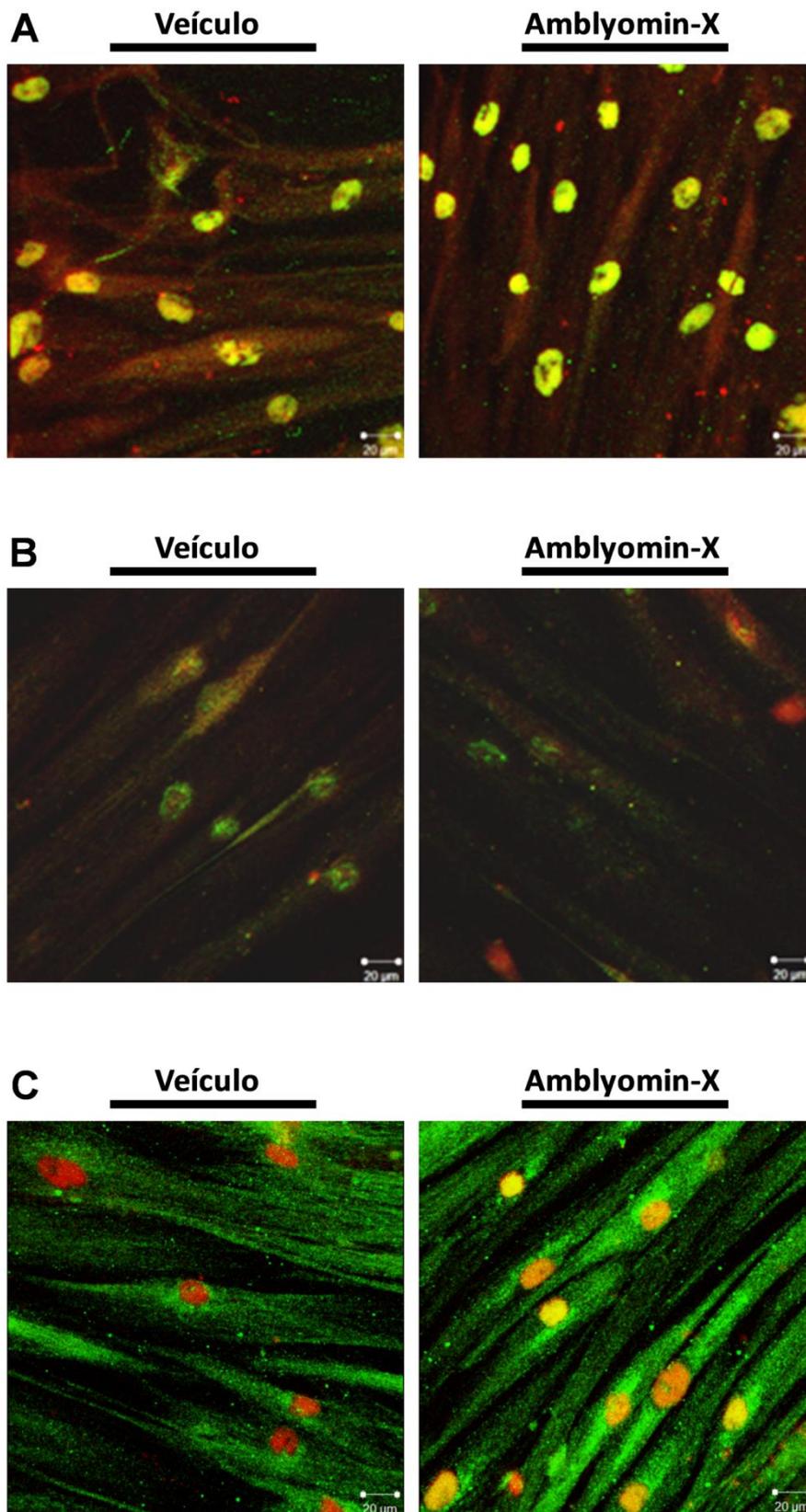


Figura 30 – Co-localização da dineína e alvos autofágicos em fibroblastos. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X (Ambly) 0,5 µM por 24 h. As imagens são representativas de cinco campos de cada experimento (n= 3), sendo a figura final, o *merge* das fluorescências, onde a fluorescência amarela representa a co-localização dos dois alvos. **(A)** HC1/mTOR, onde a fluorescência vermelha representa HC1 e a

verde representa mTOR; **(B)** LC8-1/2/AMBRA1, onde a fluorescência vermelha representa LC8-1/2 e a verde representa AMBRA1 (neste caso a fluorescência original era amarela e foi colorida artificialmente para o verde utilizando o software do microscópio); **(C)** LC8-1/2/Bim, onde a fluorescência vermelha representa LC8-1/2 e a verde representa Bim.

4.5 Sinalização *K-linkage* relacionada com a dineína em células tratadas com Amblyomin-X

Estudos anteriores demonstraram que o Amblyomin-X induziu o aumento de proteínas poliubiquitinadas após a inibição proteassomal (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). A literatura demonstra que existem diversos perfis diferentes de poliubiquitinação (GARCIA-MATA *et al.* 2002). A sinalização K48, por exemplo, é específica para a degradação pelo proteassomo enquanto que a K63, sinaliza de uma forma não-específica para endocitose, formação de agregossomos, autofagia, reparo de DNA e ubiquitinação de componentes da via NF- κ B (GARCIA-MATA *et al.* 2002; WONG *et al.* 2010).

Para correlacionar os dados obtidos do papel da dineína na via proteassomo-agregossomo-autofagia e NF- κ B, com a sinalização *K-linkage*, foi executado a técnica de citometria de fluxo para análise de K48 e K63. A análise em células SK-MEL-28, revelou que a via K48 não sofreu alterações quando as células foram tratadas com Amblyomin-X em relação às células controle (veículo) (**Figura 31A e 31B**). Com relação à via K63 em SK-MEL-28, o AmblyominX induziu um aumento na quantidade de proteínas poliubiquitinadas (**Figura 31A e 31B**). O mesmo ocorreu com as células MIA PaCa-2 nas análises K48 e K63 quando as células foram tratadas com Amblyomin-X (**Figura 31A e 31B**).

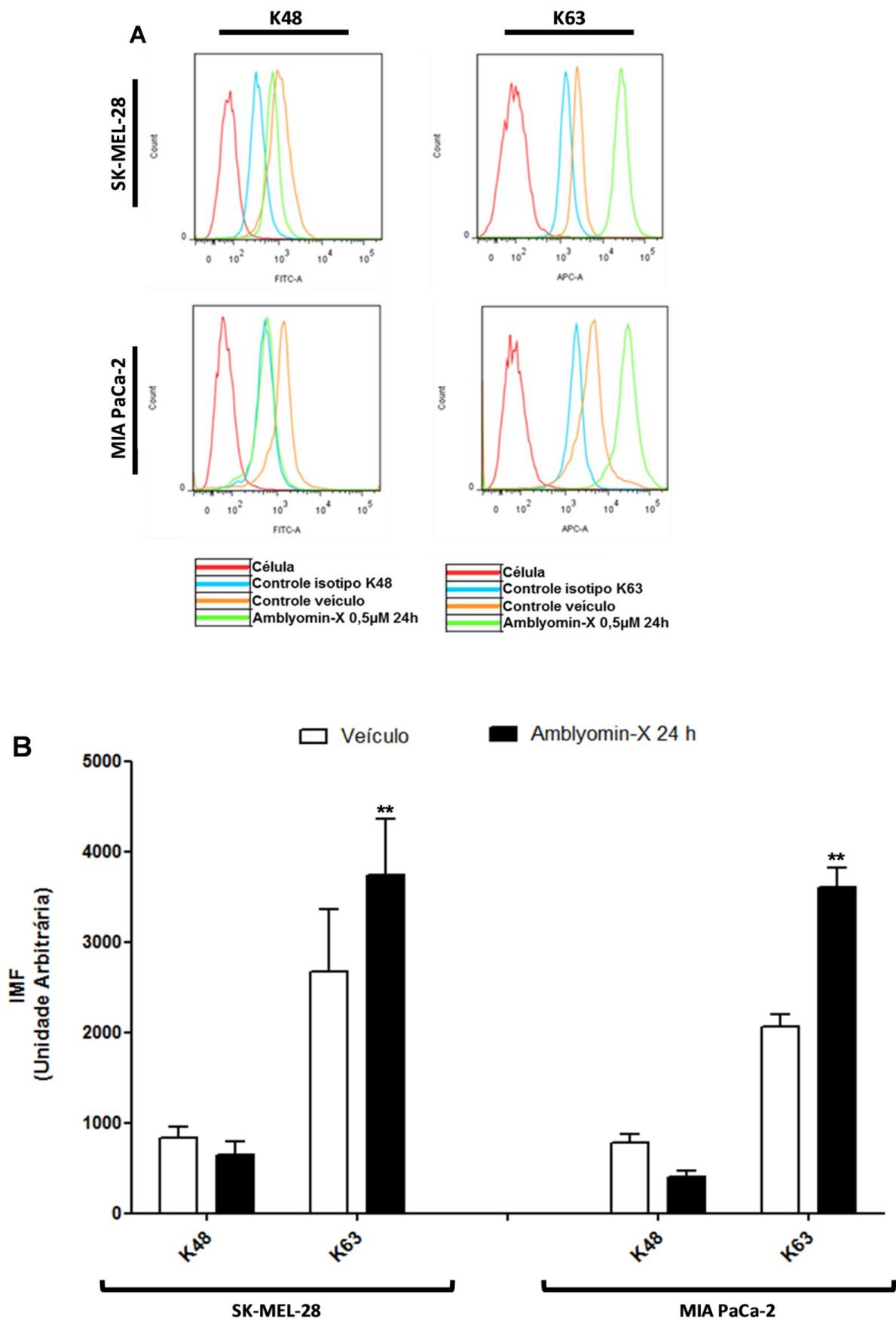


Figura 31 – *K-linkage* nas células tumorais. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X 0,5 μ M por 24 h. (A) Histogramas obtidos por citometria de fluxo. A curva

em vermelho representa a célula sem marcação; a azul representa o controle isotipo; a laranja representa o controle (veículo) e; a verde, o tratamento com Amblyomin-X. As imagens são representativas de três experimentos independentes. **(B)** IMF obtida dos histogramas. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão relativos ao controle (veículo). Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ ou *** $p \leq 0,001$.

A mesma análise foi realizada em fibroblastos. O Amblyomin-X não induziu nenhuma alteração na quantidade de proteínas poliubiquitinadas via K48 (**Figura 32A e 32B**). No entanto, a proteína recombinante induziu um aumento na quantidade de proteínas poliubiquitinadas via K63 (**Figura 32A e 32B**).

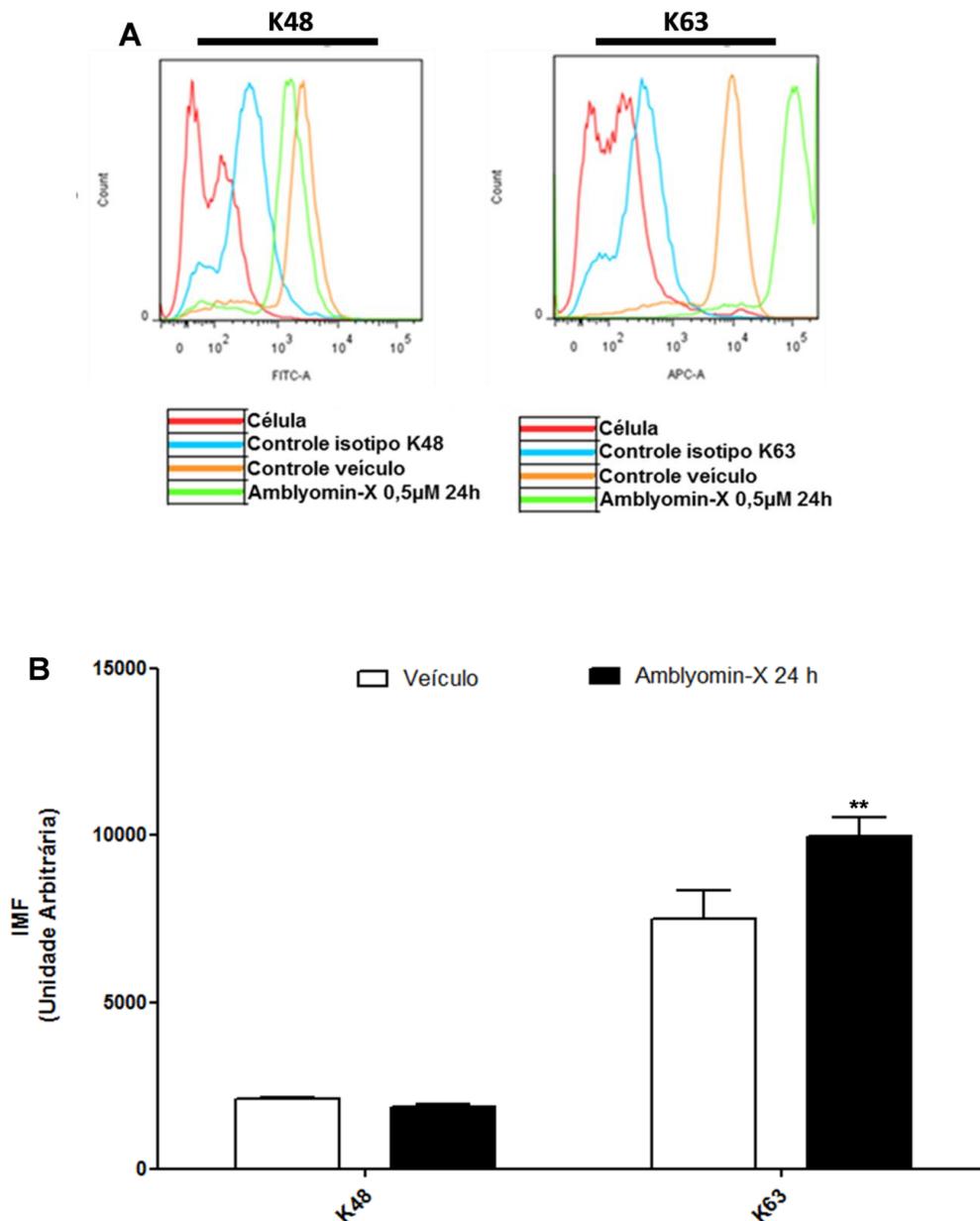


Figura 32 – K-linkage em fibroblastos. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X 0,5 μ M por 24 h. **(A)** Histogramas obtidos por citometria de fluxo. A curva em vermelho

representa a célula sem marcação; a azul representa o controle isotipo; a laranja representa o controle (veículo) e; a verde, o tratamento com Amblyomin-X. As imagens são representativas de três experimentos independentes. **(B)** IMF obtida dos histogramas. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão relativos ao controle (veículo). Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ ou *** $p \leq 0,001$.

4.6 Estudo do papel da dineína na endocitose do Amblyomin-X e na inibição do proteassomo nas células tumorais SK-MEL-28 e MIA PaCa2

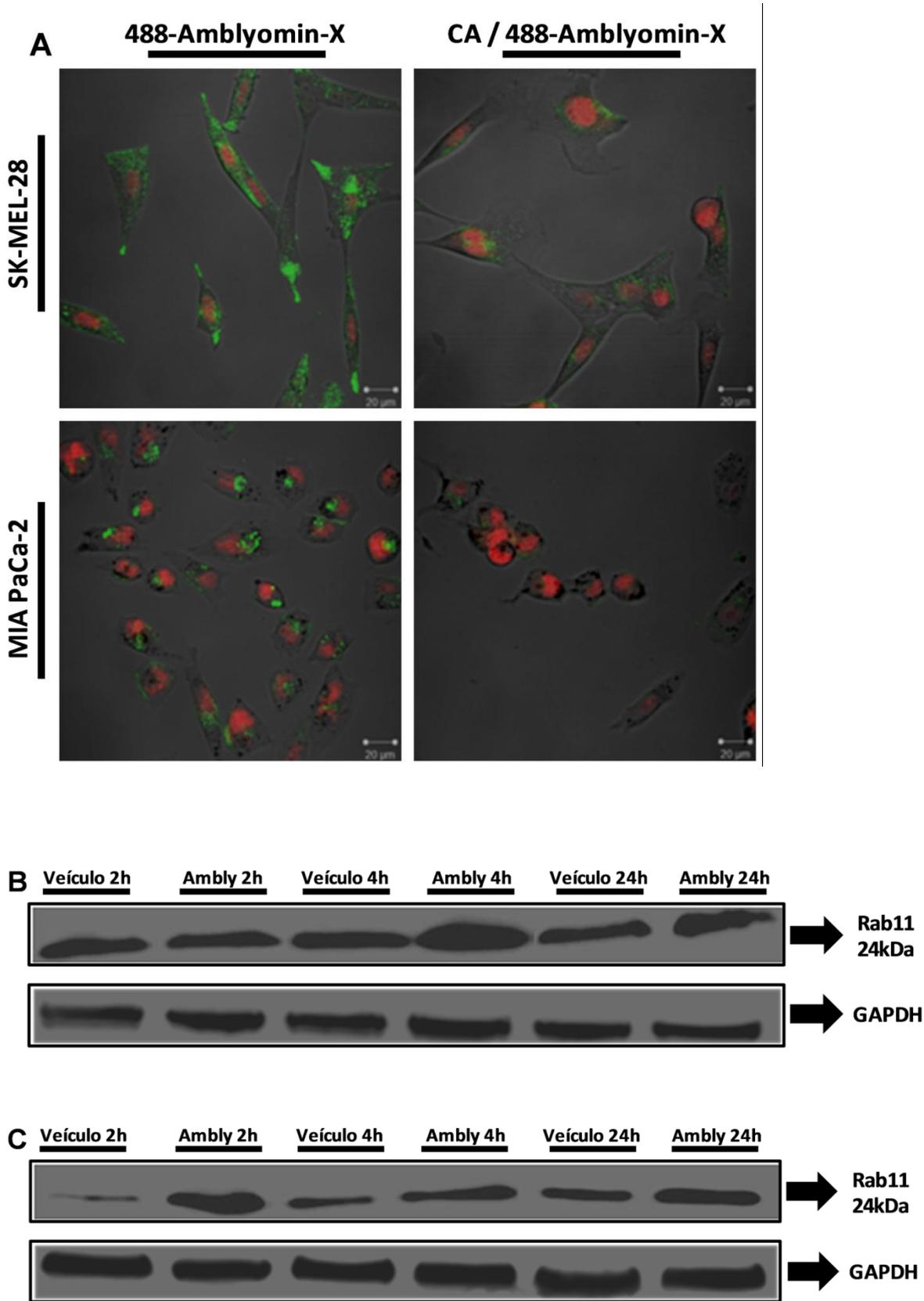
Estudos anteriores mostraram que o Amblyomin-X foi internalizado por endocitose pelas células tumorais SK-MEL-28 e MIA PaCa-2 mas não em fibroblastos (MORAIS 2014). Além disso, também foi demonstrado que o Amblyomin-X induziu a inibição preferencialmente da atividade T-L do proteassomo nas mesmas linhagens tumorais e não em fibroblastos (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). Somando-se esse dados aos resultados obtidos neste trabalho, foi investigado o papel da dineína na endocitose do Amblyomin-X e na inibição proteassomal induzida pela proteína recombinante, somente nas linhagens tumorais.

Os resultados obtidos mostraram que o Amblyomin-X marcado, denominado 488-Amblyomin-X foi internalizado em uma região perinuclear após 24 h de tratamento com a proteína marcada, nas duas linhagens tumorais (**Figura 33A**). No entanto, verificou-se que o sinal da fluorescência diminuiu drasticamente quando as células foram previamente tratadas com o inibidor da dineína CA (**Figura 33A**).

Para avaliar se a proteína recombinante poderia ser transportada até o ERC, foram realizados ensaios envolvendo a proteína G monomérica, Rab11, envolvida no transporte de RE (DOHERTY e MCMAHON 2009; MAXFIELD e MCGRAW 2004; Structure and function in cell signaling 2008); por ser um ligante conhecido da cadeia LIC2 de dineína (HORGAN *et al.* 2010). Os dados revelaram que o Amblyomin-X induziu um aumento na expressão proteica de Rab11 a partir de 4 h e 24 h de tratamento com Amblyomin-X nas células SK-MEL-28 (**Figura 33B e 33D**) e; a partir de 2 h, 4 h e 24 h de tratamento com Amblyomin-X nas células MIA PaCa-2 (**Figura 33C e 33D**).

A seguir, foi avaliada a interação entre LIC2/Rab11 por microscopia confocal. Os dados mostraram que o Amblyomin-X induziu um aumento na co-localização de

LIC2/Rab11 comparando-se o controle (veículo) e tratado com Amblyomin-X, nas duas linhagens tumorais, SK-MEL-28 e MIA PaCa-2 (**Figura 33E**).



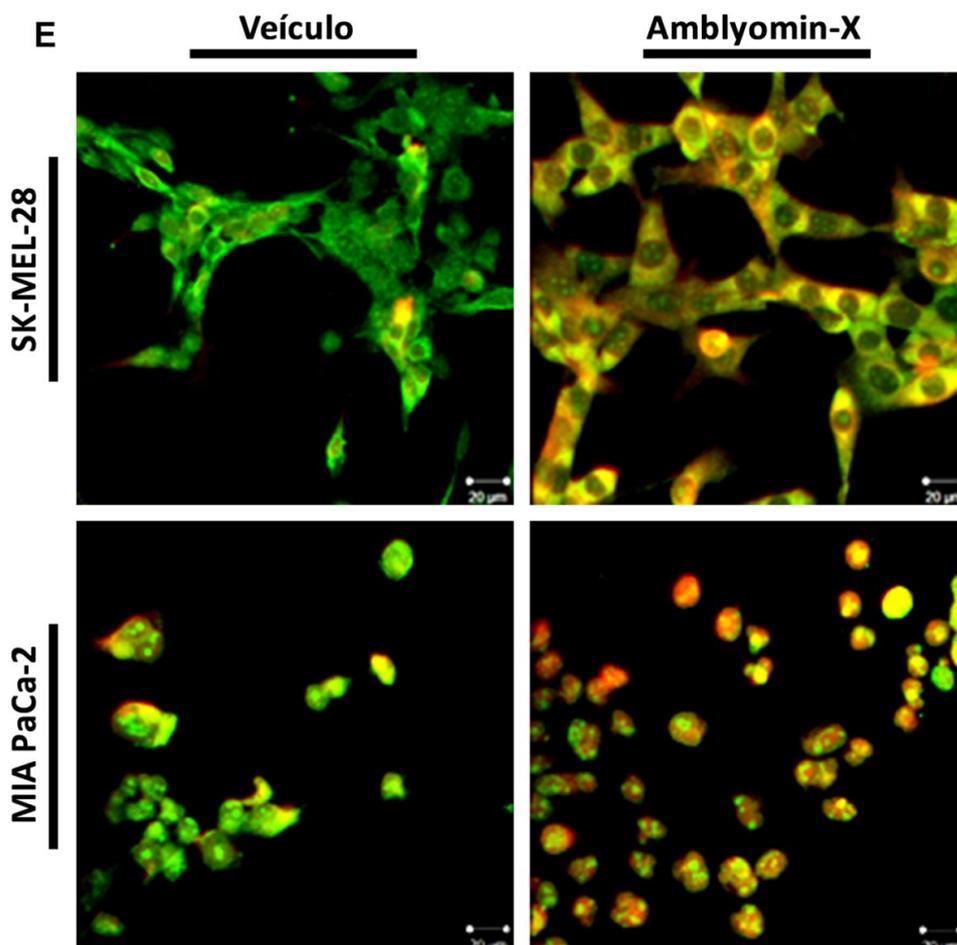
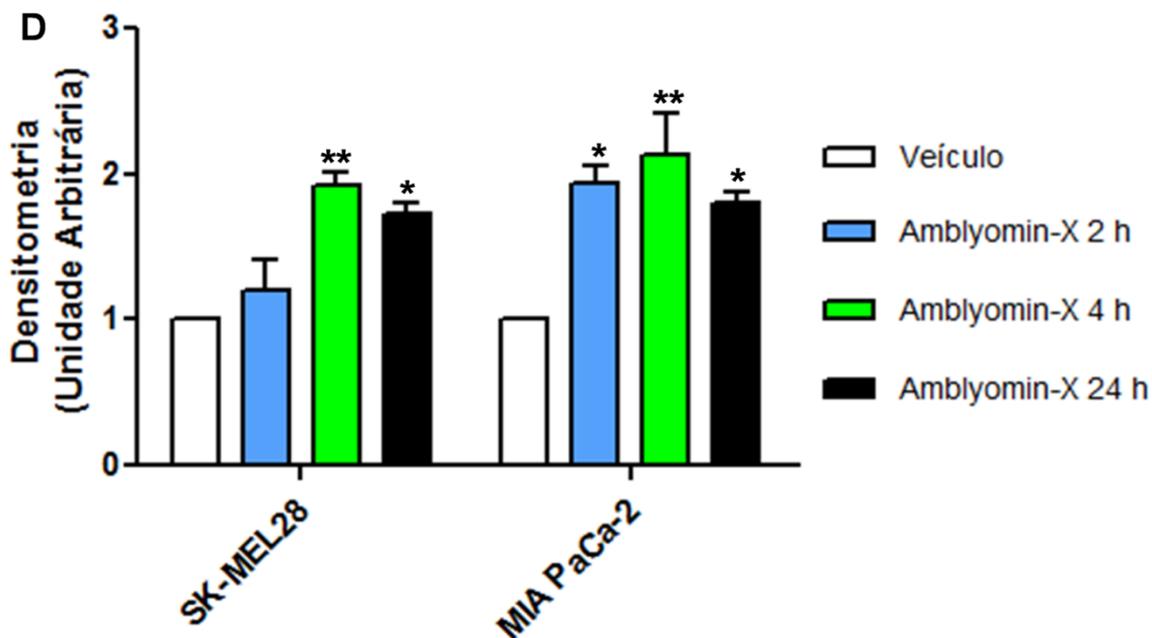


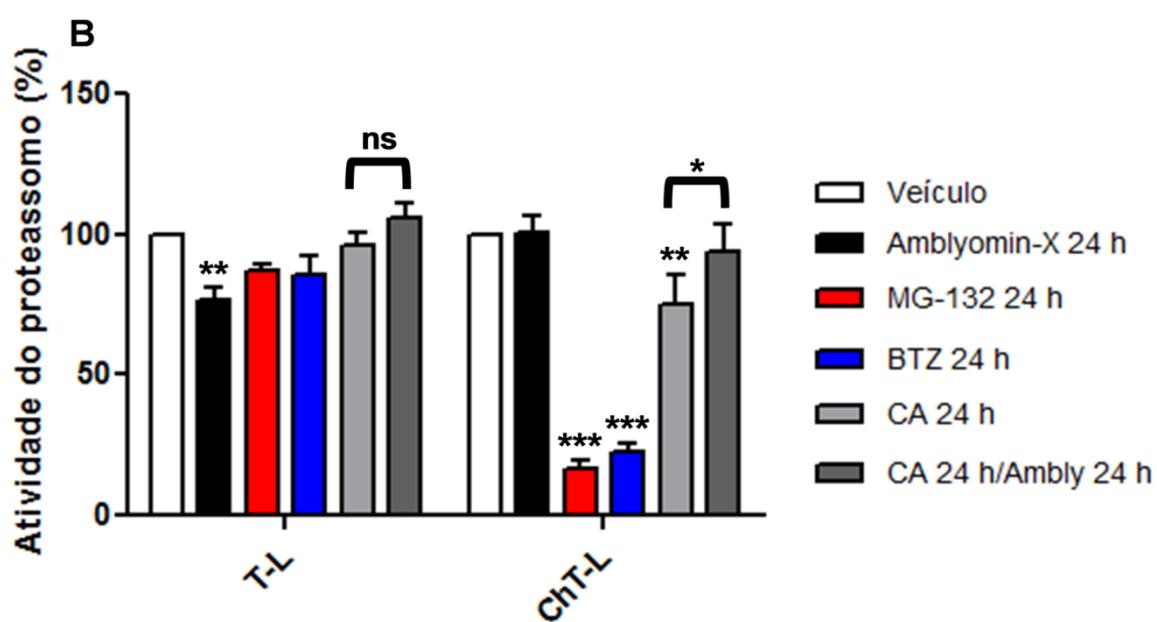
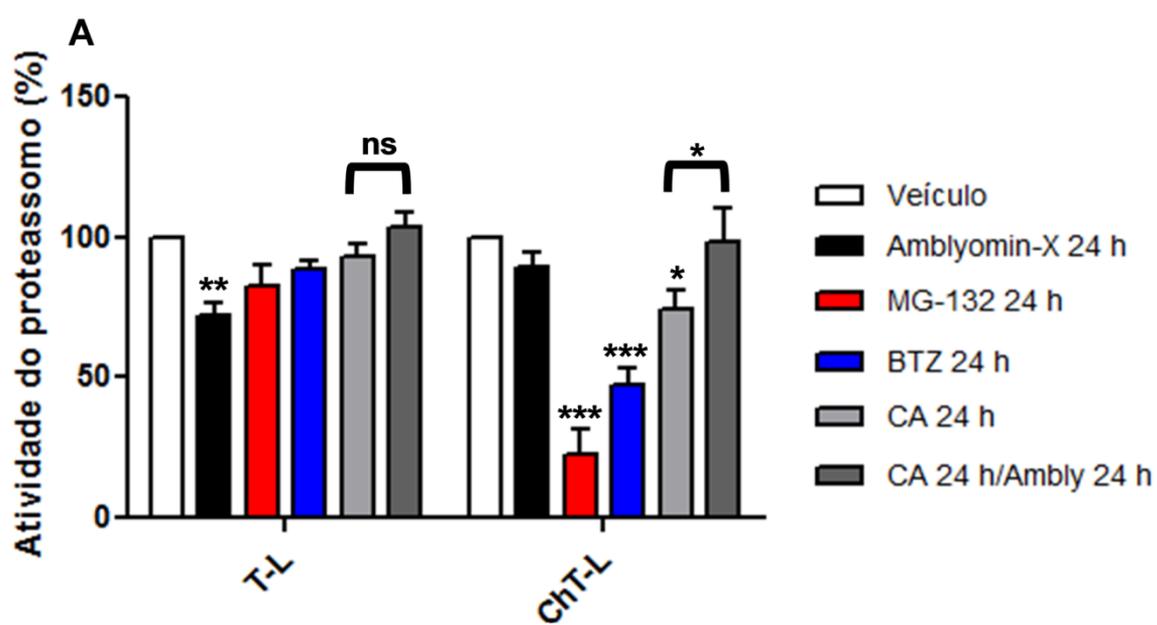
Figura 33 – Papel da dineína na endocitose do Amblyomin-X nas células tumorais. (A) As células foram tratadas Amblyomin-X marcado com Alexa® Fluor 488 (488-Amblyomin-X) 0,5 μM por 24 h ou; CA 100 μM 24 h seguido por 488-Amblyomin-X 0,5 μM por 24 h (CA/488-Amblyomin-X). As imagens são representativas de cinco campos de cada

experimento (n= 3), sendo a figura final, o *merge*, onde a fluorescência verde representa o 488-Amblyomin-X. O núcleo foi marcado em vermelho pelo corante Syto59. **(B)** *Western blotting* representativo do alvo Rab11 em SK-MEL-28. **(C)** *Western blotting* representativo do alvo Rab11 em MIA PaCa-2. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μ M por 2 h, 4 h ou 24 h. As imagens são representativas de três experimentos independentes. **(D)** Densitometria das bandas observadas nas linhagens SK-MEL-28 e MIA PaCa-2. Os resultados foram calculados relativos ao controle (veículo) e são expressos em média \pm erro padrão do aumento do *fold* da expressão proteica sobre o controle (considerado como 1) em unidades arbitrárias. Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001. **(E)** Co-localização de LIC2/Rab11. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μ M por 24 h. As imagens são representativas de cinco campos de cada experimento (n= 3), sendo a figura final, o *merge* das fluorescências, onde a fluorescência amarela representa a co-localização dos dois alvos, a vermelha representa LIC2 e a verde representa Rab11.

A inibição proteossomal induzida pelo Amblyomin-X (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010) foi verificada novamente com o intuito de se estudar se a inibição prévia da dineína com CA interfere na atividade inibitória da proteína recombinante no proteossomo. Os dados iniciais revelaram que o Amblyomin-X induziu uma diminuição da atividade T-L tanto nas células SK-MEL-28 (**Figura 34A**) quanto nas células MIA PaCa-2 (**Figura 34B**), ao contrário dos controles positivos BTZ e MG-132 que inibiram a atividade ChT-L em ambas as linhagens tumorais (**Figura 34A e 34B**).

Além disso, os resultados também mostraram que o tratamento prévio com CA seguido por Amblyomin-X (CA/Ambly) não induziu a diminuição da atividade T-L nem ChT-L em ambas as células (**Figura 34A e 34B**). O tratamento com CA sozinho induziu uma diminuição da atividade ChT-L nas duas linhagens celulares (**Figura 34A e 34B**); no entanto, quando o tratamento com CA/Ambly foi comparado ao tratamento com CA sozinho, o resultado foi um aumento da atividade ChT-L induzido pelo tratamento CA/Ambly (**Figura 34A e 34B**).

A viabilidade celular com os compostos utilizados também foi avaliada. Os resultados mostraram que o Amblyomin-X induziu uma diminuição na viabilidade celular após 24 h de tratamento em ambas as células tumorais, assim como nos tratamentos com MG-132, BTZ, CA e CA/Ambly (**Figura 34C**). Além disso, não observou-se nenhuma alteração na viabilidade celular das células tratadas com CA/Ambly quando comparados com o tratamento com CA sozinho (**Figura 34C**).



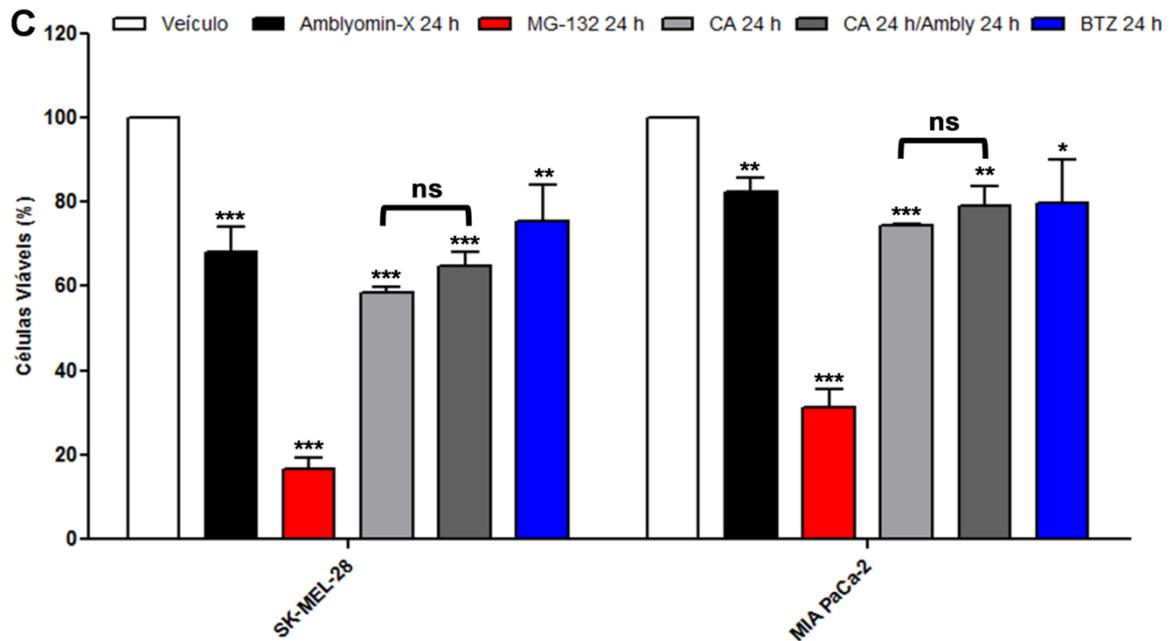


Figura 34 – Influência da dineína na inibição proteossomal induzida pelo Amblyomin-X. Atividade do proteossomo. As células foram tratadas com veículo (PBS) ou; Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μ M por 24 h ou; MG-132 5 μ M por 24 h ou; BTZ 100 nM por 24 h ou; CA 100 μ M por 24 h ou; CA 100 μ M por 24 h seguido de Amblyomin-X 0,5 μ M por 24 h (CA/Ambly). Os resultados são expressos em média \pm erro padrão relativos ao controle (veículo). Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ ou ns (não-significativo). A atividade tipo-tripsina (T-L) e tipo-quimotripsina (Ch-T) foram avaliadas utilizando-se substratos cromogênicos específicos, sendo o gráfico (A) SK-MEL-28 e o gráfico (B) MIA PaCa-2. (C) Viabilidade celular com os compostos utilizados nessa análise. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão relativos ao controle (veículo). Três experimentos independentes foram realizados. O critério de significância estatística foi definido como * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ ou ns (não-significativo).

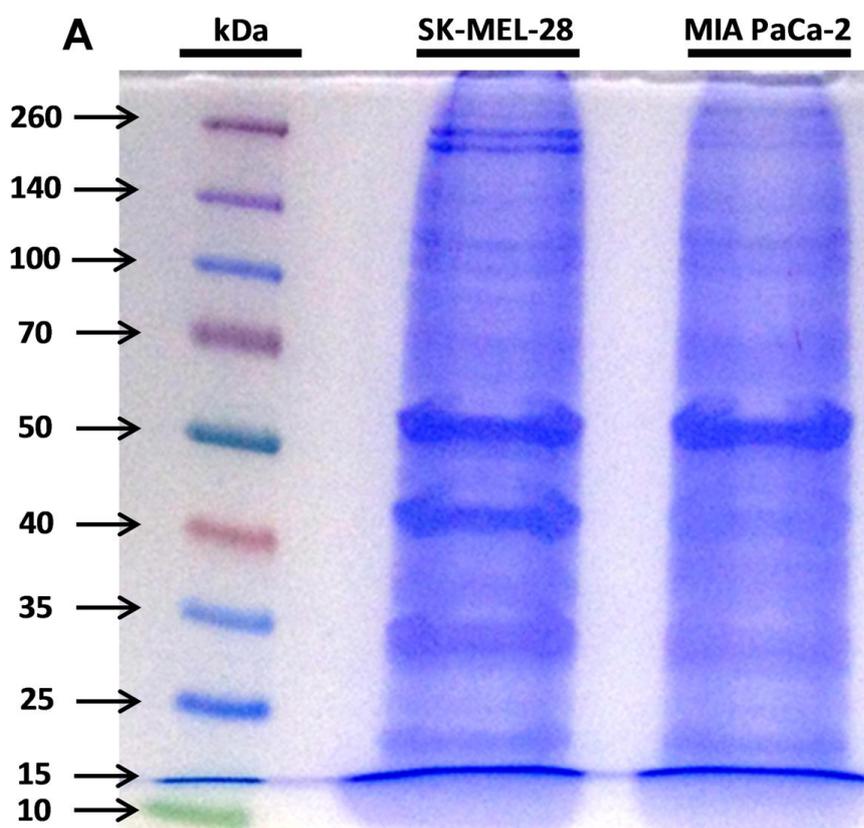
4.7 Investigação do ligantes de dineína nas células tumorais SK-MEL-28 e MIA PaCa2 tratadas com Amblyomin-X

Após todas as análises envolvendo a dineína nas células tumorais e fibroblastos tratados com Amblyomin-X e, visto a internalização da proteína recombinante nas células tumorais mas não em fibroblastos (MORAIS 2014), o próximo passo foi avaliar os ligantes da dineína. A indução das células tumorais com Amblyomin-X ocorreu por 24 h.

O tempo de 24 h de tratamento foi escolhido devido ao fato de o Amblyomin-X já ter sido internalizado pelas linhagens tumorais (MORAIS 2014) e ter induzido a inibição proteossomal (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010) e formação de agregossomos (Figura 35A e 35B).

Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com Amblyomin-X induziu um perfil proteico semelhante, de alvos ligados à dineína, em ambas as células tumorais após 24 h de tratamento (**Figura 35A**). Apesar disso, a intensidade das bandas proteicas observadas no gel parece ser diferente; sendo maior nas células SK-MEL-28 do que nas células MIA PaCa-2 após 24 h de tratamento com Amblyomin-X (**Figura 35A**).

Além disso, após 24 h de tratamento com a proteína recombinante, as duas linhagens tumorais exibiram um maior número de proteínas ligadas à dineína, mais relacionadas com citoesqueleto/*extracellular matrix* (ECM)/adesão (10 proteínas), transdução de sinal (8 proteínas), e metabolismo (6 proteínas) (**Figura 35B**).



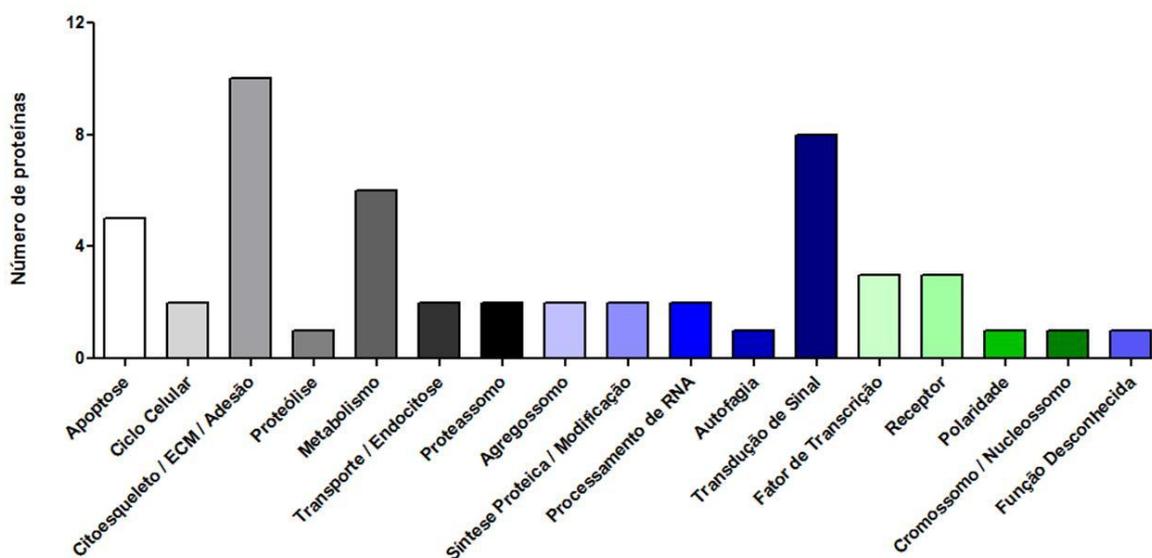
B

Figura 35 – Perfil dos ligantes da dineína nas células tumorais estimuladas com Amblyomin-X.

As células foram tratadas com Amblyomin-X (Ambly) 0,5 μ M por 24 h. Três experimentos independentes foram realizados. **(A)** SDS-PAGE das amostras derivadas de Co-IP. A imagem é representativa de três experimentos independentes. **(B)** Gráfico de barras indicando o número de proteínas ligadas à dineína, em comum entre as linhagens SK-MEL-28 e MIA PaCa-2. Os dados foram obtidos após digestão das bandas com maior intensidade comuns às duas linhagens e análise posterior por espectrometria de massa. As proteínas foram classificadas pelo envolvimento em diferentes funções celulares.

Os dados da identificação das proteínas ligadas à dineína, analisadas por espectrometria de massa, das duas células analisadas; foram sobrepostos para identificar proteínas comuns. As proteínas encontradas, ligadas à dineína, após 24 h de tratamento com Amblyomin-X nas duas linhagens tumorais estão descritas na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Ligantes de dineína após 24 h de tratamento com Amblyomin-X nas linhagens tumorais

Número de acesso	Peptídeo	Proteína relacionada	Score	
			SK-MEL-28	MIA PaCa-2
gi 8923401	MRKPDSK	<i>Ras-related protein Rab-20</i>	59,7	57,2
gi 66365795	AASGEAKPK	<i>Histone cluster 1, H1e</i>	38,4	33,0
gi 60207688	VVAPTP	<i>Beta-secretase 2</i>	47,2	51,3

continua Tabela 3 - Ligantes de dineína após 24 h de tratamento com Amblyomin-X nas linhagens tumorais

gi 2136180	TPWTESR	<i>Soluble interleukin-6 receptor (fragment)</i>	40,9	49,5
gi 167887748	NNDALR	<i>Vimentin variant 4</i>	69,7	78,4
gi 62896523	SSAVR	<i>Vimentin variant</i>	72,4	68,6
gi 119709822	ISASK	<i>Zinc finger protein castor homolog 1 isoform b</i>	60,2	51,9
gi 115334682	EMVYASR	<i>SRC kinase signaling inhibitor 1</i>	42,0	45,1
gi 40353727	GQAVPASK	<i>Synaptopodin isoform A</i>	38,4	29,7
gi 22027622	ALVSRQR	<i>TNF receptor-associated factor 4</i>	35,9	41,6
gi 49168474	AVPTDEAR	<i>Ras-related protein Rab-11A</i>	55,0	64,3
gi 23943787	IEGGK	<i>Dermatan-sulfate epimerase-like protein precursor</i>	39,3	31,2
gi 5830444	LAGDK	<i>Cytosolic serine hydroxymethyltransferase</i>	19,3	24,1
gi 119603709	ALSACKLR	<i>F-box and leucine-rich repeat protein 13, isoform CRA_f</i>	27,8	26,4
gi 260656005	NSGTK	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial isoform 2 precursor</i>	33,7	38,0
gi 24797151	GGKDK	<i>Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial precursor</i>	20,9	21,2
gi 119568055	IKLASSNCPAN	<i>Zinc finger, DHHC-type containing 14, isoform CRA_a</i>	41,0	39,8
gi 27503661	GRGYK	<i>Transmembrane protein 26</i>	49,8	45,5
gi 13236879	GSTCRLR	<i>Tumor necrosis factor receptor, partial</i>	21,2	29,8
gi 179371	DFAEMSR	<i>Bcl-2 protein</i>	19,9	31,4
gi 455713	THTTMSGVAHR	<i>Propionyl CoA carboxylase beta subunit</i>	32,0	31,9
gi 195972857	ILSVLRPQSERGFR	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor 18 isoform b</i>	38,0	41,2
gi 157168372	AVVMECKYGPRRK	<i>Calcium-responsive transcription factor isoform 1</i>	33,3	27,4
gi 39995082	SSMPWNKR	<i>tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase isoform 1</i>	30,5	24,5

conclusão Tabela 3 - Ligantes de dineína após 24 h de tratamento com Amblyomin-X nas linhagens tumorais

gi 194272210	RASGGK	<i>Lysine--tRNA ligase isoform 1</i>	32,2	31,9
gi 317373557	GPPLDGTECAAGK	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3</i>	60,4	69,7
gi 3098675	NSASK	<i>Cell cycle regulatory protein p95</i>	53,9	54,5
gi 13124888	SIIFEAER	<i>Epidermal growth factor-like protein 6 isoform 1 precursor</i>	42,4	42,0
gi 226713806	GRKTANSQGRR	<i>Nuclear receptor corepressor 2</i>	33,0	35,2
gi 541866806	GSGQK	<i>cGMP-dependent protein kinase 2 isoform b</i>	22,8	21,9
gi 4504779	SHKDQPVCSGR	<i>Integrin beta-8 precursor</i>	33,0	27,9
gi 62088530	AKLGPAGNK	<i>Protein kinase C, alpha variant</i>	27,9	41,4
gi 157502193	SSDEAVILCK	<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 isoform 1</i>	44,4	40,9
gi 4506217	TPLQVAK	<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10 isoform 1</i>	30,0	37,7
gi 296278263	IGKRLNIQLKK	<i>Partitioning defective 3 homolog isoform 3</i>	26,5	32,0
gi 281185471	LVEHVPER	<i>Laminin, alpha 1, isoform CRA_a, partial</i>	38,2	38,0
gi 38502170	SVATEER	<i>BCL2-associated athanogene 3</i>	30,0	43,9
gi 46577501	NSRVRR	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>	24,1	38,7

O número de acesso obtido se refere à proteína na base de dados do NCBI que corresponde ao peptídeo encontrado gerado pela fragmentação MS/MS. O score foi obtido no MASCOT e se refere ao score dos íons do fragmento de peptídeo gerado

A seguir, a ferramenta *online* String foi utilizada para determinar as interações entre os ligantes de dineína. Cada alvo foi identificado pela ferramenta, pelo símbolo do gene que o codifica. A **Tabela 4** a seguir descreve cada alvo com seu respectivo símbolo do gene que o codifica e a abreviação da proteína adotada.

Tabela 4 - Descrição de cada ligante de dineína encontrado

Gene relacionado	Proteína	Abreviação adotada	Descrição
RAB20	<i>Ras-related protein Rab-20</i>	Rab20	<i>Small</i> GTPase, ligação de GTP, endocitose e reciclagem, transporte
HIST1H1E1	<i>Histone cluster 1, H1e</i>	H1e	Ligação ao DNA, montagem do nucleossomo
BACE2	<i>Beta-secretase 2</i>	BACE2	Proteína de membrana <i>single-pass</i> tipo I, processamento da <i>amyloid precursor protein</i> (APP)
IL6R e IL6ST	<i>Soluble interleukin-6 receptor</i>	sIL-6R	Forma solúvel da associação dos receptores IL-6R/gp130, transdução de sinal
VIM	<i>Vimentin</i>	Vimentina	FI classe-III, citoesqueleto
CASZ1	<i>Zinc finger protein castor homolog 1</i>	CasZ1	Fator de transcrição envolvido em montagem vascular
SRCIN1	<i>SRC kinase signaling inhibitor 1</i>	SNIP	Regulador negativo de <i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase</i> (SRC) comprometendo a migração celular
SYNPO	<i>Synaptopodin</i>	Sinaptopodina	Proteína associada à actina, localizado nas junções <i>tight</i> das células
TRAF4	<i>TNF receptor-associated factor 4</i>	TRAF4	Proteína adaptadora e transdutora de sinal de receptores de <i>tumor necrosis factor alpha</i> (TNF- α), apoptose
RAB11A	<i>RAB11A</i>	Rab11A	<i>Small</i> GTPase, endocitose (reciclagem), transporte
DSEL	<i>Dermatan-sulfate epimerase-like protein</i>	Dsel	Proteína de membrana <i>multi-pass</i> , isomerase, metabolismo
SHMT1	<i>Cytosolic serine hydroxymethyltransferase</i>	SHMT1	Interconversão de serina e glicina, transferase, metabolismo
FBXL13	<i>F-box and leucine-rich repeat protein 13</i>	FBXL13	Substrato do complexo: <i>Skp, Cullin, F-box containing complex</i> (SCF) (E3 ligase), conjugação de ubiquitina
NDUFV1	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial</i>	NDUFV1	Subunidade da cadeia respiratória de <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i> (NAD ⁺) - NADH desidrogenase (Complexo I), metabolismo

continua Tabela 4 - Descrição de cada ligante de dineína encontrado

DMGDH	<i>Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial</i>	ME2GLYDH	Oxidoreductase, liga <i>flavin adenine dinucleotide</i> (FAD), metabolismo
ZDHHC14	<i>Zinc finger, DHHC-type containing 14</i>	ZDHHC14	Transferase, metabolismo
TMEM26	<i>Transmembrane protein 26</i>	TMEM26	Proteína de membrana <i>multi-pass</i>
TNFRSF1A e TNFRSF1B	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>	TNFR	Receptor de TNF- α , apoptose, resposta inflamatória
BCL2	<i>Bcl-2 protein</i>	Bcl-2	Proteína anti-apoptótica pela regulação da permeabilidade da membrana mitocondrial
PCCB	<i>Propionyl CoA carboxylase beta subunit</i>	PCCase- β	Degradação de <i>propanoyl-CoA</i> , liga ATP
ARHGEF18	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor 18</i>	RhoGEF18	GEF para <i>Ras homolog gene family, member A</i> (RhoA) e também <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i> (Rac1), ativada por G $\beta\gamma$, formato da célula, produção de ROS
ALS2CR8	<i>Calcium-responsive transcription factor</i>	CaRF	Fator de transcrição ativador responsivo ao Ca ²⁺ , ligação ao DNA
NSUN2	<i>tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase</i>	Misu	RNA metiltransferase, metilação de <i>transfer ribonucleic acid</i> (tRNA), processamento de tRNA, ciclo e divisão celular
KARS	<i>Lysine--tRNA ligase</i>	LysRS	Catalisa acoplamento de lisina ao seu tRNA, processamento de tRNA
ADAMTS3	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3</i>	ADAMTS-3	Clivagem de pró-peptídeos de colágeno tipo II
NBN	<i>Cell cycle regulatory protein p95</i>	Nibrina	Resposta ao dano ao DNA, ciclo celular
EGFL6	<i>Epidermal growth factor-like protein 6</i>	EGFL6	Pode ligar integrina alpha-8/beta-1, adesão e diferenciação celular
NCOR2	<i>Nuclear receptor corepressor 2</i>	N-CoR2	Co-repressor transcricional de alguns receptores nucleares promovendo a condensação da cromatina
PRKG2	<i>cGMP-dependent protein kinase 2</i>	cGK2	Ser/Thr quinase, liga ATP, liga <i>cyclic guanosine monophosphate</i> (cGMP)

conclusão Tabela 4 - Descrição de cada ligante de dineína encontrado

ITGB8	<i>Integrin beta-8</i>	Integrina-β8	Associa com alpha-5 e é receptor para fibronectina, adesão celular, proteína de membrana <i>single pass</i> tipo I, sinalização
PRKCA	<i>Protein kinase C, alpha</i>	PKC-α	Ativada por Ca ²⁺ e <i>diacylglycerol</i> (DAG) na presença de PS, Ser/Thr quinase, sinalização, apoptose, angiogênese, adesão celular
PSMD13	<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13</i>	Rpn13	Componente da subunidade regulatória (19S) do proteassomo 26S
PSMD10	<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10</i>	Rpn10	Componente da subunidade regulatória (19S) do proteassomo 26S, regula ativação de <i>protein kinase B</i> (Akt) induzida por <i>epidermal growth factor</i> (EGF) de maneira independente do 26S
PARD3	<i>Partitioning defective 3 homolog</i>	PARD3	Divisão celular assimétrica, polarização celular, diferenciação, liga lipídeo
LAMA1	<i>Laminin, alpha 1</i>	Laminina-1α	Ligação a glicosíngolípídeo, migração e adesão celular, componente da ECM
BAG3	<i>BCL2-associated athanogene 3</i>	Bag3	Reconhece substratos proteicos da chaperona Hsp70, atividade anti-apoptótica
RPTOR	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>	Raptor	Parte do complexo mTORC1 que contém mTOR, síntese proteica, autofagia, crescimento celular

O gene corresponde às proteínas encontradas, considerando a proteína codificada inteira e não as isoformas ou formas parciais e precursoras. A abreviação adotada (adaptada) e a descrição de cada proteína foi retirada do Uniprot (<http://www.uniprot.org>) com exceção de sIL-6R e TNFR. A proteína sIL-6R não é codificada por um gene específico; ela possui 2 genes relacionados (IL6R e IL6ST) por ser a forma ativa solúvel do receptor *interleukin-6 receptor* (IL-6R) combinado com *interleukin-6 signal transducer* (IL-6ST) ou também conhecida por glicoproteína 130 (gp130). A proteína TNFR também não é codificada por um gene específico; ela possui 2 genes relacionados (TNFRSF1A e TNFRSF1B) devido ao fato de a proteína TNFR encontrada é uma forma parcial, podendo ser de qualquer superfamília dos receptores do TNF-α.

As possíveis interações entre os ligantes de dineína após 24 h de tratamento com Amblyomin-X, analisando-se a sobreposição dos dados entre as linhagens tumorais está esquematizada na **Figura 36**. As vias intracelulares sugeridas pelo String, entre os ligantes de dineína após 24 h de tratamento com Amblyomin-X, através do termo *annotated pathway* pela plataforma KEGG foram: adesão focal; câncer; interação citocina-receptor citocina; junção *tight*; sinalização *janus kinase*

(JAK) e *signal transducer and activator of transcription* (STAT) ou JAK/STAT; endocitose; metabolismo de glicina e treonina; sinalização MAPK; interação ECM-receptor; apoptose; junção Gap: *curated pathway* (Figura 36).

Já as vias sugeridas pelo termo *curated pathway* pela plataforma Reactome foram: junção *tight*; proteassomo 26S; degradação de β -catenina; degradação de glicina e betaína; complexo da junção *tight* - *transforming growth factor beta-1/transforming growth factor beta receptor-2/transforming growth factor beta receptor-1/partitioning defective 6 homolog/Ras homolog gene family, member A* (TGF β -1/TGFBR2/TGFBR1/PARD6/RhoA) (Figura 36).

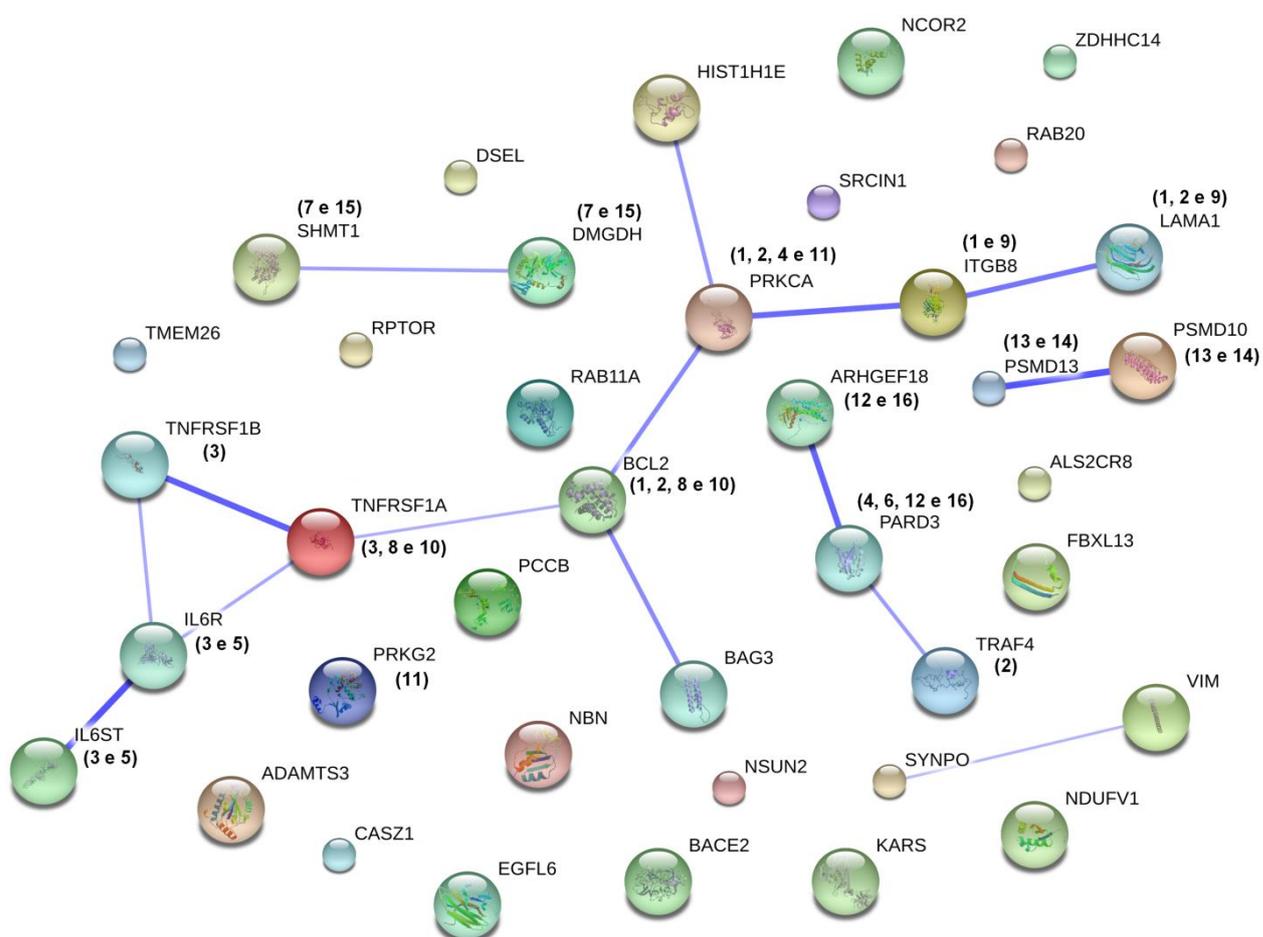


Figura 36 – Análise da interação dos ligantes comuns de dineína entre as linhagens tumorais tratadas com Amblyomin-X por 24 h. As proteínas derivadas da análise de Co-IP utilizando-se anticorpo anti-HC1 foram separadas por gel SDS-PAGE, digeridas e analisadas por espectrometria de massa através do MASCOT. A interação proteína-proteína foi avaliada pelo *software* String, onde as proteínas estão representadas pelo gene que a codifica. No caso de sIL-6R e TNFR, dois genes estão representados para cada um (IL6R / IL6ST e TNFRSF1A / TNFRSF1B, respectivamente) devido a sIL-6R ser uma forma solúvel da combinação das duas proteínas coificadas pelos genes em questão e; devido a TNFR encontrada, ser uma forma parcial, podendo ser parte de qualquer uma as proteínas coificadas pelos genes em questão. As retas em azul,

ligando duas ou mais proteínas indicam uma interação. A interação mais forte é aquele em que a reta azul é mais escura e intensa e, por sua vez, a interação mais fraca é aquela em que a reta azul é mais clara e menos intensa. A numeração acima de cada proteína indica seu envolvimento em uma via intracelular sugerida pelos termos *curated pathway* pela plataforma Reactome e *annotated pathway* pela plataforma KEGG. **(1)** KEGG - Adesão focal; **(2)** KEGG - Câncer; **(3)** KEGG - Interação citocina-receptor citocina; **(4)** KEGG - Junção *tight*; **(5)** KEGG - Sinalização JAK-STAT; **(6)** KEGG - Endocitose; **(7)** KEGG - Metabolismo de glicina e treonina; **(8)** KEGG - Sinalização MAPK; **(9)** KEGG - Interação MEC-receptor; **(10)** KEGG - Apoptose; **(11)** KEGG - Junção Gap; **(12)** Reactome - Junção *tight*; **(13)** Reactome - Proteassomo 26S; **(14)** Reactome - Degradação de β -catenina; **(15)** Reactome - Degradação de glicina e betaina; **(16)** Reactome - Complexo da junção *tight*: TGF β -1 / TGFBR2 / TGFBR1 / PARD6 / RhoA.

5. DISCUSSÃO

5.1 O Amblyomin-X modulou diferentemente os níveis de mRNA das cadeias de dineína, alvos do controle proteico e NF- κ B entre as linhagens tumorais e fibroblastos

A análise dos níveis de mRNA ou expressão gênica, pode indicar evidências de um evento celular que contribua na elucidação de mecanismos de resposta, quando são desafiadas por algum estímulo, em conjunto com outros dados. O Amblyomin-X aumentou a expressão da cadeia LIC2 de dineína e da subunidade β 2 do proteassomo nas células SK-MEL-28 e MIA PaCa-2 em estudo de *microarray* (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). Além disso a proteína recombinante exerceu um efeito inibitório preferencial sobre a atividade T-L do proteassomo mas também da atividade ChT-L em doses e tempos de tratamento maiores (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010).

Sabe-se também que os inibidores do proteassomo bloqueiam a ativação do NF- κ B (ALMOND e COHEN 2002). Considerando o alvo primário do Amblyomin-X como o proteassomo, o primeiro passo foi verificar a expressão gênica de cadeias da dineína e de alvos relativos ao controle proteico intracelular e NF- κ B, a fim de ampliar esse estudo e obter direções sobre possíveis papéis desempenhados pela dineína no mecanismo de ação antitumoral do Amblyomin-X.

No estudo de qPCR, a expressão de diversas cadeias de dineína, MEKK1 e NFKB1 nas células SK-MEL-28 e da cadeia Roadblock2 nas células MIA PaCa-2 não puderam ser quantificadas. A primeira hipótese para esse fato é devido ao possível elevado número de variações de mRNA para cada alvo, produzidos por *splicing* alternativo.

Esse processo permite a codificação de mais de uma proteína por um mesmo gene através da inclusão ou remoção de éxons (regiões codificantes) (BLACK 2003; FACKENTHAL e GODLEY 2008) e podem estar em grande número em linhagens tumorais uma vez que essas células produzem mais proteínas mutadas do que células normais (FACKENTHAL e GODLEY 2008). Este número elevado de

proteínas mutadas produzidas por *splicing* alternativo nas células tumorais poderia explicar o fato de que os alvos que não puderam ser quantificados por qPCR estão presentes somente nas linhagens SK-MEL-28 e MIA PaCa-2, mas não em fibroblastos.

Outra hipótese é a de que o par de *primers* desenhados para esses alvos não atingiram o sítio ideal da sequência nucleotídica a ser amplificada. No entanto, os *primers* foram desenhados em uma região que compreende todas as isoformas conhecidas nos alvos que possuem isoformas. Além disso, a eficiência dos *primers* foi verificada e todos eles apresentaram valores satisfatórios. A qualidade do RNA de cada amostra foi verificada por gel de agarose e a reação de qPCR foi normalizada com o controle endógeno GAPDH. Sendo assim, esta hipótese não é viável.

É de conhecimento universal que organismos multicelulares possuem diferentes tipos de células que constituem diferentes tecidos em cada organismo. Embora todos os tipos celulares nestes organismos possuam um genótipo que segue a mesma sequência do genoma de cada um; cada tipo celular pode expressar as proteínas em quantidades diferentes.

Assim, outra hipótese viável para os alvos não quantificados por qPCR é a de que eles podem não ser expressos constitutivamente em taxas elevadas de modo específico para o tipo celular (no caso SK-MEL-28 ou MIA PaCa-2). O aumento da quantidade de cDNA em SK-MEL-28 não possibilitou a quantificação desses alvos, devido à baixa amplificação e também ao deslocamento para a esquerda da curva de amplificação do controle endógeno GAPDH. Sendo assim, a baixa expressão constitutiva de cada alvo não quantificado na respectiva célula tumoral, também poderia explicar esses dados observados.

O Amblyomin-X tem como alvo o proteassomo (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010) e inibidores do proteassomo induzem formação de agregossomos (GARCIA-MATA *et al.* 2002) e a autofagia (ALMOND e COHEN 2002; CRAWFORD *et al.* 2011; ZHU *et al.* 2010). O aumento da expressão da maioria das cadeias quantificáveis de dineína, em ambas as linhagens tumorais, revelou uma primeira evidência de que a dineína poderia apresentar um papel no transporte de agregossomos, autofagossomos e lisossomos, uma vez que este motor molecular transporta essas estruturas até o MTOC para depuração autofágica dos agregossomos (GARCIA-MATA *et al.* 2002).

As cadeias intermediárias de dineína geralmente acoplam cargas sozinhas acompanhadas do regulador dinactina (através da ligação com a subunidade p150Glued) (HODGKINSON *et al.* 2005). As cadeias leve-intermediárias podem transportar outras proteínas envolvidas na dinâmica dos microtúbulos, orientação do MTOC, posicionamento do Golgi e do fuso mitótico (CSHMORANZER *et al.* 2009) e controle do tráfego de endossomos (HORGAN *et al.* 2010).

Já as cadeias leves podem ter funções independentes de estarem acopladas à dineína, como por exemplo, na sinalização da via NF- κ B, onde as cadeias LC8 regulam negativamente este fator através de uma interação redox-dependente com o inibidor natural I κ B α (JUNG *et al.* 2008). As cadeias LC8, por exemplo, podem ainda atuar de forma independente da dineína na ligação de LC8-1 e LC8-2 ao fator pró-apoptótico Bim (PUTHALAKATH *et al.* 1999) ou de LC8-1 e LC8-2 ao componente autofágico AMBRA1 (DI BARTOLOMEO *et al.* 2010).

A superexpressão de determinadas cadeias de dineína poderia também indicar cargas ou ligantes diferentes que foram acoplados ao complexo dineína para o transporte e depuração, diferenciando a composição proteica dos possíveis agregossomos formados. Nesse sentido, poderia ainda ocorrer o recrutamento e envolvimento de cadeias específicas de dineína, quando tratadas com Amblyomin-X, em outros processos celulares de transporte como de endossomos, Golgi, complexos proteicos e fatores de transcrição, posicionamento do núcleo ou ainda atuação na divisão celular e dinâmica dos microtúbulos, visto a variedade de funções da dineína (ALLAN 1995; GARCIA-MATA *et al.* 2002; PFISTER *et al.* 2006; TAN *et al.* 2010; VARMA *et al.* 2009; YADAV *et al.* 2012).

A dinactina é um conhecido regulador da dineína que contribui no acoplamento de cargas (HODGKINSON *et al.* 2005). Um resultado interessante mostrou que o Amblyomin-X induziu um aumento na expressão gênica da subunidade p150Glued da dinactina mas não da subunidade dinamitina, apenas em SK-MEL-28 após 24 h de tratamento. Esse dado poderia indicar que a dinactina talvez não seja indispensável ao transporte de possíveis cargas induzidas pelo Amblyomin-X nas células tumorais estudadas e seria, portanto, auxiliar.

Estudos anteriores mostraram que o Amblyomin-X não inibiu as atividades T-L e ChT-L do proteassomo em fibroblastos (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). Os dados de qPCR das cadeias de dineína e das duas subunidades de dinactina em

fibroblastos mostraram que o Amblyomin-X induziu um aumento na expressão gênica da cadeia Roadblock1 após 2 h de tratamento e de algumas cadeias da dineína após 4 h. No entanto, ocorreu uma normalização da expressão de todas as cadeias de dineína anteriormente alteradas com 24 h de tratamento com Amblyomin-X. Nenhuma alteração foi observada nas cadeias analisadas de dinactina.

Uma vez que o Amblyomin-X não induz a inibição proteossomal em fibroblastos (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010), não seria necessário transportar agregossomos. Sendo assim, o aumento dos níveis de mRNA de cadeias da dineína observado, principalmente após 4 h de tratamento com a molécula recombinante, poderia estar relacionado a um evento rápido e transitório envolvendo a dineína, não sendo indispensável a dinactina; induzido pela presença da proteína no microambiente celular.

A avaliação da expressão gênica do fator de transcrição NF- κ B foi inclusa devido ao fato de que inibidores do proteassomo induzem o bloqueio da ativação deste fator (ALMOND e COHEN 2002). O NF- κ B é um fator de transcrição com cinco subunidades sendo o heterodímero composto pela fração ativa de NFKB1 (p50) e a subunidade p65, o mais abundante e envolvido no maior número de funções em quase todos os tipos celulares (BALDWIN JR 1996). O gene NFKB1 em células SK-MEL-28 não foi quantificado devido à baixa amplificação. No entanto, o Amblyomin-X induziu uma superexpressão desse gene, mesmo após 24 h de tratamento, nas células MIA PACA-2. Esta observação poderia, inicialmente, representar uma resposta celular ao Amblyomin-X na tentativa de promover a transcrição de genes anti-apoptóticos que atuam na sobrevivência tumoral dessa linhagem.

Esta análise em fibroblastos mostrou que o Amblyomin-X aumentou os níveis de mRNA após 4 h de tratamento. O nível de mRNA de NFKB1 foi normalizado após 24 h de tratamento. Estes resultados sugerem que a presença de Amblyomin-X no microambiente celular poderia ter induzido uma resposta anti-apoptótica celular que foi aparentemente atenuada e resolvida pelas células.

A análise da expressão gênica nas células tumorais e fibroblastos incluiu genes relacionados ao controle proteico intracelular. A MAP kinase MEKK1 foi relatada como uma importante molécula no recrutamento de vesículas contendo agregados proteicos para a formação de agregossomos (GARCIA-MATA *et al.* 2002). Não se observou alteração significativa na expressão desse gene na linhagem

fibroblasto e MIA PaCa-2. Este alvo também não pode ser quantificado em SK-MEL-28. Esses dados poderiam indicar que a possível e esperada formação de agregossomos poderiam ser recrutados por outra molécula.

A formação de agregossomos ocorre por duas vias diferentes. A primeira é a via exclusiva de ubiquitina mediado pela molécula adaptadora HDAC6 (RODRIGUEZ-GONZALEZ *et al.* 2008) e a segunda é via não-exclusiva de ubiquitina mediado pela molécula adaptadora Bag3 (GAMERDINGER *et al.* 2010). A expressão gênica de um componente da via exclusiva de formação de agregossomos foi então, analisada. A enzima E2 conjugadora de ubiquitina Ubc13 realiza a poliubiquitinação exclusivamente pelo resíduo de lisina na posição 63 (K63) da molécula de ubiquitina (BEDFORD *et al.* 2010) e está relacionada à via exclusiva de ubiquitina de formação de agregossomos (YAO, T-P *et al.* 2010). O Amblyomin-X induziu um aumento na expressão de mRNA nas células tumorais após 24 h de tratamento, principalmente e em fibroblastos após 4 h de tratamento, retornando a níveis basais após 24 h de tratamento.

O aumento de mRNA de Ubc13 nas linhagens tumorais poderia então, possivelmente estar relacionado à sinalização para formação de agregossomos e depuração pela autofagia, uma vez que essa enzima conjuga ubiquitina por K63 (BEDFORD *et al.* 2010) e visto que a autofagia também é induzida pela sinalização K63 (GARCIA-MATA *et al.* 2002). Além disso, em fibroblastos, esta alteração poderia estar relacionada à via NF- κ B por dois motivos: a ubiquitinação pela Ubc13 é necessária para a transdução do sinal por essa via (LAPLANTINE *et al.* 2009) e, o proteossomo não é inibido em fibroblastos (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). Sendo assim não se espera a formação de agregossomos e indução de autofagia nesta célula quando induzida com Amblyomin-X.

Um componente da via não-exclusiva de ubiquitina de formação de agregossomos, a chaperona Hsp70 (GAMERDINGER *et al.* 2010), foi também analisada por qPCR. O Amblyomin-X não induziu alterações importantes e persistentes de expressão gênica deste alvo nas linhagens tumorais. No entanto, em fibroblastos o Amblyomin-X induziu um aumento na expressão de Hsp70 após 4 h de tratamento e uma normalização dos níveis de mRNA deste alvo após 24 h. Este aumento em fibroblastos, poderia estar relacionado a uma resposta ao tratamento com Amblyomin-X para realizar o *fold*ing correto de proteínas em uma possível

resposta anti-apoptótica frente à perturbação desencadeada pela presença do Amblyomin-X no microambiente celular.

A β -actina é outra proteína que apresenta um papel no controle proteico intracelular. Ela atua na fusão de lisossomos e autofagossomos na autofagia além da sustentação da célula (KIMURA *et al.* 2008). A β -actina não apresentou alterações na expressão de mRNA em fibroblastos e MIA PaCa-2. No entanto, o Amblyomin-X em SK-MEL-28 induziu um aumento na expressão deste gene após 24 h de tratamento.

Este resultado observado poderia refletir alterações no citoesqueleto com a possível formação dos agregossomos visto que são componentes de alto peso molecular (GARCIA-MATA *et al.* 2002). Este evento, caso ocorra, poderia ser mais intenso nessa linhagem tumoral do que em células MIA PaCa-2, levando a célula a transcrever mais β -actina como forma de sustentação desses agregados de alto peso molecular. Este alvo poderia ainda apresentar uma possível relação com a depuração autofágico, caso ocorra, no que se refere à fusão de autofagossomos (contendo agregossomos) com lisossomos.

5.2 O Amblyomin-X induziu aumento na expressão proteica de dineína e bloqueio da ativação de NF- κ B nas células tumorais mas não em fibroblastos

A partir dos dados de qPCR, foi avaliada a expressão proteica por *western blotting* das cadeias HC1, LIC2 e LC8-1/2 de dineína, β -actina e de NFKB1 (p105/p50). A proteína recombinante induziu nas duas linhagens tumorais, um aumento na expressão proteica das três cadeias de dineína em praticamente todos os tempos de tratamento com Amblyomin-X. Estes dados corroboram com os resultados apresentados de qPCR indicando que o aumento da transcrição gênica desses alvos envolveu a tradução em proteínas.

Sendo assim, aumentam as chances da dineína provavelmente desempenhar um ou mais papéis importantes no transporte de cargas relacionados ao mecanismo de ação antitumoral do Amblyomin-X. Além disso, o aumento da expressão proteica de LIC2, especialmente, em ambas as linhagens tumorais, faz com que a hipótese de participação da dineína na formação de endossomos possa ser viável, uma vez

que o Amblyomin-X é internalizado por endocitose nas células SK-MEL-28 e MIA PaCa-2 mas não em fibroblastos (MORAIS 2014). Além disso, a dineína é um conhecido transportador de endossomos para as rotas que levam até a região perinuclear (TAN *et al.* 2010) bem como a interação de LIC2 com Rab11, através da proteína adaptadora FIP3 (HORGAN *et al.* 2010).

As cadeias LC8-1/2 interagem com moléculas envolvidas na autofagia e apoptose, como AMBRA1 (DI BARTOLOMEO *et al.* 2010) e Bim (DAY *et al.* 2004) e na via NF- κ B (JUNG *et al.* 2008). O aumento da expressão proteica das cadeias LC8-1/2 também aumentam as chances da participação dessas proteínas em eventos de sinalização de autofagia, apoptose e da via NF- κ B. Além disso, o aumento da expressão da cadeia motora HC1 poderia indicar o envolvimento da dineína no transporte dos complexos contendo mTOR até seu local de ação (CLIPPINGER e ALWINE 2012) e do dímero atuante de NF- κ B até o núcleo (SHRUM *et al.* 2008).

Como evidenciado nos resultados, a expressão proteica de HC1 e LIC2 não se revelou alterada em nenhum tempo de tratamento com Amblyomin-X na linhagem de fibroblastos. Esses resultados indicam que a alteração na expressão gênica após 4 h de tratamento não envolveu um aumento na tradução dessas cadeias proteicas. No entanto, na mesma análise, as cadeias LC8-1/2 encontram-se superexpressas após 4 h de tratamento, mas com normalização e 24 h. Esse dado reforça a hipótese de que o Amblyomin-X poderia induzir uma perturbação no microambiente celular que é atenuado pela linhagem normal de fibroblastos. Sendo assim, as cadeias LC8-1/2 poderiam estar envolvidas em uma resposta pró-apoptótica mediada pelo NF- κ B, uma vez que elas regulam negativamente esta via (JUNG *et al.* 2008) ou ainda uma resposta anti-apoptótica mediada pelo sequestro do fator pró-apoptótico Bim (DAY *et al.* 2004).

As hipóteses envolvendo a via NF- κ B foram então avaliadas pela análise da proteólise de NFKB1, que ocorre pelo proteassomo (COHEN *et al.* 2006; LIN *et al.* 1998), da fração p105 na forma ativa p50. Os inibidores do proteassomo conhecidos induzem um bloqueio nesta via (ALMOND e COHEN 2002), uma vez que o inibidor natural deste fator de transcrição, o I κ B α , necessita ser degradado pelo proteassomo para liberar o complexo NF- κ B para exercer sua função (HAYDEN e GHOSH 2004), além da necessidade da proteólise de NFKB1 pelo proteassomo (COHEN *et al.*

2006; LIN *et al.* 1998) para formar o dímero mais abundante NFKB1 (p50) / RelA (BALDWIN JR 1996; OKADA *et al.* 2004).

O Amblyomin-X induziu um bloqueio da proteólise do NFKB1 nas duas linhagens tumorais e este dado reforça a inibição do proteassomo pelo Amblyomin-X (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010), atuando igualmente os demais inibidores do proteassomo conhecidos (ALMOND e COHEN 2002; CRAWFORD *et al.* 2011; DORSEY *et al.* 2008; JAIN *et al.* 2011; RUSCHAK *et al.* 2011). Portanto, a dineína não poderia estar envolvida na translocação de NF- κ B nas duas células tumorais estudadas porque o componente NFKB1 do dímero mais abundante (NFKB1/RelA) não foi ativado em consequência da inibição proteassomal induzida pelo Amblyomin-X (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). Apesar de não ter sido investigado, o aumento da expressão gênica e proteica das cadeias LC8-1/2 também poderia estar relacionada com a regulação negativa e, portanto, inativação da via NF- κ B através de uma interação redox com I κ B α , que permitiria a atuação deste inibidor do NF- κ B no bloqueio da proteólise de NFKB1 (JUNG *et al.* 2008).

Além disso, a enzima Ubc13 atua na ubiquitinação dos componentes da via NF- κ B (CHEN, J. e CHEN, Z. J. 2013; LAPLANTINE *et al.* 2009). Sendo assim, a superexpressão gênica da enzima Ubc13, no caso das células tumorais induzidas pelo Amblyomin-X, não poderia indicar que a enzima, caso fosse codificada e aumentasse a expressão proteica; pudesse atuar na ubiquitinação e ativação dos componentes da via NF- κ B, visto o bloqueio da proteólise de NFKB1 induzido pelo Amblyomin-X.

Interessantemente, o Amblyomin-X induziu a proteólise de NFKB1 em fibroblastos. Este resultado sugere e reforça a hipótese de que a presença do Amblyomin-X no microambiente celular poderia induzir uma resposta anti-apoptótica por esta célula, mediada pela via NF- κ B. Neste caso, a dineína provavelmente apresenta um papel na translocação do dímero para o núcleo, visto a necessidade desse transporte para a função do fator de transcrição (SHRUM *et al.* 2008), mesmo sem o aumento da expressão proteica de HC1. Além disso, o aumento da expressão gênica de LC8-1/2 após 4 h de tratamento em fibroblastos, somado à ativação da proteólise de NFKB1 nesta célula; descarta a hipótese da regulação negativa pelas cadeias LC8-1/2 da via NF- κ B.

A hipótese de que um evento transitório ocorra devido à presença do

Amblyomin-X no microambiente celular dos fibroblastos, pode, portanto, estar relacionado com a ativação da proteólise NF- κ B. Este fato também poderia justificar o aumento observado da expressão gênica de Ubc13 (com retorno aos níveis basais após 24 h de tratamento), uma vez que esta enzima atua na conjugação de ubiquitina de componentes dessa via (CHEN, J. e CHEN, Z. J. 2013; LAPLANTINE *et al.* 2009) e também porque o Amblyomin-X não induz a inibição proteossomal em fibroblastos (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). Assim, não se espera a formação de agregossomos que envolveria necessariamente a sinalização K63 desempenhada também pela Ubc13 (BEDFORD *et al.* 2010).

A β -actina desempenha funções de sustentação do citoesqueleto celular e fusão de organelas autofágicas com o auxílio da forma filamentosa F-actina da β -actina citoplasmática em células não-musculares (KIMURA *et al.* 2008). A análise desta proteína por western blotting, mostrou que o Amblyomin-X induziu um aumento na expressão proteica de β -actina somente na linhagem SK-MEL-28 e após 24 h de tratamento, mas não em fibroblastos e MIA PaCa-2. Este fato reforça a hipótese de que o tratamento com Amblyomin-X poderia indicar uma sensibilidade maior nesta linhagem tumoral em relação à MIA PaCa-2, caso ocorra a formação de agregossomos e a depuração autofágica.

5.3 O Amblyomin-X induziu a formação de agregossomos de morfologia diferentes nas linhagens tumorais que foram transportados pela dineína pela via não-exclusiva de ubiquitinação

Os inibidores do proteassomo conhecidos induzem a formação de agregossomos (ALMOND e COHEN 2002; CRAWFORD *et al.* 2011; GARCIA-MATA *et al.* 2002), requerendo a dineína para este transporte, através da via exclusiva de ubiquitina (ALMOND e COHEN 2002; CRAWFORD *et al.* 2011; RODRIGUEZ-GONZALEZ *et al.* 2008; RUSCHAK *et al.* 2011). Esta formação de agregossomos foi descrita como sendo dependente da síntese de polipeptídeos nascentes dos ribossomos (CENCI *et al.* 2012).

O Amblyomin-X induziu a formação de agregossomos nas duas células tumorais, ao contrário do que ocorreu em fibroblastos onde não houve formação. A não formação de agregossomos em fibroblastos era esperada uma vez que o

Amblyomin-X não inibe o proteassomo (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). Além disso, os agregossomos induzidos pelo Amblyomin-X nas células tumorais foram formados de uma maneira dependente da síntese de polipeptídeos nascentes dos ribossomos, uma vez que o tratamento prévio com CHX impediu a formação de agregossomos nessas células. Este fato compara o Amblyomin-X com os inibidores do proteassomo conhecidos como o BTZ, pois é de conhecimento científico que este agente tumoral também deixa formar agregossomos frente a uma inibição na síntese proteica (CENCI *et al.* 2012).

Os estudos relacionados com a formação de agregossomos frente a uma inibição prévia por CHX, mostram que a síntese proteica contribui para determinar a sensibilidade do inibidor do proteassomo pela saturação da capacidade degradativa do proteassomo (CENCI *et al.* 2012). Sendo assim, o bloqueio da síntese proteica pode diminuir a carga do proteassomo, protegendo as células da inibição proteassomal (CENCI *et al.* 2012). Estes estudos poderiam justificar a não formação de agregossomos induzidos pelo Amblyomin-X nas células tumorais tratadas previamente com CHX que foi observada nos ensaios de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo realizados.

Os agregossomos podem ainda se formar em duas distintas morfologias; esféricos ou em fitas (GARCIA-MATA *et al.* 2002). Os dois tipos podem ser compostos de diferentes substratos como proteínas citosólicas, proteínas transmembrana ou proteínas secretórias (GARCIA-MATA *et al.* 2002). A morfologia varia de acordo com o tipo de substrato agregado e com o tipo celular (GARCIA-MATA *et al.* 2002). O Amblyomin-X induziu a formação de agregossomos do tipo em fitas nas células SK-MEL-28 e do tipo esféricos nas células MIA PaCa-2, em análise por microscopia eletrônica de transmissão. Como esperado, não houve formação de agregossomos em fibroblastos tratados com Amblyomin-X, uma vez que não há inibição proteassomal (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010).

A linhagem tumoral de melanoma (SK-MEL-28) representa células malignas derivados de melanócitos localizados no tecido epitelial da pele (BOSCH *et al.* 2010; COCHRAN *et al.* 1997). A linhagem tumoral de adenocarcinoma de pâncreas (MIA PaCa-2) representa células malignas localizadas no pâncreas, que é uma glândula dos sistemas endócrino e digestivo (NAWROCKI *et al.* 2004; SEUFFERLEN *et al.* 2012). Sendo assim, a hipótese sobre o tipo de agregossomo formado nas células

MIA PaCa-2 é de que eles sejam compostos majoritariamente de proteínas secretórias, o que condiziria com a função endócrina e digestiva do pâncreas. Estas proteínas poderiam, portanto, ser o fator de distinção entre os agregossomos esféricos observados em MIA PaCa-2 e os agregossomos em fita observados em SK-MEL-28.

Sabe-se que a formação de agregossomos pode ocorrer tanto pela via exclusiva da sinalização de poliubiquitinação K63, com auxílio da molécula HDAC6 (via exclusiva de ubiquitina) (RODRIGUEZ-GONZALEZ *et al.* 2008), quanto pela via não exclusiva de ubiquitina, com auxílio da molécula Bag3 (GAMERDINGER *et al.* 2010). Na via não exclusiva, o substrato proteico, ubiquitinado ou não, da chaperona Hsp70 é transferido para a molécula adaptadora Bag3 (GAMERDINGER *et al.* 2010). Ambas as vias são reconhecidas pelo complexo dineína para que ocorra o transporte de agregados formados para a formação de agregossomos no MTOC (YAO, T-P *et al.* 2010). No entanto, a via predominante nos inibidores de proteassomo conhecidos é a via exclusiva de ubiquitina (ALMOND e COHEN 2002; CRAWFORD *et al.* 2011; RODRIGUEZ-GONZALEZ *et al.* 2008; RUSCHAK *et al.* 2011).

Nos ensaios de ELISA, foi evidenciado que a molécula Bag3, já se encontrava constitutivamente em maior concentração intracelular nas linhagens tumorais do que em fibroblastos (que não apresentou diferenças entre controle e tratado com Amblyomin-X tanto na avaliação de HDAC6, quanto Bag3). A maior quantidade de Bag3 constitutiva em células tumorais já é descrita na literatura por se tratar de uma molécula anti-apoptótica importante no processo carcinogênico para manutenção da massa tumoral (GAMERDINGER *et al.* 2010). Além disso, o aumento da concentração intracelular de Bag3 somente nas linhagens tumorais mas não em fibroblastos tratados com Amblyomin-X, sugere fortemente que a via de formação de agregossomo envolvida poderia ser a via não exclusiva de ubiquitinação mediada pelo transporte da dineína. A confirmação da formação de agregossomos justificaria em parte, a hipótese do aumento da expressão gênica e proteica das cadeias de dineína nas duas linhagens tumorais.

A participação da enzima Ubc13 na formação de agregossomos em fibroblastos foi descartada uma vez que não ocorreu este evento celular. No entanto, a participação desta enzima na formação de agregossomos nas linhagens tumorais

é viável, apesar de terem sido realizados apenas ensaios de expressão gênica por qPCR. O aumento dos níveis de mRNA nas células tumorais induzidos pelo Amblyomin-X poderia estar relacionado com a necessidade de sinalização para a formação de agregossomos que foi observada, uma vez que, Ubc13 atua na sinalização K63 para formação de agregossomos (BEDFORD *et al.* 2010; GARCIA-MATA *et al.* 2002) e que, a hipótese de atuação dela na via NF-κB foi descartada devido ao bloqueio observado da proteólise de NFKB1. Apesar do via sugerida de formação de agregossomos pelo Amblyomin-X nas células tumorais ser a via não exclusiva de ubiquitina, a superexpressão de Ubc13 poderia sugerir a ubiquitinação K63 dos substratos componentes dos agregossomos.

5.4 O Amblyomin-X induziu o bloqueio da ativação autofágica nas células tumorais envolvendo a participação da dineína na sinalização intracelular

Os inibidores do proteassomo conhecidos, são sabidamente indutores da autofagia (ALMOND e COHEN 2002; CRAWFORD *et al.* 2011; WU *et al.* 2010; ZHU *et al.* 2010). Sabe-se ainda que a dineína apresenta papel importante no transporte de componentes autofágicos como autofagossomos (GARCIA-MATA *et al.* 2002) e lisossomos (PFISTER *et al.* 2006). É reconhecido também que o passo inicial da autofagia envolve a ativação da molécula LC3 (I em II) que irá atuar na formação de membrana autofágica (FIMIA *et al.* 2011; MIZUSHIMA *et al.* 2004; YAO *et al.* 2010). Já o passo final da autofagia, envolve a fusão dos lisossomos com os autofagossomos contendo o material a ser depurado (KIMURA *et al.* 2008). Os lisossomos são ainda, vesículas reconhecidamente ácidas com o pH em torno de 5,0 e rico em aproximadamente cinquenta enzimas diferentes que permanecem ativas nessas condições (HUOTARI e HELENIUS 2011; TRAGANOS *et al.* 1994).

O Amblyomin-X não induziu a formação de membrana autofágica nos ensaios de imunofluorescência em nenhuma das linhagens estudadas, nem a conversão de LC3-I em LC3-II nos experimentos de *western blotting*. A proteína recombinante também não induziu um aumento na formação de vesículas ácidas nos ensaios de microscopia de fluorescência em nenhuma das células estudadas. Estes resultados em fibroblastos não são uma surpresa porque o Amblyomin-X não inibe o

proteassomo nessa célula (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010) e também não induziu formação de agregossomos. Sendo assim, a autofagia não seria ativada pela via da inibição proteassomal.

Estes resultados observados nas células tumorais foram surpreendentes. O Amblyomin-X nesse caso, não atuou como um inibidor clássico do proteassomo porque esses agentes são conhecidos indutores da autofagia (ALMOND e COHEN 2002; CRAWFORD *et al.* 2011; WU *et al.* 2010; ZHU *et al.* 2010). Além disso a inibição proteassomal pelo Amblyomin-X nas células tumorais estudadas foi comprovada (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010), bem como a formação de agregossomos.

Qual seria então o motivo do bloqueio da ativação da autofagia nas células tumorais tratadas com Amblyomin-X? Um resultado interessante mostrou que o tratamento prévio das duas células tumorais com rapamicina e posterior tratamento com Amblyomin-X, retornou a quantidade visual de vesículas ácidas a níveis iguais aos encontrados no controle negativo. A rapamicina é um agente farmacológico reconhecidamente indutor da autofagia pela inibição de mTOR (BROWN *et al.* 1994). O mTOR por sua vez, é responsável pela regulação negativa da autofagia através da fosforilação do complexo ULK1 (PARKHITKO *et al.* 2014; THOREEN *et al.* 2009) que desprenderia o *core* autofágico (AMBRA-1-Beclin-1-Vps34) da dineína, para atuar na formação da membrana autofágica. Os dados sugeriram uma possível participação de mTOR na disfunção autofágica induzida pelo Amblyomin-X nas células tumorais.

A dineína poderia apresentar alguma função na autofagia nas células tumorais tratadas com Amblyomin-X, uma vez que não há formação de autofagossomos e lisossomos? Sabe-se que a dineína pode atuar no transporte de mTOR até o seu local de ação (CLIPPINGER e ALWINE 2012) e que está envolvida no sequestro do *core* autofágico pela ligação das cadeias LC8-1/2-AMBRA1 (DI BARTOLOMEO *et al.* 2010). O sequestro do *core* pode ocorrer com o auxílio do recrutamento pelo fator pró-apoptótico Bim às cadeias LC8-1/2, também regulando negativamente a autofagia (DAY *et al.* 2004; LUO *et al.* 2012).

De modo interessante, o Amblyomin-X induziu um aumento na expressão proteica de mTOR após 4 h e 24 h de tratamento em ambas as células tumorais. Nas linhagens tumorais, o Amblyomin-X induziu também uma diminuição da

expressão proteica de AMBRA1 após 4 h e 24 h de tratamento, principalmente. Nenhuma alteração na expressão proteica de Bim nessas linhagens foi observada.

Ensaio de microscopia confocal, revelaram que o Amblyomin-X induziu um aumento na co-localização de HC1/mTOR nas duas células tumorais e um aumento na co-localização de LC8-1/2/AMBRA1 apenas nas células MIA PaCa-2. Nenhuma alteração foi identificada na interação LC8-1/2/Bim.

Estes dados indicam que o mTOR possivelmente atua no bloqueio da ativação da autofagia nas células tumorais tratadas com Amblyomin-X por quatro motivos: (i) restauração dos níveis basais de vesículas ácidas em tratamento prévio com rapamicina; (ii) aumento da expressão proteica de mTOR; (iii) aumento da co-localização de dineína (HC1) com mTOR e; (iv) aumento da co-localização de dineína (LC8-1/2) com AMBRA1 nas linhagem MIA PaCa-2. Este último motivo (iv), sugeriu que o mTOR poderia ter impedido a liberação do *core* que contém AMBRA1, da dineína, pela fosforilação de ULK1.

Por que a co-localização de dineína e AMBRA1 não aumentou em SK-MEL-28? O Amblyomin-X induziu uma diminuição da expressão proteica de AMBRA1 e talvez a diminuição teria sido o suficiente para que não houvesse uma quantidade expressiva dessa molécula ligada à dineína juntamente com o restante do *core*, que permitisse a visualização da interação entre os dois alvos. Além disso, a diminuição da expressão de AMBRA1 corrobora para o bloqueio da ativação da autofagia nas duas células tumorais.

A molécula Bim pode atuar tanto na regulação negativa da autofagia pelo recrutamento do *core* à dineína (DAY *et al.* 2004; LUO *et al.* 2012), quanto na apoptose celular, visto seu caráter pró-apoptótico pela atuação na mitocôndria dependente da ativação de Bax e Bak (LUO *et al.* 2012). Portanto, o Bim pode gerar um *crosstalk* entre os eventos de autofagia e apoptose (DAY *et al.* 2004; LUO *et al.* 2012). O Amblyomin-X não induziu alterações na expressão proteica de Bim nem na interação com a dineína nas células tumorais. Assim, a regulação negativa da autofagia observada nessas células, não está relacionada com Bim. Esses dados reforçam a hipótese do papel principal de mTOR neste evento celular induzido pelo Amblyomin-X que foi auxiliado pela dineína.

Além disso, o Bim não associado à dineína, poderia atuar de forma livre para induzir uma resposta pró-apoptótica nas células tumorais induzidas por Amblyomin-X

em resposta ao acúmulo de agregossomos, uma vez que não foram depurados. Sabe-se que a formação de agregossomos não depurados pela autofagia são desencadeadores de apoptose celular (GARCIA-MATA *et al.* 2002). Os inibidores do proteassomo conhecidos induzem o mecanismo de apoptose através de moléculas pró-apoptóticas da família BH3 como o fator Bim (NIKRAD *et al.* 2005). Os dados apresentados sugeriram que o Amblyomin-X, apesar de não ter induzido um aumento da expressão proteica de Bim, não induziu o sequestro de Bim à dineína e, portanto, não inativou Bim por essa via. Sendo assim, Bim poderia atuar na apoptose celular desencadada pelo Amblyomin-X nas células tumorais estudadas (AKAGI *et al.* 2012; CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010; VENTURA *et al.* 2013).

É conhecido o envolvimento da sinalização K63 na autofagia (GARCIA-MATA *et al.* 2002; WONG *et al.* 2010) e que a enzima Ubc13 atua na conjugação de ubiquitina via K63 (BEDFORD *et al.* 2010). A superexpressão gênica de Ubc13 nas células tumorais tratadas com Amblyomin-X, neste caso, não poderia sugerir nenhum envolvimento dessa enzima na ubiquitinação K63 uma vez que não há indução da autofagia. Esse aumento nos níveis de mRNA de Ubc13 caso seja codificado, reforça a hipótese de que esse dado nas linhagens tumorais, está relacionado exclusivamente à formação de agregossomos e não à via NF- κ B e autofagia.

Finalmente, o aumento da expressão proteica de β -actina observado em SK-MEL-28 mas não em MIA PaCa-2, não poderia estar ligado à autofagia por ela estar inibida, não requerendo assim, a fusão de lisossomos e autofagossomos auxiliados pelo esqueleto de F-actina (KIMURA *et al.* 2008). Com relação à esta observação, este aumento de β -actina indica a sustentação dos agregossomos que parece ser mais necessária em SK-MEL-28 do que em MIA PaCa-2, a ponto de precisar de mais β -actina. Esta hipótese é reforçada pelos ensaios de viabilidade celular que mostraram que o Amblyomin-X induziu e redução da viabilidade celular em menor proporção nas células MIA PaCa-2 do que em SK-MEL-28.

A via autofágica também foi analisada em fibroblastos tratados com Amblyomin-X. A formação de vesículas ácidas induzidas pela rapamicina foi recuperada a níveis basais quando tratadas com Amblyomin-X posteriormente. Nesta célula, a proteína recombinante não induziu alterações na expressão proteica de mTOR, AMBRA1 ou Bim. Também não induziu alterações na co-localização de

HC1/mTOR e LC8-1/2/AMBRA1. No entanto, o Amblyomin-X induziu um aumento na co-localização de LC8-1/2/Bim.

A recuperação de níveis basais de vesículas ácidas em fibroblastos, sugeriu que o mTOR foi ativado apesar de não ter ocorrido o aumento da expressão proteica. Sabe-se que o Amblyomin-X não é internalizado pelos fibroblastos (MORAIS 2014) e que não induz a inibição proteossomal (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010), além de não ter induzido a formação de agregossomos e indução da autofagia. Neste caso, a retirada do estímulo da rapamicina e a adição do Amblyomin-X, permitiu às células uma recuperação de sua viabilidade celular, o que não ocorreu com as células tumorais na comparação entre rapamicina e rapa/Ambly.

O Amblyomin-X não diminuiu a viabilidade celular de fibroblastos mesmo após 72 h de tratamento. O mesmo não é observado nas linhagens tumorais onde a citotoxicidade parece ser tempo-dependente. Sendo assim, o estímulo de indução autofágica pela rapamicina, em fibroblastos, foi cortado, permitindo uma recuperação natural da quantidade de vesículas ácidas em fibroblastos visto que a expressão proteica de mTOR nem a interação com a dineína foram alteradas no tratamento com Amblyomin-X. Esses dados somados à análise de expressão proteica de AMBRA1 e a interação com a dineína, indicaram que a autofagia não foi ativada e também não está inibida em fibroblastos como nas células tumorais.

Ainda com relação às células normais (fibroblastos), apesar do Amblyomin-X não ter induzido alterações na expressão proteica de Bim, a co-localização entre Bim e dineína aumentou. Os dados indicam que Bim foi sequestrado à dineína e assim, permanece inativo. Esta observação somada à ativação da proteólise de NFKB1 reforçam a hipótese de que a presença do Amblyomin-X no microambiente celular promove uma resposta celular anti-apoptótica transitória nesta célula. Além disso, o aumento nos níveis de mRNA de Ubc13 observado após 4 h de tratamento (com retorno aos níveis basais após 24 h), caso seja codificado, reforça a hipótese de que essa enzima, poderia estar relacionada exclusivamente à via NF- κ B e não à formação de agregossomos e autofagia.

5.5 O Amblyomin-X induziu um aumento de proteínas poliubiquitinadas via K63 relacionadas a vias diferentes auxiliadas pela dineína entre as células tumorais e fibroblastos

O Amblyomin-X induz o aumento de proteína poliubiquitinadas nas células SK-MEL-28 e MIA PaCa-2 (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). No entanto, não se conhece o perfil de ubiquitinação. Com a investigação de todo o fluxo no controle proteico intracelular que envolve a dineína, a próxima etapa foi investigar a sinalização de ubiquitina para verificar outras possíveis funções deste motor molecular no mecanismo de ação do Amblyomin-X. Como já descrito na literatura, a sinalização K48 de ubiquitina promove a degradação do substrato proteico ubiquitinado pelo proteassomo 26S, enquanto que a sinalização K63 indica a formação de agregossomos, ativação de autofagia, reparo de DNA, sinalização intracelular e.g. via NF- κ B e tráfego de endossomos (GARCIA-MATA *et al.* 2002).

Os resultados de citometria de fluxo, revelaram que o Amblyomin-X não induziu alterações na quantidade de proteína poliubiquitinadas via K48 em nenhuma das linhagens. No entanto, na mesma análise, foi evidenciado um aumento da quantidade de proteínas poliubiquitinadas via K63 em todas as células estudadas.

Após 24 h de tratamento com Amblyomin-X nas células tumorais, o proteasomo já se encontra inibido (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010), ocorre a formação de agregossomos e o bloqueio da ativação da autofagia. Os resultados obtidos sobre a sinalização K48 nas células tumorais, indicam possivelmente que a célula não está sinalizando mais para a degradação proteassomal do que comparado ao controle negativo porque o evento da tentativa de depuração dos agregossomos, devido à inibição proteassomal, já esta ocorrendo.

Após 24 h de tratamento com Amblyomin-X em fibroblastos, o proteasomo não é inibido (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010), não ocorre a formação de agregossomos nem a ativação da autofagia. Os resultados obtidos sobre a sinalização K48 em fibroblastos, indicam que a célula não está sinalizando mais para a degradação proteassomal do que comparado ao controle negativo porque não há necessidade do aumento nessa via.

Com relação à via K63, nas células tumorais, os resultados indicam que o aumento induzido pelo Amblyomin-X está relacionado à formação de agregossomos transportados pela dineína. A sinalização para formação de agregossomos parece então ocorrer com o auxílio da poliubiquitinação K63, porém, foi sugerido que a formação de agregossomos ocorreu pela via não exclusiva de ubiquitina (Bag3).

Pode-se inferir que apesar da via envolvida ser não exclusiva de ubiquitina, é necessário o aumento da sinalização K63 para a formação de agregossomos nas linhagens tumorais tratadas com Amblyomin-X, para que a dineína possa exercer sua função. Além disso o aumento de Ubc13 nas análises de qPCR em conjunto com o aumento da via K63 induzida pelo Amblyomin-X nas células tumorais, reforça a sugestão de que os substratos poderiam estar ubiquitinados via K63 e serem transportados pela via não-exclusiva de ubiquitina pela dineína.

O aumento observado de K63 nas células tumorais, não está relacionado à autofagia por ela estar inibida nessas linhagens. Com relação ao dano ao DNA, sabe-se que os inibidores do proteassomo diminuem a disponibilidade de ubiquitina livre na célula devido à formação de agregossomos e assim, a depleção de ubiquitina resulta em perda da monoubiquitinação de histonas no núcleo celular, induzindo assim o dano (CRAWFORD *et al.* 2011). Sendo assim, o aumento de K63 induzido pelo Amblyomin-X não poderia apresentar correlação com o reparo do DNA, o que é reforçado através de estudos anteriores que mostraram a degradação seletiva do material genético e indução de apoptose nessas linhagens tumorais (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). A via NF- κ B também não se relaciona com o aumento de K63 nessas células devido ao bloqueio da proteólise de NFKB1 observado.

No caso dos fibroblastos, o Amblyomin-X também induziu um aumento na sinalização K63. Sendo assim, a via NF- κ B poderia estar atuando em uma resposta anti-apoptótica, auxiliada pela dineína, frente ao estímulo com a proteína recombinante, através da sinalização K63. De fato, essa hipótese foi confirmada sendo reforçada em conjunto com o aumento a expressão de mRNA da subunidade NFKB1 e de Ubc13 observada após 4 h e da ativação da proteólise de NFKB1 pelo proteassomo.

A via K63 em fibroblastos, não está correlacionada com a autofagia, visto que ela não foi ativada (e também, não está inibida) ou ainda com a formação de agregossomos (que não ocorreu), pois não há inibição proteassomal (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). A relação da via K63 com o reparo de DNA também não é viável visto que não foi encontrado efeitos citotóxicos nessa linhagem, assim como a hipótese de endocitose porque o Amblyomin-X não foi internalizado em fibroblastos (dados não publicados).

5.6 A dineína é necessária para a inibição do proteassomo e internalização do Amblyomin-X que é transportado até o ERC

Os inibidores do proteassomo conhecidos são todos pequenas moléculas permeáveis à célula, como por exemplo, o BTZ, o CFZ e o MG-132 (ALMOND e COHEN 2002; CRAWFORD *et al.* 2011). Sendo assim, eles não necessitam de um mecanismo especializado de entrada porque passam diretamente pela membrana celular. A seletividade descrita de alguns inibidores do proteassomo, como o CFZ por exemplo, é restrita ao sítio de ação no proteassomo (JAIN *et al.* 2011; MENG *et al.* 1999; SHEN *et al.* 2011).

O BTZ por exemplo, já apresenta resistência tumoral (LU e WANG 2013; RUSCHAK *et al.* 2011). O CFZ apresenta efeitos adversos hematológicos, cardíacos e pulmonares além de neuropatia periférica (SIEGEL 2013). Foi descrito também a ação citotóxica dos inibidores do proteassomo em fibroblastos (CHUNG *et al.* 2010; LEGESSE-MILLER *et al.* 2012; PARK e KIM 2012; YOU e PARK 2011). No entanto, a citotoxicidade descrita em fibroblastos ocorre com maior intensidade quando as células estão em estado proliferativo e não quiescentes, ou seja, que não estão se dividindo (LEGESSE-MILLER *et al.* 2012). Isso se deve ao fato de que as células proliferativas necessitam degradar componentes do ciclo celular para manter a ocorrência do ciclo celular no tempo ideal (REED 2006; SKAAR e PAGANO 2009). O efeito citotóxico dos inibidores do proteassomo também é diminuído em células tumorais em estado quiescente (SCHEWE e AGUIRRE-GHISO 2009). A ação de inibidores do proteassomo liberados para o uso na terapia do câncer (BTZ e CFZ) pelo FDA, está ainda limitada para tumores malignos do sangue (CRAWFORD *et al.*, 2006; DORSEY *et al.* 2008; JAIN *et al.* 2011; RUSCHAK *et al.* 2011; SHEN *et al.* 2011).

O Amblyomin-X não apresentou citotoxicidade em células de fibroblastos humanos e fibroblastos murinos NIH3T3 (AKAGI *et al.* 2012; CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010; VENTURA *et al.* 2013), HUVECs e células do sistema imune e melanócitos (dados não publicados), até o momento. Além disso, a molécula se encontra na fase de ensaios não clínicos e não apresentou toxicidade em órgãos como coração, cérebro e cerebelo, baço, rim, fígado e pulmão, nos exames

histopatológicos (dados não publicados). O Amblyomin-X exerceu efeito citotóxico em fibroblastos somente quando microinjetado, indicando uma seleção pela membrana celular (MORAIS 2014). A molécula apresentou citotoxicidade em linhagens tumorais derivadas de tumores sólidos humanos, SK-MEL-28 e MIA PaCa-2 (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010).

Sendo assim, a preferência do Amblyomin-X pela célula tumoral ou uma possível seletividade pode ocorrer, embora não esteja descartada uma possível citotoxicidade em outras células normais ou não tumorais. A literatura demonstra que as células tumorais apresentam maior exposição de PS na membrana tumoral do que na membrana das células normais (CONNOR *et al.* 1989; RAN *et al.* 2002; WOEHLCKE *et al.* 2003). Essa preferência do Amblyomin-X pela célula tumoral tem sido hipotetizada, por ocorrer através de uma interação com a PS da membrana tumoral em ensaios com vesículas contendo PS (dados não publicados). Além disso, essa interação poderia ocorrer através de uma interação eletrostática (dados não publicados) e; ser reforçada pelo fato de que a atividade anti-coagulante do Amblyomin-X é mais eficaz na presença de fosfolípidos (dados não publicados).

Sabe-se que a proteína recombinante é endocitada pelas células tumorais mas não por fibroblastos, supostamente pela região de *lipid rafts* (MORAIS 2014). Os dados da via K63 nessas células poderiam ainda indicar o papel da dineína na endocitose do Amblyomin-X. Sendo assim, essa hipótese foi verificada.

Existem diversas vias diferentes de endocitose sendo todas complexas e interconectadas, por exemplo, endocitose dependente de clatrina, independente de clatrina, formação de cavéola, *lipid rafts* e etc (DOHERTY e MCMAHON 2009; MARSH e MCMAHON 1999; MAXFIELD e MCGRAW 2004; MUKHERJEE *et al.* 1997). A endocitose leva à formação de endossomos (SE) que podem ser destinados à degradação ou reciclagem de estruturas da membrana (DOHERTY e MCMAHON 2009; MARSH e MCMAHON 1999; MAXFIELD e MCGRAW 2004; MUKHERJEE *et al.* 1997; STENMARK 2009). A degradação ocorre após maturação do SE, agora denominado EE, em LE e então em lisossomo, enquanto que a reciclagem pode ocorrer por uma via rápida e direta para a membrana plasmática ou uma via lenta direcionando o SE, agora chamado RE, para o ERC que então poderá direcionar para a membrana plasmática, para a TGN ou para maturação em LE (DOHERTY e MCMAHON 2009; MAXFIELD e MCGRAW 2004; STENMARK 2009).

A dineína transporta qualquer tipo de endossomos (TAN *et al.* 2010), sendo que o transporte para o ERC envolve a ligação da cadeia LIC2 com a proteína Rab11 através da molécula adaptadora FIP3 (HORGAN *et al.* 2010). Sabe-se ainda que no processo de endocitose ocorre o envolvimento da sinalização K63 (GARCIA-MATA *et al.* 2002).

Para se avaliar se a entrada do Amblyomin-X nas células tumorais é dependente da dineína, o inibidor não exclusivo CA foi utilizado. O CA inibe a atividade ATPásica da dineína (FIRESTONE *et al.* 2012) mas pode também inibir outras estruturas com essa atividade, como por exemplo, o proteassomo (GLICKMAN *et al.* 2002). O CA também inibe a via Hedgehog, frequentemente ativada nas células tumorais (FIRESTONE *et al.* 2012).

O Amblyomin-X marcado (488-Amblyomin-X) foi internalizado por ambas as linhagens tumorais estudadas. Porém, o sinal fluorescente foi drasticamente diminuído quando as células foram previamente tratadas com CA.

Analisando-se a expressão proteica de Rab11A, observamos que o Amblyomin-X induziu um aumento em sua expressão proteica em quase todos os tempos de tratamento nas linhagens tumorais. Além disso, os dados de microscopia confocal revelaram um aumento da co-localização de LIC2 e Rab11A nessas células.

Temos então: (i) a primeira alteração na expressão gênica da cadeia LIC2 de dineína em análise de *microrarray* como a de maior destaque (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010); (ii) a confirmação desta alteração por qPCR; (iii) aumento da expressão proteica de LIC2 e de Rab11A; (iv) aumento da sinalização K63 e; (v) internalização do 488-Amblyomin-X e redução da entrada na célula com tratamento prévio com CA. Estes resultados, indicam que o Amblyomin-X é internalizado por endocitose com o auxílio da dineína e pode ser transportado até o ERC, onde provavelmente é liberado inteiro para atuar na inibição proteassomal.

Esta hipótese é reforçada porque os endossomos, a medida que vão maturando, apresentam pH cada vez mais ácido e conteúdo enzimático cada vez maior (DUNN *et al.* 1989; HUOTARI e HELENIUS 2011; TRAGANOS *et al.* 1994). No entanto, o conteúdo enzimático do endossomo de reciclagem ainda não é maduro suficiente para hidrolisar uma proteína (DUNN *et al.* 1989; HUOTARI e HELENIUS 2011; TRAGANOS *et al.* 1994). Sendo assim, esses dados sugerem que o proteassomo possa ser o responsável pela quebra do Amblyomin-X, uma vez que

peptídeos clivados principalmente por um padrão do tipo tripsina, foram encontrados em lisados celulares (dados não publicados).

Já a liberação da proteína inteira no citoplasma poderia ocorrer no ERC no momento em que o RE fosse destinado à reciclagem para a membrana ou para a degradação através do LE ou ainda para a TGN. No entanto, o Amblyomin-X não co-localiza com lisossomos (MORAIS 2014) e também não foi encontrado um aumento de vesículas ácidas nas células tumorais tratadas com a proteína recombinante. Sendo assim, esses dados reforçam ainda mais a hipótese do transporte do Amblyomin-X até o ERC pela dineína.

O Amblyomin-X induz parada do ciclo celular das células tumorais estudadas na fase G0/G1 (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). Na fase G0 as células se encontram metabolicamente ativas em estado quiescente, ou seja, não se dividem (VERMEULEN *et al.* 2003). Quando a célula sai de G0 e entra na fase G1, ocorre intensa atividade metabólica de síntese de RNA e proteínas, antecedendo a fase S, onde ocorre a duplicação do DNA (VERMEULEN *et al.* 2003). A fase G2 ocorre após a fase S e prepara a célula para a divisão celular com pequena síntese de RNA e proteínas essenciais para o início da mitose (fase M) (VERMEULEN *et al.* 2003). Sendo assim, a fluorescência do 488-Amblyomin-X está aumentada em 24 h (MORAIS 2014) possivelmente porque as células não internalizam a proteína recombinante ao mesmo tempo, por estarem em fases distintas do ciclo celular e, ao internalizar, ela induz a parada do ciclo em G0/G1, onde estão metabolicamente ativas. Assim, mais moléculas podem ser internalizadas, o que aumentaria o sinal fluorescente. Por isso, a avaliação da endocitose com 488-Amblyomin-X ou CA/488-Amblyomin-X ou ainda a análise da co-localização LIC2/Rab11A por um período de tratamento de 24 h, indicam o transporte do Amblyomin-X até o ERC, mesmo sabendo-se que a endocitose do Amblyomin-X ocorre já a partir de 2 h (MORAIS 2014).

O próximo passo foi avaliar a necessidade do transporte do Amblyomin-X pela dineína para que ela iniba o proteassomo. Como esperado, o Amblyomin-X induziu uma inibição somente da atividade T-L nas linhagens tumorais, visto que ele inibe preferencialmente essa atividade (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010), ao contrário dos inibidores do proteassomo conhecidos que atuam na atividade ChT-L, preferencialmente (ALMOND e COHEN 2002; CRAWFORD *et al.* 2011; DORSEY *et*

al. 2008; JAIN *et al.* 2011; RUSCHAK *et al.* 2011; SHEN *et al.* 2011). O Amblyomin-X perdeu a capacidade de inibição desta atividade quando as células tumorais foram tratadas previamente com CA. O CA também inibiu a atividade ChT-L nas duas linhagens celulares; no entanto, quando o tratamento com CA/Ambly foi comparado ao tratamento com CA sozinho, o resultado foi um aumento da atividade ChT-L induzido por CA/Ambly.

Estes resultados mostraram que para atingir o proteassomo, o Amblyomin-X necessita ser transportado pela dineína. O CA inibiu a atividade ChT-L por inibir atividade ATPásica. O proteassomo cliva seus substratos de uma maneira dependente de ATP (GLICKMAN *et al.* 2002) e a atividade ChT-L é a primeira a ser ativada (GLICKMAN *et al.* 2002). O Amblyomin-X também pode inibir a atividade ChT-L em doses e tempo de tratamento maiores (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). Ainda assim, o tratamento posterior com Amblyomin-X aumentou a atividade ChT-L que havia sido inibida pelo CA sozinho, indicando que a inibição da dineína afetou a inibição proteassomal.

No entanto, a viabilidade celular das células tumorais tratadas com CA/Ambly quando comparadas ao tratamento com CA não foi alterada apesar de apresentar uma tendência de aumento. Este resultado poderia ser explicado devido ao fato do agente CA não apresentar seletividade de inibição da dineína. Caso ela fosse inibida completamente, possivelmente a viabilidade celular poderia aumentar com o tratamento posterior com Amblyomin-X na comparação entre CA e CA/Ambly, pois a inibição proteassomal seria prejudicada ainda mais e os efeitos citotóxicos do Amblyomin-X poderiam ser menos intensos ainda.

5.7 Os ligantes da dineína induzidos pelo tratamento com Amblyomin-X confirmaram hipóteses e revelaram possíveis vias intracelulares envolvidas no seu mecanismo de ação

Os resultados obtidos demonstraram papéis importantes e distintos entre as células tumorais e fibroblastos. A investigação dos ligantes da dineína induzidos pelo Amblyomin-X nas células tumorais poderia confirmar hipóteses levantadas e sugerir vias de sinalização intracelular desencadeadas pelo estímulo com a proteína recombinante. Sabe-se que a dineína transporta diversas organelas como

endossomos (TAN *et al.* 2010; VARMA *et al.* 2009), autofagossomos (GARCIA-MATA *et al.* 2002; VARMA *et al.* 2009), lisossomos (PFISTER *et al.* 2006; VARMA *et al.* 2009), Golgi (VARMA *et al.* 2009; YADAV *et al.* 2012), RE (ALLAN 1995; VARMA *et al.* 2009) e agregossomos (GARCIA-MATA *et al.* 2002; VARMA *et al.* 2009); além de transportar proteínas e complexos como NF- κ B (SHRUM *et al.* 2008), mTOR (CLIPPINGER e ALWINE 2012), Bim (DAY *et al.* 2004), AMBRA1 (DI BARTOLOMEO *et al.* 2010) e Rab11 (HORGAN *et al.* 2010).

Primeiro, os resultados obtidos demonstraram que a dineína auxiliou na endocitose do Amblyomin-X, que provavelmente ocorreu pela região de LR (MORAIS 2014). Os LRs são centros organizadores de moléculas envolvidas na sinalização intracelular e influenciam a fluidez da membrana e o tráfego de proteínas de membrana (PIKE 2008; SIMONS e TOOMRE 2000). Estas estruturas são mais ordenadas e coesas do que a bicamada lipídica da membrana celular, porém flutuam livremente pela bicamada (PIKE 2008; SIMONS e TOOMRE 2000). É proposto ainda, dois tipos diferentes de LRs, um tipo planar e o tipo cavéola (PIKE 2008; SIMONS e TOOMRE 2000). O tipo planar não se apresenta no formato de invaginação da membrana e o tipo cavéola se apresenta no formato de invaginação e contém uma proteína chamada caveolina (PIKE 2008; SIMONS e TOOMRE 2000).

Os LRs são regiões ricas em colesterol, receptores proteicos, lipídeos e glicoesfingolipídeos (PIKE 2008; SIMONS e TOOMRE 2000). No entanto, os níveis de *phosphatidylcoline* (PC) estão diminuídos nesta região para compensar os altos níveis de esfingolipídeos (PIKE 2008; SIMONS e TOOMRE 2000). Além disso, estudos demonstram que a externalização de PS pode se localizar na região de LR (ISHII *et al.* 2005; SEGAWA *et al.* 2011). Sabe-se ainda que as células tumorais apresentam maior exposição de PS (CONNOR *et al.* 1989; RAN *et al.* 2002; WOEHLCKE *et al.* 2003) e que os LRs apresentam um importante papel na adesão e migração celular de células cancerígenas (MURAI 2012).

A endocitose de macromoléculas pode desencadear uma sinalização celular a partir de receptores de membrana contidos na região de entrada do agente, mesmo após os receptores terem sido internalizados (MAXFIELD e MCGRAW 2004; MURPHY *et al.* 2009). Neste sentido, alguns receptores foram encontrados ligados à dineína em ambas as células tumorais tratadas com Amblyomin-X, por exemplo, sIL-6R e TNFR. O sIL-6R é a forma solúvel da associação dos receptores de

interleucina-6 (IL-6), IL-6R e gp130 (HEINRICH *et al.* 2003; JONES *et al.* 2001). Estes receptores podem ser encontrados em LRs e dependem de sua integridade (BUK *et al.* 2004; KIM *et al.* 2004). Receptores TNFR é uma referência aos tipos de receptores para TNF- α que podem encontrados, como por exemplo, *tumor necrosis factor receptor-1* (TNFR-1) codificado pelo gene TNFRSF1A e *tumor necrosis factor receptor-2* (TNFR-2) codificado pelo gene TNFRSF1B (HUEBER 2003). O envolvimento de receptores TNFR com LRs também foi descrito como importante na transdução de sinal (HUEBER 2003). Além disso, uma proteína adaptadora e transdutora do sinal de TNFR, o TRAF4 (FENGFENG *et al.* 2013), que foi encontrada ligada à dineína, também é constitutivamente associada à LR (WU *et al.* 2005).

Os LRs são endocitados quando estimulados, no caso, pelo Amblyomin-X, visto que a endocitose da proteína recombinante foi sugerida por ocorrer pela região LR (MORAIS 2014). Sendo assim, os receptores sIL-6R e TNFR encontrados ligados à dineína nas células tumorais estimuladas pelo Amblyomin-X, poderiam ter sido internalizados juntamente com a molécula recombinante pela região LR.

Outras proteínas ligadas à dineína após estimulação das células tumorais com Amblyomin-X, e que se relacionam com os LRs, foram encontradas. A proteína de membrana BACE2 é responsável pelo processamento de APP que ocorre predominantemente no LR (CORDY *et al.* 2003; FARZAN *et al.* 2000). A proteína do citoesqueleto vimentina também é encontrada localizada em LR (MECKES *et al.* 2012). Proteínas da família Src fazem a mediação da sinalização do *epidermal growth factor receptor* (EGFR) de dentro de LRs (IRWIN *et al.* 2011) e o inibidor de Src, SNIP (DI STEFANO *et al.* 2007), foi encontrado ligado à dineína. A proteína Dsel é um proteoglicano de membrana (SARRAZIN *et al.* 2011) que também são encontrados em LR (MULLER, T. *et al.* 2003). A proteína NDUFV1 componente da cadeia respiratória envolvida na síntese de ATP também é encontrada em LRs (BAE, T-J *et al.* 2004).

Em continuação, a proteína LysRS que é um tRNA também foi encontrada em LR em situação de *stress* celular (KEPP *et al.* 2010). A quinase cGK2, encontrada ligada à dineína, fica ancorada em lipídeo e também já foi encontrada em LR (LUO *et al.* 2014; VAANDRAGER *et al.* 1996). As integrinas são proteínas de membrana receptoras de componentes da MEC que podem ser encontradas em

LRs (DEL POZO 2004; LEITINGER e HOGG 2002); e a integrina $\beta 8$ que associa com $\alpha 5$, sendo receptora para fibronectina (Cell Invasion), também foi encontrada ligada à dineína. A quinase PKC- α que é ativada por Ca^{2+} e DAG na presença de PS (SUMANDEA *et al.* 2003; RUVOLO *et al.* 1998), quando ativada, também pode inibir a sinalização relacionada ao EGFR, ligando à proteína caveolina de LR do tipo cavéola (WANG *et al.* 2007), e foi encontrada ligada à dineína. A laminina-1 α , componente da MEC, também pode ser encontrada em LR (ICHIKAWA *et al.* 2009). Todas essas observações reforçam a hipótese de internalização do Amblyomin-X por endocitose na região de LR.

Sendo assim, um ligante de dineína encontrado relacionado com LR também sugere que o tipo de LR ao qual o Amblyomin-X possivelmente foi internalizado, auxiliado pela dineína, nas células SK-MEL-28 e MIA PaCa-2; poderia ser o tipo cavéola. Essa hipótese é reforçada observando-se a proteína PKC- α , uma vez que poderia ser ativada em uma sinalização envolvendo EGFR no LR (WANG, X-Q *et al.* 2007). O EGFR é um receptor do tipo RTK (HERBST 2004) e apesar do EGFR não ter sido encontrado ligado à dineína, este receptor também poderia estar presente no endossomo formado uma vez que somente as bandas com maior intensidade do gel SDS-PAGE foram digeridas e analisadas por espectrometria de massa. Além disso proteínas da família Src atuam na sinalização EGFR (IRWIN *et al.* 2011) e a proteína inibidora de Src, SNIP (DI STEFANO *et al.* 2007) foi encontrada ligada à dineína, reforçando a hipótese do envolvimento deste receptor.

A proteína PKC- α é ativada na presença de PS (SUMANDEA *et al.* 2003; RUVOLO *et al.* 1998). Recentemente, Amblyomin-X revelou uma interação com PS mas não com PC, através de análises utilizando a técnica *differential scanning calorimetry* (DSC) com vesículas contendo PS ou PC (dados não publicados). As células tumorais possuem naturalmente maior quantidade de PS exposta no folheto externo da membrana celular (CONNOR *et al.* 1989; RAN *et al.* 2002; WOEHLCKE *et al.* 2003). O PS também pode ser externalizado na região LR (ISHII *et al.* 2005; SEGAWA *et al.* 2011). Sendo assim, o Amblyomin-X poderia interagir com o PS exposto nas células tumorais, servindo como uma âncora para a região de LR do tipo cavéola e assim ser endocitado, com o auxílio da dineína, com o conteúdo de receptores e moléculas dessa região.

No processo de endocitose, as proteínas G monoméricas conhecidas por *Ras*

superfamily of monomeric G proteins (Rab) são essenciais (DOHERTY e MCMAHON 2009; MAXFIELD e MCGRAW 2004; STENMARK 2009; Structure and function in cell signaling 2008). A Rab20 por exemplo, é um marcador de EE, assim como a Rab11, embora a Rab11 esteja presente em menor quantidade (DOHERTY e MCMAHON 2009; MAXFIELD e MCGRAW 2004; STENMARK 2009; Structure and function in cell signaling 2008). A Rab11 é um marcador de RE (DOHERTY e MCMAHON 2009; MAXFIELD e MCGRAW 2004; STENMARK 2009; Structure and function in cell signaling 2008). Quando o endossomo não matura em LE para seguir para a via de degradação lisossomal, ele pode seguir para as rotas de reciclagem (DOHERTY e MCMAHON 2009; MAXFIELD e MCGRAW 2004). Este fato pode ocorrer por uma via rápida de reciclagem direta para a membrana celular ou por uma via lenta de reciclagem sendo transportado até o ERC (DOHERTY e MCMAHON 2009; MAXFIELD e MCGRAW 2004).

O ERC é uma coleção de organelas associadas aos microtúbulos e condensadas em torno do MTOC (MAXFIELD e MCGRAW 2004). Do ERC, o endossomo pode ainda ser direcionado para a membrana plasmática (via lenta de reciclagem), para a TGN e de lá, para maturação em *late endosomes* (MAXFIELD e MCGRAW 2004).

Ambas as proteína Rab11A e Rab20 foram encontradas ligadas à dineína. As células tumorais tratadas com Amblyomin-X apresentaram um aumento na expressão proteica de Rab11A e LIC2 além de um aumento na co-localização de LIC2/Rab11. Esses dados somados com as proteínas encontradas ligadas à dineína reforçam a hipótese de que a dineína transportou as vesículas endocitadas contendo Amblyomin-X e receptores até a região ERC através da interação LIC2/Rab11A. No ERC, o Amblyomin-X poderia ser liberado para atuar no proteassomo e o endossomo seguiria para a rota de reciclagem lenta de volta à membrana plasmática. Essa hipótese é reforçada porque o Amblyomin-X não co-localiza com lisossomos (MORAIS 2014), não aumentou a quantidade de vesículas ácidas e não foram encontrados marcadores Rab de LE, ligados à dineína. Além disso, o Amblyomin-X inibe preferencialmente a atividade T-L do proteassomo e peptídeos derivados da proteína recombinante foram encontrados em padrão de clivagem predominantemente T-L (dados não publicados). A hipótese é a de que o Amblyomin-X seja clivado no proteassomo.

Em adição à esses dados, temos que uma vez identificada a via de reciclagem lenta até o ERC, os endossomos, após liberação de parte do seu conteúdo, retornariam à membrana plasmática para reciclagem de receptores e proteínas de membrana (DOHERTY e MCMAHON 2009; MAXFIELD e MCGRAW 2004). No entanto, a dineína não transporta cargas no sentido mais dos microtúbulos (PFISTER *et al.* 2006; VARMA *et al.* 2009). Esse transporte seria então realizado pela cinesina (HIROKAWA *et al.* 2009; SCHLIWA e WOEHLKE, 2003; VARMA *et al.* 2009). Porém, após 24 h de tratamento com Amblyomin-X, as células tumorais apresentavam aumento na co-localização de LIC2/Rab11A e através das análises de Co-IP/massa, foram encontrados os marcadores de *early endosomes*, Rab20 e Rab11 (DOHERTY e MCMAHON 2009; MAXFIELD e MCGRAW 2004; STENMARK 2009) e de *recycling endosomes*, Rab11 (DOHERTY e MCMAHON 2009; MAXFIELD e MCGRAW 2004; STENMARK 2009). Além disso, foram encontrados e também sugeridos, diversos receptores e proteínas de sinalização. Após o período de 24 h, o Amblyomin-X também já induz apoptose (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010) provavelmente decorrente dos agregossomos não depurados. Sendo assim, os dados sugerem que os endossomos não foram reciclados de volta à membrana plasmática tumoral após liberação do conteúdo no ERC.

A superexpressão gênica de maior destaque da cadeia LIC2 observada em estudos de *microarray* (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010) e a confirmação desses dados pelo aumento da expressão gênica por qPCR e da expressão proteica por *western blotting*, nas células tumorais estimuladas pelo Amblyomin-X, poderiam ser explicadas pelo fato do Amblyomin-X requerer a endocitose com o auxílio da dineína pela interação LIC2/Rab11, para o transporte até o ERC. No entanto, outro ligante de LIC2 foi identificado nos ensaios de Co-IP seguido de massa, o PARD3 (SCHMORANZER *et al.* 2009).

O PARD3 é uma molécula relacionada com à polarização celular e pode ser encontrada nas junções *tight* e associar-se com complexos contendo PKCs ou PARD6 (KHAZAEI e PUSCHEL 2009). Interessantemente, a PKC- α foi encontrada ligada à dineína. Além disso, duas vias de sugestão da ferramenta String se referem à junções *tight*. Uma delas foi a do complexo da junção *tight* (TGF- β 1/TGFBR2/TGFBR1/PARD6/RhoA) envolvendo as proteínas PARD3 e RhoGEF18. A outra foi uma via envolvendo PKC- α e PARD3. Observando-se as proteínas

envolvidas, pode-se concluir que elas estão interconectadas por PARD3.

As junções *tight* são junções intercelulares que regulam o fluxo de água e solutos entre as camadas epiteliais (SHIN *et al.* 2006). Sendo assim, a superexpressão gênica e proteica de LIC2 com maior destaque, poderia estar também relacionada com as junções *tight* com possível envolvimento de PKC- α e receptores de TGF- β , TGFBR1 e TGFBR2. Os receptores de TGF- β são receptores serina/treonina quinase (DORÉ JR *et al.* 1998) e essa hipótese do se envolvimento se torna possivelmente viável porque receptores de TGF- β também podem ser encontrados em LR tanto do tipo planar ou quanto do tipo cavéola (CHEN 2009; CHEN *et al.* 2008). Outra proteína encontrada ligada à dineína atuante nas junções *tight* foi a sinaptopodina (PATRIE *et al.* 2002), reforçando a hipótese do envolvimento dessa via no mecanismo de ação antitumoral do Amblyomin-X.

A proteína RhoGEF18, encontrada ligada à dineína nas células tumorais induzidas pelo Amblyomin-X, é uma GEF para RhoA e Rac1 e é ativada por G $\beta\gamma$ (BLOMQUIST *et al.* 2000; NIU *et al.* 2003). Caso ela tenha sido ativada no processo de endocitose auxiliado pela dineína, seria necessário que a proteína G heterotrimérica (G $\alpha\beta\gamma$) associada a um receptor GPCR fosse ativada, gerando G α e G $\beta\gamma$ (Structure and function in cell signaling 2008), que recrutaria e ativaria RhoGEF18 para o GPCR (BLOMQUIST *et al.* 2000; NIU *et al.* 2003). Assim, seria possível que receptores GPCR estejam envolvidos, apesar de não terem sido encontrados na análise. Esses receptores podem não ter sido encontrados porque as bandas mais evidentes do gel foram selecionadas para digestão. Essa hipótese é reforçada porque receptores GPCR podem ser regulados e localizados em LR, do tipo cavéola ou não (FALLAHI-SICHANI e LINDERMAN 2009; OSTROM e INSEL 2004). Tendo em vista a ação do Amblyomin-X na coagulação (BATISTA *et al.* 2010; VENTURA *et al.* 2013) e a relação entre câncer e coagulação (KASTHURI *et al.* 2009); sugere-se que caso exista um receptor GPCR envolvido, este receptor poderia ser, por exemplo, o receptor GPCR, PAR2 (COTTRELL *et al.* 2003; KASTHURI *et al.* 2009).

Outra via de sinalização sugerida pelo String foi a via de junções *gap*. As junções *gap* são junções intercelulares com a função de estabelecer uma comunicação entre as células (EVANS e MARTIN 2002). As proteínas ligadas à dineína, envolvidas nessa via, foram a cGK2 e a PKC- α , ambas encontradas em LRs

(LUO *et al.* 2014; VAANDRAGER *et al.* 1996; WANG, X-Q *et al.* 2007).

Com relação às junções celulares, mais uma via foi sugerida pelo String, a adesão focal. A junção de adesão focal é uma junção célula-matriz, proporcionando a adesão entre a célula e a ECM (BURRIDGE *et al.* 1988). As integrinas são glicoproteínas integrais aderentes entre a célula e a ECM agindo como receptores de proteínas da ECM (DEL POZO 2004; LEITINGER e HOGG 2002). Por sua vez, a ECM se interage por meio de integrinas e são importantes para o crescimento celular e apoptose (DEL POZO 2004; LEITINGER e HOGG 2002).

Uma integrina foi encontrada ligada à dineína nas células tumorais tratadas com Amblyomin-X, a integrina $\beta 8$. A integrina $\beta 8$ se associa à integrina $\alpha 5$ e é receptor de fibronectina, componente da ECM (Cell Invasion). A ferramenta String sugeriu o envolvimento das proteínas integrina $\beta 8$, PKC- α , a proteína anti-apoptótica Bcl-2 e a laminina-1 α nessa via. Além disso, o String sugeriu que a integrina $\beta 8$ e a laminina-1 α estivessem envolvidas na via interação ECM -receptor. A laminina-1 α é componente da ECM, envolvida na adesão e migração celular e se liga a glicosfingolipídeos da membrana celular (ICHIKAWA *et al.* 2009). As integrinas, por sua vez, tem a sua função regulada e se localizam em LRs (DEL POZO 2004; LEITINGER e HOGG 2002). Os LRs, por sua vez, também são extremamente ricos em glicosfingolipídeos (PIKE 2008; SIMONS e TOOMRE 2000).

Assim, a hipótese de endocitose do Amblyomin-X, auxiliado pela dineína pela região LR é reforçada. Os dados apresentados das junções *tight*, *gap* e adesão focal, sugerem que o Amblyomin-X possa atuar nas vias de adesão e migração celular, visto que a proteína recombinante reduziu o número de metástases em um modelo de melanoma com metástase no pulmão, *in vivo* (AKAGI *et al.* 2012; CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). Esse dado é também complementado devido à presença da proteína EGFL6 encontrada ligada à dineína após tratamento com Amblyomin-X nas células tumorais. O EGFL6 apresenta uma estrutura que hipotetiza uma ligação, por similaridade, com as integrinas, como por exemplo, com a integrina $\alpha 8/\beta 1$ e sabe-se que ela pode promover migração celular (OBERAUER *et al.* 2010).

Além disso, outra proteína relacionada com a ECM foi encontrada ligada á dineína, a ADAMTS3. As proteínas *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs* (ADAMTS), são proteases da ECM envolvidas em

coagulação, angiogênese e migração celular, por exemplo (PORTER *et al.* 2005). A ADAMTS3 realiza a clivagem de pró-peptídeos de colágeno tipo II (FERNANDES *et al.* 2001). Esses dados reforçam a hipótese da participação do Amblyomin-X em vias de adesão e migração celular que podem culminar na redução do processo metastático observado *in vivo* (AKAGI *et al.* 2012; CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010).

Outro resultado interessante foi a presença de duas subunidades do proteassomo ligadas à dineína nas células tumorais estimuladas pelo Amblyomin-X. As duas proteínas encontradas, Rpn10 e Rpn13, estão presentes na fração regulatória 19S do proteassomo 26S e são receptoras de ubiquitina (GLICKMAN *et al.* 2002; RUSCHAK *et al.* 2011). Além disso, a proteína Rpn10 possui funções independentes fora da estrutura do proteassomo, como por exemplo, a regulação da ativação de Akt induzida por EGF através da inibição da via *RhoA/Rho-associated coiled coil-containing protein kinase (ROCK)/phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN)*; via ROCK/PTEN (MAN *et al.* 2010). Esses dados contribuem para a hipótese da presença de EGFR no endossomo transportado pela dineína a partir da região de LR.

Além disso a ferramenta String sugeriu a via de sinalização do proteassomo envolvendo as proteínas Rpn10 e Rpn13 mas também sugeriu a via de degradação de β -catenina pelo proteassomo. A β -catenina é um fator de transcrição mas também é uma proteína que coordena a adesão celular e contribui na transdução de sinal da via Wnt, envolvida em transcrição gênica e regulação do citoesqueleto (VALENTA *et al.* 2012). No entanto, como o proteassomo está inibido nas células tumorais tratadas com Amblyomin-X (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010), essa hipótese não é viável.

As subunidades Rpn10 e Rpn13 encontradas ligadas à dineína, provavelmente estariam presentes nos agregossomos e não nos endossomos porque sabe-se que proteassomos são constituintes de agregossomos (GARCIA-MATA *et al.* 2002). Ainda assim, como a proteína Rpn10 possui funções independentes do proteassomo (MAN *et al.* 2010), ela poderia estar ligada à dineína através tanto das estruturas dos agregossomos quanto de endossomos, visto sua participação em vias de sinalização envolvendo EGF (MAN *et al.* 2010), caso seja uma via relacionada com a ação do Amblyomin-X.

Analisando-se as proteínas ligadas à dineína nas células tumorais tratadas com Amblyomin-X, foi possível confirmar outras hipóteses levantadas anteriormente. A primeira está relacionada com a formação de agregossomos. Essas estruturas, quando formadas nas células requerem uma sustentação por serem estruturas de alto peso molecular (GARCIA-MATA *et al.* 2002). Sendo assim, a vimentina, componente do citoesqueleto como IF, se acomoda ao redor dos agregossomos formando uma espécie de gaiola para realizar a sustentação dos agregossomos (GARCIA-MATA *et al.* 2002). Além disso, foi sugerido através de ensaios de ELISA, que os agregossomos formados nas duas células tumorais estudadas, ocorreriam pela via não exclusiva de ubiquitina, mediado pela molécula Bag3. Os resultados de Co-IP seguido de espectrometria de massa, revelaram que tanto a vimentina quanto o Bag3, estão ligadas à dineína após tratamento com Amblyomin-X; reforçando a formação de agregossomos e confirmando a via de formação auxiliado pela dineína.

A segunda hipótese está relacionada ao bloqueio da ativação da autofagia. O bloqueio foi verificado pela não conversão de LC3-I em LC3-II, não difusão da fluorescência do LC3 marcado e a não alteração na quantidade visual de vesículas ácidas, nas células tumorais. O auxílio da dineína nessa via foi sugerido pelo aumento da co-localização dela com as moléculas mTOR e AMBRA1 (em MIA PaCa-2), além do aumento da expressão proteica de mTOR e redução de AMBRA1 nas duas linhagens. A proteína Raptor é um componente exclusivo do complexo mTORC1 envolvido na inibição autofágica e necessário para esse evento celular (PARKHITKO *et al.* 2014; THOREEN *et al.* 2009). Esta proteína foi encontrada ligada à dineína, confirmando a ativação de mTOR e o papel da dineína na inibição autofágica induzida pelo Amblyomin-X.

Proteínas envolvidas no metabolismo celular foram encontradas ligadas à dineína: Dsel, SHMT1, NDUFV1, ME2GLYDH, ZDHHC14 e PCCase- β . Estas proteínas talvez estejam presentes nas estruturas de agregossomos transportados pela dineína, com exceção de Dsel e NDUFV1 que poderiam também se encontrar nos endossomos visto a possível localização delas no LR (BAE, T-J *et al.* 2004; MULLER, T. *et al.* 2003). O String sugeriu que as vias envolvidas nesse caso, seriam as de metabolismo de glicina, treonina e betaína. Além disso, estas proteínas poderiam ter sido agregadas em resposta à disfunção mitocondrial induzida pelo Amblyomin-X (MARIA *et al.* 2013).

Outras vias foram sugeridas pelo String, como a do câncer, endocitose e apoptose, que condizem com os dados apresentados. Além disso a via de sinalização MAPK foi sugerida mas os dados apresentados não são suficientes para hipotetizar o seu envolvimento no mecanismo de ação do Amblyomin-X.

Além disso, uma proteína transmembrana com funções ainda desconhecidas, a TMEM26 (TOWN *et al.* 2011), foi encontrada ligada à dineína e possivelmente se localizou nos endossomos, por estar presente na membrana celular, apesar de não haver relatos na literatura de sua localização em LRs. As proteínas relacionadas ao tRNA, Misu e LysRS, também foram encontradas ligadas à dineína e, enquanto Misu possivelmente estaria presente na estrutura do agregossomos; LysRS poderia também estar presente na estrutura dos endossomos, visto que ela pode se localizar nos LRs (KEPP *et al.* 2010).

O Amblyomin-X induz parada do ciclo celular na fase G0/G1 e dano ao DNA nas células tumorais estudadas (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). A proteína nibrina, encontrada ligada à dineína, está relacionada em resposta ao dano ao DNA e ciclo celular (MARCELEIN *et al.* 2005). Sendo assim, a hipótese de que a nibrina poderia ter sido induzida pelas células tumorais como um mecanismo de resposta ao Amblyomin-X é viável. Se caso essa resposta celular ocorresse, a célula, que já teria apresentado um dano ao DNA, estaria com o proteassomo inibido e os agregossomos formados e não depurados pela autofagia, através da indução com o Amblyomin-X. Assim, provavelmente a proteína encontrada ligada à dineína se encontrava na estrutura dos agregossomos.

Outra proteína encontrada ligada à dineína é a proteína anti-apoptótica, Bcl-2 (BURLACU 2003). É uma proteína de membrana mitocondrial, do ER ou do envelope nuclear (BURLACU 2003). Sabe-se também que Bcl-2 pode ser degradada pelo proteassomo 26S após modificação traducional (BREITSCHOPF *et al.* 2000) e que quando complexada com Beclin-1, componente do *core* autofágico, pode inibir a autofagia (MARQUEZ e CHU 2012). Como ela foi encontrada ligada à dineína e considerando-se a inibição proteassomal induzida pelo Amblyomin-X; Bcl-2 poderia estar contida nos agregossomos formados e assim, não estar livre para exercer um efeito anti-apoptótico ou de inibição da autofagia, o que reforça o envolvimento de mTOR na inibição autofágica induzida pelo Amblyomin-X nas células tumorais.

Os dados de superexpressão gênica de Ubc13 em conjunto com o dados de

aumento de K63, formação agregossomos, inibição da autofagia e inibição da via NF- κ B, sugeriram que esta enzima poderia ser a enzima E2 conjugadora de ubiquitina atuante nas células tumorais tratadas com Amblyomin-X. Um dado interessante foi ligação da proteína FBXL13 à dineína. Esta proteína é um substrato do complexo SCF que é uma E3 ligase, sendo assim, FBXL13 atua na conjugação de ubiquitina e, portanto, é uma E2 (WANG *et al.* 2014). Então, no processo de formação de agregossomos sinalizados pela via K63 e transportados pela dineína pela via não exclusiva de ubiquitina (Bag3) e induzidos pelo Amblyomin-X nas células tumorais; além da provável atuação da enzima Ubc13, a enzima FBXL13 também poderia estar atuando nesse processo. Além disso, ela provavelmente foi encontrada ligada à dineína, pela estrutura dos agregossomos.

Finalmente, fatores de transcrição foram encontrados ligados à dineína. CasZ1 está relacionado à transcrição de genes envolvidos na adesão celular, montagem vascular e morfogênese (LIU *et al.* 2011). CaRF é um fator de transcrição responsivo ao Ca²⁺ (TAO *et al.* 2002). N-CoR2 é um co-repressor da transcrição de alguns receptores nucleares (MENDEZ *et al.* 2008). O Amblyomin-X promove dano ao DNA de células tumorais (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.* 2010). O N-CoR2, por ser um co-repressor da transcrição de receptores nucleares (MENDEZ *et al.* 2008), poderia, hipoteticamente, ter sido induzido por alguma via após o dano ao DNA induzido pelo Amblyomin-X. Esse fator possivelmente estaria ligado à estrutura de agregossomos ligados à dineína. Outra proteína encontrada ligada à dineína relacionada ao dano ao DNA induzido pelo Amblyomin-X foi a histona H1e, envolvida na montagem do nucleossomo através da ligação dos nucleossomos adjacentes (GERHARD *et al.* 2004).

Visto os dados anteriores que sugerem a atuação do Amblyomin-X em vias de migração e adesão celular que justificaria a redução da metástase observada *in vivo*, o CasZ1 poderia estar atuando desde o início do estímulo do Amblyomin-X no microambiente tumoral a fim de favorecer a transcrição de genes que, se codificados em proteínas, atuariam na sinalização da adesão celular promovendo a via endocítica de reciclagem lenta através da região de LRs. Sabe-se que muitas vias de sinalização são ativadas por endocitose (MAXFIELD e MCGRAW 2004; MURPHY *et al.* 2009) e o CasZ1 poderia explicar em parte os resultados de qPCR nas células tumorais. Além disso, uma vez ligado à dineína ele poderia ter sido translocado para

o núcleo.

Visto que o Amblyomin-X induz um aumento no Ca^{2+} intracelular das células tumorais estudadas (MORAIS 2014), o CaRF é um fator de transcrição viável para a transcrição de um ou mais genes que envolvem as cadeias de dineína, alvos do controle proteico e NFKB1. No entanto, caso ele atue, essa atuação deve ter sido tardia porque para que o aumento do Ca^{2+} intracelular ocorra, a célula necessitaria ter sofrido um *stress*. Após 24 h de tratamento com Amblyomin-X, temos inibição do proteassomo (CHUDZINSKI-TAVASSI et al. 2010), formação de agregossomos, *stress* do RE (MORAIS 2014) e apoptose (CHUDZINSKI-TAVASSI et al. 2010) nas células tumorais estudadas, o que justificaria o aumento do Ca^{2+} intracelular e a consequente atuação de CaRF. Essa hipótese é viável porque o aumento da expressão gênica de muitos dos alvos estudados é mais intensa após 24 h de tratamento com Amblyomin-X. Mais uma vez, já que foi encontrado ligado à dineína ele poderia ter sido translocado para o núcleo.

Os dados expostos indicam que as vias de adesão e migração celular podem ser importantes no mecanismo de ação do Amblyomin-X. Indicam também a possibilidade de ativação de receptores pela endocitose. Os receptores envolvidos sugeridos foram: os receptores da família TNF, TNFR-1 e TNFR-2; sIL-6R (IL-6R e gp130); a integrina $\alpha 5/\beta 8$; os RTKs, EGFR e IGF-1R; os receptores serina/treonina quinase TGFBR1 e TGFBR2 e; os GPCRs, e.g., PAR2. Sendo assim, alguns deles ou todos, possivelmente, estariam contidos na região de LRs. A ativação desses receptores e vias, além de uma possível ligação do Amblyomin-X à um deles, são hipóteses que necessitam de maior investigação experimental, porém, o sIL-6R encontrado ligado à dineína indica que houve ativação de IL-6R/gp130.

A sinalização JAK/STAT foi sugerida pelo String, envolvendo os receptores de IL-6. A sinalização JAK/STAT ocorre em resposta à citocinas e fatores de crescimento e regulam proliferação, diferenciação e migração celular e apoptose (HEINRICH et al. 2003; RAWLINGS et al. 2004). Sabe-se que a geração de sIL-6R ocorre por uma trans-sinalização de IL-6 que provoca a formação do complexo dos receptores IL-6R e gp130 e consequente formação de sIL-6R e ativação da via JAK/STAT (HEINRICH et al. 2003; RAWLINGS et al. 2004). Evidências mostram que a proteína mTOR pode ser regulada pela via JAK/STAT (LEIBINGER et al. 2013) e que ainda podem estar interconectadas pela via PI3K/Akt em resposta à EGF ou *insulin-like growth*

factor-1 (IGF-1), por exemplo (BEIER e LOESER 2011; MAN *et al.* 2010).

Outra observação importante é a de que mTOR é um componente chave da via PI3K/Akt, onde o mTOR é positivamente regulado pela fosforilação por Akt (BEIER e LOESER 2011; PARKHITKO *et al.* 2014; THOREEN *et al.* 2009). A via PI3K/Akt pode ser ativada por muitos receptores como os receptores de TGF- β , sendo os mais notáveis os receptores RTKs como o EGFR, mas principalmente o *insulin-like growth factor receptor-1* (IGF-1R) (BEIER e LOESER 2011; MAN *et al.* 2010). Além disso, a via PI3K/Akt é regulada negativamente, principalmente por PTEN (BEIER e LOESER 2011). Sabe-se também que o IGF-1R pode ser encontrado em LR (XU *et al.* 2013) e que vias intracelulares ativadas por receptores de TGF- β , realizadas pela família de proteínas *Sma and Mad related proteins* (Smad), também apresentam um *crosstalk* com a via PI3K/Akt (HELDIN *et al.* 1997; JIA e SOUCHELNYTSTKYI 2011). Além disso, é conhecido que moléculas da família dos receptores TNFR podem também ativar a via PI3K/Akt (TAKANORI e MICHAEL 2013).

O efeito inibitório da autofagia exercido por mTOR e auxiliado pela dineína nas células tumorais tratadas com Amblyomin-X, pode ter sido ativado pela via PI3K/Akt em resposta à um ou mais receptores (sIL-6R, EGFR, IGF-1R, TGFBR1, TGFBR2, TNFR) no processo de endocitose da proteína recombinante. Essa hipótese é reforçada pela presença de Rpn10 ligado à dineína nas células tumorais tratadas com Amblyomin-X, uma vez que Rpn10 possui funções independentes do proteassomo 19S, regulando a ativação de Akt (MAN *et al.* 2010). Além disso, caso o Akt esteja ativo e seja o responsável pela ativação de mTOR observada, um possível fator de transcrição envolvido seria o *forkhead box* (Fox) do tipo O, uma vez que é um conhecido substrato da via PI3K/Akt (BEIER e LOESER 2011), mesmo com a observação de que este fator não foi encontrado ligado à dineína a partir das bandas selecionadas do gel obtido por Co-IP.

Outro dado importante que pode reforçar a contribuição de Akt na ativação de mTOR é a de que a quinase PKC- α , encontrada ligada à dineína, é um conhecido ativador de Akt pela fosforilação da Ser473 (PARTOVIAN *et al.* 2004) e sabe-se ainda que os LR estão implicados na ativação de Akt (ELHYANY *et al.* 2004), reforçando a hipótese de que a entrada do Amblyomin-X ocorra por LR. Sabe-se ainda que a PKC- α é ativada por Ca²⁺ e DAG na presença de PS (SUMANDEA *et*

al. 2003; RUVOLO *et al.* 1998). Por sua vez a formação de DAG depende da clivagem de *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate* (PIP₂), presente na membrana celular, formando assim *inositol 1,4,5-trisphosphate* (IP₃) e DAG, pela enzima PLC-β ou *phospholipase C-γ* (PLC-γ) (KADAMUR e ROSS 2013; Structure and function in cell signaling 2008). A PLC-β é regulada por receptores GPCR enquanto que a PLC-γ é regulada por receptores RTK (KADAMUR e ROSS 2013; Structure and function in cell signaling 2008). As proteínas encontradas ligadas à dineína nas células tumorais tratadas com Amblyomin-X, sugeriram que um receptor GPCR, como PAR2, poderia estar envolvido; assim como receptores RTK, como EGFR e IGF-1R.

Ainda com relação aos receptores GPCR, possivelmente envolvidos na internalização de Amblyomin-X auxiliado pela dineína nas células tumorais; a quinase envolvida poderia ser a *protein kinase A* (PKA), uma vez que ela é regulada por GPCRs que ativam AC formando *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) que ativa PKA (PIDOUX e TASKE'N 2010; Structure and function in cell signaling 2008).

Dese modo, se torna possível que a ativação de mTOR e consequente regulação negativa da autofagia observada nas células tumorais tratadas com Amblyomin-X, tenha sido regulada pela via PI3K/Akt, com envolvimento de PKC-α ou PKA e PLC-β ou PLC-γ, interconectadas ou não com as vias JAK/STAT ou Smad pela ativação de um ou mais receptores (sIL-6R, TGFBR1 e 2, GPCR, EGFR, IGF-1R, TNFR1 e 2).

O Amblyomin-X tem como alvo principal o proteassomo. No entanto, inibidores conhecidos do proteassomo passam direto pela membrana plasmática das células (ALMOND e COHEN 2002; CRAWFORD *et al.* 2011). O Amblyomin-X, por ser uma proteína de 13,5 kDa, necessitou de um mecanismo especializado de endocitose para a entrada na célula. A endocitose parece ocorrer preferencialmente pelas células tumorais através de uma possível ancoragem do Amblyomin-X na PS exposta na região de LR das células tumorais estudadas.

A endocitose da proteína recombinante foi auxiliada pela dineína e envolveu uma região contendo muitos receptores e moléculas de sinalização. Além disso, os agregossomos formados e transportados pela dineína, em consequência da inibição proteassomal, não foram depurados e possivelmente desencadearam a apoptose. Durante este processo diversas vias de sinalização foram envolvidas, assim como vias de adesão e migração celular, todas apresentando alguma relação com a

dineína. Todos os resultados mostraram que a dineína desempenhou diversos papéis importantes no mecanismo de ação antitumoral do Amblyomin-X, correlacionando com os resultados de redução da massa tumoral e metástase observados *in vivo* (CHUDZINSKI-TAVASSI et al. 2010). Dados experimentais para comprovar o envolvimento de todas as sinalizações, receptores e fatores de transcrição identificados através dos ligantes de dineína no mecanismo do Amblyomin-X são necessários, no entanto, as hipóteses se mostram consistentes, coerentes e passíveis de investigação.

6. CONCLUSÕES

O Amblyomin-X é uma proteína recombinante obtida a partir da construção de uma biblioteca de cDNA do *Amblyomma cajennense*. Esta molécula é um inibidor de serino protease com um domínio tipo-Kunitz similar ao TFPI endógeno. Possui atividade de inibição do FXa e complexo tenase na presença de fosfolípídeos além de atividade antitumoral *in vitro* e redução da massa tumoral e metástase *in vivo*.

A molécula apresentou nas células tumorais SK-MEL-28 e MIA PaCa-2, resumidamente:

(i) interação preferencial pelas células tumorais estudadas, possivelmente através de LRs tipo planar ou cavéola após possível ancoragem na PS exposta das células tumorais;

(ii) ativação de sIL-6R e possíveis vias intracelulares (JAK/STAT, PI3K/Akt e Smad com envolvimento de PKA, PKC- α , PLC- β ou PLC γ), além de possível ativação ou interação com um ou mais dos receptores TNFR (1 e 2), TGFBR (1 e 2), EGFR, IGF-1R, GPCRs, integrina $\alpha 5/\beta 8$ ou outros;

(iii) possível ativação do fator de transcrição CasZ1 com translocação pela dineína ou ainda ativação e translocação de Fox; e possível ativação de mTOR que poderia ser induzida por um ou mais receptores; sIL-6R, IGF-1R, EGFR, TGFBR (1 ou 2), GPCR ou TNFR;

(iv) aumento da expressão gênica de cadeias de dineína e alvos do controle proteico e NFKB1;

(v) aumento da expressão proteica de cadeias da dineína;

(vi) endocitose e transporte do endossomo contendo o Amblyomin-X, receptores e molécula de sinalização, pela dineína até o ERC;

(vii) regulação de vias de adesão e migração celular;

(viii) liberação do Amblyomin-X, provavelmente inteiro, no ERC e interação com o proteassomo;

(ix) possível clivagem do Amblyomin-X pelo proteassomo e inibição proteassomal preferencialmente T-L;

(x) bloqueio da proteólise de NFKB1 pelo proteassomo;

(xi) aumento de K63 com possível participação de Ubc13 e FBXL13, para a

sinalização de formação de agregossomos;

(xii) formação de agregossomos transportados pela dineína até o MTOC pela via não exclusiva de ubiquitina (Bag3);

(xiii) possível ativação do fator de transcrição CaRF com translocação pela dineína, devido ao aumento de Ca²⁺ intracelular e *stress* do ER já observados;

(xiv) permanência do estímulo de aumento da expressão gênica dos alvos e expressão proteica das cadeias de dineína;

(xv) atuação de mTOR através do complexo mTORC1 com o auxílio da dineína e diminuição da expressão de AMBRA1;

(xvi) regulação negativa da autofagia impedindo a formação de membrana autofágica e;

(xvii) citotoxicidade e apoptose desencadeada pela não depuração de agregossomos.

No caso de MIA PaCa-2 a regulação negativa da autofagia poderia ter ocorrido em conjunto com o sequestro de AMBRA1.

A molécula apresentou em fibroblastos, resumidamente:

(i) perturbação do microambiente celular sem internalização do Amblyomin-X;

(ii) aumento da expressão gênica de cadeias de dineína, Ubc13, Hsp70 e NFKB1;

(iii) aumento de K63 com possível participação de Ubc13, para a sinalização da via NF-kB;

(iv) resposta anti-apoptótica pela via NF-kB ativada proteólise de NFKB1 pelo proteassomo e translocado pela dineína;

(v) resposta anti-apoptótica através do sequestro de Bim pela dineína;

(vi) atenuação do estímulo pela célula com retorno de expressão gênica e proteica das cadeias de dineína, Ubc13, Hsp70 e NFKB1 a níveis basais.

O Amblyomin-X apresenta como alvo primário o proteassomo. Sendo assim, algumas semelhanças com relação aos inibidores de proteassomo conhecidos foram observadas:

(i) formação de agregossomos dependente da síntese de polipeptídeos nascentes dos ribossomos;

(ii) bloqueio da via NF-kB em consequência da inibição proteassomal e;

(iii) indução de dano ao DNA e *stress* do RE.

O Amblyomin-X apresentou algumas diferenças com relação aos inibidores de proteassomo conhecidos:

- (i) é uma proteína e não um peptídeo ou pequena molécula;
- (ii) não é permeável à célula;
- (iii) não apresentou citotoxicidade em fibroblastos;
- (iv) atuou em células de origem em tumores sólidos e não em tumores malignos do sangue;
- (v) mecanismo de entrada por endocitose dependente de dineína;
- (vi) possível ligação ou regulação de receptores de membrana;
- (vii) inibiu preferencialmente a atividade T-L do proteassomo e não a ChT-L;
- (viii) formação de agregossomos transportados pela dineína pela via não exclusiva (Bag3) e não pela via exclusiva (HDAC6) de ubiquitina;
- (ix) regulação negativa da autofagia;
- (x) indução de resposta anti-apoptótica em fibroblastos auxiliada pela dineína.

Os dados expostos indicam que o Amblyomin-X é um candidato promissor como nova droga para o tratamento de tumores sólidos como melanoma e adenocarcinoma de pâncreas, promovendo redução da massa tumoral e de metastases. Além disso, a molécula patenteada se encontra na fase de ensaios não clínicos e até o momento não foram observados efeitos citotóxicos em fibroblastos e outras linhagens não tumorais ou normais, nem efeitos danosos em tecidos normais (evidenciado por testes histopatológicos). Esses dados indicam uma maior afinidade da proteína recombinante por ambientes tumorais.

O mecanismo de ação do Amblyomin-X, em comum, nas linhagens tumorais estudadas, está representado na **Figura 37**.

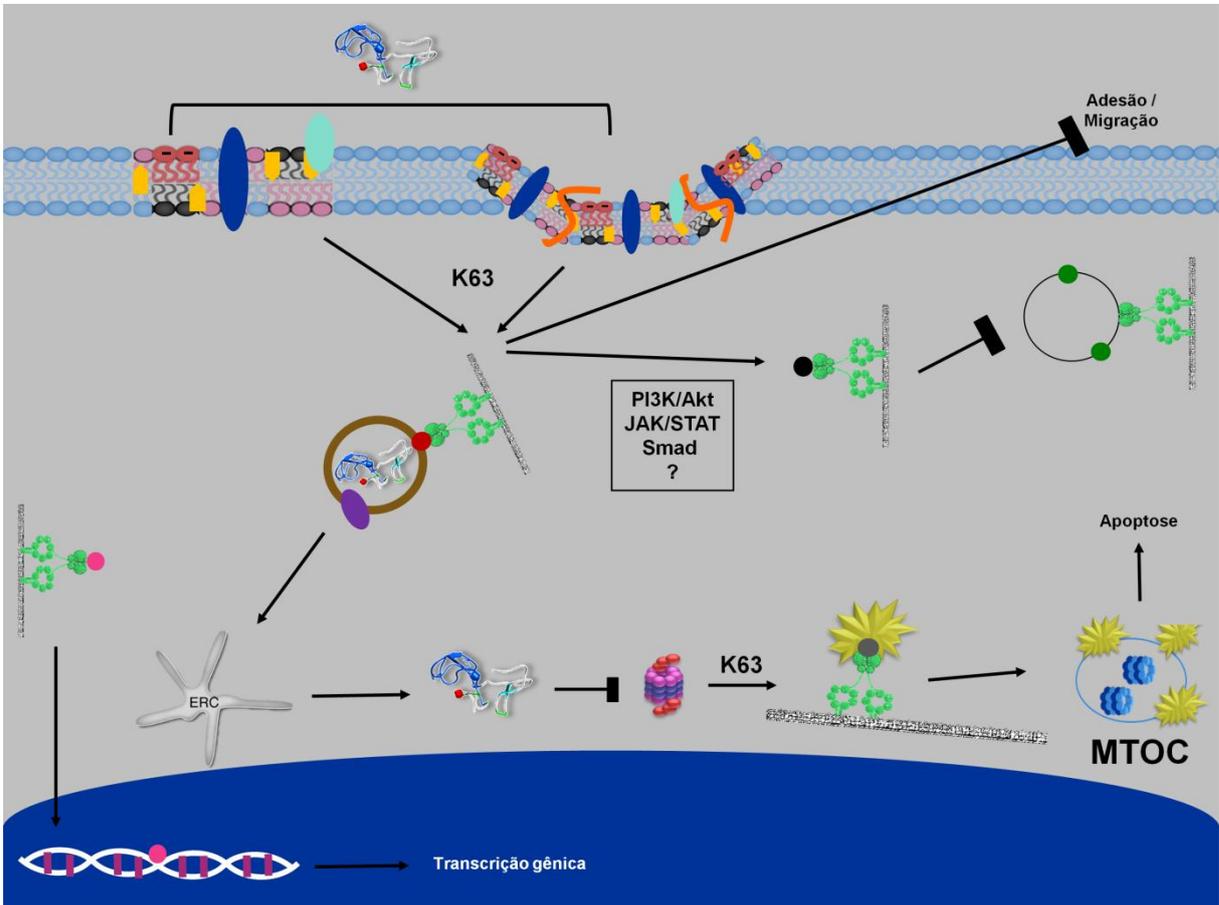
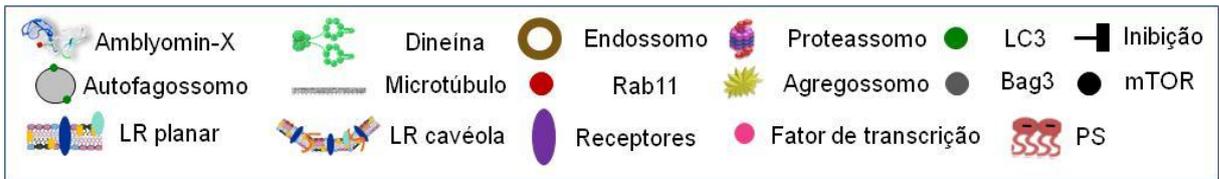


Figura 37 – Mecanismo de ação comum proposto para o Amblyomin-X nas células tumorais SK-MEL-28 e MIA PaCa-2. O Amblyomin-X poderia ancorar na membrana tumoral pela região de LR (planar ou cavéola) através da interação com a PS exposta. O endossomo contendo o Amblyomin-X, receptores e proteínas sinalizadoras seria internalizado com o auxílio da dineína e sinalização K63. Este processo poderia induzir a ativação de vias intracelulares específicas como PI3K/Akt, JAK/STAT e Smad e também induzir a inibição de vias de adesão e migração celular. O endossomo formado seria transportado até o ERC pela dineína, liberando a molécula inteira de Amblyomin-X, no momento da reciclagem pela via lenta, dos receptores e componentes da membrana celular que foram internalizados. O Amblyomin-X exerceria o efeito de inibição proteossomal, induzindo a formação de agregossomos sinalizados por K63, que seriam transportados pela dineína pela via não exclusiva de ubiquitina, mediada por Bag3. Os agregossomos não seriam depurados pela autofagia, uma vez que paralelamente, o mTOR foi ativado possivelmente pela via PI3K/Akt, que poderia estar ou não interconectada com as vias JAK/STAT e Smad. Assim, o mTOR foi posteriormente transportado pela dineína para exercer seu efeito de inibição da membrana autofágica, impedindo a conjugação de LC3-I com PE para formar LC3-II e consequentemente, a membrana autofágica. Os agregossomos não depurados iniciariam então a sinalização para a apoptose celular. Paralelamente, a dineína ainda poderia translocar fatores de transcrição para a transcrição de genes relacionados à dineína e ao controle de qualidade proteico intracelular.

REFERÊNCIAS*

AKAGI, E. M.; JÚNIOR, P. L.; SIMONS, S. M.; BELLINI, M. H.; BARRETO, S. A.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma in “vitro”. **Biomed. Pharmacother.**, v. 66, n. 1, p. 64-9, 2012.

ALKALAY, I.; YARON, A.; HATZUBAI, A.; ORIAN, A.; CIECHANOVER, A.; BEN-NERIAH, Y. Stimulation-dependent I κ B α phosphorylation marks the NF- κ B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. **PNAS**, v. 92, p. 10599–10603, 1995.

ALLAN, V. J. Cytoplasmic dynein. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 39, n. 5, p. 1169-78, 2011.

ALLAN, V. Protein phosphatase 1 regulates the cytoplasmic dynein-driven formation of endoplasmic reticulum networks in vitro. **JCB**, v. 128, n. 5, p. 879-891, 1995.

ALMOND, J. B.; COHEN, G. M. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. **Leukemia**, v. 16, p. 433–443, 2002.

AMAKYE, D.; JAGANI, Z.; DORSCH, M. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. **Nat. Med.**, v. 19, n. 11, p. 1410-22, 2013.

AMOS, L. A.; LOWE, J. How Taxol stabilizes microtubule structure. **Chem. Biol.**, v. 6, p. 65-69, 1999.

ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K. B.; THARAKAN, S. T.; LAI, O. S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharm. Res.**, v. 25, n. 9, p. 2097–2116, 2008.

APPELQVIST, H.; WASTER, P.; KAGEDAL, K.; OLLINGER, K. The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. **JMCB**, v. 5, n. 4, p. 214–226, 2013.

BAE, T-J.; KIM, M-S.; KIM, J-W.; KIM, B-W.; CHOO, H-J.; LEE, J-W.; KIM, K-B.; LEE, S. C.; KIM, J-H.; CHANG, S. Y.; KANG, C-Y.; LEE, S-W.; KO, Y-G. Lipid raft proteome reveals ATP synthase complex in the cell surface. **Proteomics**, v. 4, p. 3536-3548, 2004.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BALDWIN JR, A. S. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 14, p. 649–683, 1996.

BASSERMANN, F.; EICHNER, R.; PAGANO, M. The ubiquitin-proteasome system - implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1843, n. 1, p. 150-162, 2014.

BATISTA, I. F.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FARIA, F.; SIMONS, S.M.; BARROS-BATESTTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; LEÃO, L. I.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Toxicon**, v. 51, n. 5, p. 823-834, 2008.

BATISTA, I. F.; RAMOS, O. H.; VENTURA, J. S.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; HO, P. L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 493, p. 151-156, 2010.

BEDFORD, L.; LOWE, J.; DICK, L. R.; MAYER, R. J.; BROWNELL, J. E. Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets. **Nature**, v. 10, p. 29-46, 2010.

BEIER, F.; LOESER, R. F. Biology and pathology of Rho GTPase, PI-3 Kinase-Akt and MAP Kinase signaling pathways in chondrocytes. **J. Cell. Biochem.**, v. 110, n. 3, p. 573-580, 2010.

BLACK, D. L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. **Annu. Rev. of Biochem.**, v. 72, n. 1, p. 291–336, 2003.

BLOMQUIST, A.; SCHWOERER, G.; SCHABLOWSKI, H.; PSOMA, A.; LEHNEN, M.; JAKOBS, K. H.; RUEMENAPP, U. Identification and characterization of a novel Rho-specific guanine nucleotide exchange factor. **Biochem. J.**, v. 352, p. 319-325, 2000.

BOSCH, T. V. D.; KILLIC, E.; PARIDAENS, D.; KLEIN, A D. Genetics of Uveal melanoma and cutaneous melanoma: two of a kind?. **Dermat. Res. Prac.**, v. 10, p. 1-13, 2010.

BREITSCHOPF, K.; HAENDELER, J.; MALCHOW, P.; ZEIHNER, A. M.; DIMMELER, S. Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. **Mol. Card.**, v. 20, n. 5, p. 1886–1896, 2000.

BROWN, E. J.; ALBERS, M. W.; SHIN, T. B.; ICHIKAWA, K.; KEITH, C. T.; LANE, W.

S.; SCHREIBER, S. L. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. **Nature**, v. 369, p. 756-758, 1994.

BROZE JR, G. J.; GIRARD, T. J. Tissue factor pathway inhibitor: Structure-function. **Front. Biosci.**, v. 17, p. 262-280, 2013.

BUK, D. M.; WAIBEL, M.; BRAIG, C.; MARTENS, A. S.; HEINRICH, P. C.; GRAEVE, L. Polarity and lipid raft association of the components of the ciliary neurotrophic factor receptor complex in Madin-Darby canine kidney cells. **JCS**, v. 117, p. 2063-2075, 2004.

BURKHARDT, J. K.; ECHEVERRI, C. J.; NILSSON, T.; VALLEE, R. B. Overexpression of dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. **JCB**, v. 139, n. 2, p. 469-484, 1997.

BURLACU, A.; SIMIONESCU, N. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 7, n. 3, p. 249-257, 2003.

BURRIDGE, K.; FATH, K.; KELLY, T.; NUCKOLLS, G.; TURNER, C. Focal Adhesions: Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. **Annu. Rev. Cell. Biol.**, v. 4, p. 487-525, 1988.

CALAY, D.; VIND-KEZUNOVIC, D.; FRANKART, A.; LAMBERT, S.; POUMAY, Y.; GNIADHECKI, R. Inhibition of Akt signaling by exclusion from lipid rafts in normal and transformed epidermal keratinocytes. **J. Invest. Dermat.**, v. 130, p. 1136-1145, 2010.

CENCI, S.; OLIVA, L.; CERRUTI, F.; MILAN, E.; BIANCHI, G.; RAULE, M.; MEZGHRANI, A.; PASQUALETTO, E.; SITIA, R.; CASCIO, P. Pivotal Advance: Protein synthesis modulates responsiveness of differentiating and malignant plasma cells to proteasome inhibitors. **JLB**, v. 92, p. 1-11, 2012.

CHEN, C-L.; HUANG, S. S.; HUANG, J. S. Cholesterol modulates cellular TGF- β responsiveness by altering TGF- β binding to TGF- β receptors. **J. Cell. Phys.**, v. 215, n. 1, p. 223-233, 2008.

CHEN, J.; CHEN, Z. J. Regulation of NF- κ B by ubiquitination. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 25, p. 4-12, 2013.

CHEN, L.; MADURA, K. Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue. **Cancer Res.**, v. 65, p. 5599-5606, 2005.

CHEN, S-F.; CHEN, H-Y.; ZHANG, Y-X.; LIU, W.; WANG, W-H.; ZHANG, B.; WANG, L-X. Apoptotic effect of MG-132 on human tongue squamous cell carcinoma. **Biomed. Pharmacother.**, v. 65, p. 322-327, 2011.

CHEN, Y-G. Endocytic regulation of TGF- β signaling. **Cell. Res.**, v. 19, p. 58-70, 2009.

CHEUNG, P.; ZHANG, Y.; LONG, J.; LIN, S.; ZHANG, M.; JIANG, Y. 2004. p150Glued, dynein and microtubules are specifically required for activation of MMK3/6 and p38 MAPKs. **JBC**, v. 279, n. 44, p. 45308-45311, 2004.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; DE-SÁ-JÚNIOR, P.; SIMONS, S. M.; MARIA, D. A.; VENTURA, J. S.; BATISTA, I. F. C.; FARIA, F.; DURÃES, E.; REIS, E. M; DEMASI, M. A new Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. **Toxicon**, v. 56, p. 1145-1154, 2010.

CHUNG, E. J.; MOON, S. W.; JUNG, S-A; CHO, Y. J.; KIM, S. W.; LEE, J. H. Potentiation of Bortezomib-induced apoptosis by TGF- β in cultured human Tenon's fibroblasts: contribution of the PI3K/Akt signaling pathway. **Invest. Ophthalm. Vis. Sci.**, v. 51, n. 12, p. 6232-7, 2010.

CLIPPINGER, A. J.; ALWINE, J. C. Dynein mediates the localization and activation of mTOR in normal and human cytomegalovirus-infected cells. **Genes. Dev.**, v. 26, p. 2015-2016, 2012.

COCHRAN, A. J.; BAILLY, C.; EBERHARD, P.; REMOTTI, F. **Melanocytic tumors: a guide to diagnoses**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.

COHEN, S.; LAHAV-BARATZ, S.; CIECHANOVER, A. Two distinct ubiquitin-dependent mechanisms are involved in NF-kappaB p105 proteolysis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 345, n. 1, p. 7-13, 2006.

CONNOR, J.; BUCANA, C.; FIDLER, I. J.; SCHROIT, A. J. Differentiation-dependent expression of phosphatidylserine in mammalian plasma membranes: quantitative assessment of outer-leaflet lipid by prothrombinase complex formation. **PNAS**, v. 86, n. 9, p. 3184-8, 1989.

CORDY, J. M.; HUSSAIN, I.; DINGWALL, C.; HOOPER, N. M.; TURNER, A. J. Exclusively targeting β -secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates β -site processing of the amyloid precursor protein. **PNAS**, v. 100, n. 20, p. 11735-11740, 2003.

COTTRELL, G. S.; AMADESI, S.; SCHMIDLIN, F.; BUNNETT, N. Protease-activated receptor 2: activation, signalling and function. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, n. 6, p. 1191-1197, 2003.

COULOMB, P. A.; WONG, P. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. **Nat. Cell. Biol.**, v. 6, n. 8, p. 699-706, 2004.

CRAWFORD, L. J.; WALKER, B.; IRVINE, A. E. Proteasome inhibitors in cancer therapy. **J. Cell. Signal.**, v. 5, p. 101-110, 2011.

DAY, C. L.; PUTHALAKATH, H.; SKEA, G.; STRASSER, A.; BARSUKOV, I.; LIAN, L.; HUANG, D. C. S.; HINDS, G. Localization of dynein light chains 1 and 2 and their pro-apoptotic ligands. **Biochem. J.**, v. 377, p. 597-605, 2004.

DEBATIN, K-M.; KRAMMER, P. H. Death receptors in chemotherapy and cancer. **Nat. Oncog.**, v. 23, p. 2950-2966, 2004.

DEL POZO, M. A. Integrin signaling and lipid rafts. **Cell Cycle**, v. 3, n. 6, p. 725-728, 2004.

DENIAUD, A.; SHARAF EL DEIN, O.; MAILLIER, E.; PONCET, D.; KROEMER, G.; LEMAIRE, C.; BRENNER, C. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. **Oncogene**, v. 27, p. 285-299, 2008.

DI BARTOLOMEO, S.; CORAZZARI, M.; NAZIO, F.; OLIVERIO, S.; LISI, G.; ANTONIOLI, M.; PAGLIARINI, V.; MATTEONI, S.; FUOCO, C.; GIUNTA, L.; D'AMELIO, M.; NARDACCI, R.; ROMAGNOLI, A.; PIACENTINI, M.; CECCONI, F.; FIMIA, G. M. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. **JCB**, v. 191, n. 1, p. 155-168, 2010.

DI STEFANO, P.; DAMIANO, L.; CABODI, S.; ARAMU, S.; TORDELLA, L.; PRADUROUX, A.; PIVA, R.; CAVALLO, F.; FORNI, G.; SILENGO, L.; TARONE, G.; TURCO, E.; DEFILIPPI, P. p140Cap protein suppresses tumour cell properties, regulating Csk and Src kinase activity. **EMBO J.**, v. 26, p. 2843-2855, 2007.

DICK, L. R.; CRUIKSHANK, A. A.; GRENIER, L.; MELANDRI, F. D.; NUNES, S. L.; STEIN, R. L. Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 13, p. 7273-7276, 1996.

DOHERTY, G. J.; MCMAHON, H. T. Mechanisms of endocytosis. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 78, p. 857-902, 2009.

DONATI, M. B.; SEMERARO, N. Cancer cell procoagulant and their pharmacological modulation. **Haemostasis**, v. 14, p. 422-429, 1984.

DORÉ JR, J. J.; EDENS, M.; GARAMSZEGI, N.; LEOF, E. B. Heteromeric and homomeric transforming growth factor-beta receptors show distinct signaling and endocytic responses in epithelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 48, p. 31770–31777, 1998.

DORSEY, B. D.; IQBAL, M.; CHATTERJEE, S.; MENTA, E.; BERNARDINI, R.; BERNAREGGI, A.; CASSARA, P. G.; D'ARASMO, G.; FERRETTI, E.; DE MUNARI, S.; OLIVA, A.; PEZZONI, G.; ALLIEVI, C.; STREPPONI, I.; RUGGERI, B.; ATOR, M. A.; WILLIAMS, M.; MALLAMO, J. P. Discovery of a potent, selective, and orally active proteasome inhibitor for the treatment of cancer. **J. Med. Chem.**, v. 51, n. 4, p. 1068-1072, 2008.

DREWES, C. C.; DIAS, R. Y.; HEBEDA, C. B.; SIMONS, S. M.; BARRETO, S. A.; FERREIRA JR, J. M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M., FARSKY, S. H. Actions of the kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. **Toxicol.**, v. 60, n. 3, p. 333-340, 2012.

DREXLER, H. C.; RISAU, W.; KONERDING, M. A., Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells. **Faseb J.**, v. 14, n. 1, p. 65-77, 2000.

DUNN, K. W.; MCGRAW, T. E.; MAXFIELD, F. R. Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. **JCB**, v. 109, p. 3303–3314, 1989.

ELHYANY, S.; ASSA-KUNIK, E.; TSORY, S.; MULLER, T.; FEDIDA, S; SEGAL, S.; FISHMAN, D. The integrity of cholesterol-enriched microdomains is essential for the constitutive high activity of protein kinase B in tumour cells. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 32, p. 837–839, 2004.

ERIKSSON, E.; ZAMAN, F.; CHRYSIS, D.; WEHTIE, H.; HEINO, T. J.; SAVENDAHL, L. Bortezomib is cytotoxic to the human growth plate and permanently impairs bone growth in young mice. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50523, 2012.

EVANS, W. H.; MARTIN, P. E. Gap junctions: structure and function. **Mol. Membr. Biol.**, v. 19, n. 2, p. 121-136, 2002.

EVSTIGNEEVA, Z. G.; SOLOV'EVA, N. A.; SIDEL'NIKOVA, L. I. Structures and functions of chaperones and chaperonins. **App. Biochem. Microbiol.**, v. 37, n. 1, p. 1-13, 2001.

FACKENTHAL, J. D.; GODLEY, L. A. Aberrant RNA splicing and its functional consequences in cancer cells. **Dis. Model. Mech.**, v. 1, n. 1, p. 37-42, 2008.

FALLAHI-SICHANI, M.; LINDERMAN, J. J. Lipid Raft-mediated regulation of G-protein coupled receptor signaling by ligands which influence receptor dimerization: A computational study. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. 1-14, 2009.

FARZAN, M.; SCHNITZLER, C. E.; VASILIEVA, N.; LEUNG, D.; CHOE, H. BACE2, a β -secretase homolog, cleaves at the β site and within the amyloid- β region of the amyloid- β precursor protein. **PNAS**, v. 97, n. 17, p. 9712–9717, 2000.

FENGFENG, N.; HENG, R.; WEI, D.; SONGYING, O.; ZHI-JIE, L. Structural biology study of human TNF receptor associated factor 4 TRAF domain. **Protein Cell.**, v. 4, n. 9, p. 687–694, 2013.

FERNANDES, R. J.; HIROHATA, S.; ENGLE, J. M.; COLIGE, A.; COHN, D. H.; EYRE, D. R.; APTE, S. S. Procollagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 34, p. 31502-31509, 2001.

FIMIA, G. M.; DI BARTOLOMEO, S.; PIACENTINI, M.; CECCONI, F. Unleashing the AMBRA 1- Beclin 1 complex from dynein chains. **Autophagy**, v. 7, n. 1, p. 115-117, 2011.

FIRESTONE, A. J.; WEINGER, J. S.; MALDONADO, M.; BARLAN, K.; LANGSTON, L. D.; O'DONNELL, M.; GELFAND, V. I.; KAPOOR, T. M.; CHEN, J. K. Small-molecule inhibitors of AAA+ ATPase motor cytoplasmic dynein. **Nature**, v. 484, n. 7392, p. 125-129, 2012.

FOSTER, F. M.; TRAER, C. J.; ABRAHAM, S. M.; FRY, M. J. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. **J. Cell. Sci.**, v. 116, p. 3037-3040, 2003.

FRANCESCHINI, A.; SZKLARCZYK, D.; FRANKILD, S.; KUHN, M.; SIMONOVIC, M., et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. **Nucleic Acids Res.**, v. 41, p. 808–815, 2013.

FRANCISCHETTI, I. M.; SA-NUNES, A.; MANS, B. J.; SANTOS, I. M.; RIBEIRO, J. M. The role of saliva in tick feeding. **Front. Biosci.**, v. 14, p. 2051–2088, 2009.

FRIBLEY, A.; ZENG, Q.; WANG, C. Y. Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress-reactive oxygen species in head and neck squamous cell carcinoma cells. **MCB**, v. 24, p. 9695-9704, 2004.

GAMERDINGER, M.; KAYA, A. M.; WOLFRUM, U.; CLEMENT, A. M.; BEHL, C. Bag3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. **Embo Reports**, v. 12, n. 2, p. 149-156, 2011.

GARCIA-MATA, R.; GAO, Y-S.; STZUL, E. Hassles with taking out the garbage: Aggravating aggresomes. **Traffic**, v. 3, p. 388-396, 2002.

GERHARD, D. S.; WAGNER, L.; FEINGOLD, E. A.; SHENMEN, C. M.; GROUSE, L. H.; SCHULER, G.; KLEIN, S. L.; OLD, S.; RASOOLY, R.; GOOD, P.; GUYER, M.; PECK, A. M.; DERGE, J. G.; LIPMAN, D.; COLLINS, F. S.; JANG, W.; SHERRY, S.; FEOLO, M.; MALEK, J. The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC). **Genome Res.**, v. 14, p. 2121-2127, 2004.

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiol. Rev.**, v. 82, n. 2, p. 373-428, 2002.

GUINDALINI, C.; TUFIK, S. Use of microarrays in the search of gene expression patterns – application to the study of complex phenotypes. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 29, n. 4, p. 370-374, 2007.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Signaling to NF-kappaB. **Genes Dev.**, v. 18, n. 18, p. 2195-2224, 2004

HEINRICH, P. C.; BEHRMANN, I.; HAAN, S.; HERMANN, H. M.; ULLER-NEUEN, G. M.; SCHAPER, F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochem. J.**, v. 374, p. 1–20, 2003.

HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K.; TEN DIJKE, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature**, v. 390, n. 6659, p. 465–471, 1997.

HERBST, R. S. Review of epidermal growth factor receptor biology. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 59, n. 2, p. 21-26, 2004.

HIROKAWA, N.; NODA, Y.; TANAKA, Y.; NIWA, S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. **Nature Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 10, p. 682-696, 2009.

HODGKINSON, J. L.; PETERS, C.; KUZNETSOV, S. A.; STEFFEN, W. Three-dimensional reconstruction of the dynactin complex by single-particle image analysis. **PNAS**, v. 102, p. 3667-3672, 2005.

HOESEL B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Mol. Cancer.**, v. 12, p. 86, 2013.

HORGAN, C. P.; HANSCOM, S. R.; JOLLY, R. S.; FUTTER, C. E.; MCCAFFREY, M. W. Rab11-FIP3 binds dynein light intermediate chain 2 and its overexpression fragments the Golgi complex. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 394, p. 387-392, 2010.

HOVIUS, J. W.; LEVI, M.; FIKRIG, E. Salivating for knowledge: potential pharmacological agents in tick saliva. **PLoS Med.**, v. 5, p. e43, 2008.

HUEBER, A. O. Role of membranemicrodomain rafts in TNFR-mediated signal transduction. **Cell Death Diff.**, v. 10, p. 7–9, 2003.

HUOTARI, J.; HELENIUS, A. Endosome maturation. **EMBO J.**, v. 30, p. 3481–3500, 2011.

ICHIKAWA, N.; IWABUCHI, K.; KURIHARA, H.; ISHII, K.; KOBAYASHI, T.; SASAKI, T.; HATTORI, N.; MIZUNO, Y.; HOZUMI, K.; YAMADA, Y.; ARIKAWA-HIRASAWA, E. Binding of laminin-1 to monosialoganglioside GM1 in lipid rafts is crucial for neurite outgrowth. **JCS**, v. 122, p. 289-299, 2009.

IRWIN, M. E.; BOHN, N.; BOERNER, J. L. Src family kinases mediate epidermal growth factor receptor signaling from lipid rafts in breast cancer cells. **Cancer Biol. Ther.**, v. 12, n. 8, p. 718-726, 2011.

ISHII, H.; MORI, T.; SHIRATSUCHI, A.; NAKAI, Y.; SHIMADA, Y.; OHNO-IWASHITA, Y.; NAKANISHI, Y. Distinct localization of lipid rafts and externalized phosphatidylserine at the surface of apoptotic cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 327, n. 1, p. 94-9, 2005.

JAIN, S.; DIEFENBACH, C.; ZAIN, J.; O'CONNOR, O. A. Emerging role of carlfizomib in treatment of relapsed and refractory lymphoid neoplasms and multiple myeloma. **Core Evid.**, v. 6, p. 43-57, 2011.

JIA, M.; SOUCHELNYTSTKYI, S. Comments on the cross-talk of TGF β and EGF in cancer. **Exp. Oncol.**, v. 33, n. 3, p. 170–173, 2011.

JONES, S. A.; HORIUCHI, S.; TOPLEY, N.; YAMAMOTO, N.; FULLER, G. M. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. **FASEB J.**, v. 15, p. 43-58, 2001.

JUNG, Y.; KIM, H.; MIN, S. H.; RHEE, S. G.; JEONG, W. Dynein light chain LC8 negatively regulates NF- κ B through the redox-dependent interaction with I κ B α . **JBC**, v. 283, n. 35, p. 23963-23871, 2008.

KADAMUR, G.; ROSS, E. M. Mammalian phospholipase c. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 75, p. 127-154, 2013.

KARDON, J. R.; VALE, R. D. Regulators of the cytoplasmic dynein motor. **Nature**, v. 10, p. 854-865, 2009.

KARKI, S.; TOKITO, M. K.; HOLZBAUR, E. L. F. Casein Kinase II binds to and phosphorylates cytoplasmic dynein. **JBC**, v. 272, n. 9, p. 5887-5991, 1996.

KEPP, O.; GDOURA, A.; MARTINS, I.; PANARETAKIS, T.; SCHLEMMER, F.; TESNIERE, A.; FIMIA, G. M.; CICCOSANTI, F.; BURGEVIN, A.; PIACENTINI, M.; EGGLETON, P.; YOUNG, P. J.; ZITVOGEL, L.; ENDERT, P. V.; KROEMER, G. Lysyl tRNA synthetase is required for the translocation of calreticulin to the cell surface in immunogenic death. **Cell Cycle**, v. 9, n. 15, p. 3072-3077, 2010.

KHASTURI, R. S.; TAUBMAN, M. B.; MACKMAN, N. Role of tissue factor in cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 27, p. 4834-4838, 2009.

KHAZAEI, M. R.; PUSCHEL, A. W. Phosphorylation of the par polarity complex protein Par3 at serine 962 is mediated by aurora A and regulates its function in neuronal polarity. **JBC**, v. 284, p. 33571-33579, 2009.

KIM, J.; ADAM, R. M.; SOLOMON, K. R.; FREEMAN, M. R. Involvement of cholesterol-rich lipid rafts in interleukin-6-induced neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate cancer cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 613-619, 2004.

KIM, K. B.; CREWS, C. M. From epoxomicin to carlfizomib: chemistry, biology and medical outcomes. **Nat. Prod. Rep.**, v. 30, p. 600-604, 2013.

KIMURA, S.; NODA, T.; YOSHIMORI, T. Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. **Cell Struc. Func.**, v. 33, p. 109-122, 2008.

KOMANDER, D.; CLAGUE, M., J.; URBÉ, S. Breaking the chains: structure and function of deubiquitinases. **MCB**, v. 10, p. 550-556, 2009.

LANDER, G. C.; ESTRIN, E.; MATYSKIELA, M. E.; BASHORE, C.; NOGALES, E.; MARTIN, A. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle.

Nature, v. 482, p. 186-191, 2012.

LAPLANTINE, E.; FONTAN, E.; CHIARAVALLI, J.; LOPEZ, T.; LAKISIC, G.; VERÓN, M.; AGOU, F.; ISRAEL, A. NEMO specifically recognizes K63-linked poly-ubiquitin chains through a new bipartite ubiquitin-binding domain. **Embo J.**, v. 28, p. 2885-2895, 2009

LEE, A. GRP78 induction in cancer: Therapeutic and prognostic implications. **Cancer Res.**, v. 67, p. 3496-3499, 2007.

LEE, J-Y.; YAO, T-P. Quality control autophagy. **Embo J.**, v. 29, p. 969-980, 2010.

LEGESSE-MILLERA, A.; RAITMANA, I.; HALEYA, E. M.; LIAOA, A.; SUNA, L. L.; WANGA, D. J.; KRISHNANA, N.; LEMONSB, J. M. S.; SUHA, E. J.; JOHNSONA, E. L.; LUNDA, B. A.; COLLER, H. A. Quiescent fibroblasts are protected from proteasome inhibition-mediated toxicity. **MBoC**, v. 23, p. 3566-3586, 2012.

LEHMANN, A. Ecallantide (DX-88), a plasma kallikrein inhibitor for the treatment of hereditary angioedema and the prevention of blood loss in on-pump cardiothoracic surgery. **Exp. Opin. Biolo. Ther.**, v. 8, n. 8, p. 1187-1199, 2008.

LEIBINGER, M.; MÜLLER, A.; GOBRECHT, P.; DIEKMANN, H.; ANDREADAKI, A.; FISCHER, D. Interleukin-6 contributes to CNS axon regeneration upon inflammatory stimulation. **Cell Death Dis.**, v. 4, p. e609, 2013.

LEITINGER, B.; HOGG, N. The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. **JCS**, v. 115, p. 963-972, 2002.

LIN, L.; DEMARTINO, G. N.; GREENE, W. C. Cotranslational biogenesis of NF- κ B p50 by the 26S Proteasome. **Cell Press**, v. 92, p. 819-828, 1998.

LIU, Z.; YANG, X.; LI, Z.; MCMAHON, C.; SIZER, C.; BARENBOIM-STAPLETON, L.; BLISKOVSKY, V.; MOCK, B.; RIED, T.; LONDON, W. B.; MARIS, KHAN, J.; THIELE, C. J. CASZ1, a candidate tumor-suppressor gene, suppresses neuroblastoma tumor growth through reprogramming gene expression. **Cell Death Differ.**, v. 18, n. 7, p. 1174-1183, 2011.

LU, S.; WANG, J. The resistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib. **Biomar. Res.**, v. 1, n. 13, p. 2-9, 2013.

LUO, M.; LIU, Y.; RIEDERER, B.; PATRUCCO, E.; HOFMANN, F.; DONOWITZ, M.; TIAN, D.; YUN, C.; DE JONGE, H.; LAMPRECHT, G.; SEIDLER, U.; HEINO, J.;

VELI-MATTI, K. The cGMP-dependent kinase 2 is recruited to and colocalizes with Na⁺/H⁺ regulatory factor 2 and Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 during guanylate cycle C receptor activation in murine small intestinal brush border membrane in vivo. **Proc. Physiol. Soc.**, v. 31, p. C30, 2014.

LUO, S.; GARCIA-ARENCIBIA, M.; ZHAO, R.; PURI, C.; TOH, P. C. P.; SADIQ, O.; RUBINSZTEIN, D. C. Bim inhibits autophagy by recruiting beclin-1 to microtubules. **Mol. Cell.**, v. 47, n. 3, p. 359-370, 2012.

LUO, S.; RUBINSZTEIN, D. C., A novel molecular link between autophagy and apoptosis. **Landes Biosci.**, v. 9, n. 1, p. 104-105, 2013.

MAN, J-H.; LIANG, B.; GU, Y-X.; ZHOU, T.; LI, A-L.; LI, T.; JIN, B-F.; BAI, B.; ZHANG, H-Y.; ZHANG, W-N.; LI, W-H.; GONG, W-L.; LI, H-Y.; ZHANG, X-M. Gankyrin plays an essential role in Ras-induced tumorigenesis through regulation of the RhoA/ROCK pathway in mammalian cells. **J. Clin. Invest.**, v. 120, n. 8, p. 2829–2841, 2010.

MANDEL, G. L.; DOUGLAS, R. G.; BENNETT, J. E. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. New York, Churchill Livingstone, 4 th ed. 1995.

MARCELAIN, K.; DE LA TORRE, C.; GONZÁLEZ, P.; PINCHEIRA, J. Roles of nibrin and AtM/ATR kinases on the G2 checkpoint under endogenous or radio-induced DNA damage. **Biol. Res.**, v. 38, n. 2, p. 179-185, 2005.

MARIA, D. A.; SOUZA, J. G.; MORAIS, K. L. P.; BERRA, C. M.; ZAMPOLLI, H. C.; DEMASI, M.; SIMONS, S. M.; SAITO, R. F.; CHAMMAS, R.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A novel proteasome inhibitor acting in mitochondrial dysfunction, ER stress and ROS production. **Invest. New Drugs**, v. 31, n. 3, p. 493-505, 2013.

MARQUEZ, R. T.; XU, L. Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. **Am. J. Cancer Res.**, v. 2, n. 2, p. 214-221, 2012.

MARSH, M.; MCMAHON, H. T. The structural era of endocytosis. **Science**, v. 285, n. 5425, p. 215–20, 1999.

MAXFIELD, F. R.; MCGRAW, T. E. Endocytic recycling. **Nature**, v. 5, p. 121-132, 2004.

MECKES, D. G.; MENAKER, N. F.; RAAB-TRAUB, N. Epstein-Barr virus LMP1 Modulates lipid raft microdomains and the vimentin cytoskeleton for signal transduction and transformation. **J. Virol.**, v. 87, n. 3, p. 1301-1311, 2012.

MENDEZ, L. M.; POLO, J. M.; YU, J. J.; KRUPSKI, M.; DING, B. B.; MELNICK, A.; YE, B. H. CtBP is an essential corepressor for BCL6 autoregulation. **MCB**, v. 28, p. 2175-2186, 2008.

MENG, L.; MOHAN, R.; KWOK, B. H. B.; ELOFSSON, M.; SIN, N.; CREWS, C. M. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits invivo antiinflammatory activity. **PNAS**, v. 96, p. 10403-10408, 1999.

MIZUSHIMA, N.; YAMAMOTO, A.; MATSUI, M.; YOSHIMORI, T.; OHSUMI, Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. **MBoC**, v. 15, p. 1101–1111, 2004.

MORAIS, K. L. P. **Internalização, tráfego e avaliação do mecanismo de ação pró-apoptótica do Amblyomin-X**. 156 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 2014.

MUKHERJEE, S.; GHOSH, R. N.; MAXFIELD, F. R. Endocytosis. **Physiol. Rev.**, v. 77, p. 759–803, 1997.

MULLER, T.; MIZUMOTO, S.; SURESH, I.; KOMATSU, Y.; VODOPIUTZ, J.; DUNDAR, M.; STRAUB, V.; LINGENHEL, A.; MELMER, A.; LECHNER, S.; ZSCHOCKE, J.; SUGAHARA, K.; JANECKE, A. R. Loss of dermatan sulfate epimerase (DSE) function results in musculocontractural Ehlers–Danlos syndrome. **Hum. Mol. Gen.**, v. 22, n. 18, p. 3761–3772, 2003.

MURAI, T. The role of lipid rafts in cancer cell adhesion and migration. **JCB**, v. 2012, p.763283, 2012.

MURPHYA, JANE. E.; PADILLAA, B. E.; HASDEMIRA, B.; COTTRELLB, G. S.; BUNNETTA, N. W. Endosomes: A legitimate platform for the signaling train. **PNAS**, v. 106, n. 42, p. 17615–17622, 2009.

NAWROCKI, S. T.; SEENEY-GOTSCH, B.; TAKAMORI, R.; MCCONKEY, D. J. The proteasome inhibitor bortezomib enhances the activity of docetaxel in orthotopic human pancreatic tumor xenografts. **Mol. Cancer Ther.**, v. 3, p. 59-70, 2004.

NELSON, J. **Structure and function in cell signaling**. Belfast, UK: Queen's University. John Wiley & Sons Ltd. 2008.

NIKRAD, M.; JOHNSON, T.; PUTHALALATH, H.; COULTAS, L.; ADAMS, J.; KRAFT, A. S. The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim. **Mol. Cancer Ther.**, v. 4, n. 3, p. 443-449, 2005.

NIU, J.; PROFIROVIC, J.; PAN, H.; VAISKUNAITE, R.; VOYNO-YASENETSKAYA, T. G. Protein beta gamma subunits stimulate p114RhoGEF, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and Rac1: regulation of cell shape and reactive oxygen species production. **Circ. Res.**, v. 93, p. 848-856, 2003.

OBERAUER, R.; RIST, W.; LENTER, M. C.; HAMILTON, B. S.; NEUBAUER H. EGFL6 is increasingly expressed in human obesity and promotes proliferation of adipose tissue-derived stromal vascular cells. **Mol. Cell Biochem.**, v. 343, n. 1, p. 257-269, 2010.

OBRIG, T. G. The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. **JBC**, v. 246, p. 174-181, 1971.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 592-603, 2004.

OSTROM, R. S.; INSEL, P. A. The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 143, p. 235-245, 2004.

PARK, W. H.; KIM, S. H. MG132, a proteasome inhibitor, induces human pulmonary fibroblast cell death via increasing ROS levels and GSH depletion. **Oncol. Rep.**, v. 27, p. 1284-1291, 2012.

PARKHITKO, A. A.; FAVOROVA, O. O.; KHABIBULLIN, D. I.; ANISIMOV, V. N.; HENSKE, E. P. Kinase mTOR: Regulation and role in maintenance of cellular homeostasis, tumor development and aging. **Biochem. (Moscow)**, v. 79, n. 2, p. 88-101, 2014.

PARTOVIAN, C.; SIMONS, M. Regulation of protein kinase B/Akt activity and Ser473 phosphorylation by protein kinase C alpha in endothelial cells. **Cell Signal.**, v. 16, p. 951-957, 2004.

PATRIE, K. M.; DRESCHER, A. J.; WELIHINDA, A.; MUNDEL, P.; MARGOLIS, B. Interaction of two actin-binding proteins, synaptopodin and alpha-actinin-4, with the tight junction protein MAGI-1. **JBC**, v. 277, n. 33, p. 30183-30190, 2002.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Ox. Univ. Press.**, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

PFISTER, K. K.; SHAH, P. R.; HUMMERICH, H.; RUSS, A.; COTTON, J.; ANNUAR, A. A.; KING, S. M.; FISCHER, E. M. C. Genetic analysis of the cytoplasmic dynein

subunit families. **Plos Gen.**, v. 2, n. 1, p. e1, 2006.

PIDOUX, G.; TASKE'N, K. Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 44, p. 271–284, 2010.

PIKE, L. J. The challenge of lipid rafts. **J. Lipid Res.**, v. 50, p. S323, 2008.

PORTER, S.; CLARK, I. M.; KEVORKIAN, L.; EDWARDS, D. R. The ADAMTS metalloproteinases. **Biochem. J.**, v. 386, n. 1, p. 15-27, 2005.

PUTHALAKATH, H.; HUANG, D. C. S.; O'REILLY, L. A.; KING, S. M.; STRASSER, A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. **Mol. Cell**, v. 3, p. 287-296, 1999.

QIU, W.; DERR, N. D.; GOODMAN, B. S.; VILLA, E.; WU, D.; SHIH, W.; RECK-PETERSON, S. L. Dynein achieves processive motion using both stochastic and coordinated stepping. **Nature**, v. 19, n. 2, p. 193-200, 2012.

RAAB, M. S.; PODAR, K.; BREITKREUTZ, I.; RICHARDSON, P. G.; ANDERSON, K. C. Multiple myeloma. **Lancet**, v. 374, n. 9686, p. 324–339, 2009.

RAN, S.; DOWNES, A.; THORPE, P. E. Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels. **Cancer Res.**, v. 62, n. 21, p. 6132-6140, 2002.

RAWLINGS, J. S.; ROSLER, K. M.; HARRISON, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. **JCS**, v. 117, p. 1281-1283, 2004.

RAYOU, B.; PARK, W. H. Proteasome inhibition by MG132 induces growth inhibition and death of human pulmonary fibroblast cells in a caspase-independent manner. **Oncol. Rep.**, v. 25, p. 1705-1712, 2011.

REED, S. I. The ubiquitin-proteasome pathway in cell cycle control. **Results Probl. Cell Differ.**, v. 42, p. 147–181, 2006.

REESE, E. L.; HAIMO, L. T. Dynein, dynactin, and kinesin II's interaction with microtubules is regulated during bidirectional organelle transport. **JCB**, v. 151, p. 155–166, 2000.

REIS-SOBREIRO, M.; ROUE', G.; MOROS, A.; GAJATE, C.; DE LA IGLESIA-

VICENTE, J.; COLOMER, D.; MOLLINEDO, F. Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. **Blood Cancer J.**, v. 3, p. e118, 2013.

REN, S.; SMITH, M. J.; LOURO, I. D.; MCKIE-BELL, P.; BANI, M. R, *et al.* The p44S10 locus, encoding a subunit of the proteasome regulatory particle, is amplified during progression of cutaneous malignant melanoma. **Oncogene.**, v. 19, p. 1419–1427, 2000.

RODRIGUEZ-GONZALEZ, A; LIN, T.; IKEDA, A. T.; SIMMS-WALDRIP, T.; FU, C.; SAKAMOTO, K. M. Role of the aggresome pathway in cancer: Targeting Histone-Deacetylase 6-dependent protein degradation. **Cancer Res.**, v. 68, n. 8, p. 2557-2660, 2008.

RUSCHAK, A. M.; SLASSI, M.; KAY, L. E.; SCHIMMER, A, D. Novel proteasome inhibitors to overcome bortezomib resistance. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 103, n. 13, p. 1007-1017, 2011.

RUVOLO, P. P.; DENG, X.; CARR, B. K.; MAY, W. S. A functional role for mitochondrial protein kinase C alpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. **JBC**, v. 273, p. 25436-25442, 1998.

Sarrazin, S.; Lamanna, W. C.; Esko, J. D. Heparan sulfate proteoglycans. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 3, p. a004952, 2011.

SCHEWE, D. M.; AGUIRRE-GHISO, J. A. Inhibition of eIF2alpha dephosphorylation maximizes bortezomib efficiency and eliminates quiescent multiple myeloma cells surviving proteasome inhibitor therapy. **Cancer Res.**, v. 69, p. 1545–1552, 2009.

SCHLIWA, M.; WOEHLEKE, G. Molecular Motors. **Nature**, v. 422, p. 759-765, 2003.

SEGAWA, K.; SUZUKI, J.; NAGATA, S. Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells. **PNAS**, v. 108, n. 48, p. 19246–19251, 2011.

SELLERS, J. R. Myosins: a diverse superfamily. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1496, p. 3-22, 2000.

SEUFFERLEIN, T.; BACHET, J. B.; VAN CUTSEM, E.; ROUGIER, P. Pancreatic adenocarcinoma: ESMO–ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals Oncol.**, v. 23, p. vii33–vii40, 2012.

SHEN, Y.; ZHOU, X.; WANG, Z.; JIANG, Y.; WANG, J.; TONG, Y.; GUO, H. Coagulation profiles and thromboembolic events of bortezomib plus thalidomide and

dexamethasone therapy in newly diagnosed multiple myeloma. **Leuk. Res.**, v. 35, n. 2, p. 147-51, 2011.

SHIN, K.; FOGG, V. C.; MARGOLIS, B. Tight Junctions and Cell Polarity. **Annu. Rev. Cell Develop. Biol.**, v. 22, p. 207-235, 2006.

SHMORANZER, J., FAWCETT, J. P., SEGURA, M., TAN, S., VALLEE, R. B., PAWSON, T., GUNDERSEN, G. G. Par3 and dynein associate to regulate local microtubule dynamics and centrosome orientation in migration cells. **Curr. Biol.**, v. 19, n. 13, p. 1065-1074, 2009.

SHRUM, C. K.; DeFRANCISCO, D.; MEFFERT, M. K. Stimulated nuclear translocation of NF- κ B and shuttling differentially depend on dynein and the dynactin complex. **PNAS**, v. 106, p. 2647-2652, 2008.

SIEGEL, D. S. From clinical trials to clinical practice: single-agent carfilzomib adverse events and their management in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. **Ther. Adv. Hematol.**, v. 4, n. 6, p. 354–365, 2013.

SIMONS, K.; TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. **MCB**, v. 1, p. 31-41, 2000.

SKAAR, J. R.; PAGANO, M. Control of cell growth by the SCF and APC/C ubiquitin ligases. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 21, p. 816–824, 2009.

SO, T.; CROFT, M. Regulation of PI-3-Kinase and Akt signaling in T Lymphocytes and other cells by TNFR family molecules. **Front. Immunol.**, v. 4, n. 139, p. 00139, 2013.

STENMARK, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. **Nature Rev.**, v. 10, p. 513-525, 2009.

SU, Y.; KONDRIKOV, D.; BLOCK, E. R. β -actin: A regulator of NOS-3. **Science Signal.**, v. 404, p. 52, 2007.

SUMANDEA, M. P.; PYLE, W. G.; KOBAYASHI, T.; DE TOMBE, P. P.; SOLARO, R. J. Identification of a functionally critical protein kinase C phosphorylation residue of cardiac troponin T. **JBC**, v. 278, p. 35135-35144, 2003.

TAN, S. C.; SHERER, J.; VALLEE, R. B. Recruitment of dynein to late endosomes and lysosomes through light intermediate chains. **MBoC**, v. 22, p. 467-477, 2010.

TAO, X.; WEST, A. E.; CHEN, W. G.; CORFAS, G.; GREENBERG, M. E. A calcium-responsive transcription factor, CaRF, that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF. **Neuron.**, v. 33, p. 383-395, 2002.

THOREEN, C. C.; KANG, S. A.; CHANG, J. W.; LIU, Q.; ZHANG, J.; GAO, Y.; REICHLING, L. J.; SIM, T.; SABATINI, D. M.; GRAY, N. S. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. **JBC**, v. 284, p. 8023-8032, 2009.

TOWN, L.; MCGLINN, E.; DAVIDSON, T-L.; BROWNE, C. M.; CHAWENGSAKSOPHAK, K.; KOOPMAN, P.; RICHMAN, J. M.; WICKING, C. Tmem26 is dynamically expressed during palate and limb development but is not required for embryonic survival. **Plos One**, v. 6, n. 9, p. e25228, 2011.

TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z. Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocytes subpopulations. **New York Acad. Press.**, v. 41, p. 185-194, 1994.

TSANG, C. K.; LIU, H.; ZHENG, X. F. mTOR binds to the promoters of RNA polymerase I- and III-transcribed genes. **Cell Cycle**, v. 9, n. 5, p. 953-957, 2010.

TSUBUKI, S.; KAWASAKI, H.; SAITO, Y.; MIYASHITA, N.; INOMATA, M.; KAWASHIMA, S. Purification and characterization of a Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading protease expected to regulate neurite formation: a novel catalytic activity in proteasome. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 196, n. 3, p. 1195-1201, 1993.

TYNAN, S. H., PUROHIT, A., DOXSEY, S. J., VALLEE, R. B. Light intermediate chain 1 defines a functional subfraction of cytoplasmic dynein which binds to pericentrin. **JBC**, v. 275, n. 42, p. 32763-32768, 2000.

VAANDRAGER, A. B.; EHLERT, E. M.; JARCHAU, T.; LOHMANN, S. M.; DE JONGE, H. R. N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II. **JBC**, v. 271, p. 7025-7029, 1996.

VALE, R. D. The molecular motor toolbox for intracellular transport. **Cell**, v. 112, p. 467-480, 2003.

VALENTA, T.; HAUSMANN, G.; BASLER, K. The many faces and functions of β -catenin. **EMBO J.**, v. 31, p. 2714–2736, 2012.

VARMA, D.; DAWN, A.; GHOSH-ROY, A.; WEIL, S. J.; ORI-MCKENNEY, K. M.; ZHAO, W.; KEEN, J.; VALLEE, R. B.; WILLIAMS, J. C. Development and application

of in vivo molecular traps reveals dynein light chain occupancy differentially affects dynein-mediated processes. **PNAS**, v. 107, n. 8 p. 3493-3498, 2009.

VENERE, M.; LATHIA, J. D.; RICH, J. N. Growth factors receptor define cancer hierarchies. **Cancer Cell**, v. 23, n. 2, p. 135-137, 2013.

VENTURA, J. S.; FARIA, F.; BATISTA, I. F.; SIMONS, S. M.; OLIVEIRA, D. G.; MORAIS, K. L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A kunitz-type FXa inhibitor affects tumor progression, hypercoagulable state and triggers apoptosis. **Biomed. Pharmacother.**, v. 67, n. 3, p. 192-196, 2013.

VERMEULEN, K.; DIRK R. BOCKSTAELE, V.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, v. 36, p. 131–149, 2003.

WANG, X.; PROUD, C. G. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. **Physiology**, v. 21, p. 362-369, 2006.

WANG, X-Q.; YAN, Q.; SUN, P.; LIU, J-W.; GO, L.; MCDANIEL, M. S.; PALLER, A. S. Suppression of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling by Protein Kinase C-A Activation Requires CD82, Caveolin-1, and Ganglioside. **Cancer Res.**, v. 67, n. 20, 2007.

WANG, Z.; LIU, P.; INUZUKA, H.; WEI, W. Roles of F-box proteins in cancer. **Nature Rev.**, v. 14, p. 233-247, 2014.

WHYTE, J.; BADER, J. R.; TAUHATA, S. B. F.; RAYCROFT, M.; HORNICK, J.; PFISTER, K. K.; LANE, W. S.; CHAN, G. K.; HINCHCLIFFE, E. H.; VAUGHAN, P. S.; VAUGHAN, K. T. Phosphorylation regulates targeting of cytoplasmic dynein to kinetochores during mitosis. **JCB**, v. 183, n. 5, p. 819-834, 2008.

WILCKE, M.; JOHANNES, L.; GALLI, T.; MAYAU, V.; GOUD, B.; SALAMERO, J. Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-Golgi network. **JCB**, v. 151, n. 6, p. 1207-1220, 2000.

WOEHLECKE, H. et al. Enhanced exposure of phosphatidylserine in human gastric carcinoma cells overexpressing the half-size ABC transporter BCRP (ABCG2). **Biochem. J.**, v. 376, n. 2, p. 489-495, 2003.

WONG, E.; CUERVO, A. M. Integration of clearance mechanisms: The proteasome and autophagy. **CSH Perspec.**, v. 2, n. 12, p. a006734, 2010.

WU, R. F.; XU, Y. C.; ZHENYI, M.; NWARIAKU, F. E.; SAROSI JR, G. A.; TERADA, L. S. Subcellular targeting of oxidants during endothelial cell migration. **JCB**, v. 171, n. 5, p. 893–904, 2005.

WU, W. K. K.; SAKAMOTO, K. M.; MILANI, M.; ALDANA-MASANKGAY, G.; FAN, D.; WU, K.; LEE, C. W.; CHO, C. H.; YU, J.; SUNG, J. J. Y. Macroautophagy modulates cellular response to proteasome inhibitors in cancer therapy. **Drug Resist. Upd.**, v. 13, p. 87-92, 2010.

XU, L.; QU, X.; HU, X.; ZHU, Z.; LI, C.; LI, E.; MA, Y.; SONG, N.; LIU, Y. Lipid raft-regulated IGF-1R activation antagonizes TRAIL-induced apoptosis in gastric cancer cells. **FEBS Lett.**, v. 587, n. 23, p. 3815–3823, 2013.

YADAV, S.; PUTHENVEEDU, M. A.; LINSTEDT, A. D. Golgin160 recruits the dynein motor to position the Golgi apparatus. **Dev. Cell**, v. 23, n. 1, p. 153-165, 2012.

YAO, T-P. The role of ubiquitin in autophagy-dependent protein aggregate processing. **Genes & Cancer**, v. 1, n. 7, p. 779-786, 2010.

ZHU, K.; DUNNER, K.; MCCONKEY, D. J. Proteasome inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human prostate cancer cells. **Oncogene**, v. 29, n. 3, p. 451–462, 2010.