



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

THATYANNE GRADOWSKI FARIAS DA COSTA DO NASCIMENTO

**INDUÇÃO DA MORTE CELULAR EM NEUROBLASTOMA:
INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO DA SALIVA BRUTA DO CARRAPATO
*Amblyomma sculptum***

CURITIBA

2018

THATYANNE GRADOWSKI FARIAS DA COSTA DO NASCIMENTO

**INDUÇÃO DA MORTE CELULAR EM NEUROBLASTOMA:
INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO DA SALIVA BRUTA DO CARRAPATO
*Amblyomma sculptum***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Selene Elifio Esposito

CURITIBA

2018

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Edilene de Oliveira dos Santos CRB 9 / 1636

Nascimento, Thatyanne Gradowski Farias da Costa do
N244i 2018 Indução de morte celular neuroblastoma : investigação da ação da saliva
bruta do carrapato *Amblyomma Sculptum* / Thatyanne Gradowski Farias da
Costa do Nascimento ; orientadora, Selene Elifio Esposito. -- 2018
78 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2018
Bibliografia: f. 71-78

1. Câncer. 2. Tumores – Tratamento. 3. Neuroblastoma. 4. Quimioterapia.
I. Elifio-Esposito, Selene Lobo. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 616.994

Dedicatória

*Dedico esse trabalho aos meus pais Renato e Denise
pelo apoio incondicional, e incentivo de superar
meus limites para ir cada vez mais longe.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por estar ao meu lado e me guiar durante os momentos difíceis, me dando forças para superar as dificuldades.

Agradeço a **minha família**, por sempre acreditarem em mim, me fazendo cada vez ir mais longe. Em especial aos meus pais, **Renato e Denise** e meu irmão, **Renato**; por sempre se preocuparem comigo e me ajudarem nesta trajetória, principalmente pela compreensão nas noites em claro, nos compromissos adiados, nos momentos de estresse. Oferecendo o que cada um de vocês tem de melhor: amor, carinho, companhia, passeios, inspiração, sabedoria e união.

A **minha orientadora**, Professora Doutora **Selene Elifio Esposito** pela oportunidade, e especialmente pela amizade construída nesses anos. Sou muito grata pela oportunidade a mim concedida, pelo crédito ao meu trabalho e por me ensinar tantas coisas que não são possíveis de serem aprendidas em livros. E principalmente por me proporcionar a chance de trabalhar ao lado de pessoas que ajudaram a superar meus limites e pela impecável condução deste trabalho.

Agradeço a colaboração da Dra. Simone Michaela Simons do Laboratório de Parasitologia, do instituto Butantan, pela parceria firmada ao longo desse projeto.

À **equipe** do Laboratório Experimental Multiusuário, em especial a **Irenice** por estar sempre por perto e facilitar o desenvolvimento dos experimentos, fornecendo suporte técnico, transmitindo conhecimento e pela sua amizade.

Aos **amigos e colegas** do Laboratório Experimental, pela paciência e ajuda nas horas difíceis e por promoverem um ambiente amigável, estando sempre dispostos a dividir boas conversas. Em especial a **Marcela Netipanyj** que esteve comigo desde o início dessa jornada, enfrentando a todos os desafios, sendo um ombro amigo, e uma pessoa para me espelhar. A **Luana, Maria Helena e Vitória** pela ajuda nas etapas do desenvolvimento do trabalho, conversas e risadas no cultivo celular.

A todos aqueles que de alguma forma me auxiliaram para realização deste trabalho.

À Capes/Fundação Araucária pelo suporte financeiro e a PUCPR pela infraestrutura.

EPÍGRAFE

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

RESUMO

O neuroblastoma (NB) é um tumor pediátrico com grande heterogeneidade clínica, que sozinho representa 15% das mortes entre os cânceres infantis. Pode variar desde a regressão espontânea à progressão para uma manifestação muito agressiva da doença, levando à necessidade de diferentes estratégias terapêuticas específicas para as diferentes manifestações da doença. Secreções e venenos de animais compreendem misturas de moléculas biologicamente ativas disponível na natureza e são fontes promissoras de compostos terapêuticos. A saliva bruta (SB) de carrapatos ainda é pouco explorada, mas surge como uma fonte de moléculas com potencial antitumoral. O objetivo geral deste projeto foi avaliar o potencial apoptótico da SB do carrapato *Amblyomma sculptum* em células de NB. A toxicidade da saliva foi testada em quatro diferentes linhagens de NB e em uma linhagem de fibroblastos humanos pelo teste do azul de metileno, usando diferentes concentrações da saliva (dosagem inicial de 20% (v/v), seguida pela sua diluição seriada), por 24, 48 e 72h. Marcadores de morte celular, tais como Anexina V/7-AAD, Caspase 3 ativada e potencial mitocondrial foram analisados por citometria de fluxo. A saliva foi tóxica para todas as linhagens de forma dose e tempo dependente, com queda de pelo menos 70% na viabilidade das linhagens de células tumorais e de aproximadamente 40% para os fibroblastos, para o tempo de 72h, na maior concentração testada. Nessa mesma concentração, apenas as células da linhagem SK-N-SH apresentaram aumento no teor de células marcadas positivamente para Anexina/7AAD e Caspase-3-ativada. As outras linhagens apresentaram resultados que sugerem o envolvimento de outras vias de morte além da apoptose. Com exceção da linhagem SK-N-SH, não houve alteração significativa no potencial mitocondrial pela incubação com a SB nas células tumorais. Por outro lado, os fibroblastos demonstraram diminuição na atividade mitocondrial em 48h de incubação, mas a atividade foi normalizada na incubação por 72h. Estes resultados apresentam uma nova perspectiva para o uso da SB como um agente antitumoral, todavia mais estudos são necessários para a caracterização das moléculas presentes e suas funções.

ABSTRACT

Neuroblastoma (NB) is a pediatric cancer with a wide range of clinical features, which alone accounts for 15% of deaths among childhood cancers. It presents a tendency for spontaneous regression to progression for a very aggressive manifestation of the disease. In the highly aggressive stages, tumor cells can be resistant to chemotherapy drugs. The way in which this occurs was not yet clarified, leading to the need for the study of new therapeutic agents. Animal secretions and poisons comprise mixtures of active molecules available in nature and promising sources of therapeutic components. The tick crude saliva is still little explored, and appears as a source of molecules with antitumor activity. The aim of this project was to evaluate the apoptotic potential of the crude saliva (CS) of the tick *Amblyomma sculptum* on NB cell lines. Saliva toxicity was tested in four neuroblastoma cell lines, and one non-tumoral human fibroblasts foreskin by the Methylene Blue assay using different concentrations of saliva [initial dose 20% (v/v) followed by serial dilution] for 24, 48 and 72 hour. Cell death markers, such as Annexin/7-AAD, activated Caspase 3 and mitochondrial potential were analyzed by flow cytometry. CS was toxic to all lineages in a dose-dependent manner, with a decrease of at least 70% in the viability of the tumor cell lines and approximately 40% for the fibroblasts at 72h in the highest concentration tested. At the same dose, only SK-N-SH presented a combined increase in positively Annexin/7-AAD and Caspase-3-activated. The others lineages present results that suggest other pathways of death, besides apoptosis. With the exception of SK-N-SH, there was no significant change in the mitochondrial membrane potential. Non-tumoral control demonstrated a decrease at the time of 48 hour, but the activity was normalized at 72 hours, indicating a cellular recovery with the increased time incubation. These results present a new perspective for the use of CS as an antitumor agent, however further studies are needed to characterize the molecules and their functions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. INSS - Sistema Internacional de Estadiamento do Neuroblastoma ..	21
Figura 2. Esquema de interação entre as vias de morte celular.....	23
Figura 3. Desenho esquemático das duas vias da apoptose, a via intrínseca	25
Figura 4. Fluxograma da metodologia empregada	40
Figura 5. Análise da citotoxicidade da saliva bruta do <i>A. sculptum</i> , nas linhagens tumorais de neuroblastoma Be(2)-M17, SK-N-SH, CHLA-20, SH-SY5Y e na linhagem não tumoral, HFF-1.1	52
Figura 6. Análise da determinação do tipo de morte celular da linhagem de neuroblastoma SK-N-SH incubada com 20% de saliva bruta de <i>A. sculptum</i> por 72h pelos testes Anexina/7AAD e Caspase-3-Ativada.....	56
Figura 7. Análise da determinação do tipo de morte celular da linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y incubada com 20% de saliva bruta de <i>A. sculptum</i> por 72h pelos testes Anexina/7AAD e Caspase-3-Ativada.....	57
Figura 8. Análise da determinação do tipo de morte celular da linhagem de neuroblastoma Be(2)-M17 incubada com 20% de saliva bruta de <i>A. sculptum</i> por 72h pelos testes Anexina/7AAD e Caspase-3-Ativada.	58
Figura 9. Análise da determinação do tipo de morte celular da linhagem de neuroblastoma CHLA-20 incubada com 20% de saliva bruta de <i>A. sculptum</i> por 72h pelos testes Anexina/7AAD e Caspase-3-Ativada.....	59
Figura 10. Gráficos comparativos entre as linhagens de neuroblastoma para os marcadores Anexina V e 7-AAD, Caspase 3- Atvada e MitoStatus incubadas com a concentração de 20% da Saliva Bruta, pelo tempo de 72h.	60
Figura 11. Análise da determinação do tipo de morte celular da linhagem de neuroblastoma SK-N-SH incubadas com 5% de saliva bruta de <i>A. sculptum</i> por 72h pelo teste MitoStatus.....	61
Figura 12. Análise da determinação do tipo de morte celular da linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y incubadas com 5% de saliva bruta de <i>A. sculptum</i> por 72h pelo teste MitoStatus.....	62
Figura 13. Análise da determinação do tipo de morte celular da linhagem de neuroblastoma Be(2)-M17 incubadas com 5% de saliva bruta de <i>A. sculptum</i> por 72h pelo teste MitoStatus.	63

Figura 14. Análise da determinação do tipo de morte celular da linhagem de neuroblastoma CHLA-20 incubadas com 5% de saliva bruta de <i>A. sculptum</i> por 72h pelo teste MitoStatus.	64
Figura 15. Análise da determinação do tipo de morte celular da linhagem HFF-1 incubada com 5% de saliva bruta de <i>A. sculptum</i> por 48 e 72h pelo teste de MitoStatus.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localizações mais frequentes do neuroblastoma, com seus respectivos sinais e sintomas associados.....	17
Tabela 2. Proteínas anti e pró-apoptóticas envolvidas na via intrínseca da apoptose.....	26
Tabela 3. Efeitos biológicos de moléculas associadas a diferentes carrapatos.	33
Tabela 4. Estudos realizados com saliva ou glândula salivar de forma cronológica.....	35
Tabela 5. Classificação das linhagens celulares de neuroblastoma segundo sua morfologia.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD → 7-Aminoactinomycin D

Be(2)-M17 → linhagem tumoral de neuroblastoma

CHLA-20 → linhagem tumoral de neuroblastoma

DMEM → Dulbecco's Modified Eagle's Medium

HFF-1 → linhagem não tumoral de fibroblastos

INSS → Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma

INGR → Sistema Internacional de Grupos de Risco de Neuroblastoma

NB → Neuroblastoma

SB → Saliva Bruta

SFB → Soro Fetal Bovino

SH-SY5Y → linhagem tumoral de neuroblastoma

SK-N-SH → linhagem tumoral de neuroblastoma

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Neuroblastoma	17
1.1.1. Estadiamento e Tratamento	18
1.2 Morte Celular Programada	22
1.2.1. Apoptose	23
1.2.1.1 Via Intrínseca	25
1.2.1.2 Via extrínseca	27
1.3 Carrapatos	28
1.3.1. Saliva dos Carrapatos	31
2. JUSTIFICATIVA.....	38
3. OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos específicos:	39
4. MÉTODOS.....	40
4.1 Obtenção da saliva bruta	40
4.2 Cultivo, Manutenção e Caracterização das Linhagens Celulares	41
4.3 Estudo da viabilidade celular	42
4.3.1. Citotoxicidade	42
4.3.2. Clonogênico.....	42
4.4 Análise da indução da apoptose.....	43
4.5 Análise estatística.....	44
5. RESULTADOS	45
6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONCLUSÃO	71
8. REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença multifatorial que pode ser desencadeada por diferentes fatores de transformação celular, responsáveis pelo início da formação tumoral e sua progressão. Entre esses fatores podem ser citados: (i) o escape de fatores de crescimento, (ii) imortalidade, (iii) indução da angiogênese, (iv) resistência à morte, entre outras. Esses fatores são essenciais para que o tumor consiga, além de um ambiente para seu desenvolvimento, escapar de mecanismos desenvolvidos pelo organismo e da ação de agentes terapêuticos (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O câncer é um problema de saúde pública mundial e o número de casos tem aumentado consideravelmente ao longo dos últimos anos, ultrapassando até mesmo o número de mortes ocasionadas por doenças coronárias e acidentes vasculares cerebrais, especialmente nos países desenvolvidos (FERLAY et al., 2015). Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), até o ano de 2025 devem ser diagnosticados aproximadamente 20 milhões de novos casos (FERLAY et al., 2015). Em 2012, a GLOBOCAN estimou 9,1 milhões de novos casos de câncer, com 4,4 milhões de mortes entre as idades de 0 e 69 anos. O câncer de pulmão é o mais abundante, tanto em novos casos (1,8 milhões de casos, 12,9% do total), quanto em óbitos (1,6 milhões de óbitos, 19,4%). O câncer de mama, apesar de ser o segundo mais comum (1,7 milhões de casos, 11,9%), ocupa o 5º lugar como causa de óbito (522.000, 6,4%). Em terceiro lugar o câncer colorretal (1,4 milhões de casos, 693.000 mortes), seguido pelo câncer de próstata (1,1 milhões de casos, 307.000 mortes), estômago (951.000 casos, 723.000 óbitos) e fígado (782.000 casos e 745.000 mortes) (FERLAY et al., 2015).

Estima-se que o câncer pediátrico corresponda a uma porcentagem entre 1 a 4% em toda a população mundial, variando em países desenvolvidos e em desenvolvimento. No Brasil, é esperado para o biênio 2018-19, 450.000 novos casos de câncer (excluindo os tumores de pele não melanoma), com aproximadamente 12.500 destes afetando crianças e adolescentes até 19 anos de idade (INCA, 2018).

Dentre os tumores pediátricos, os mais comuns são: leucemia, tumores do sistema nervoso, e linfomas (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Os tumores

do sistema nervoso periférico simpático são responsáveis por 7,8% de todos os cânceres em crianças menores de 15 anos no mundo, e no Brasil essa representação corresponde a cerca de 4% do total de tumores infanto-juvenis (INCA, 2016). Nesse grupo, espera-se que 20% dos tumores sejam representados pelo trio, neuroblastoma, retinoblastoma, e o tumor de Wilms (INCA, 2016).

O tratamento do câncer envolve o uso de um conjunto de estratégias terapêuticas, tais como cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Entre elas, a quimioterapia é uma das mais utilizadas, visando essencialmente à indução da morte das células tumorais (KHAN et al., 2015). É uma terapia sistêmica, sendo mais indicada para pacientes que apresentem metástase ou uma doença localmente avançada (MASTRANGELO et al., 2011). No entanto, algumas das células neoplásicas apresentam resistência natural aos quimioterápicos ou adquirem a resistência à morte ao longo do tratamento, o que contribui para a reincidência e mortalidade da doença (LABI; ERLACHER, 2015).

Os venenos e outras secreções de animais são misturas de componentes biologicamente ativos e dessa forma se caracterizam como importantes fontes de alternativas terapêuticas com alvo em diferentes mecanismos celulares (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010). O fato de serem capazes de desencadear diferentes respostas biológicas, de acordo com sua composição, possibilita a seleção de novos alvos no tratamento de doenças. Recentemente foi demonstrado que a saliva dos carrapatos contém compostos bioativos com potenciais aplicações médicas (SOUSA et al., 2015). Desta forma, a identificação e a caracterização estrutural e funcional de seus componentes podem mostrar uma perspectiva diferente na busca de agentes antitumorais de fácil obtenção e ação direcionada.

1.1 Neuroblastoma

O neuroblastoma (NB) é um tumor embrionário do sistema nervoso simpático, derivado das células da crista neural (RATNER et al., 2016). Dentre os cânceres infantis o NB é o mais comum a ser diagnosticado no primeiro ano de vida, representando cerca de 15% das mortes. A sua ocorrência é predominantemente observada na primeira infância, principalmente entre 0 e 5 anos, sendo diagnosticado em idade média de 18 meses (KAMIHARA et al., 2017; MATTHAY et al., 2016; MLAKAR et al., 2017).

Devido à origem de suas células, o NB pode ocorrer em qualquer local em que o tecido neural simpático é encontrado, com maior frequência na medula da glândula adrenal (**Tabela 1**) (GARNER; BEIERLE, 2015), e pode apresentar metástase na medula óssea, linfonodos e fígado (MULLASSERY; LOSTY, 2016). A localização do tumor primário pode estar associada à idade e ao desfecho clínico (IRWIN; PARK, 2015).

Tabela 1. Localizações mais frequentes do neuroblastoma, com seus respectivos sinais e sintomas associados.

Localização	Sinais e Sintomas
Abdomem/pelve	Dor, constipação, distensão, retenção urinária, hipertensão
Tórax	Estresse respiratório, Síndrome de Horner
Pré-sacral e paraespinal	Sintoma de compressão de corda (retenção urinária, paraplegia)
Pescoço	Massa/Inchaço
Metástases	Irritabilidade, dor nos ossos, citopenias, febre, perda de peso
Metástase 4S	Hepatomegalia, coagulopatia, hiperbilirrubinemia, dificuldade respiratória (do aumento abdominal), nódulos de pele

Fonte: Adaptado de (IRWIN; PARK, 2015).

O desenvolvimento do NB pode ser entendido como uma falha na diferenciação das células da crista neural (RATNER et al., 2016). Isto poderia explicar sua natureza clínica altamente heterogênea, podendo se manifestar como tumores que sofrem regressão espontânea ou tumores com perfil altamente agressivo (ALBANUS et al., 2013; MATTHAY et al., 2016). A

agressividade costuma ser relacionada com o grau de diferenciação celular: quanto mais diferenciado, menor a agressividade e potencial metastático (MOHLIN; WIGERUP; PÅHLMAN, 2011). A heterogeneidade celular também é encontrada nas linhagens celulares derivadas deste tipo de tumor que fornecem assim, modelos celulares com fenótipos diferenciados. As células que se assemelham com neurônios simpáticos imaturos, são classificadas como *N-type*, e as células semelhantes as células de Schwann do sistema nervoso periférico, classificadas como *S-type* (RATNER et al., 2016). Dentre as linhagens de NB que são usadas para estudos *in vitro*, além desses dois fenótipos característicos, existe um terceiro, o *I-type*, que seria um intermediário entre elas (PEZZINI et al., 2017). Os tumores seriam então resultantes de uma mistura desses tipos celulares, em diferentes proporções e graus de associação.

1.1.1. Estadiamento e Tratamento

O Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma (INSS) o classifica em cinco estadios diferentes: 1 a 3 são os tumores localizados, baseados na quantidade de ressecção e invasão local. O estadio 4 é definido por metástases distantes e o 4S é caracterizado por metástase no fígado, pele ou medula óssea. Este último é associado a desfecho clínico favorável, pois tem propensão à regressão espontânea (IRWIN; PARK, 2015; PINTO et al., 2015). As características específicas de cada estágio da doença podem ser observadas na **Figura 1**.

Além da classificação pelo INSS existem também outros fatores, tais como a classificação de Shimada que leva em conta o perfil histológico e a idade no diagnóstico, e importantes determinantes genéticos, dentre eles a amplificação dos genes NMYC e ALK e deleções nas regiões cromossômicas 1p e 11q. O sistema de classificação *International Neuroblastoma Risk Group Classification System* (INGR), leva em consideração critérios patológicos, cirúrgicos, além de marcadores biológicos do tumor, como por exemplo, o perfil genético (PINTO et al., 2015). Este sistema classifica os tumores em quatro diferentes categorias: L1 (tumores que não estão envolvidos com estruturas vitais e confinados a um compartimento), L2 (tumor locorregional), M (metástase distante), MS (metástase em crianças mais jovens que 18 meses) (IRWIN; PARK, 2015).

Um sistema de classificação não exclui o outro, e devem ser utilizados em paralelo, cada qual com suas características e vantagens no momento de avaliação e diagnóstico do paciente. A associação entre as classificações pelo INSS, INGR, Shimada e demais fatores de risco permitem estratificar o NB em três diferentes grupos: de baixo, intermediário e de alto risco (LONERGAN; SCHWAB, 2002; LOUIS; SHOHET, 2015). Segundo a Sociedade Americana de Câncer (*American Cancer Society*) crianças do grupo de baixo risco têm taxa de sobrevivência em cinco anos superior a 95%. No grupo de risco intermediário, a taxa de sobrevivência é de 90% a 95% em cinco anos e no grupo de alto risco é de cerca de 40% a 50% (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

O tratamento do NB consiste inicialmente na ressecção total do tumor, para os casos menos agressivos ou com regressão espontânea, e quimioterapia, para os casos mais agressivos e de alto risco.

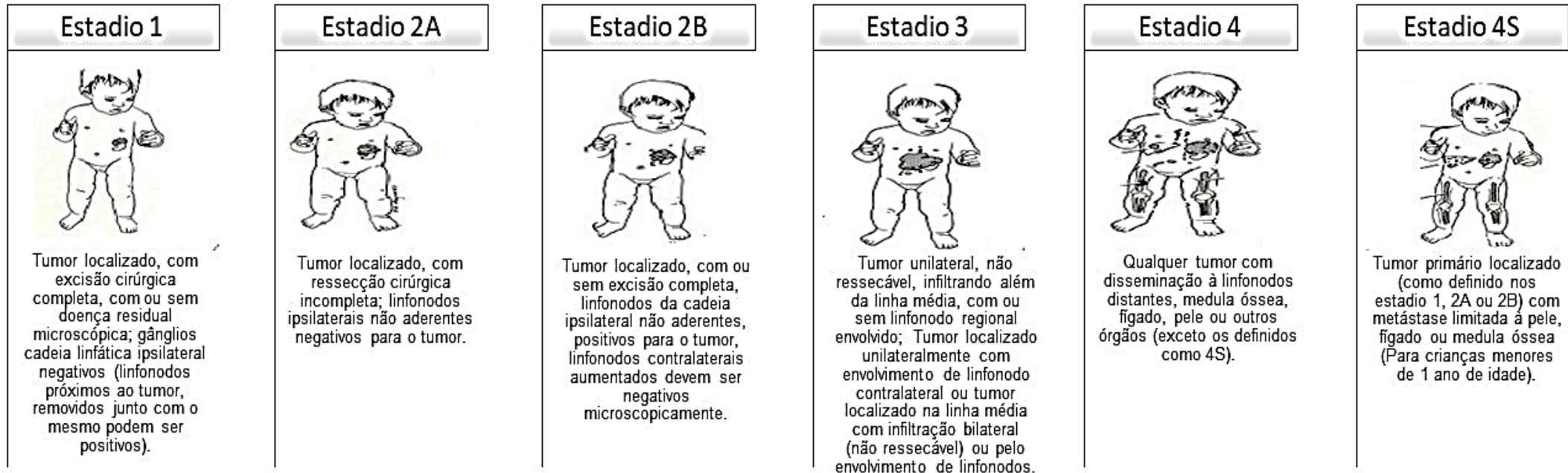
A quimioterapia pode ocorrer antes da cirurgia (neoadjuvante) ou após (adjuvante) e, neste caso é consolidada em três etapas: a indução da remissão, a consolidação da remissão e a fase de manutenção, que terá como objetivo a erradicação da doença residual mínima (KHAN et al., 2015; MARIS, 2010). As drogas mais comumente utilizadas no tratamento do neuroblastoma são: ciclofosfamida, carboplatina, vincristina, doxorubicina, etoposide, topotecan e melfalan. A dose para o tratamento é limitada devido aos efeitos colaterais gerais ou específicos para cada droga (MASTRANGELO et al., 2011).

A radioterapia utiliza radiações ionizantes para destruir ou inibir o crescimento das células tumorais. Existem vários tipos de radiação, porém as mais utilizadas são as eletromagnéticas (raios X e gama) e os elétrons (disponíveis em aceleradores lineares de alta energia). Mesmo que seja parte necessária para o tratamento, a radioterapia é evitada sempre que possível em tumores pediátricos (JAIRAM; ROBERTS; YU, 2013). Entre os efeitos colaterais a longo prazo está a pré-disposição a novos tumores. A curto prazo, o que se percebe, é uma forte inclinação para a seleção de células resistentes (LABI; ERLACHER, 2015).

Além da cirurgia, quimioterapia e radioterapia, classificados como tratamentos convencionais, outros tratamentos têm emergido para o NB. Entre essas novas abordagens estão a indução da diferenciação, transplante de células tronco e imunoterapia (ESPOSITO et al., 2017; MATTHAY et al., 2016).

Mas apesar dos avanços na pesquisa para o entendimento da biologia do tumor e também para o tratamento, o NB de alto risco permanece sendo um dos mais difíceis tipos a ser tratado (KHAN et al., 2015).

Figura 1. INSS - Sistema Internacional de Estadiamento do Neuroblastoma



Fonte: Adaptado de (IRWIN; PARK, 2015)

1.2 Morte Celular Programada

A morte celular programada é um processo essencial, que ocorre naturalmente ao longo da vida de organismos multicelulares (LI; NAKAGAWARA, 2013). É considerada uma proteção intrínseca do organismo, capaz de erradicar células com alguma alteração funcional, ou genotoxicidade, antes que essa possa desencadear um desequilíbrio associado com doenças degenerativas, tumorigenese e quimioresistência (PANDEY et al., 2016).

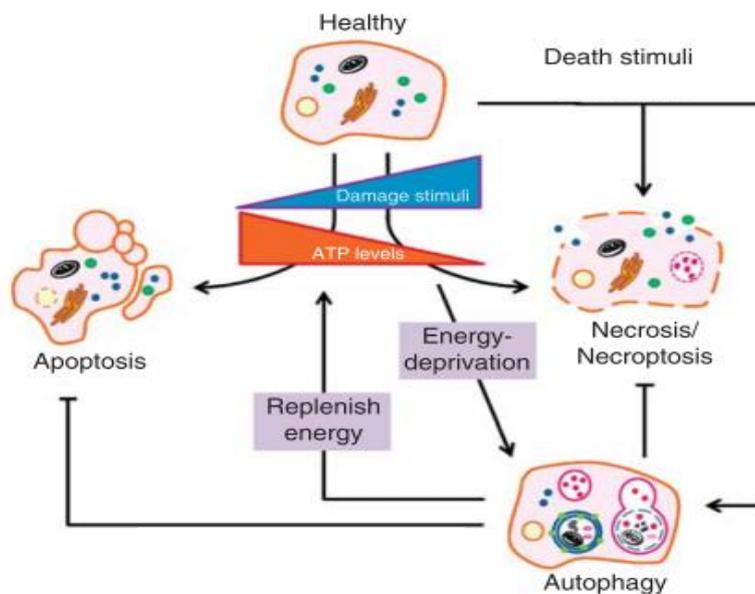
Inicialmente o termo morte celular programada se referia somente à apoptose. Contudo, sabe-se atualmente que as células podem progredir para outros mecanismos de morte como a autofagia e a necrose (BRO; KRUYT; GIACCONE, 2005; LI; NAKAGAWARA, 2013), cada qual com características bioquímicas e morfológicas distintas, como mostra a **Figura 2**.

A autofagia permite à célula sustentar o metabolismo energético para a sobrevivência em resposta ao estresse e pode ocorrer como um processo completo de morte ou apenas seletivo para a eliminação de estruturas celulares específicas (LONG; RYAN, 2012). Seu mecanismo de atuação é dependente da formação de um autofagossomo, uma estrutura de membrana dupla que se liga aos lisossomos e permite a degradação do material (GREEN; LLAMBI, 2015).

A necrose apresenta características pontuais que a diferem muito da apoptose: existe uma perda da integridade da membrana plasmática, independência da via das caspases, indução da resposta imune e inflamatória, devido ao extravasamento do conteúdo celular, entre outras (CHEN; YU; ZHANG, 2016; LONG; RYAN, 2012). A necrose pode ocorrer por um dano à integridade celular, devido a fatores como altas temperaturas, estresse mecânico, onde o processo não exige uma ativação de via de sinalização particular, ou pode ocorrer através de um processo regulado através de uma cascata de sinalização, dependente de quinases, onde pode ser chamada de necroptose (GREEN; LLAMBI, 2015).

Verifica-se assim que o processo da morte celular não é único, mas sim heterogêneo e complicado. Seria muito simplificado afirmar que a manutenção do organismo, contra células indesejadas e potencialmente prejudiciais, dependesse apenas de um mecanismo (BRO; KRUYT; GIACCONE, 2005; LI; NAKAGAWARA, 2013).

Figura 2. Esquema de interação entre as vias de morte celular. Uma célula saudável pode sofrer estímulos/danos (como diminuição de níveis de ATP, ou estímulos de morte), sendo direcionada para diferentes tipos de morte celular, como autofagia, necrose e/ou apoptose. Dentro desses processos a autofagia é único tipo que apresenta um processo reversível, podendo impedir estímulos celulares que podem levar a necrose e apoptose.



Fonte: (LONG; RYAN, 2012)

1.2.1. Apoptose

O conceito de apoptose foi introduzido pela primeira vez em meados da década de 60, e teve seu termo pela primeira vez ilustrado em 1972 (BREDESEN; RAO; MEHLEN, 2006). Esse processo foi classificado como um mecanismo de suicídio celular altamente organizado, capaz de eliminar células danificadas sem causar danos as células circundantes. Regulado através da manutenção de um equilíbrio entre a expressão de proteínas anti- e pró-apoptóticas (KELLY; STRASSER, 2011).

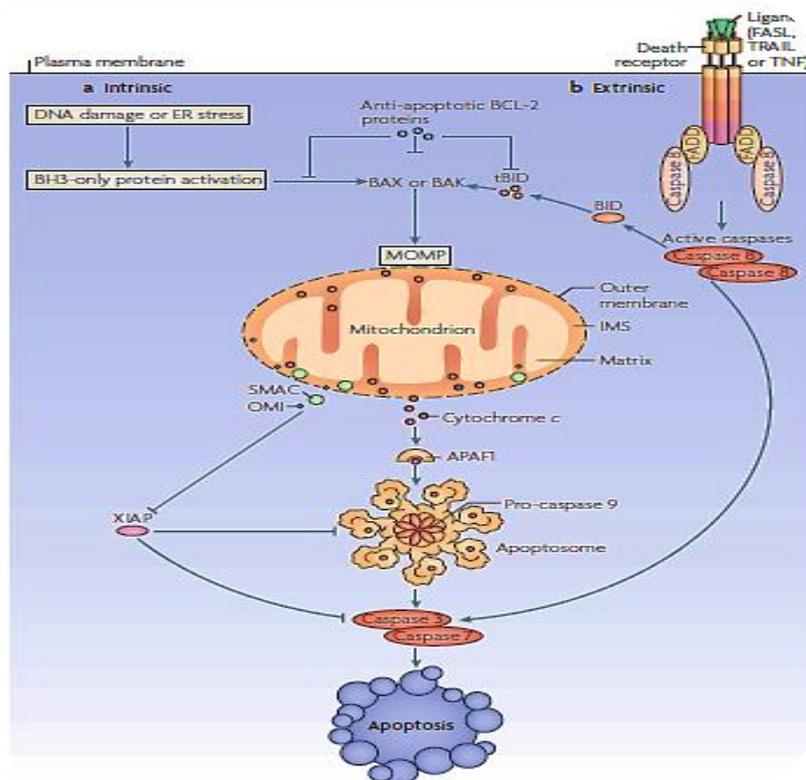
Apresentando duas vias que podem ser ativadas, um fator em comum em ambas, é a ativação das caspases, um grupo de cisteíno-proteases (BREDESEN; RAO; MEHLEN, 2006). Dentre as caspases são identificados dois grupos, as caspases iniciadoras e as caspases efetoras. O primeiro grupo é formado pelas caspases 2, 8 e 9, iniciadoras do processo de apoptose. Sem a

ativação destas, as caspases efetoras 3, 6 e 7, não são capazes de executar suas funções (LONG; RYAN, 2012).

As vias de sinalização para a apoptose, como demonstrado na **Figura 3**, são: a via intrínseca, também conhecida como mitocondrial e a via extrínseca, ou dos receptores de morte. As duas são altamente coordenadas e dependentes de energia. Envolvem proteínas da família das caspases na ativação de uma cascata proteolítica que desencadeiam alterações morfológicas tais como formação de bolhas na membrana plasmática, encolhimento da célula, condensação da cromatina e fragmentação do DNA, vinculando os estímulos iniciais à morte celular (ELMORE, 2007; FULDA; DEBATIN, 2006).

Nos mais diversos tipos celulares, uma via quando ativada não precisa necessariamente excluir a outra, na verdade há uma comunicação cruzada, a qual é responsável pela ativação de ambas as vias ao mesmo tempo (GOLDSMITH; HOGARTY, 2005).

Figura 3. Desenho esquemático das duas vias da apoptose, a via intrínseca e a via extrínseca.



Fonte: (TAIT; GREEN, 2010)

1.2.1.1 Via Intrínseca

A ativação da via intrínseca acontece por meio de estímulos intracelulares, tais como danos no DNA, ativação de oncogenes, estresse celular e privação de fatores de crescimento. Seu funcionamento é dependente de diversas vias moleculares altamente coordenadas que envolvem proteínas anti- e pró- apoptóticas, que pertencem a família Bcl-2 (*B cell lymphoma protein 2*) (FULDA; DEBATIN, 2006). Para a manutenção da homeostase, é essencial que haja o equilíbrio entre as proteínas dos dois grupos, principalmente para impedir que ocorra morte de células saudáveis do organismo (STRASSER; CORY; ADAMS, 2011).

A primeira proteína a ser descrita foi a Bcl-2, que deu o nome a família, identificada em linfócitos provenientes de linfoma folicular de células B. Desde sua descrição muitas outras proteínas reguladoras da apoptose vem sendo classificadas. As proteínas dessa família apresentam em sua estrutura, regiões homólogas, que são denominadas domínios BH, sendo que entre elas podem

ter uma ou mais dessas regiões em comum (WEYHENMEYER et al., 2012). Os domínios BH subdividem essas proteínas, em duas subfamílias com funções distintas, sendo elas anti e pró-apoptóticas, como apresentado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Proteínas anti e pró-apoptóticas envolvidas na via intrínseca da apoptose.

Anti-apoptóticas	<p>Bcl-2, Bcl-xL - <i>Bcl-2-related protein long form of Bcl-x</i>, Bcl-x - <i>Bcl-2-like 1 protein</i>, Bcl-w - <i>Bcl-2-like 2 protein</i>, Mcl-1 - <i>Myeloid Cell Leukemia 1</i>, Bfl-1 - <i>Bcl-2 related gene expressed in fetal liver</i>).</p>
Pró-apoptóticas	<p>Proteínas efectoras: Bak, Bax e Bok - <i>Bcl-2 related ovarian killer</i> BH3 only (dois grupos): BH3 <i>only</i> ativadoras diretas: Bid - <i>BH3-interactin domain</i>, Bim - <i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>; BH3 <i>only</i> sensibilizadoras: Noxa - <i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>, Puma - <i>p53 Upregulated Modulator of Apoptosis</i>, Bad - <i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>, Bik - <i>Bcl-2-interacting killer</i>, BMF - <i>Bcl-2-Modifying Factor, HRK (Harakiri)</i></p>

Fonte: Autor, (OPFERMAN, 2016; STRASSER; CORY; ADAMS, 2011).

O que irá diferenciar um grupo de BH3 *only* do outro é a sua habilidade de interagir com as proteínas Bcl-2 anti e pró-apoptóticas. As ativadoras diretas são as responsáveis pela oligomerização de Bax e Bak, permitindo a

permeabilização da membrana mitocondrial externa, liberando fatores pró-apoptóticos, tais como citocromo c, Smack/ DIABLO e Omi que uma vez liberados no citoplasma permitem a montagem do complexo de ativação das caspases, o apoptossomo e a interação com a APAF1 e principalmente a caspase 9 (*Apoptotic protease activating factor*), resultando na destruição da célula (GREEN; LLAMBI, 2015; LETAI, 2017; SEGAWA; NAGATA, 2015). Essa ação pode ser inibida, quando proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas se ligam diretamente a essas proteínas, impedindo que os sinais subsequentes ocorram e a função das proteínas sensibilizadoras, é a de neutralizar a ação dessas proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas, impedindo que elas interrompam a oligomerização de Bax ou Bak (GREEN; LLAMBI, 2015).

1.2.1.2 Via extrínseca

A via extrínseca exige a ligação de fatores de morte a receptores de superfície celular específicos, que pertencem a família dos receptores de Fator de Necrose Tumoral (TNF). Dentre esses receptores podem ser citados TNF 1, CD95 (APO-1, Faz), TRAIL *TNF-related apoptosis-inducing ligand*, TRAIL-R1 e TRAIL-R2 (VERBRUGGE; JOHNSTONE; SMYTH, 2010).

Uma vez que os receptores são acionados pelo ligante, formam um complexo de indução de sinalização de morte (DISC), pelo recrutamento do composto Fas associado com o domínio de morte (FADD) e pró-caspase 8 e/ou 10 (ASHKENAZI, 2008). Assim que ocorre a formação do complexo, a caspase 8 é processada para sua forma ativa, liberada no citoplasma e participa da ativação das caspases efetoras no final do processo da via de morte. A ativação da caspase 8 pode ocorrer isolada, ativando as caspases efetoras, ou simultaneamente à ativação da via intrínseca, mediada por proteínas BH3 *only* (ASHKENAZI, 2008; SEGAWA; NAGATA, 2015). Essa característica classifica os tipos de morte em I e II, onde o tipo I atua de forma independente, apenas com as caspase 8, e o tipo II, dependente da ativação da via intrínseca, que recruta uma proteína pró-apoptótica, a Bid, que é clivada pela caspase 8, capaz de neutralizar Bcl-2, culminando na ativação das duas vias simultaneamente (POWLEY et al., 2016; SEGAWA; NAGATA, 2015). Visto que os receptores de morte são amplamente expressos em células tumorais, e apresentam um alvo

que pode ser acessado através de medicamentos, tem se tornado um importante objeto de estudo para novas terapias para o tratamento do câncer (SAYERS, 2011).

Diversos são os mecanismos capazes de alterar as vias da apoptose, como a dependência da expressão de proteínas regulatórias, inativação do gene p53, desregulação da via Fas-dependente, super expressão de proteínas anti-apoptóticas. Estes são descritos como agentes capazes de desencadear resistência a drogas em células tumorais. Desta maneira, evidenciando que mesmo que haja um estímulo para a morte celular, não há garantias de que a via seja finalizada de fato (IOLASCON et al., 2003).

As células progenitoras das células neuronais do sistema nervoso simpático, apresentam como característica, uma proteção contra a ativação da via extrínseca. Essas células não expressam a caspase 8, além de apresentarem uma alta expressão da proteína PED/PEA 15, um inibidor de DISC, fazendo com que essas células ativem predominantemente a via intrínseca da apoptose. Nas linhagens de neuroblastoma essa perda da caspase-8 pode ocorrer por silenciamento ou deleção de genes. Essa característica é observada principalmente nas linhagens com um perfil mais agressivo e metastático (BORRIELLO et al., 2016). Todavia nem todas as células de neuroblastoma apresentam essa perda da caspase 8. Principalmente porque quando presente, a caspase-8 pode apresentar como uma função paralela promover migração e metástase em linhagens celulares de neuroblastoma de uma maneira que não depende da sua atividade proteolítica e apoptótica, mas que é regulada pelo contato com a matriz extracelular (BORRIELLO et al., 2016).

1.3 Carrapatos

Os carrapatos constituem um dos mais importantes grupos de artrópodes parasitas hematófagos de animais domésticos, silvestres e do homem. Pertencem à subclasse Acari da classe Arachnida, ordem Ixodida. É um grupo com cerca de 900 espécies descritas e reconhecidas como válidas (NAVA et al., 2014), distribuídas em três famílias: Argasidae, Nuttalliellidae e Ixodidae.

Estão distribuídos desde os trópicos até regiões subárticas, apresentando a maior diversidade nas regiões tropicais e subtropicais (NARASIMHAN;

FIKRIG, 2015). Aproximadamente 10% das espécies conhecidas apresentam alguma significância médica ou veterinária (DE LA FUENTE et al., 2017) .

Os carrapatos apresentam três estágios de vida (larva, ninfa e adulto), com ciclos de alimentação variando nas diferentes famílias, principalmente entre os “carrapatos moles” (*Argasidae*) e “carrapatos duros” (*Ixodidae*). Essas duas famílias, em particular, apresentam características muito bem definidas e distintas, modulando diferentes estratégias de alimentação para o desenvolvimento (KADA; MCCOY; BOULINIER, 2017; MANS et al., 2012).

A família *Ixodidae* apresenta 702 espécies de carrapatos (GUGLIELMONE et al., 2010) e são encontrados em diversos ambientes. O ciclo de vida dos “carrapatos-duros” compreende as fases de ovo (estágio inativo), larva, um único estágio ninfal e adulto (estágios ativos). Cada estágio requer vários dias de fixação no hospedeiro e longos repastos sanguíneos, havendo uma alimentação em cada fase antes da muda, sendo que as fêmeas ingurgitam totalmente, para produção de milhares de ovos e os machos alimentam-se intermitentemente, podendo permanecer muito tempo sobre o hospedeiro (por aproximadamente quatro meses). As fêmeas dessa família realizam uma única oviposição e morrem em seguida (OLIVER, 1989). Seu ciclo de vida leva em média um ano para estar completo (MOURA-MARTINIANO et al., 2017). Nesta família é observada uma maior dispersão da espécie, uma vez que o carrapato é levado junto com o hospedeiro quando o mesmo se locomove (KADA; MCCOY; BOULINIER, 2017).

Os argasídeos compreendem 193 espécies conhecidas (GUGLIELMONE et al., 2010). Os “carrapatos-moles” contrastam bastante com a morfologia dos “carrapatos-duros”, por não apresentarem o escudo dorsal e tendo seu aparelho bucal localizado no anterior ventral (MANS et al., 2012). São carrapatos encontrados abundantemente em habitats áridos e semiáridos, próximos a seus hospedeiros. O ciclo de vida dessa família compreende as fases de ovo (estágio inativo), larva, vários estágios ninfais e adultos (estágios ativos). Uma das características que define a família *Argasidae* é a rápida ingurgitação de ninfas e adultos, com duração de 30 a 40 minutos, enquanto que as larvas da maioria das espécies se fixam no hospedeiro por aproximadamente 7 a 10 dias, entretanto há espécies em que as larvas não se alimentam, fazem a ecdise direto para ninfa do estágio 1. De maneira geral, larvas e ninfas necessitam de uma

alimentação antes de cada ecdise, e os adultos se alimentam múltiplas vezes, inclusive antes das cópulas e oviposição (HOOGSTRAAL, 1985).

Durante a alimentação, ambas as famílias, podem ser utilizadas como vetores (BITENCOURTH et al., 2016; NARASIMHAN; FIKRIG, 2015), proporcionando um ambiente favorável para uma infecção, multiplicação e transmissão de patógenos (DE LA FUENTE et al., 2016). Apesar dessas características específicas presentes em cada espécie, são considerados vetores com baixa especificidade com o hospedeiro, e podem se alimentar do sangue dos mais diversos vertebrados, inclusive o homem (GUGLIELMONE et al., 2006).

As diversas espécies de carrapatos apresentam diferenças na quantidade de hospedeiros que parasitam para concluírem seu ciclo de vida. Existem os ciclos monoxeno, na qual o carrapato completa todo o ciclo, de larva a adulto (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*), em apenas um hospedeiro, retornando ao ambiente já na fase adulta, o ciclo dioxeno, que necessita de dois hospedeiros (*Hyalomma*) para completar seu desenvolvimento e o ciclo trioxeno (*Amblyomma*), que compreende três hospedeiros, um para cada estágio ativo (larva, ninfa e adultos) (OLIVER, 1989).

Os animais trioxenos realizam as mudas e oviposição no ambiente. De modo geral, as larvas e ninfas dessas espécies apresentam menor especificidade, podendo parasitar diferentes espécies, inclusive os humanos, já o estágio adulto é mais específico. Essa característica faz com que os carrapatos trioxenos sejam destaques na transmissão de patógenos, pois facilita a passagem de agentes causadores de doenças de um hospedeiro para outro (OLIVER, 1989).

1.3.1 *Amblyomma sculptum*

O carrapato *Amblyomma sculptum*, previamente catalogado como *Amblyomma cajenneense* (NAVA et al., 2014), faz parte da família Ixodidae (NARASIMHAN; FIKRIG, 2015). Essa distinção foi realizada há pouco tempo, por estudos realizados, que demonstram que a espécie *A. cajenneense* (Fabricius, 1787) é um complexo de unidades taxonômicas constituído por seis espécies distintas (BEATI et al., 2013), sendo a espécie *A. cajenneense* restrita à Amazônia e ao norte do Brasil, enquanto que a *A. sculptum* tem sua

distribuição geográfica entre as Américas Central e do Sul, podendo ser encontrada em países como Argentina, Bolívia, Paraguai, e Brasil (principalmente na região Sudoeste)(ESTEVEZ et al., 2017; ESTRADA-PEÑA et al., 2014). Apresenta como hospedeiros animais selvagens e/ou domésticos, com preferência pelo cavalo, mas também tem afinidade pelo homem (ESTEVEZ et al., 2017; GUGLIELMONE et al., 2006). É o principal vetor da *Rickettsia rickettsii*, responsável pela febre maculosa (BITENCOURTH et al., 2016), tendo grande importância médica e veterinária (MOREIRA et al., 2017).

1.3.1. Saliva dos Carrapatos

A saliva dos carrapatos é uma mistura complexa de moléculas biologicamente ativas, que são inoculadas na pele do hospedeiro durante a alimentação (KAZIMÍROVÁ; ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013; RIBEIRO, 1985; WIKEL, 2013). Como a saliva de diversos outros hematófagos, como mosquitos, insetos, flebotomíneos, pulgas, sanguessugas, ancilostomídeos, morcegos, sua gama de moléculas bioativas desencadeia respostas específicas no hospedeiro (FRANCISCHETTI, 2010; HOVIUS; LEVI; FIKRIG, 2008).

A resposta natural no hospedeiro é a formação de um tampão hemostático (impedindo a perda de sangue), ativação da cascata de coagulação, vasoconstrição, resposta inflamatória (que pode produzir coceira e dor), iniciando o processo de cicatrização e remodelamento da injúria, acarretando a interrupção da alimentação e prejudicando a viabilidade e reprodução do parasita (FRANCISCHETTI, 2009; KAZIMÍROVÁ; ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013). As moléculas bioativas presentes na saliva apresentam efeitos tais como bloqueio da dor e coceira, inibição da coagulação sanguínea, ação antiplaquetária, vasodilatadora e anti-inflamatória (KAZIMÍROVÁ; ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013; WIKEL, 2013). A interferência no processo natural de dor, coagulação, fibrinólise, imunidade, inflamação, angiogênese, entre outros, permite que o carrapato consiga continuar preso ao hospedeiro e concluir o processo de ingurgitação (DE LA FUENTE et al., 2016; FRANCISCHETTI, 2009).

Existem diferenças na expressão de genes nas glândulas salivares e na composição da saliva entre todos os gêneros dos carrapatos encontrados na natureza, principalmente devido à grande gama de hospedeiros (KAZIMÍROVÁ; ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013; WIKEL, 2013). Na **Tabela 3** estão listadas algumas

substâncias primárias já identificadas de diferentes carrapatos e suas funções biológicas. As mais diferentes moléculas proteicas e não proteicas são caracterizadas com diferentes funções e interações. Dentre elas podem ser citadas as quitinases, mucinas, lectinas, além de prostaglandinas e endocanabinóides (OLIVEIRA et al., 2011). Todavia ainda existem diversos compostos não descritos, que em conjunto interagem e interferem na resposta final desencadeada por essas moléculas (OLIVEIRA et al., 2011). Entre estes, existem moléculas que são capazes de alterar respostas imunológicas, através da modulação de citocinas, proteínas e células, descritos em recentes revisões Carvalho-Costa et al. (2015), Kazimirová et al. (2017), Kotál et al.(2015).

O estudo das glândulas salivares tem se mostrado de grande importância biológica, principalmente devido ao seu grande potencial farmacológico (BOWMAN; SAUER, 2005). Quando analisada por um ponto de vista evolucionário e funcional, a saliva pode ser enquadrada como um subtipo de veneno especializado, que apresenta as mais diversas ações devido a sua variedade de moléculas ativas (CABEZAS-CRUZ; VALDÉS, 2014). É importante considerar, portanto, seu potencial como fonte de moléculas com ação terapêutica, visto que algumas apresentam baixa toxicidade e imunogeneidade em humanos, o que são características essenciais para produtos seguros (SOUSA et al., 2015), sendo assim um importante objeto de estudo para desenvolvimento de novos fármacos.

Tabela 3. Efeitos biológicos de moléculas associadas a diferentes carrapatos.

ESPECIE	MATERIAL DE ESTUDO	EFEITO BIOLÓGICO	REFERÊNCIAS
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> <i>Amblyomma variegatum</i>	Extrato da Glândula Salivar	Indução da Apoptose	(KAZIMÍROVÁ et al., 2006)
<i>Amblyomma cajennense</i>	Proteína recombinante Amblyomin-X Saliva	Inibidor do fator Xa: efeito Antitumoral e antiangiogênico Inibidor da coagulação sanguínea, da ativação e agregação plaquetária e efeito Citotóxico	(BATISTA et al., 2010; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; DREWES et al., 2012; MESQUITA PASQUALOTO et al., 2014) (SIMONS et al., 2011)
<i>Ixodes scapularis</i>	Extrato da glândula Salivar	Inibidor de angiogênese	(VALENZUELA et al., 2002)
<i>Dermacentor reticulatus</i> <i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes scapularis</i> <i>Rhipicephalus appendiculatus</i> <i>Amblyomma variegatum</i>	Extrato da Glândula Salivar	Ligação de fatores de crescimento, inibição da proliferação celular	(HAJNICKÁ et al., 2011)
<i>Dermacentor variabilis</i>	Saliva	Inibição de atividades migratórias e invasivas	(POOLE et al., 2013a, 2013b)
<i>Ixodes scapularis</i> <i>Ixodes ricinus</i>	Metaloproteases isoladas	Inibidor da angiogênese	(FRANCISCHETTI; MATHER; RIBEIRO, 2005) (DECREM et al., 2008)
<i>Ixode scapularis</i>	Proteína recombinante Ixolaris	Ação Anticoagulante	(FRANCISCHETTI et al., 2002)
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Proteína isolada da glândula salivar (Haemangin). HLTnl: molécula antroponina-1 like	Inibidor de angiogenese	(ISLAM et al., 2009) (FUKUMOTO et al., 2006)

Fonte: Adaptado pelo autor de (SOUSA et al., 2015)

A utilização de venenos de animais como fontes para a produção de medicamentos é algo que vem sendo bem aceito. Existem exemplos de produtos bem-sucedidos, implementados e disponíveis no mercado. Entre eles o anti-hipertensivo Captopril desenvolvido a partir do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, o analgésico Ziconotide (nome comercial: Prialt®, Elan Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA), derivado do veneno da lesma-do-mar *Conus magus* e o regulador da glicemia Exenatida (nome comercial: Byetta®, Amylin and Eli Lilly), obtido da saliva do lagarto norte-americano *Heloderma suspectum* (ZAMBELLI et al., 2016).

A utilização, tanto da saliva, como dos compostos extraídos das glândulas salivares de carrapatos ainda está em processo de descoberta. A ação antitumoral destas moléculas é um alvo que cada vez mais tem ganhado espaço e apresentado resultados promissores (**Tabela 4**). Ainda se faz necessário um aprofundamento quanto a parte molecular, e interações que esses compostos apresentam quando em contato com células humanas.

Tabela 4. Estudos realizados com saliva ou glândula salivar com ação antitumoral.

(CONTINUA)

<i>Moléculas de Interesse</i>	<i>Estudo realizado</i>	<i>Referência</i>
Extrato da glândula salivar <i>Ixodes ricinus</i>, <i>Rhipicephalus appendiculatus</i>, <i>Dermacentor reticulatus</i>, e <i>Amblyomma variegatum</i>	Indução de apoptose e necrose em células HeLa, e efeito anti-proliferativo.	(KAZIMÍROVÁ et al., 2006)
Efeito da saliva <i>Dermacentor variabilis</i>	Agente modulador da ação migratória, sinalizadora e invasiva em células de osteosarcoma (Saos-2) e câncer de mama (MB-231).	(POOLE et al., 2013b)
Saliva do carrapato <i>Amblyomma cajennense</i>*	Efeito citotóxico significante sobre células tumorais, mas nenhum efeito em células não tumorais, fibroblastos. As células tumorais testadas foram SKMEL-28 (melanoma) e MIA PaCa-2 (Carcinoma pancreático)	(SIMONS et al., 2011)
Proteína isolada da glândula salivar - <i>Ixolaris (Ixodes scapularis)</i>	Ação antitumoral, através da redução da vascularização. Testes <i>in vivo</i> em ratos machos Balb/C nude com células U87-MG (glioblastoma).	(CARNEIRO-LOBO et al., 2009)
	Inibidor da angiogênese, diminui o crescimento primário do tumor e seu potencial metastático em células B1610 (modelo de melanoma murinho)	(DE OLIVEIRA et al., 2012)
	Bloqueio do crescimento primário do tumor, e uma ação anticoagulante. Comparação entre células de câncer de mama humano, (MDA-MB-231mfp), com células de carcinoma mamário de ratos (PyMT).	(CARNEIRO-LOBO et al., 2012)
Proteína recombinante <i>Amblyomin-X</i>**	Indução da morte celular pela via apoptótica em células de carcinoma renal (Renca).	(AKAGI et al., 2012)
	Agente indutor de morte celular através da via apoptótica, em modelo de melanoma murinho (B16F10)	(CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010)
	Efeito citotóxico, resultante de um aumento da expressão de cadeias de dineína em células tumorais de melanoma humano (SK-MEL-28) e adenocarcinoma pancreático humano (MIA PaCa-2).	(PACHECO et al., 2014)

Efeito apoptótico sobre adenocarcinoma de pâncreas ((MIA-PaCa-2, Panc1, BxPC3, AsPC1) e melanoma (SK-MEL-28 and SK-MEL-5). (MORAIS et al., 2016)

Mecanismo antitumoral através do envolvimento da dineína citoplasmática na endocitose e a atividade da proteína intracelular de uma nova molécula atuando no proteassoma em células tumorais de melanoma humano (SK-MEL-28) e adenocarcinoma pancreático humano (MIA PaCa-2), e não tumoral Fibroblastos e efeito pró-apoptótico. (PACHECO et al., 2016)

Efeito antiproliferativo em células de adenocarcinoma renal (Renca) e não tumoral Fibroblastos (NHI3T3) (SOUZA et al., 2016)

Saliva dos carrapatos: Efeito Citotóxico nas células tumorais células tumorais de câncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231) mas (SOUZA et al., 2018)
Amblyomma sculptum, não às células não tumorais (MCF-10A)
Amblyomma parvum,
Rhipicephalus sanguineus

Fonte: Autor

Nota: *A. cajennense** (agora catalogado como *A. sculptum*), **Inibidor recombinante do tipo Kunitz obtido a partir das glândulas salivares do carrapato *A. sculptum*

2. JUSTIFICATIVA

Os processos que atuam na indução da morte e sobrevivência das células tumorais são complexos e envolvem um grande número de moléculas e organelas. Falhas na via regulatória da apoptose atribuem mecanismos de fuga às células tumorais, proporcionando vantagens e resistência sobre as terapias aplicadas. A utilização de um novo agente antitumoral de ação específica é um diferencial e pode auxiliar num melhor entendimento dos mecanismos tumorais de resistência.

O estudo *in vitro* de ação da saliva bruta em diferentes linhagens de neuroblastoma, torna possível comparações entre as próprias linhagens, além de sugerir a atuação de componentes antitumorais altamente específicos a esse tipo particular de tumor, proporcionando novas informações sobre os efeitos desse novo agente antitumoral e explorando mecanismos específicos para a ativação de diferentes vias de morte celular.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

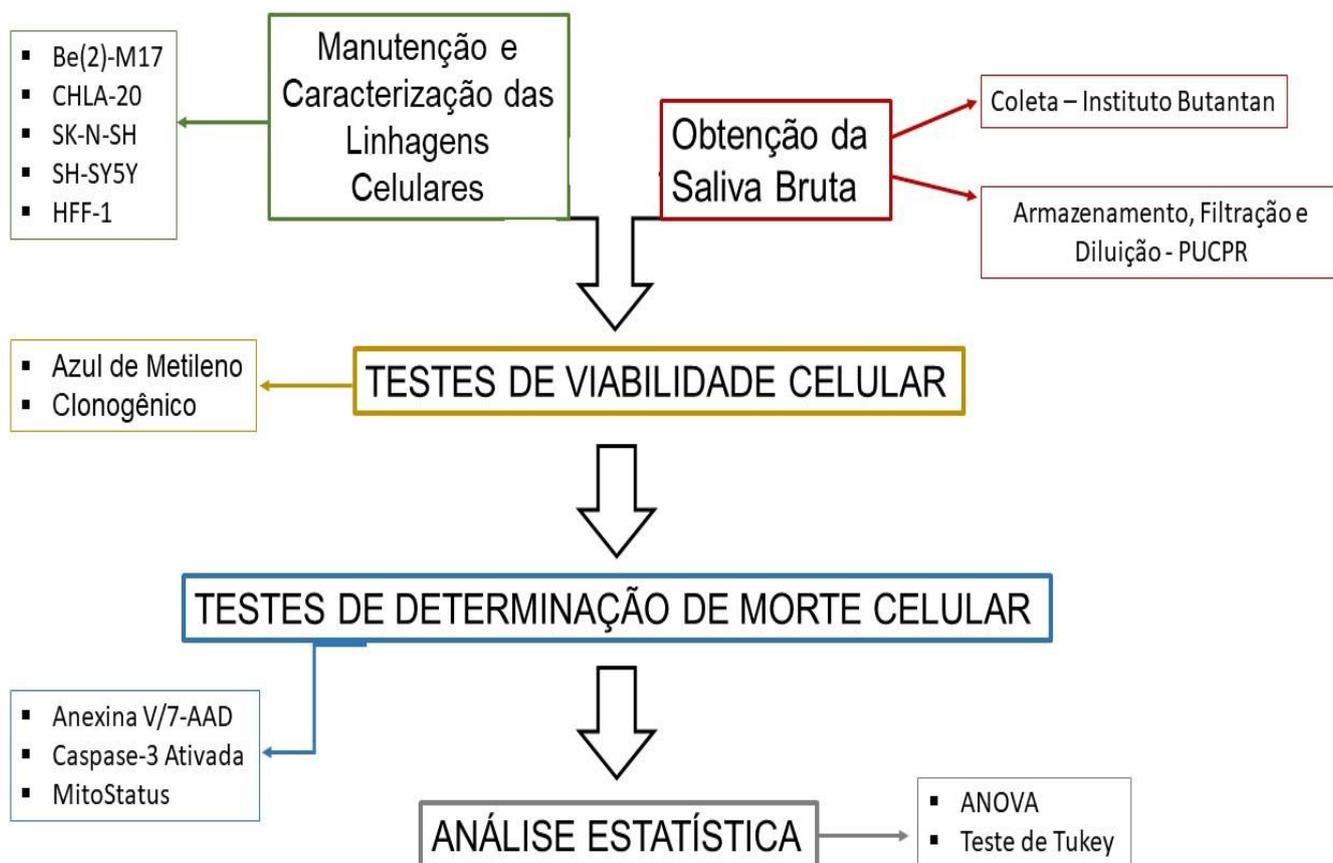
Avaliar o potencial da saliva bruta de *Amblyomma sculptum* como um agente pró-apoptótico em células derivadas de neuroblastoma humano.

3.2 Objetivos específicos:

1. Avaliar a citotoxicidade da saliva bruta do carrapato *Amblyomma sculptum* em diferentes linhagens celulares de neuroblastoma e na linhagem controle não-tumoral;
2. Caracterizar a extensão da indução da apoptose pela saliva bruta.

4. MÉTODOS

Figura 4. Fluxograma da metodologia empregada



4.1 Obtenção da saliva bruta

A saliva bruta (SB) de *Amblyomma sculptum* foi cedida pela Dra. Simone Michaela Simons do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, São Paulo. O procedimento de extração seguiu um protocolo adaptado descrito anteriormente por Simons et al. (2011). Brevemente, após o período de alimentação em coelhos brancos (*Oryctolagus cuniculus*, Nova Zelândia), as fêmeas semi-ingurgitadas foram aderidas ventralmente a uma fita de dupla face e, em seguida, foram aplicadas 5 a 10 μL de uma solução de dopamina (Sigma) (5% p/v em NaCl 0,15 M) no dorso com uma agulha de calibre 30, acoplada em uma seringa micrométrica de Hamilton. A SB foi coletada por tubo microcapilar ajustada sobre o hipostômio, aparelho bucal do carrapato. Este sistema foi mantido durante 2 horas à temperatura ambiente (25°C). Depois da coleta da saliva de vários animais, toda a saliva foi reunida, filtrada através de um filtro de 0,22 μm (Millipore), dividido em alíquotas, congelado em gelo seco e álcool e

mantido a -80°C até o uso. A concentração de proteína foi determinada utilizando reagente de Bradford (Bio-Rad) e por absorbância a 280 nm. O transporte para Curitiba foi feito em gelo seco. O procedimento com os carrapatos foi aprovado pelo Comitê de ética no uso de animais do Instituto Butantan, SP (CEUA nº 3270051115).

4.2 Cultivo, Manutenção e Caracterização das Linhagens Celulares

As linhagens de neuroblastoma humano CHLA-20 (Texas Tech University Health Sciences Center, 1988), SH-SY5Y (ATCC®CRL 2266™), Be(2)-M17 (ATCC® 2267™) e SK-N-SH (ATCC®HTB – 11™) foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM Ham's F12– Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; GIBCO) e 100 IU/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina (GIBCO). As garrafas foram mantidas em estufa úmida, contendo 5% de CO₂, a 37 °C, e observadas diariamente em microscópio óptico. A troca de meio foi realizada a cada dois dias e os repiques foram feitos quando a garrafa atingia 80% de confluência. Os fibroblastos de linhagem HFF-1 (ATCC®SCRC-1041™) foram cultivados como descrito acima para células de linhagem de neuroblastoma. O meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM Ham's F12– Sigma-Aldrich) foi suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB; GIBCO) e 100 IU/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina (GIBCO). As linhagens foram caracterizadas por microscopia de luz.

Tabela 5. Classificação das linhagens celulares de neuroblastoma segundo sua morfologia

LINHAGEM		MORFOLOGIA	LINHAGEM PARENTAL
SK-N-SH	I-type	Intermediária	-
SHSY-5Y	N-type	Diferenciada	SK-N-SH
Be(2)-M17			SK-N-Be(2)
CHLA-20		Indeterminado	Linhagem pós-quimioterapia

Fonte: Adaptado de (KESHELAVA et al., 1998; ROSS et al., 2015; THIELE, 1998) pelo Autor

4.3 Estudo da viabilidade celular

4.3.1. Citotoxicidade

Para o teste de citotoxicidade foi realizado o teste de azul de metileno, teste colorimétrico que determina a viabilidade celular pelo teor de células aderidas após o tratamento/teste. Para isso a saliva bruta foi descongelada e diluída em meio DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino. A dosagem inicial da saliva foi de 20% (v/v) pela sua diluição em meio de cultura, seguida por uma diluição seriada. Foram testados diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 horas). Os resultados foram comparados com o controle negativo, de células não tratadas, e com o controle positivo de células tratadas com camptotecina 160 μM (CTP; Sigma-Aldrich), considerada um padrão-ouro para a indução da apoptose. As células foram plaqueadas em uma densidade de 1×10^4 /mL por poço em placa de 96 poços. Após o período de incubação com a saliva as células foram fixadas com metanol e coradas com solução aquosa de azul de metileno (0,05% p/v) por 10 minutos em temperatura ambiente. Foram realizadas repetidas lavagens com água corrente para retirar qualquer excesso que pudesse interferir na leitura. Após secagem foi acrescentado HCl (0,1M), e a placa foi lida em uma leitora de microplaca (VersaMax™ ELISA Microplate Reader) no comprimento de onda da 630 nm.

4.3.2. Clonogênico

As células das diferentes linhagens foram cultivadas em placas de 24 poços (1×10^5 /mL) e tratadas nas seguintes concentrações de Saliva Bruta 5%, 10% e 20%. Após o período de incubação de 72h as células foram transferidas para placas de 24 poços na densidade de (2×10^2 /mL) e mantidas em cultivo durante 21 dias. Após o período de incubação, o meio de cultura foi cuidadosamente removido e os poços foram lavados com tampão salina fosfato (PBS). As colônias formadas foram fixadas com a solução fixadora (Ac acético: Metanol) durante 5 min, e coradas com cristal violeta (0,5%, p/v) com incubação por 2 horas a temperatura ambiente. A solução foi removida, e as células foram lavadas cuidadosamente com água corrente e mantidas a temperatura ambiente até secagem completa.

4.4 Análise da indução da apoptose

O estado necrótico e/ou apoptótico das células tumorais foi medido por citometria de fluxo usando marcadores de viabilidade celular Anexina V/7-AAD (BD Biosciences). A Anexina V é uma proteína ligante da fosfatidilserina (PS), que quando disponível na superfície celular, é associada com alterações morfológicas associadas ao início da apoptose. Já o 7-AAD (7-Aminoactinomycin D), é utilizado para distinção de células viáveis e apoptóticas ou mortas, através da mudança de permeabilidade da membrana celular, tendo sua fluorescência aumentada em células em apoptose tardia ou necrose (ZEMBRUSKI et al., 2012).

As células foram cultivadas em uma densidade de 1×10^5 /mL em placas de 24 poços e após os períodos de incubação com a saliva ou controles (DMEM ou Camptotecina 160 mM) foram transferidas para tubos de citometria, com seus respectivos sobrenadantes. As células foram lavadas por centrifugação (12500 rpm por 5min) em temperatura ambiente, com PBS 1X gelado, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas com 100 μ L de tampão de ligação (Sigma-Aldrich) e adicionados 5 μ L Anexina V e 5 μ L de 7-AAD (BD Biosciences) e incubadas por 15 minutos ao abrigo de luz. Foram analisadas por citômetro de fluxo FACS Calibur® (BD Biosciences).

A integridade mitocondrial foi avaliada usando MitoStatus Red (BD Pharmingen™), utilizado para caracterização do metabolismo celular, viabilidade e apoptose, uma vez que marca mitocôndrias ativas (ATTENE-RAMOS et al., 2015; SAKAMURU; ATTENE-RAMOS; XIA, 2016). Esse teste foi realizado de duas formas distintas: 1) análise da porção total – nos ensaios foram utilizadas tanto as células em suspensão quanto as aderidas após o tempo de incubação com a saliva ou controles; 2) análise da porção parcial – nesse ensaio foram utilizadas apenas as que permaneceram aderidas, conforme indicação do fabricante.

Ambas as células foram cultivadas em uma densidade de 1×10^5 /mL, em placas de 48 poços. Após o período de incubação com a saliva, para a porção total foi apenas acrescentado o reagente Mitotracker. Para a porção parcial foi realizada a retirada do sobrenadante e as células foram incubadas com uma solução Mitotracker e tampão FBS (5% Soro Fetal Bovino em PBS), por 15 min a 37°C, protegido da luz. Após esse tempo, as duas formas seguiram os mesmos

passos. As células foram desadheridas e junto com seus respectivos sobrenadantes foram transferidas para os tubos de citometria para duas lavagens com o tampão FBS, e então analisadas no citômetro de fluxo FACS Calibur® (BD Biosciences).

O teste foi realizado pelo teste Caspase 3 Active form apoptosis Kit (BD Biosciences), o qual permite a visualização da ativação da via apoptótica (independente de qual fosse, se intrínseca ou extrínseca) através de sua marcação (PORTER; JANICKE, 1999; SNIGDHA et al., 2012).

Após o período de incubação as células, em uma densidade de 1×10^5 /mL, em placas de 24 poços, foram transferidas para os tubos de citometria com seus respectivos sobrenadantes, seguida por duas lavagens com PBS 1X gelado. Depois foram incubadas com a solução de fixação e permeabilização por 20 min, no gelo. Após o tempo de incubação, os tubos passaram por uma lavagem com tampão, e em seguida foi adicionado 10 μ L do anticorpo Anti- Caspase 3 ativada por 1h, ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Foram realizadas mais duas lavagens com tampão e os tubos foram levados para leitura e análise por citômetro de fluxo FACS Calibur® (BD Biosciences).

4.5 Análise estatística

Todos os procedimentos *in vitro* foram realizados em triplicata e em três ensaios independentes. Os resultados expressos apresentaram média e desvio padrão. A análise de variância foi realizada por ANOVA, seguido do teste de Tukey para comparação entre os grupos. Foram considerados valores significativos os valores nos quais $*p < 0,05$. As análises foram feitas utilizando o programa Graph Pad Prism 6.0 (San Diego, USA).

5. RESULTADOS

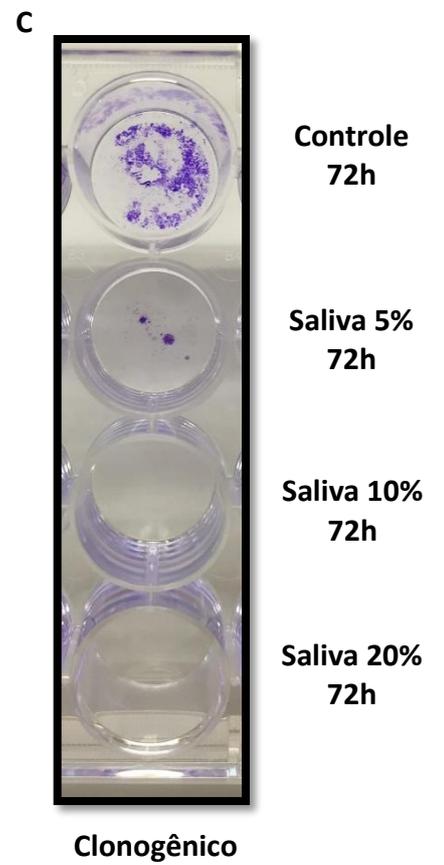
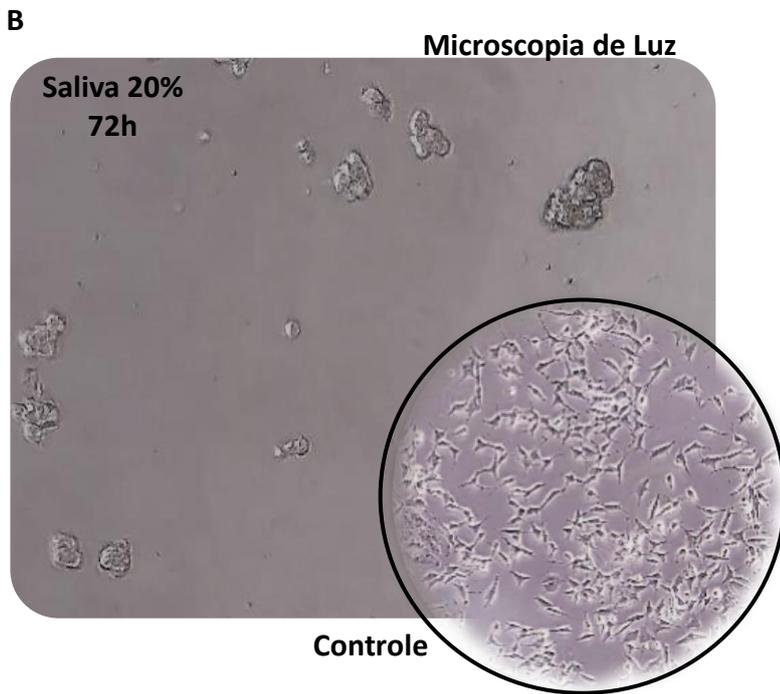
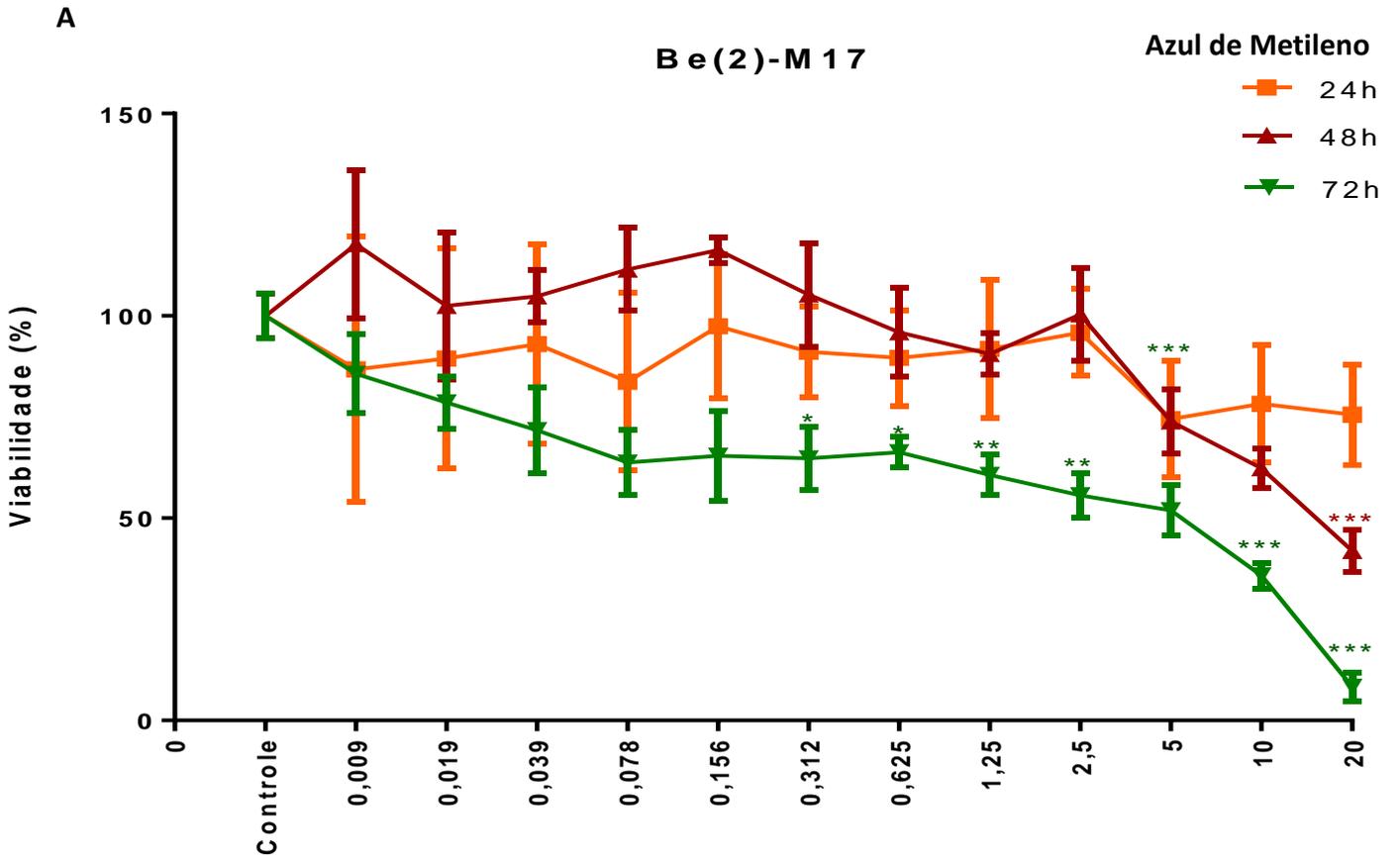
A ação da SB (100µg/mL, dosagem determinada por Bradford) foi avaliada inicialmente pelo seu potencial de indução de morte celular por ensaio de viabilidade com azul de metileno e em paralelo realizou-se o acompanhamento das células em cultivo (**Figura 5**). Em todos os tempos de incubação verificaram-se curvas com o padrão de dose-resposta. Em 24h todas as linhagens tumorais apresentaram perda de viabilidade na faixa entre 25 a 40%. A linhagem SK-N-SH (**Figura 5G e 5H**) demonstrou maior suscetibilidade desde as menores concentrações, enquanto a linhagem CHLA-20 (**Figura 5D e 5E**), apresentou uma perda de viabilidade apenas na maior concentração. As linhagens Be(2)-M17 (**Figura 5A e 5B**) e SH-SY5Y (**Figura 5J e 5K**) apresentaram um perfil de resposta semelhante, respondendo a SB a partir da dose de 5%. Já a linhagem controle não-tumoral mostrou um perfil diferente, mantendo viabilidade maior do que 90%, mesmo na maior concentração de SB.

Os gráficos revelaram ainda que o aumento do tempo de incubação foi determinante para a maior perda de viabilidade para todas as linhagens, mesmo que tenham expressado um perfil levemente diferente entre elas. No tempo de 72h, todas as linhagens tumorais demonstraram perda de pelo menos 70% de viabilidade na maior concentração da SB, enquanto que os fibroblastos (**Figura 5M e 5N**), apresentaram uma leve queda desde as concentrações de 5%. Todavia na maior concentração mantiveram a viabilidade de 50% em 48h e de 60% em 72h de incubação, indicando que de alguma maneira essas células possam estar conseguindo se recuperar da ação da SB.

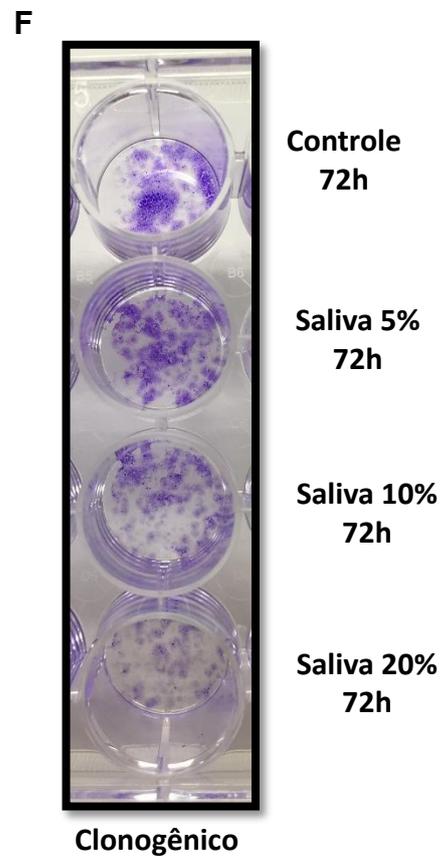
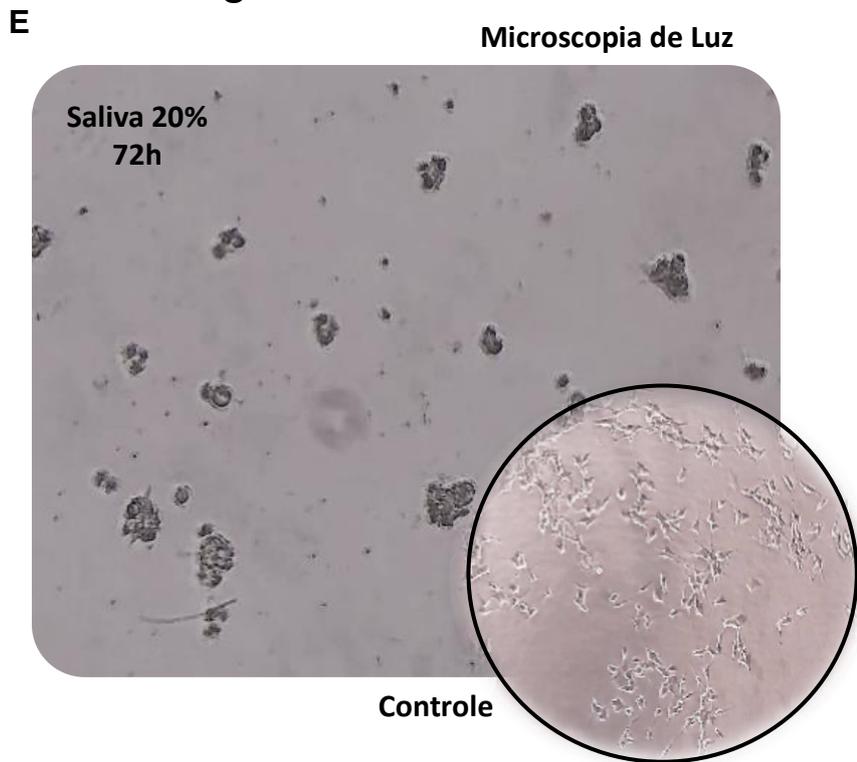
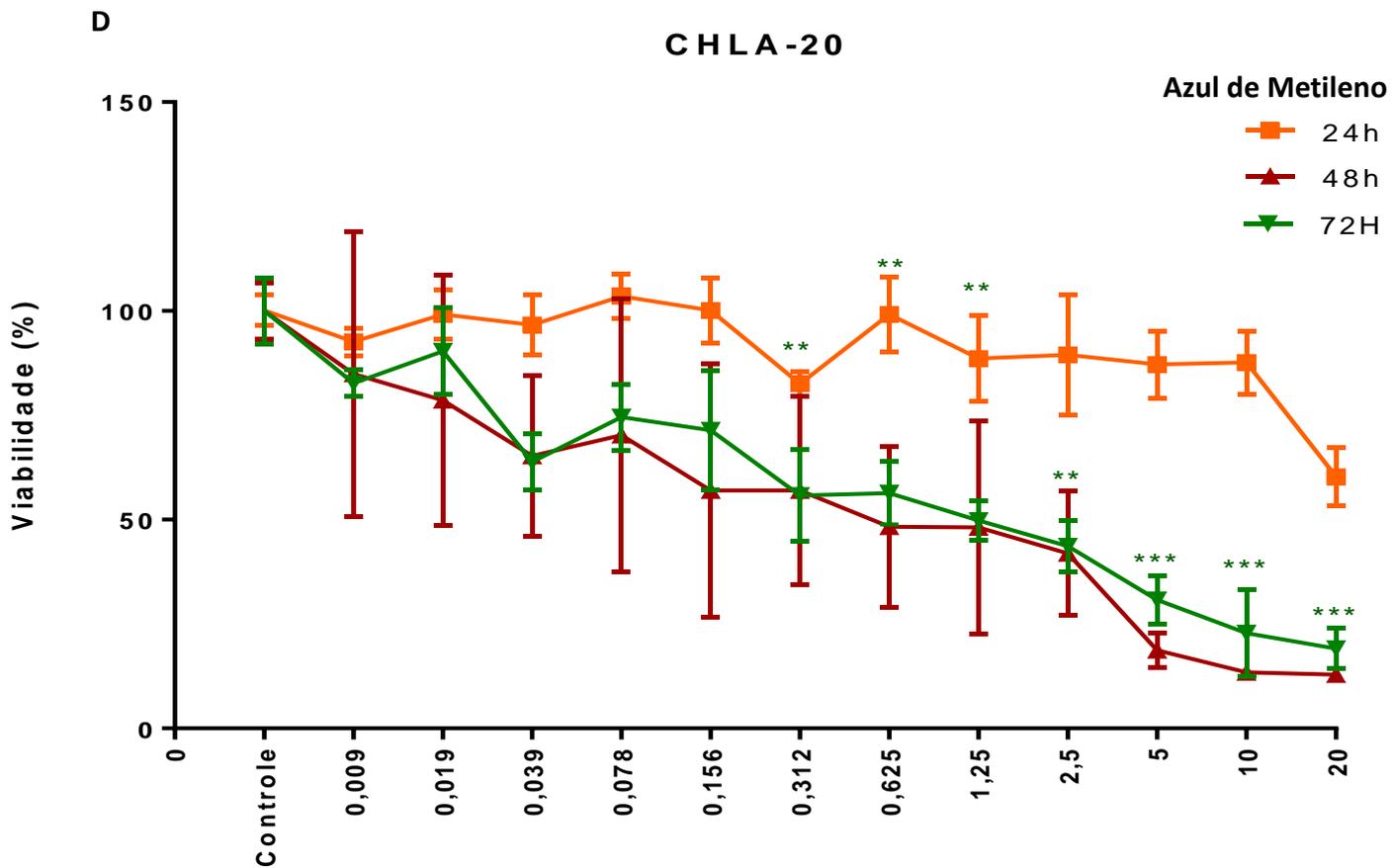
Na comparação entre as linhagens na maior concentração de saliva 20%, no tempo de 72h (**Figura 5P**), é possível observar que a ação da SB foi maior sobre as células de NB do que na linhagem controle. Que após esse período de incubação, ainda manteve aproximadamente 60% de sua viabilidade.

A análise da recuperação das células incubadas com a saliva foi realizada através do teste Clonogênico, onde foi possível observar a formação de colônias (21 dias depois) após a incubação com a saliva por 72h. Foi demonstrado que a linhagem Be(2)-M17 (**Figura 5C**), não apresentou capacidade de formação de colônias, com exceção da menor concentração 5%, após a incubação com as diferentes concentrações da saliva. Já as outras linhagens de neuroblastoma

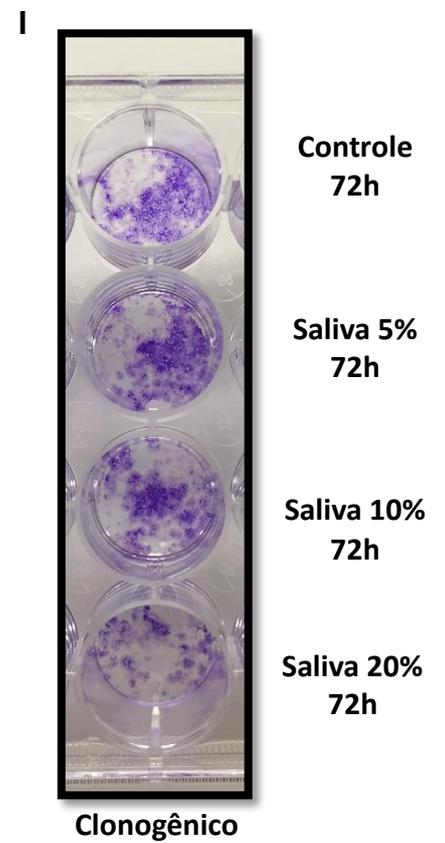
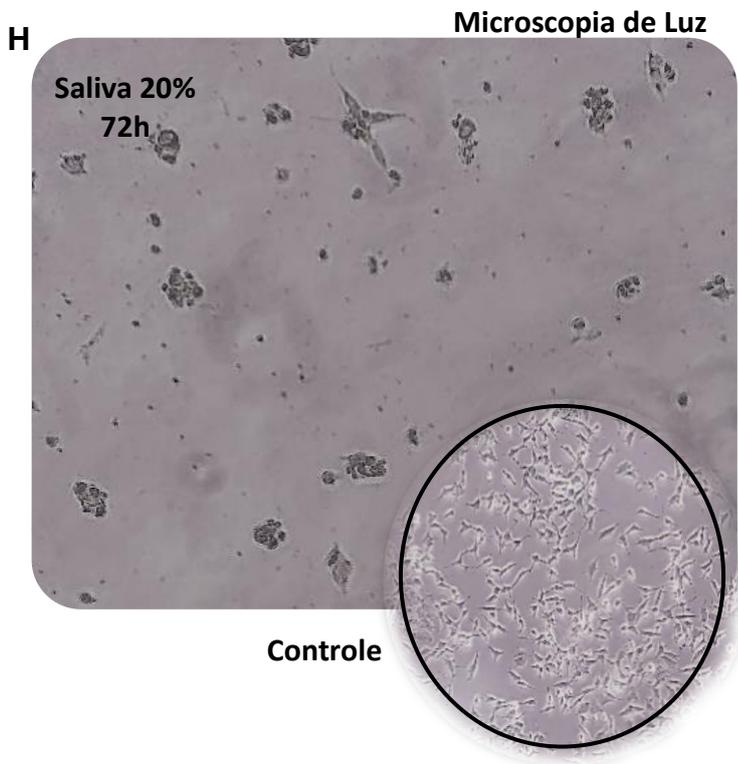
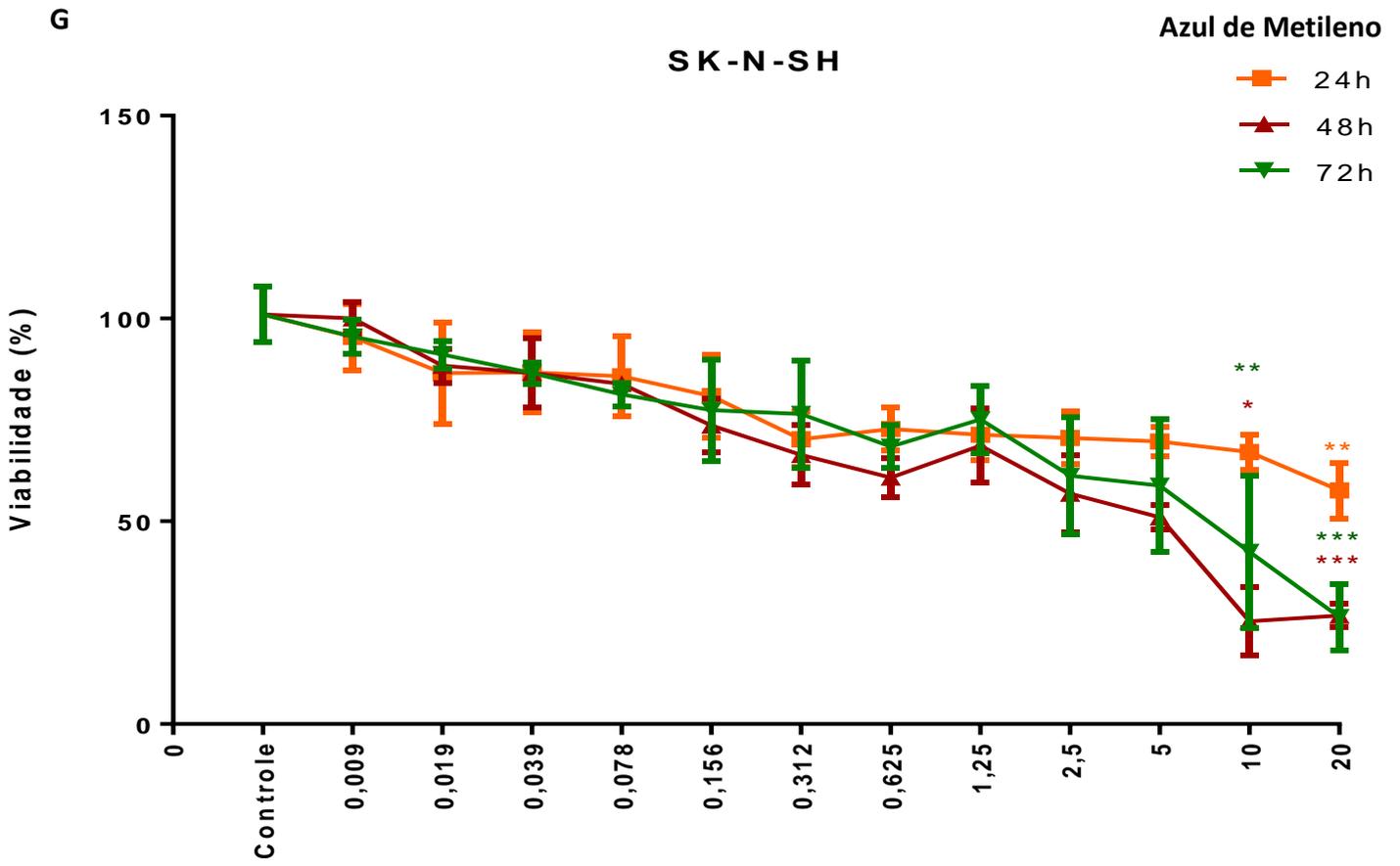
apresentaram uma recuperação dependente da dose a qual foram submetidas, reforçando os resultados encontrados no Azul de metileno, correspondente a dose-dependência. Já a linhagem controle (HFF-1) (**Figura 50**), não apresentou diferença entre as diferentes concentrações.



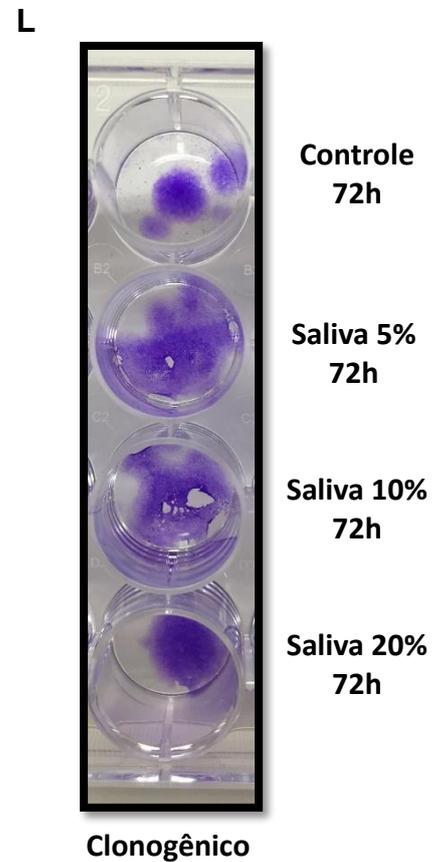
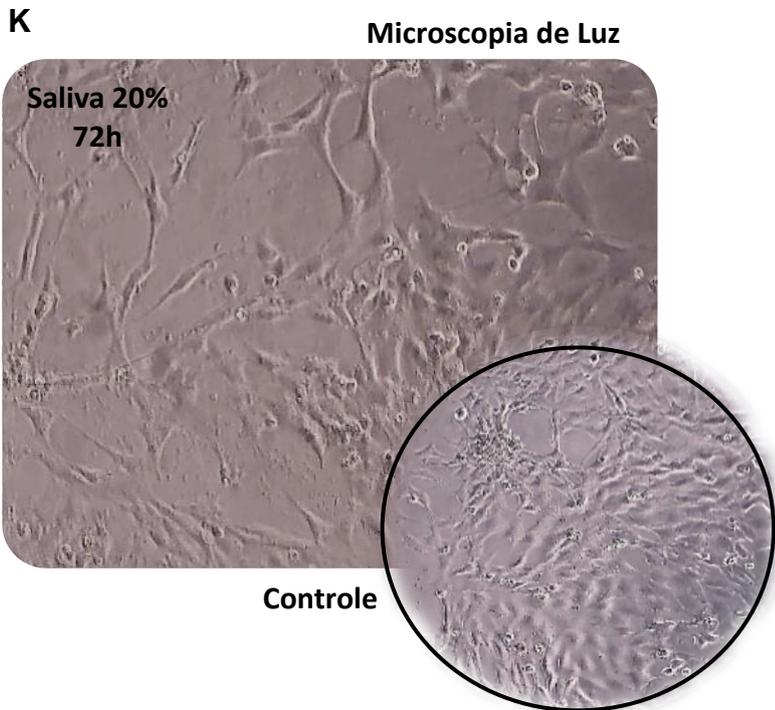
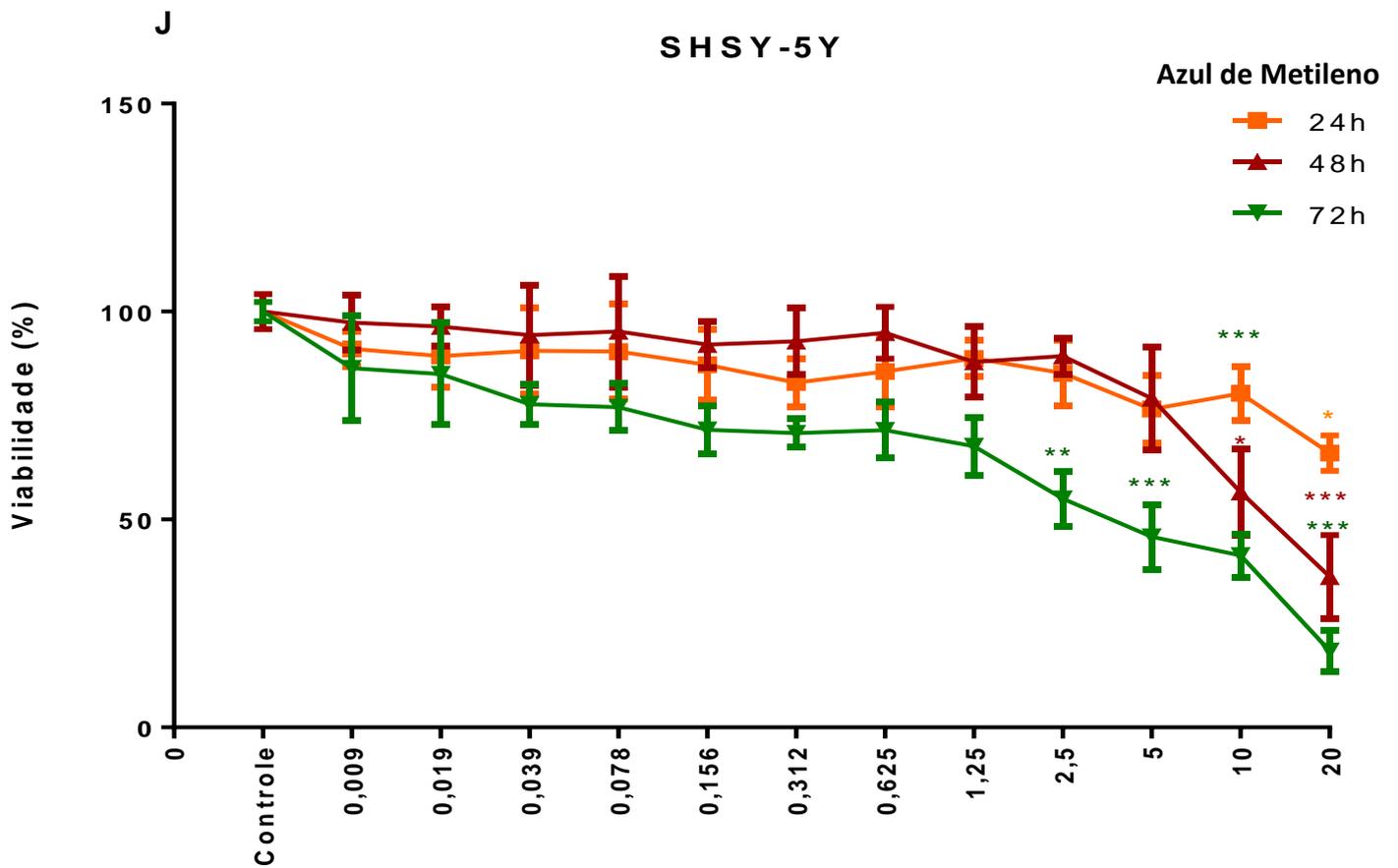
(CONTINUA)



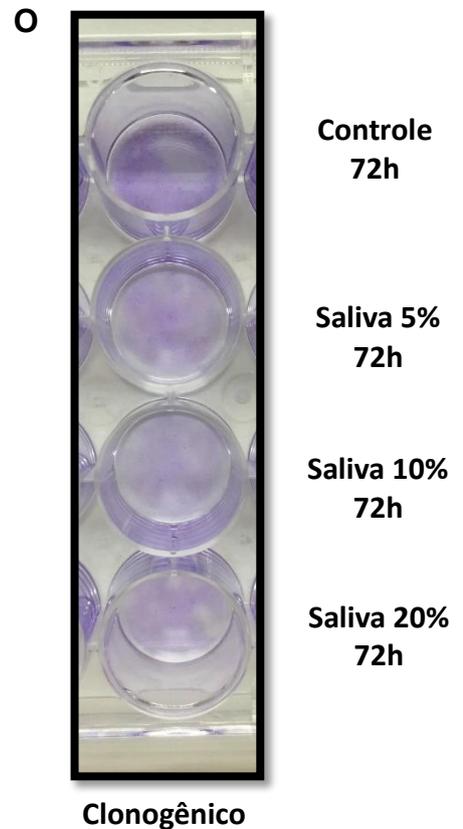
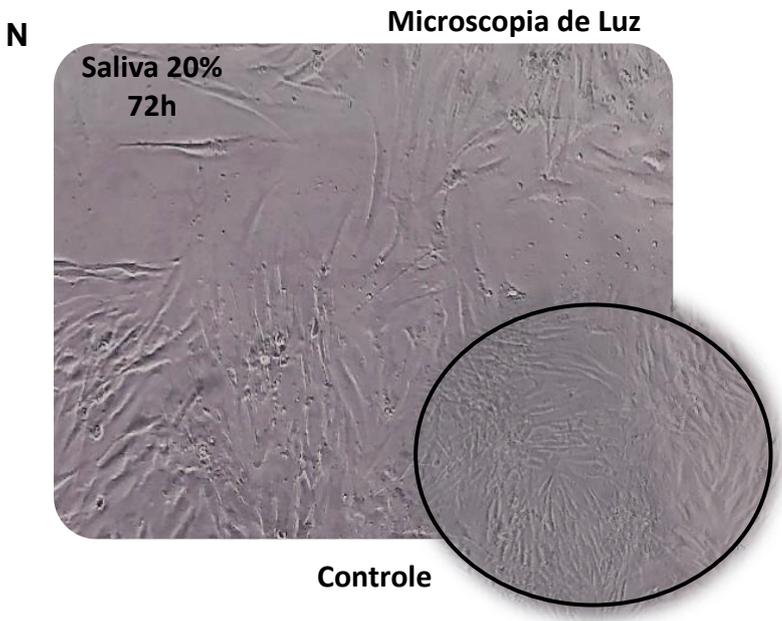
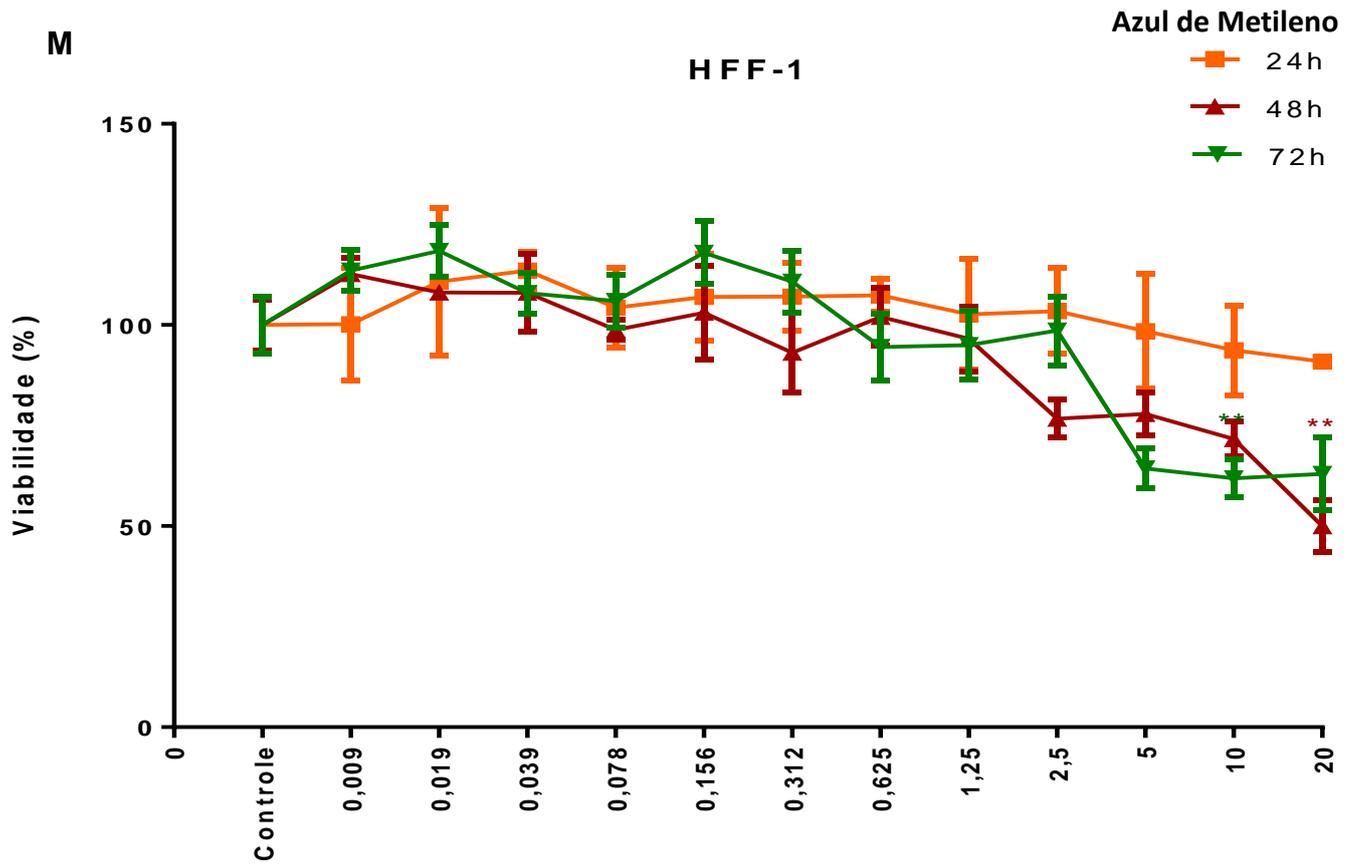
(CONTINUA)



(CONTINUA)



(CONTINUA)



(CONTINUA)

P

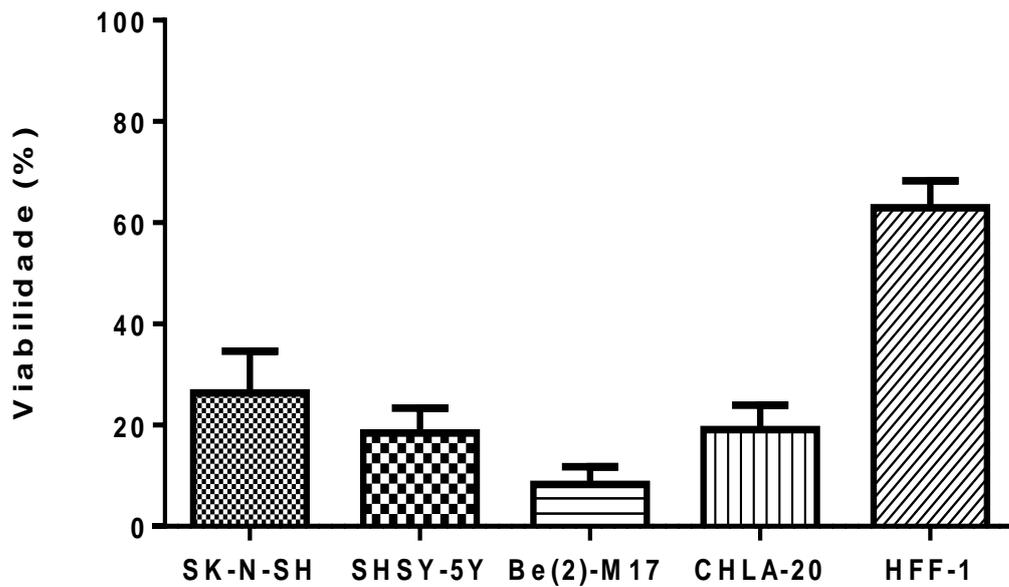


Figura 5. Análise da citotoxicidade da saliva bruta do *A. sculptum*, nas linhagens tumorais de neuroblastoma Be(2)-M17, SK-N-SH, CHLA-20, SH-SY5Y e na linhagem não tumoral, HFF-1. Nas letras A, D, G, J e M representadas pelo teste de azul de Metileno após 24, 48 e 72 horas de incubação. Foi realizada uma diluição seriada, sendo o último ponto o de maior concentração da saliva (20%). Os resultados estão demonstrados como média, a partir de três ensaios independentes em triplicata. Os valores foram normalizados pela viabilidade dos controles de células não tratadas, considerados como tendo viabilidade de 100%. Nas letras B, E, H, K, N são representadas as imagens de microscopia de luz das células controle e incubadas com saliva, no aumento de 100x (Zeiss Axion Vison, Alemanha). Nas letras C, F, I, L, O estão as imagens representativas do teste Clonogênico, realizado nas concentrações de 5, 10 e 20% de SB, após 72h de incubação, mantido por 21 dias. Na letra P, está representado um gráfico comparativo entre as respostas das diferentes linhagens no tempo de incubação de 72h, na concentração de 20% de Saliva Bruta.

A partir destes resultados, foram realizados testes específicos para se verificar se a SB estava induzindo as células à apoptose, de acordo com o que foi verificado em ensaios preliminares. Foram escolhidos os marcadores Anexina/7AAD e Caspase 3- Ativada. Para essa análise a incubação com a SB foi realizada apenas no tempo de 72h e com a concentração máxima de 20% da saliva.

Para a marcação com Anexina-V/7-AAD verificou-se tanto a marcação positiva para cada marcador isoladamente, quanto a dupla marcação. As **Figuras 6 a 9** representam os resultados para as linhagens tumorais na forma de *dot blot* representativos dos resultados e também um gráfico com a quantificação e análise estatística da ação dos marcadores no grupo controle, de células não marcadas, tratamento com a saliva e com a camptotecina. Nas mesmas figuras estão representados os resultados para a caspase-3, molécula determinante para a finalização do processo apoptótico. Na **Figura 10** está representado um gráfico comparativo entre as diferentes linhagens para os marcadores Anexina/7-AAD.

A linhagem SK-N-SH, foi a única a apresentar um perfil que indica que a via de morte celular escolhida seja a apoptose (**Figura 6**). Quando analisada pelos marcadores Anexina/7AAD apresentou um aumento de aproximadamente 15% das células positivamente marcadas, entre seu controle e a SB, na dupla marcação. Quando analisado cada um dos marcadores de forma individual, foi possível observar que ainda assim existe um aumento de células marcadas pelo 7-AAD, aproximadamente 20%, enquanto a marcação para Anexina permanece estável. Já as células marcadas positivamente para a Caspase 3, diferente das outras linhagens, ocorreu com um aumento de pequeno, embora significativo, quando comparado ao controle negativo.

A linhagem SH-SY5Y apresentou um perfil característico, diferente das outras linhagens, um perfil de morte celular misto. Através da **Figura 7**, foi possível observar um aumento na dupla marcação para Anexina/7AAD de quase 15% em relação ao controle não tratado. Todavia na marcação isolada de 7-AAD houve um aumento de quase 50%. Já através do teste de Caspase 3 foi possível observar uma queda nas células marcadas.

Para a linhagem Be(2)-M17 (**Figura 8**) houve marcação positiva para apoptose tanto quanto na linhagem SK-N-SH. Quando analisado separadamente

cada um de seus marcadores, foi possível observar que existe um aumento de quase 50%, tanto na marcação de 7-AAD, quanto na marcação para Anexina-V nas células incubadas com a SB. Esse resultado, entretanto, não foi comprovado através da marcação de Caspase 3, a qual demonstrou uma queda nas células marcadas quando comparadas com o controle.

A linhagem CHLA-20 apresentou um resultado similar a essas outras linhagens, onde o aumento da marcação de células positivamente marcadas para Anexina/7-AAD, é pequeno (8%) quando comparado com o aumento da marcação de 7-AAD, aproximadamente 15%. Além dessa marcação também é possível visualizar uma queda nas células marcadas positivamente Caspase 3 na SB (**Figura 9**).

Quando analisadas em conjunto (**Figura 10**), é possível observar mais claramente o quanto cada uma das linhagens respondeu ao estímulo da SB, onde é retratada a diferença entre as linhagens para os marcadores Anexina V/ 7-AAD, em que todas as linhagens tiveram um aumento maior do marcador 7-AAD. A linhagem SK-N-SH, a maior porcentagem de células marcadas positivamente para Caspase 3- Ativada, bem como a diferença de células marcadas como viáveis, no tempo de 72h, para o marcador MitoStatus.

O teste MitoStatus foi utilizado com o intuito do entendimento da ação da SB sobre a alteração do potencial de membrana mitocondrial. Este foi realizado nos tempos de 48 e 72h, com a concentração de 5%. Essa dose de SB foi selecionada, visto que foi o ponto em comum no qual as linhagens começaram a apresentar um perfil de perda de viabilidade. A análise de alteração do potencial da membrana mitocondrial foi analisado de duas formas distintas, a porção total (células em suspensão e aderidas) e a porção parcial (células aderidas).

A linhagem SK-N-SH mostrou um perfil distinto de qualquer uma das outras linhagens (**Figura 11**). Quando analisada pela sua porção total apresentou uma grande alteração no seu potencial de membrana mitocondrial, chegando a perder aproximadamente 60% das células em 48h e 80% em 72h. Todavia quando analisada pela sua porção parcial não houve diferença, assemelhando-se às outras linhagens.

Quando analisadas pela sua porção total e parcial, as mesmas três linhagens (Be(2)-M17, SH-SY5Y e CHLA-20) que não apresentaram um perfil

apoptótico tiveram um comportamento similar (**Figuras 12-14**), não apresentando variação no potencial da membrana, tanto no tempo de 48h como 72h, mesmo que no teste de viabilidade tenham apresentado uma suscetibilidade a essa dose. Houve apenas uma pequena queda, aproximadamente 30% nas células marcadas positivamente na linhagem SH-SY5Y, na análise parcial, que condiz com o ponto que começou a queda na viabilidade pelo teste de azul de metileno.

A linhagem controle, HFF-1, que foi usada como um controle não-tumoral, apresentou um perfil diferente das células tumorais. Durante os ensaios ocorreram limitações em suas análises, desta forma sendo apresentados apenas os resultados de MitoStatus. Onde é possível observar que as células no menor tempo, 48h, sofreram uma queda nas células viáveis, que é possível observar na **Figura 15**, todavia a célula apresenta uma recuperação no período de 72h da mesma maneira que ocorreu no teste de azul de metileno.

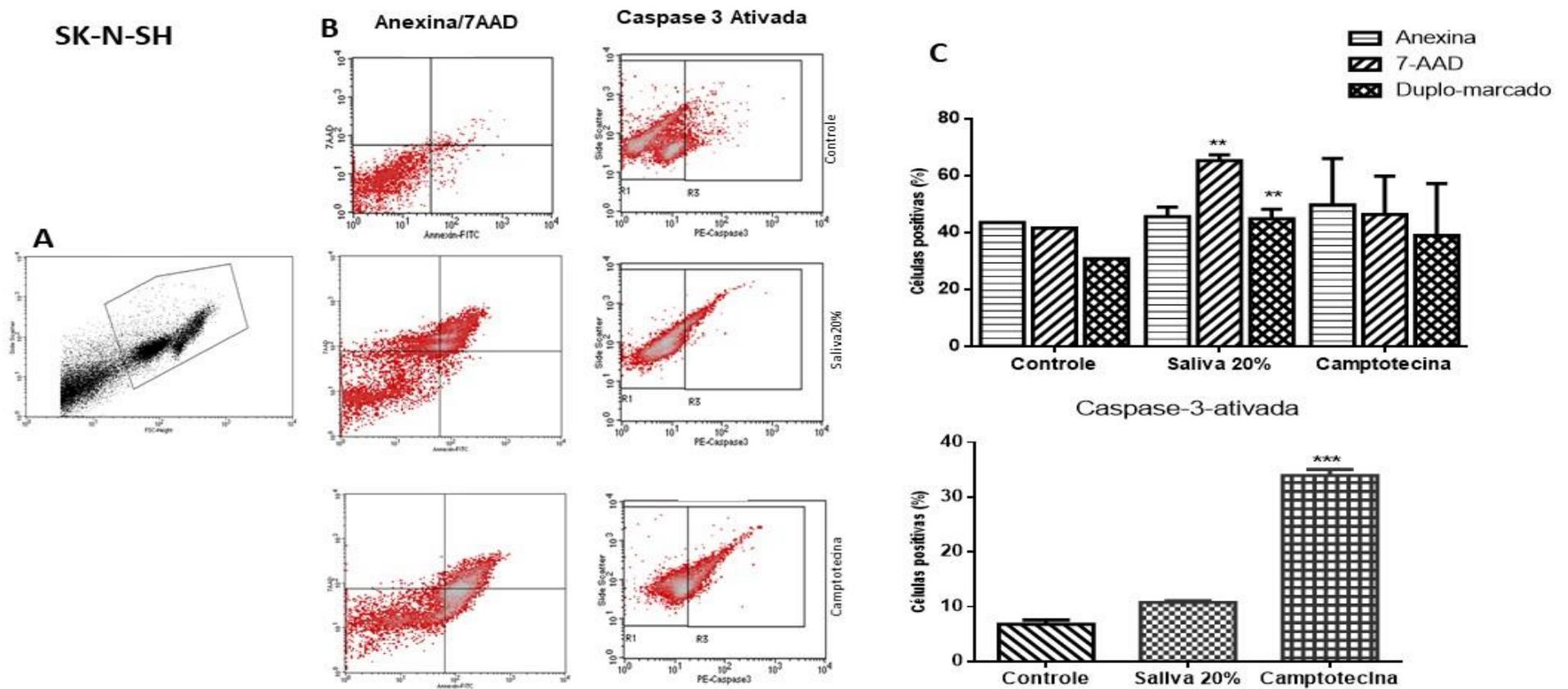


Figura 6. Análise da determinação do tipo de morte celular da linhagem de neuroblastoma SK-N-SH incubada com 20% de saliva bruta de *A. sculptum* por 72h pelos testes Anexina/7AAD e Caspase-3-Ativada. **A.** DotBlot da linhagem, demonstrando gate analisado. **B.** DotBlot dos testes de Anexina/ 7AAD e Caspase 3 ativada. **C.** Estão representados na figura os dois gráficos, Anexina/7AAD e Caspase 3 ativada. Todos os resultados estão em comparação com seu respectivo controle não tratado. Os resultados foram obtidos através de dois ensaios independentes em triplicata. Diferença significativa, em relação ao controle para $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). Teste ANOVA, seguido de teste de

SH-SY5Y

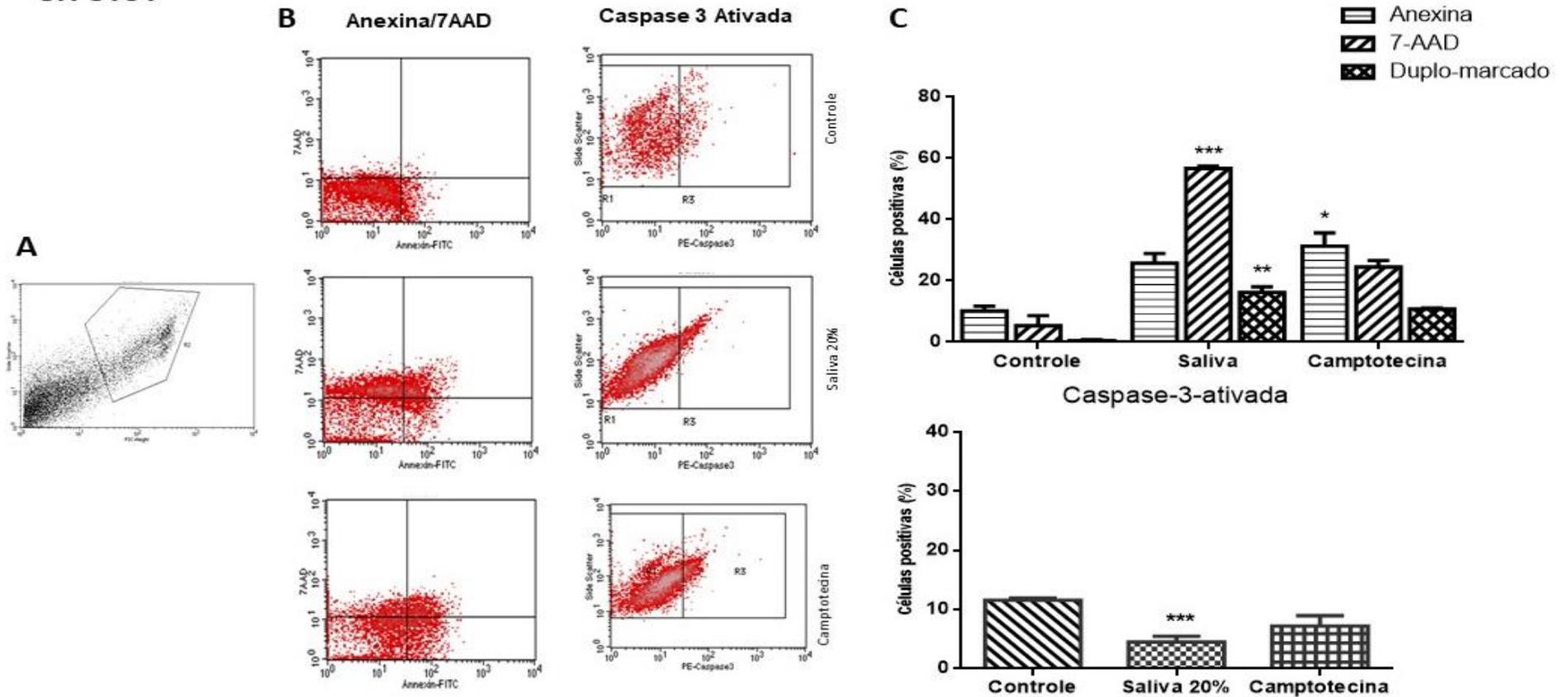


Figura 7. Análise da determinação do tipo de morte celular da linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y incubada com 20% de saliva bruta de *A. sculptum* por 72h pelos testes Anexina/7AAD e Caspase-3-Ativada. **A.** DotBlot da linhagem, demonstrando gate analisado. **B.** DotBlot dos testes de Anexina/ 7AAD e Caspase 3 ativada. **C.** Estão representados na figura os dois gráficos, Anexina/7AAD e Caspase 3 ativada. Todos os resultados estão em comparação com seu respectivo controle não tratado. Os resultados foram obtidos através de dois ensaios independentes em triplicata. Diferença significativa, em relação ao controle para $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). Teste ANOVA, seguido de teste de Tukey.

Be(2)-M17

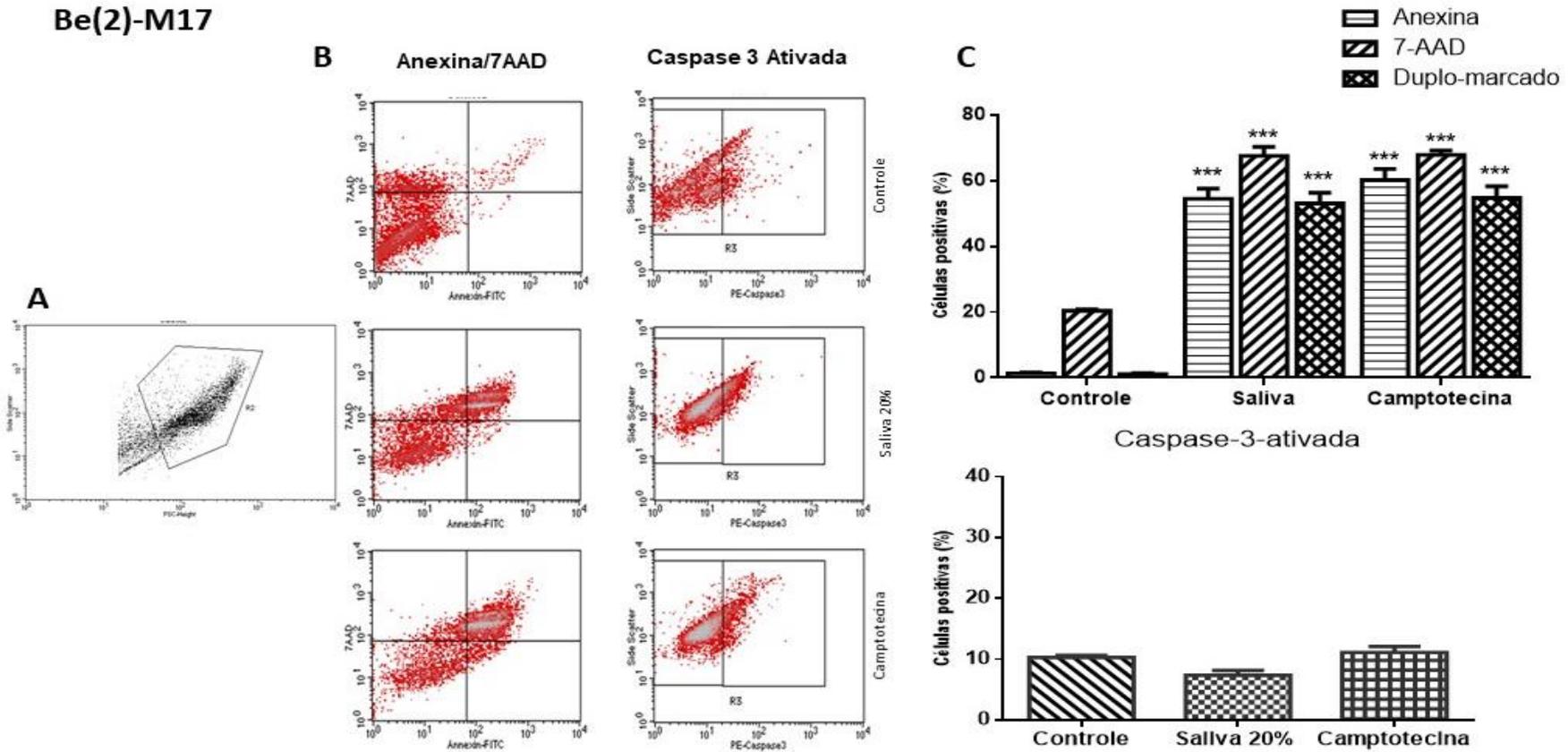


Figura 8. Análise da determinação do tipo de morte celular da linhagem de neuroblastoma Be(2)-M17 incubada com 20% de saliva bruta de *A. sculptum* por 72h pelos testes Anexina/7AAD e Caspase-3-Ativada. **A.** DotBlot da linhagem, demonstrando gate analisado. **B.** DotBlot dos testes de Anexina/ 7AAD e Caspase 3 ativada. **C.** Estão representados na figura os dois gráficos, Anexina/7AAD e Caspase 3 ativada. Todos os resultados estão em comparação com seu respectivo controle não tratado. Os resultados foram obtidos através de dois ensaios independentes em triplicata. Diferença significativa, em relação ao controle para $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) . Teste ANOVA, seguido de teste de Tukey.

CHLA-20

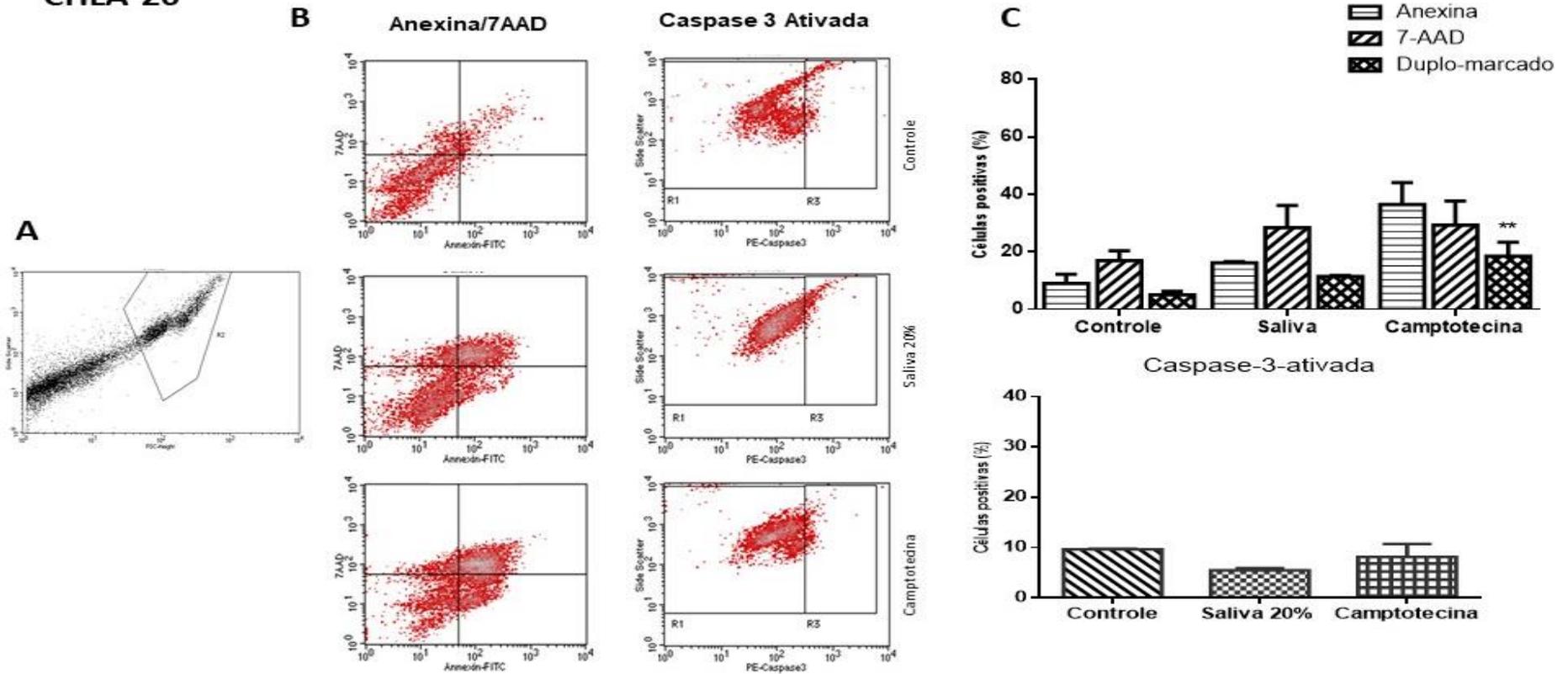


Figura 9. Análise da determinação do tipo de morte celular da linhagem de neuroblastoma CHLA-20 incubada com 20% de saliva bruta de *A. sculptum* por 72h pelos testes Anexina/7AAD e Caspase-3-Ativada. **A.** DotBlot da linhagem, demonstrando gate analisado. **B.** DotBlot dos testes de Anexina/ 7AAD e Caspase 3 ativada. **C.** Estão representados na figura os dois gráficos, Anexina/7AAD e Caspase 3 ativada. Todos os resultados estão em comparação com seu respectivo controle não tratado. Os resultados foram obtidos através de dois ensaios independentes em triplicata. Diferença significativa, em relação ao controle para $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) . Teste ANOVA, seguido de teste de Tukey.

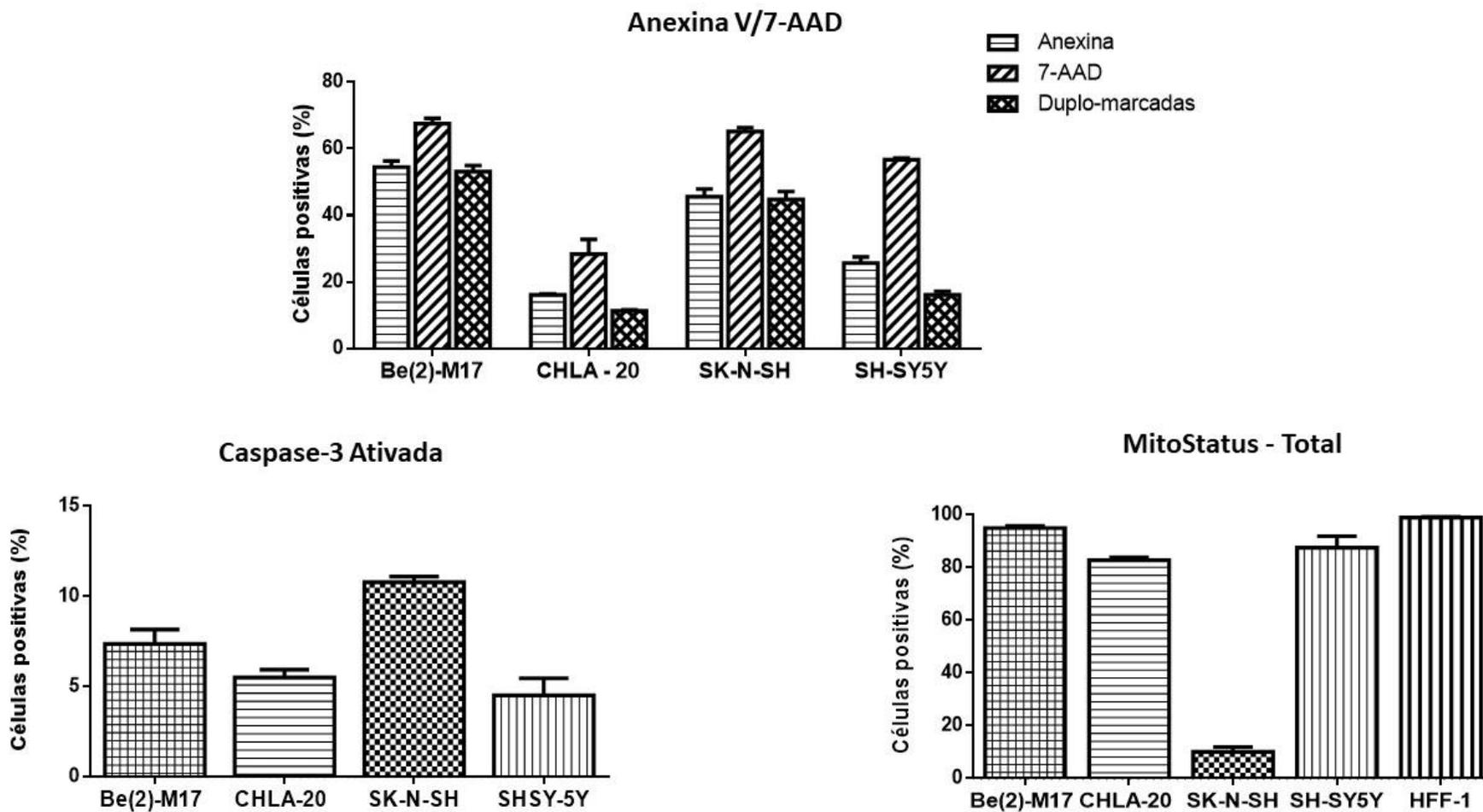


Figura 10. Gráficos comparativos entre as linhagens de neuroblastoma para os marcadores Anexina V e 7-AAD, Caspase 3- Ativada e MitoStatus incubadas com a concentração de 20% da Saliva Bruta, pelo tempo de 72h.

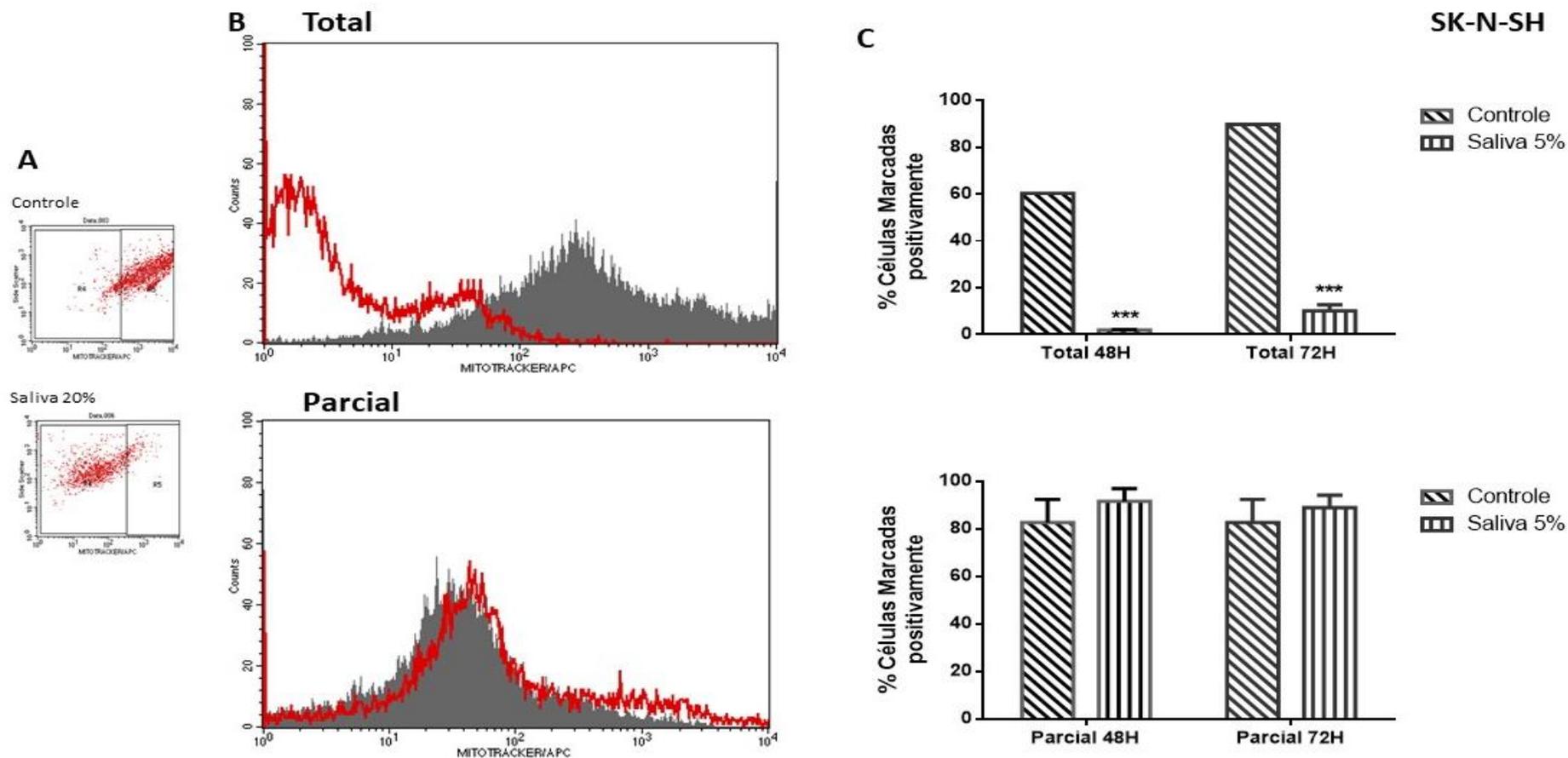


Figura 11. Análise da determinação do tipo de morte celular da linhagem de neuroblastoma SK-N-SH incubadas com 5% de saliva bruta de *A. sculptum* por 72h pelo teste MitoStatus. **A.** DotBlot representativo da linhagem, demonstrando como foi feita a análise. **B.** Histograma representativo das repetições do teste de MitoStatus, análise total e parcial. **C.** Estão representados na figura os dois gráficos. Todos os resultados estão em comparação com seu respectivo controle não tratado. Os resultados foram obtidos através de dois ensaios independentes em triplicata. Diferença significativa, em relação ao controle para $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) . Teste ANOVA, seguido de teste de Tukey

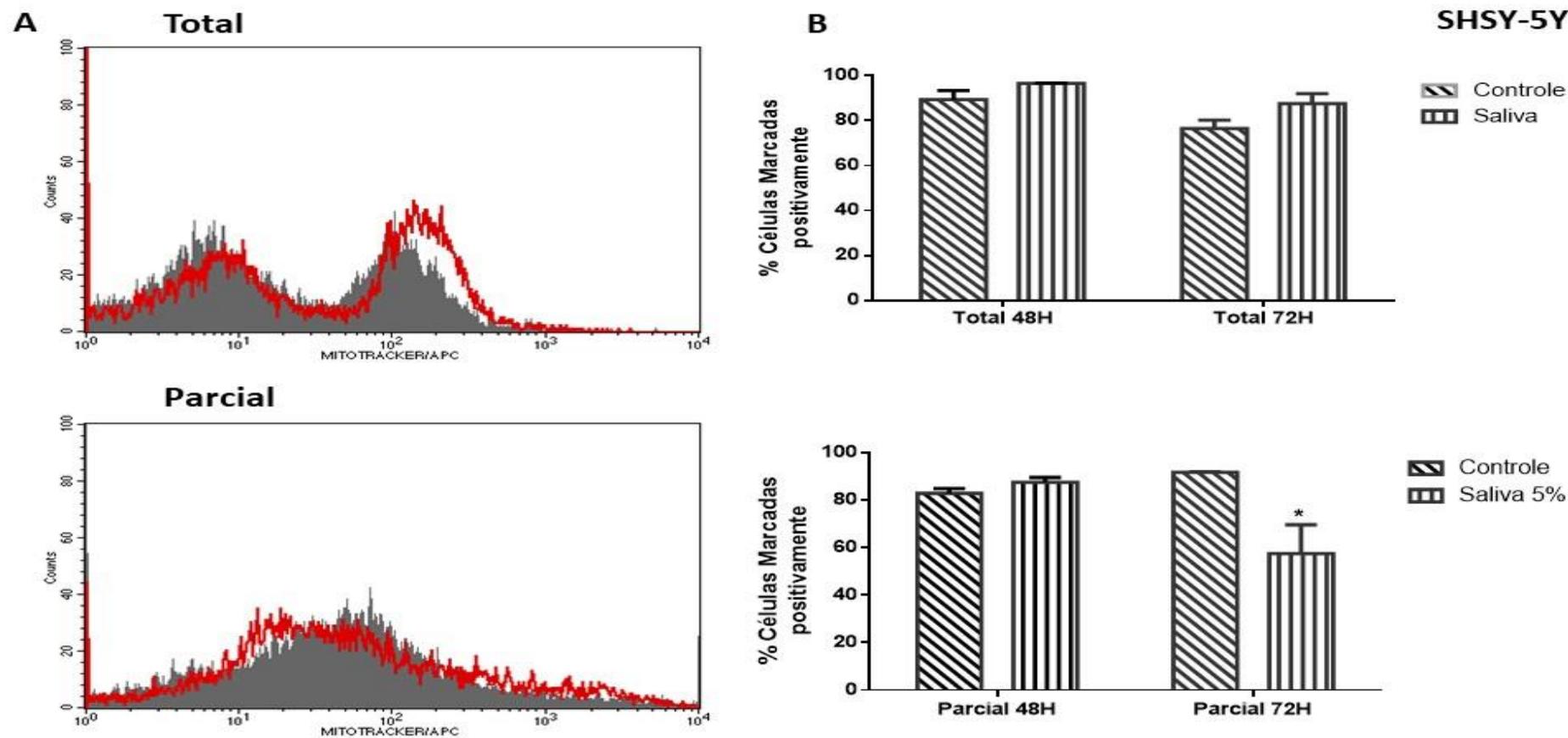


Figura 12. Análise da determinação do tipo de morte celular da linhagem de neuroblastoma SHSY-5Y incubadas com 5% de saliva bruta de *A. sculptum* por 72h pelo teste MitoStatus. **A.** Histograma representativo das repetições do teste de MitoStatus, análise total e parcial. **B.** Estão representados na figura os dois gráficos. Todos os resultados estão em comparação com seu respectivo controle não tratado. Os resultados foram obtidos através de dois ensaios independentes em triplicata. Diferença significativa, em relação ao controle para $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). Teste ANOVA, seguido de teste de Tukey

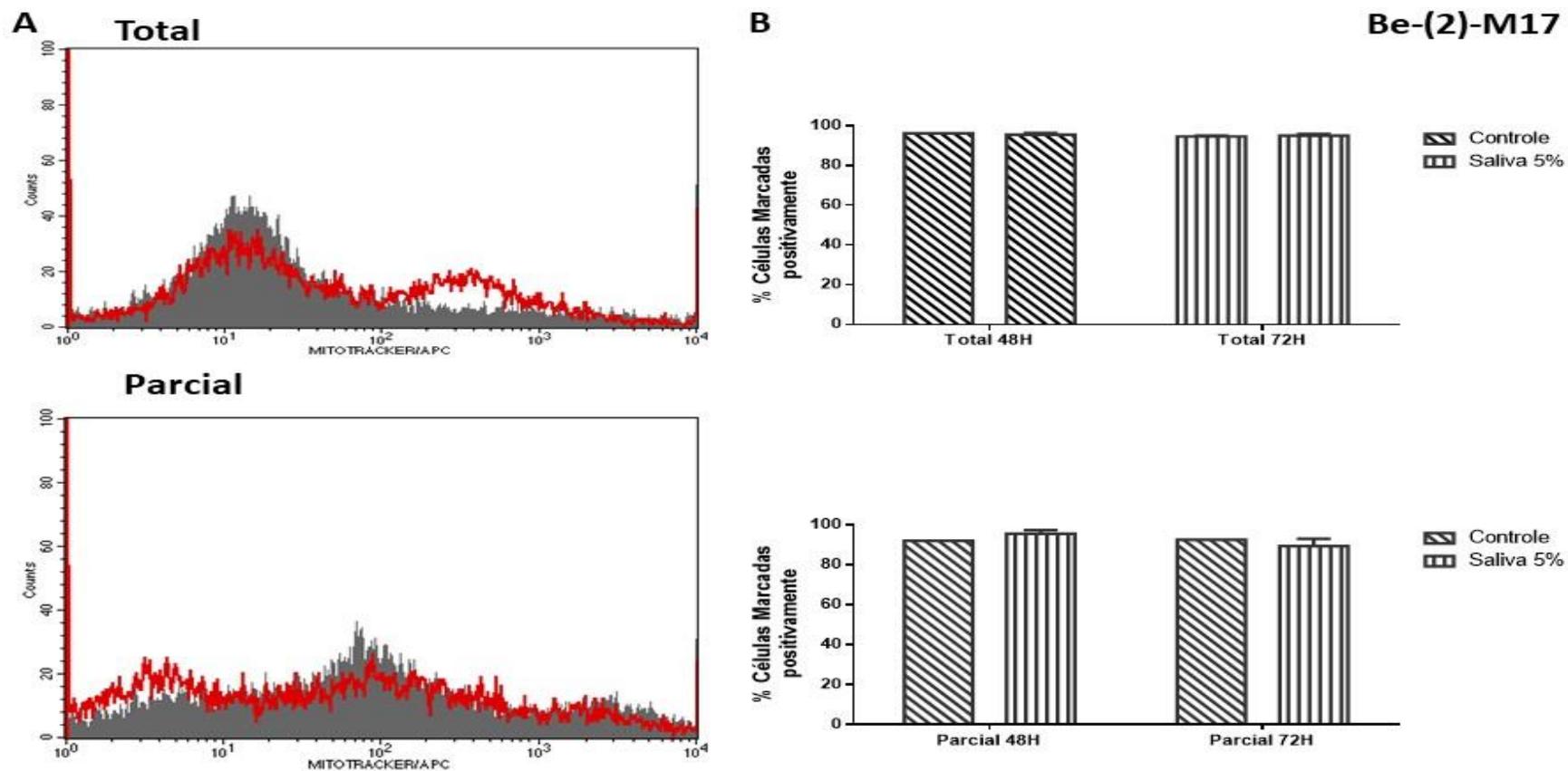


Figura 13. Análise da determinação do tipo de morte celular da linhagem de neuroblastoma Be(2)-M17 incubadas com 5% de saliva bruta de *A. sculptum* por 72h pelo teste MitoStatus. **A.** Histograma representativo das repetições do teste de MitoStatus, análise total e parcial. **B.** Estão representados na figura os dois gráficos. Todos os resultados estão em comparação com seu respectivo controle não tratado. Os resultados foram obtidos através de dois ensaios independentes em triplicata. Diferença significativa, em relação ao controle para $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) . Teste ANOVA, seguido de teste de Tukey

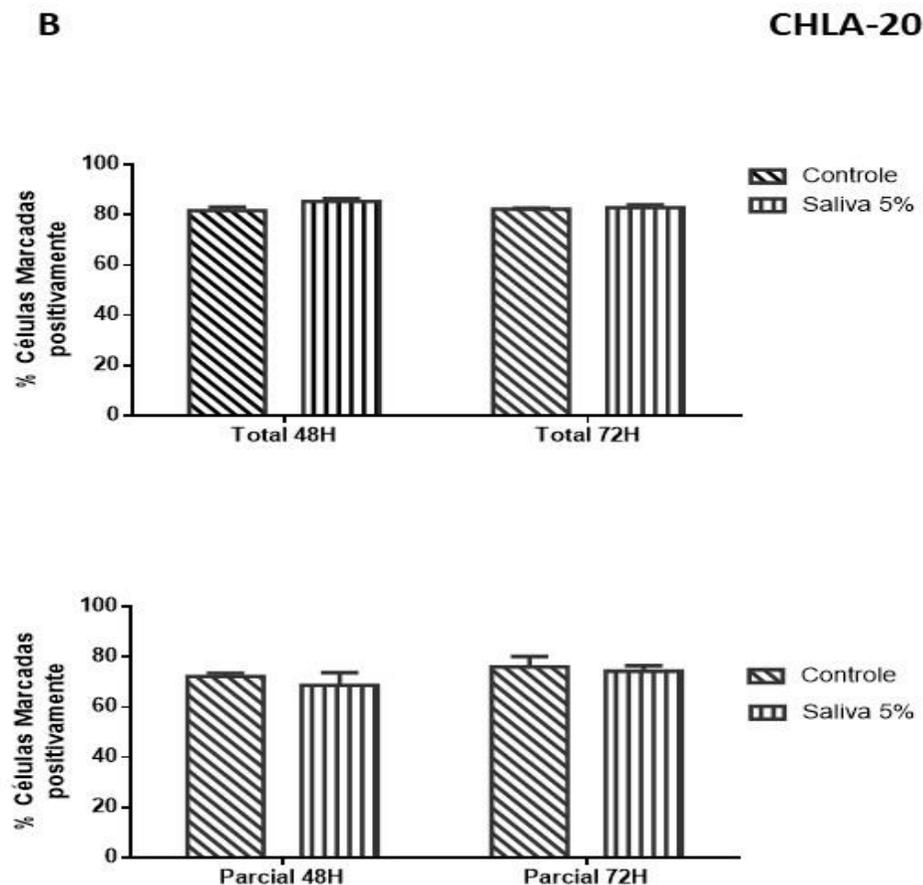
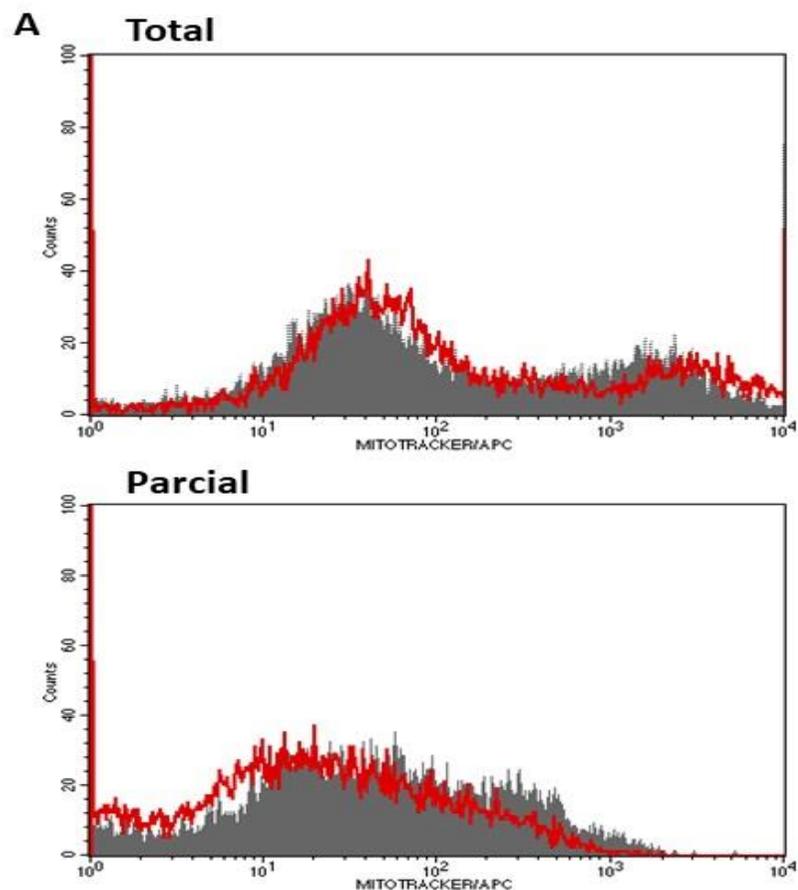


Figura 14. Análise da determinação do tipo de morte celular da linhagem de neuroblastoma CHLA-20 incubadas com 5% de saliva bruta de *A. sculptum* por 72h pelo teste MitoStatus. **A.** Histograma representativo das repetições do teste de MitoStatus, análise total e parcial. **B.** Estão representados na figura os dois gráficos. Todos os resultados estão em comparação com seu respectivo controle não tratado. Os resultados foram obtidos através de dois ensaios independentes em triplicata. Diferença significativa, em relação ao controle para $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). Teste ANOVA, seguido de teste de Tukey

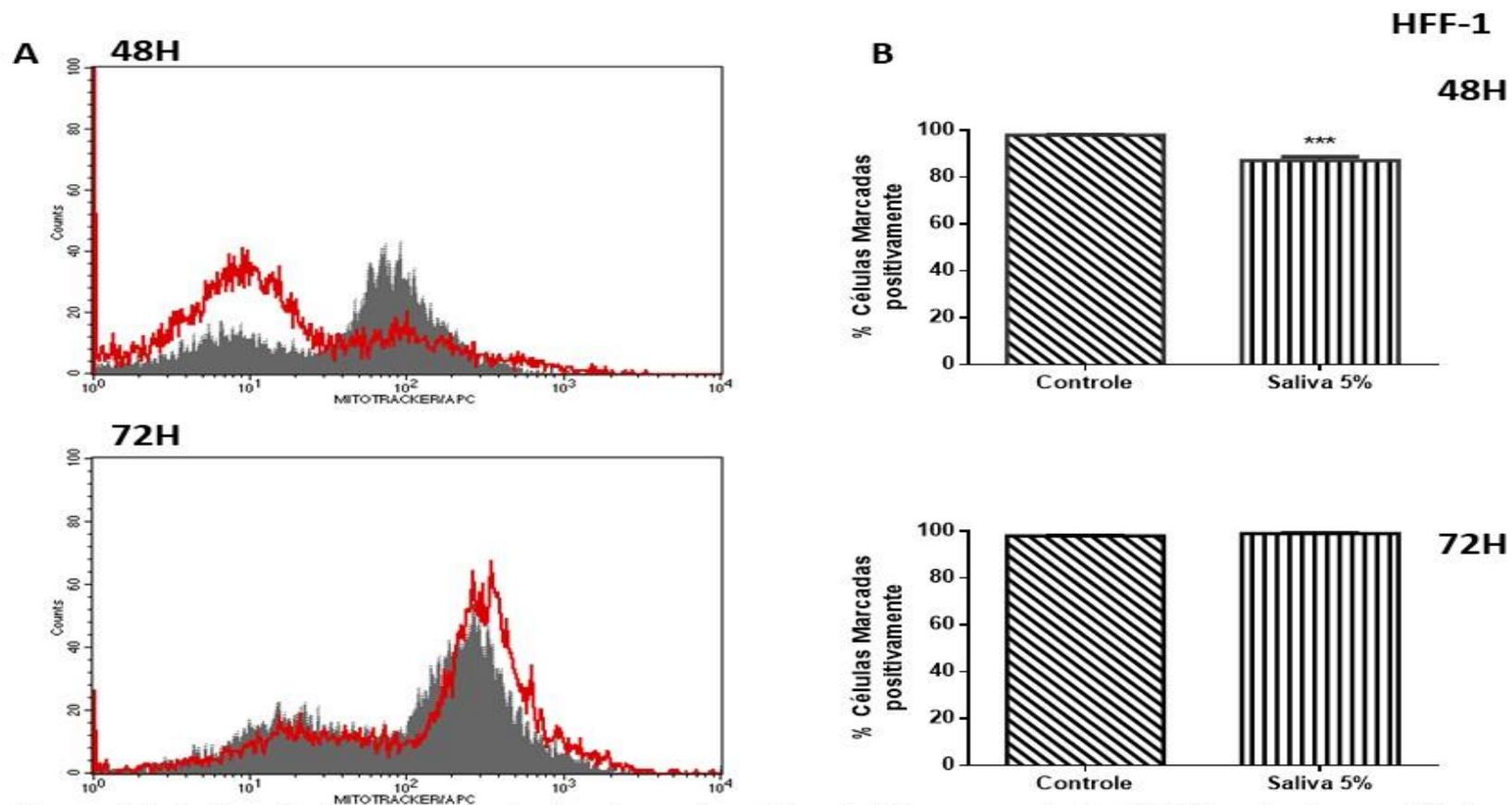


Figura 15. Análise da determinação do tipo de morte celular da linhagem controle HFF-1 incubada com 5% de saliva bruta de *A. sculptum* por 48 e 72h pelo teste de MitoStatus. **A.** Histograma representativo com a imagem que representava melhor as repetições do teste de MitoStatus, análise total e parcial. **B.** Estão representados na figura os dois gráficos. Todos os resultados estão em comparação com seu respectivo controle não tratado. Os resultados foram obtidos através de dois ensaios independentes em triplicata. Diferença significativa, em relação ao controle para $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). Teste ANOVA, seguido de teste de Tukey.

6. DISCUSSÃO

Resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa mostraram o efeito citotóxico da saliva bruta do carrapato *A. sculptum* sobre diferentes linhagens tumorais, com ação mais intensa sobre linhagens de neuroblastoma. O presente projeto teve o objetivo de ampliar o estudo e identificar se a saliva teria potencial como fonte de moléculas indutoras de apoptose para esse tipo tumoral.

O neuroblastoma é o tumor sólido mais abundante e tem como característica uma grande diversidade histológica (CHEN; PAPPO; DYER, 2015) podendo apresentar tipos celulares em diferentes estágios de diferenciação: desde células indiferenciadas com características neuroblásticas, até células completamente diferenciadas ganglionares e células de Schwann (ABBOTT et al., 2004).

As combinações destes tipos celulares geram um espectro de tumores neuroblásticos distintos entre si pelo grau de maturação celular e diferenciação (HE et al., 2017). Os ganglioneuromas (GN) são tumores considerados benignos, formados por células diferenciadas; neuroblastoma (NB) são tumores malignos que podem apresentar células diferenciadas, indiferenciadas ou em diferenciação. De modo geral, o grau de diferenciação celular é determinante no estadiamento do tumor e prognóstico, sendo que quanto mais diferenciada melhor o prognóstico. E por fim, os ganglioneuroblastomas, tumores que apresentam áreas tanto de GN quanto de NB (ABBOTT et al., 2004). Essa diferenciação das células pode ocorrer de forma espontânea ou pós-tratamento (CHEN; PAPPO; DYER, 2015).

Nossos resultados mostraram que a saliva bruta foi citotóxica para todas as linhagens testadas, mas apenas para SK-N-SH parece ter um efeito apoptótico. Estas células se mostraram muito sensíveis à saliva, respondendo ao menor estímulo, como demonstrado pela sua queda de viabilidade no teste de azul de metileno e, na maior concentração, pelas marcações positivas para anexina-V, 7-AAD e Caspase 3 ativada.

Um dos diferenciais das células SK-N-SH em relação às outras linhagens testadas é sua característica fenotípica altamente heterogênea, capaz de originar ambas populações de neuroblastoma (*N-type* e *S-type*), devido à presença de células classificadas como *I-type* (BOEVA et al., 2017).

A população neuroblástica (*N-type*) é composta por células pequenas redondas, e a *S-type* corresponde a células maiores, mais aderentes e espalhadas (TWEDDLE et al., 2001). O que é um resultado interessante para a utilização da SB visto que quando encontrado o fenótipo celular, *I-type*, o potencial maligno no neuroblastoma se mostra 4 a 5 vezes mais tumorigênico do que as células do tipo N e S (WALTON et al., 2004). Esse potencial aumentado poderia ser explicado por uma alta expressão de genes relacionados a células-tronco, que em conjunto podem possibilitar a proliferação sustentada e maior sobrevivência (ROSS et al., 2015). Alguns marcadores como vimentina, fibronectina vem sendo explorados, para a identificação de populações de células mais diferenciadas (CICCARONE et al., 1989) e outros como CD133, CD44 para a marcação de células com perfil mesenquimal (ROSS et al., 2015; ROSS; SPENGLER, 2007; WALTON et al., 2004).

A análise por citometria de fluxo mostra um perfil com duas populações celulares bem definidas para SK-N-SH, como demonstrado no *dotblot* de distribuição FSCxSSC (**Figura 6**), o que a diferencia das demais. A linhagem SH-SY5Y foi estabelecida como um subclone da linhagem SK-N-SH. Durante o estabelecimento desta linhagem, houve uma seleção de células distintas, grandes, semelhantes às células epiteliais com poucas projeções (**Figura 5K**). Apresenta ainda uma população heterogênea de células pouco diferenciadas e pouco aderentes, algumas em suspensão, mas em pequeno número se comparada com a linhagem original (SHIPLEY; MANGOLD; SZPARA, 2016; TWEDDLE et al., 2001). Os resultados mostrados neste trabalho, indicam que a saliva não foi capaz de induzir a apoptose nas células SH-SY5Y, o que poderia sugerir que a saliva induz apoptose em células de fenótipo indiferenciado, enquanto teria um efeito citotóxico por outras vias em células diferenciadas. Já que a linhagem SH-SY5Y não apresenta um perfil uniforme, a maioria das células são células do tipo-N, contudo não são o único tipo encontrado (PEZZINI et al., 2017). Todavia uma limitação deste trabalho foi a falta de marcação específica para os diferentes tipos celulares, o que nos impede de ir além de uma sugestão de que as células de fenótipo mesenquimal sejam mais sensíveis à saliva.

Assim como SH-SY5Y as células da linhagem Be(2)-M17 apresentam perfil fenotípico diferenciado e não são encontradas células indiferenciadas em

cultivo. Outros componentes já estudados, como ácido litocólico (um ácido biliar capaz de desencadear ambas as vias de morte apoptótica intrínseca e extrínseca, ativando as caspases-3, -6, -8 e -9), conrdicepina (3'-desoxiadenosina, é um derivado do nucleotídeo adenosina, pertencente a uma nova classe potencial de drogas anticâncer), são capazes de induzir a morte celular pela apoptose nessa linhagem (GOLDBERG et al., 2011; LI et al., 2015). Demonstrando que essa linhagem é responsiva a diferentes estímulos de morte, da mesma forma como seus resultados indicam para a SB. Todavia ela não apresenta esse aumento em ambos os marcadores Anexina/7-AAD e Caspase 3, sugerindo que apesar de responder ao estímulo, a via apoptótica possa não ser a via preferencial.

Outra linhagem que seguiu esse mesmo perfil foi a CHLA-20, estabelecida a partir de um tumor metastático após tratamento quimioterápico, com um grande potencial de escape da morte celular (KESHELAVA et al., 1998). Apesar de apresentar um aumento de células positivamente marcadas para Anexina/7AAD, teve uma queda na marcação de células positivas para Caspase-3-ativada. Sugerindo novamente que, outras vias de morte possam estar sendo ativadas pela SB. Essa linhagem deve ser analisada de uma forma cuidadosa, principalmente pelo fato de ter passado por tratamento antes de ser isolada. Existem evidências que demonstram que pelo fato dela ter passado por tratamento com cisplatina, ciclofosfamida, doxorubicina e tenipósido, fazem com que essa linhagem tenha desenvolvido mecanismos que a protegem mais efetivamente do que outras linhagens da ativação da apoptose (FROMMANN et al., 2018).

Com as características clínicas tão presentes no estudo do tumor de neuroblastoma, é possível associar suas diferentes linhagens *in vitro* nos diferentes desfechos encontrados. Quando analisados os resultados da SB sobre as linhagens celulares foi possível observar que apresentaram diferentes respostas. Quanto maior o grau de diferenciação celular, menor foi a resposta de morte celular desencadeada. Essa característica foi possível de ser observada principalmente quando analisadas as linhagens SK-N-SH e sua sublinhagem SH-SY5Y em conjunto, onde ambas apresentam respostas inversamente proporcionais quando analisadas com a SB.

Estudos anteriores reforçam a diversidade de efeito antitumoral da saliva de carrapatos, seja uma ação citotóxica direta ou mesmo interferência em processos necessários para a manutenção do tumor. A proteína Ixolaris, isolada da glândula salivar de *Ixodes scapularis*, induziu a redução da vascularização e da angiogênese em modelo murino de glioblastoma e melanoma. Componentes da SB do *Amblyomma sculptum*, denominado anteriormente *A. cajennense*, apresentou a tendência em desencadear a necroptose em células de melanoma e adenocarcinoma pancreático, sem afetar linhagens não tumorais (SIMONS et al., 2011). A proteína recombinante Amblyomin-X, identificada a partir do transcriptoma das glândulas salivares desta mesma espécie, mostrou forte efeito apoptótico em células de carcinoma renal, com sugestão para via intrínseca (AKAGI et al., 2012). Esta mesma proteína apresentou efeito apoptótico sobre adenocarcinoma de pâncreas e melanoma (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; MORAIS et al., 2016), além de indicações de que possa estar atuando como uma inibidora da autofagia celular (PACHECO et al., 2014). Numa outra forma de estudar os componentes salivares, extratos de glândulas de quatro espécies de carrapatos (*Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum*) foram capazes de desencadear a apoptose em células HeLa (KAZIMÍROVÁ et al., 2006).

As mitocôndrias desempenham um papel fundamental na iniciação e amplificação da morte celular, ativando a via intrínseca da apoptose (VAN VLIET; VERFAILLIE; AGOSTINIS, 2014). O efeito final é a redução do potencial de membrana mitocondrial, que tem como consequência a inibição das atividades dos complexos enzimáticos mitocondriais, seguida pela inibição da síntese de ATP, levando a danos celulares irreversíveis (ZERIN et al., 2015). Uma característica geral das células de neuroblastoma, é a tendência a perda/inativação da caspase 8 (BORRIELLO et al., 2016), fazendo com que, pela via apoptótica, a via intrínseca seja a única possível de ser ativada.

Nossos resultados com as linhagens de neuroblastoma não demonstraram danos às mitocôndrias, exceto para a linhagem SK-N-SH no tipo de ensaio que denominamos de “total”. Neste ensaio foram analisadas tanto as células em suspensão quanto as aderidas após a incubação com a saliva por 72h. Verifica-se grande perda de atividade mitocondrial (**Figura 11**), reforçando o efeito da saliva sobre as células de perfil mesenquimal, uma vez que nos

ensaios “parcial” em que foram testadas apenas as células aderidas não se observa qualquer perda mitocondrial. As evidências encontradas nessa linhagem levam a uma sugestão de que a via intrínseca possa ser a responsável pela ativação da via apoptótica em SK-N-SH.

Por fim, é importante considerar a aparente ação seletiva dos componentes da saliva. Mesmo que o tipo de morte celular não tenha sido determinado para todas as linhagens tumorais investigadas neste trabalho, verifica-se uma certa especificidade de ação quando comparamos os resultados para a linhagem controle não tumoral. Os fibroblastos perderam viabilidade em 50% na maior concentração e após um longo período de incubação. Chama a atenção o ensaio de atividade mitocondrial com uma expressiva perda de atividade após 48h de incubação, mas o mesmo não é visto no tempo de 72h de incubação, o que sugere a recuperação ou compensação mitocondrial pelo estresse gerado pela saliva.

Em síntese, os resultados apresentados foram capazes de indicar que a SB do carrapato *Amblyomma sculptum* contém moléculas que são capazes de desencadear uma resposta antitumoral. Embora exista a evidência de que a SB apresente atividade antitumoral, através da diminuição da capacidade de proliferação e viabilidade celular grande parte dessa evidência aponta para um perfil de morte celular além da via apoptótica. Demonstrando a necessidade da continuidade desse estudo para o entendimento de outras vias que podem estar sendo ativadas, além da identificação das moléculas responsáveis.

7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados sugerem que a SB é capaz de induzir a morte celular por diferentes vias e não somente a apoptose como proposto inicialmente. Durante o estudo a citotoxicidade da SB se mostrou dose e tempo-dependente para as diferentes linhagens de neuroblastoma.

Além disso, revelou que o tratamento com a SB parece atuar preferencialmente sobre as células da linhagem SK-N-SH, para a indução da via apoptótica, que apresenta células do tipo I (indiferenciadas). Para as outras linhagens há a sugestão da ocorrência de necrose ou necroptose.

A saliva bruta foi citotóxica, também para a linhagem não tumoral, apesar de numa menor proporção quando comparada com as células tumorais.

8. REFERÊNCIAS

- ABBOTT, R. M. et al. From the Archives of the AFIP. **RadioGraphics**, v. 24, n. 4, p. 1137–1163, 2004.
- AKAGI, E. M. et al. Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma “in vitro”. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 66, n. 1, p. 64–69, 2012.
- ALBANUS, R. D. OLIVEIRA et al. Reverse engineering the neuroblastoma regulatory network uncovers max as one of the master regulators of tumor progression. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–14, 2013.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2014. **Cancer Facts and Figures**, p. 1–72, 2014.
- ASHKENAZI, A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 19, n. 3–4, p. 325–331, 2008.
- ATTENE-RAMOS, M. S. et al. Profiling of the Tox21 Chemical Collection for Mitochondrial Function to Identify Compounds that Acutely Decrease Mitochondrial Membrane Potential. **Environmental Health Perspectives**, v. 123, n. 1, p. 49–56, 2015.
- BATISTA, I. F. C. et al. A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 493, n. 2, p. 151–156, 2010.
- BEATI, L. et al. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: Phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, 2013.
- BITENCOURTH, K. et al. Analysis of *Amblyomma sculptum* haplotypes in an area endemic for Brazilian spotted fever. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, n. 3, p. 342–350, 2016.
- BOEVA, V. et al. Heterogeneity of neuroblastoma cell identity defined by transcriptional circuitries. **Nature Genetics**, v. 49, n. 9, p. 1408–1413, 2017.
- BORRIELLO, L. et al. More than the genes, the tumor microenvironment in neuroblastoma. **Cancer Letters**, v. 380, n. 1, p. 304–314, 2016.
- BOWMAN, A. S.; SAUER, J. R. Tick salivary glands: function, physiology and future. **Parasitology**, v. 129, n. 07, p. S67, 2005.
- BREDESEN, D. E.; RAO, R. V.; MEHLEN, P. **Cell death in the nervous system** *Nature*, 2006.
- BRO, L. E.; KRUYT, F. A. E.; GIACCONE, G. Cell Death Independent of Caspases : A Review. v. 11, n. 9, p. 3155–3163, 2005.
- CABEZAS-CRUZ, A.; VALDÉS, J. J. Are ticks venomous animals? **Frontiers in zoology**, v. 11, p. 47, 2014.
- CARNEIRO-LOBO, T. C. et al. Ixolaris, a tissue factor inhibitor, blocks primary tumor growth and angiogenesis in a glioblastoma model. **Journal of thrombosis**

and haemostasis : JTH, v. 7, n. 11, p. 1855–64, 2009.

CARNEIRO-LOBO, T. C. et al. The tick-derived inhibitor Ixolaris prevents tissue factor signaling on tumor cells. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 10, n. 9, p. 1849–1858, 2012.

CARVALHO-COSTA, T. et al. Immunosuppressive effects of *Amblyomma cajennense* tick saliva on murine bone marrow-derived dendritic cells. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 22, 2015.

CHEN, D.; YU, J.; ZHANG, L. **Necroptosis: An alternative cell death program defending against cancer***Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 2016.

CHEN, X.; PAPPO, A.; DYER, M. A. **Pediatric solid tumor genomics and developmental pliancy***Oncogene*, 2015.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. et al. A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1145–1154, 2010.

CICCARONE, V. et al. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: Expression of distinct neural crest lineages. **Cancer Research**, v. 49, n. 1, p. 219–225, 1989.

DE LA FUENTE, J. et al. **Tick–Host–Pathogen Interactions: Conflict and Cooperation***PLoS Pathogens*, 2016.

DE LA FUENTE, J. et al. Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 2017.

DE OLIVEIRA, A. D. S. et al. Inhibition of tissue factor by ixolaris reduces primary tumor growth and experimental metastasis in a murine model of melanoma. **Thrombosis Research**, v. 130, n. 3, 2012.

DECREM, Y. et al. A family of putative metalloproteases in the salivary glands of the tick *Ixodes ricinus*. **FEBS Journal**, v. 275, n. 7, p. 1485–1499, 2008.

DREWES, C. C. et al. Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 333–340, 2012.

ELMORE, S. **Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death***Toxicologic Pathology*, 2007.

ESPOSITO, M. R. et al. Neuroblastoma treatment in the post-genomic era. **Journal of Biomedical Science**, v. 24, n. 1, p. 14, 2017.

ESTEVES, E. et al. Analysis of the salivary gland transcriptome of unfed and partially fed *Amblyomma sculptum* ticks and descriptive proteome of the saliva. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. NOV, p. 1–17, 2017.

ESTRADA-PENÑA, A. et al. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 14, p. 1081–1089, 2014.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2015.

FRANCISCHETTI, I. M. . The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in Bioscience**, v. Volume, n. 14, p. 2051, 2009.

FRANCISCHETTI, I. M. B. et al. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, Ixodes scapularis: Identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3602–3612, 2002.

FRANCISCHETTI, I. M. B. **Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals**Toxicon, 2010.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. C. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 94, n. 1, p. 167–174, 2005.

FROMMANN, K. et al. Vincristine resistance in relapsed neuroblastoma can be efficiently overcome by Smac mimetic LCL161 treatment. **Journal of Pediatric Surgery**, 2018.

FUKUMOTO, S. et al. Tick troponin I-like molecule is a potent inhibitor for angiogenesis. **Microvascular Research**, v. 71, n. 3, p. 218–221, 2006.

FULDA, S.; DEBATIN, K.-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, p. 4798–4811, 2006.

GARNER, E.; BEIERLE, E. Cancer Stem Cells and Their Interaction with the Tumor Microenvironment in Neuroblastoma. **Cancers**, v. 8, n. 1, p. 5, 2015.

GOLDBERG, A. A et al. Lithocholic bile acid selectively kills neuroblastoma cells, while sparing normal neuronal cells. **Oncotarget**, v. 2, n. 10, p. 761–82, 2011.

GOLDSMITH, K. C.; HOGARTY, M. D. **Targeting programmed cell death pathways with experimental therapeutics: Opportunities in high-risk neuroblastoma**Cancer Letters, 2005.

GREEN, D. R.; LLAMBI, F. Cell death signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 12, 2015.

GUGLIELMONE, A. A. et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83–100, 2006.

GUGLIELMONE, A. A. et al. Redescription of the male and description of the female of Ixodes abrocomae Lahille, 1916 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 77, n. 2, p. 153–160, 2010.

HAJNICKÁ, V. et al. Ixodid tick salivary gland products target host wound healing growth factors. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 2, p. 213–223, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HE, W.-G. et al. Clinical and biological features of neuroblastic tumors: A

comparison of neuroblastoma and ganglioneuroblastoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 23, p. 37730–37739, 2017.

HOOGSTRAAL, H. Argasid and Nuttalliellid Ticks as Parasites and Vectors. **Advances in Parasitology**, v. 24, n. C, p. 135–238, 1985.

HOVIUS, J. W. R.; LEVI, M.; FIKRIG, E. **Salivating for knowledge: Potential pharmacological agents in tick saliva** **PLoS Medicine**, 2008.

INCA. **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016**. [s.l: s.n.].

INCA. **Estimativa 2018**. [s.l: s.n.].

IOLASCON, A. et al. Caspase 3 and 8 deficiency in human neuroblastoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 146, p. 41–47, 2003.

IRWIN, M. S.; PARK, J. R. Neuroblastoma: Paradigm for precision medicine. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, n. 1, p. 225–256, 2015.

ISLAM, M. K. et al. The Kunitz-like modulatory protein haemangin is vital for hard tick blood-feeding success. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 7, 2009.

JAIRAM, V.; ROBERTS, K. B.; YU, J. B. Historical trends in the use of radiation therapy for pediatric cancers: 1973-2008. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 85, n. 3, 2013.

KADA, S.; MCCOY, K. D.; BOULINIER, T. Impact of life stage-dependent dispersal on the colonization dynamics of host patches by ticks and tick-borne infectious agents. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, 2017.

KAMIHARA, J. et al. Retinoblastoma and Neuroblastoma Predisposition and Surveillance. **Clin Cancer Res**, v. 23, n. 13, p. 98–107, 2017.

KAZIMÍROVÁ, M. et al. **Anti-proliferative activity and apoptotic effect of tick salivary gland extracts on human HeLa cells**. *Neuroendocrinology Letters. Anais...*2006

KAZIMÍROVÁ, M. et al. Tick-Borne Viruses and Biological Processes at the Tick-Host-Virus Interface. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. July, p. 1–21, 2017.

KAZIMÍROVÁ, M.; ŠTIBRÁNIOVÁ, I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n. August, p. 43, 2013.

KELLY, G. L.; STRASSER, A. The essential role of evasion from cell death in cancer. **Advances in Cancer Research**, v. 111, p. 39–96, 2011.

KESHELAVA, N. et al. Drug resistance patterns of human neuroblastoma cell lines derived from patients at different phases of therapy. **Cancer research**, v. 58, n. 23, p. 5396–405, 1998.

KHAN, F. H. et al. Acquired genetic alterations in tumor cells dictate the development of high-risk neuroblastoma and clinical outcomes. **BMC cancer**, v. 15, p. 514, 2015.

KOTÁL, J. et al. **Modulation of host immunity by tick saliva** **Journal of**

Proteomics, 2015.

LABI, V.; ERLACHER, M. How cell death shapes cancer. **Cell Death and Disease**, v. 6, n. 3, p. e1675, 2015.

LETAL, A. Apoptosis and Cancer. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 1, n. 1, p. annurev-cancerbio-050216-121933, 2017.

LI, Y. et al. Cordycepin induces apoptosis and autophagy in human neuroblastoma SK-N-SH and BE(2)-M17 cells. **Oncology Letters**, v. 9, n. 6, p. 2541–2547, 2015.

LI, Y.; NAKAGAWARA, A. Apoptotic Cell Death in Neuroblastoma. **Cells**, v. 2, p. 432–459, 2013.

LONERGAN, G.; SCHWAB, C. From the Archives of the AFIP Neuroblastoma, Ganglioneuroblastoma, and Ganglioneuroma: Radiologic- Pathologic Correlation. ..., p. 911–934, 2002.

LONG, J. S.; RYAN, K. M. **New frontiers in promoting tumour cell death: Targeting apoptosis, necroptosis and autophagy** **Oncogene**, 2012.

LOUIS, C. U.; SHOHET, J. M. Neuroblastoma: Molecular Pathogenesis and Therapy. **Annu Rev Med**, v. 66, p. 49–63, 2015.

MANS, B. J. et al. The Mitochondrial Genomes of *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae) and *Argas africanus* (Ixodoidea: Argasidae): Estimation of Divergence Dates for the Major Tick Lineages and Reconstruction of Ancestral Blood-Feeding Characters. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

MARIS, J. M. Recent Advances in Neuroblastoma. **N Engl J Med**, v. 362, n. 23, p. 2202–2211, 2010.

MASTRANGELO, S. et al. Treatment of advanced neuroblastoma in children over 1 year of age: The critical role of 131I-metaiodobenzylguanidine combined with chemotherapy in a rapid induction regimen. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 56, n. 7, p. 1032–1040, 2011.

MATTHAY, K. K. et al. Neuroblastoma. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, 2016.

MESQUITA PASQUALOTO, K. et al. Structural Findings and Molecular Modeling Approach of a TFPI-Like Inhibitor. **Protein & Peptide Letters**, v. 21, n. 5, p. 452–457, 2014.

MLAKAR, V. et al. 11q deletion in neuroblastoma: a review of biological and clinical implications. **Molecular Cancer**, v. 16, p. 1–12, 2017.

MOHLIN, S. A.; WIGERUP, C.; PÅHLMAN, S. Neuroblastoma aggressiveness in relation to sympathetic neuronal differentiation stage. **Seminars in Cancer Biology**, v. 21, n. 4, p. 276–282, 2011.

MORAIS, K. L. P. et al. Amblyomin-X induces ER stress, mitochondrial dysfunction, and caspase activation in human melanoma and pancreatic tumor cell. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 415, n. 1–2, 2016.

MOREIRA, H. N. S. et al. A deep insight into the whole transcriptome of midguts, ovaries and salivary glands of the *Amblyomma sculptum* tick. **Parasitology**

International, v. 66, n. 2, p. 64–73, 2017.

MOURA-MARTINIANO, N. O. et al. Relative transcription of autophagy-related genes in *Amblyomma sculptum* and *Rhipicephalus microplus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, 2017.

MULLASSERY, D.; LOSTY, P. D. Neuroblastoma. **Paediatrics and Child Health**, v. 26, n. 2, p. 68–72, 2016.

NARASIMHAN, S.; FIKRIG, E. Tick microbiome: The force within **Trends in Parasitology**, 2015.

NAVA, S. et al. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252–276, 2014.

OLIVEIRA, C. J. F. et al. Deconstructing tick saliva: Non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p. 10960–10969, 2011.

OLIVER, J. H. Biology and Systematics of Ticks (Acari:Ixodida). **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, n. 1, p. 397–430, 1989.

OPFERMAN, J. T. **Attacking cancer's Achilles heel: antagonism of anti-apoptotic BCL-2 family members** **FEBS Journal**, 2016.

PACHECO, M. T. F. et al. Dynein function and protein clearance changes in tumor cells induced by ?? Kunitz-type molecule, Amblyomin-X. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–20, 2014.

PACHECO, M. T. F. et al. Specific role of cytoplasmic dynein in the mechanism of action of an antitumor molecule, Amblyomin-X. **Experimental Cell Research**, v. 340, n. 2, p. 248–258, 2016.

PANDEY, M. K. et al. Targeting cell survival proteins for cancer cell death. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 1, p. 1–26, 2016.

PEZZINI, F. et al. Transcriptomic Profiling Discloses Molecular and Cellular Events Related to Neuronal Differentiation in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 37, n. 4, p. 665–682, 2017.

PINTO, N. R. et al. Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. **Journal of clinical oncology**, v. 33, p. 3008–3017, 2015.

POOLE, N. M. et al. Prostaglandin E2 in tick saliva regulates macrophage cell migration and cytokine profile. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, 2013a.

POOLE, N. M. et al. Effects of tick saliva on the migratory and invasive activity of Saos-2 osteosarcoma and MDA-MB-231 breast cancer cells. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 1–2, p. 120–127, 2013b.

PORTER, A. G.; JANICKE, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell death and differentiation**, v. 6, p. 99–104, 1999.

POWLEY, I. R. et al. Caspase-8 tyrosine-380 phosphorylation inhibits CD95

DISC function by preventing procaspase-8 maturation and cycling within the complex. **Oncogene**, v. 35, n. 43, p. 5629–5640, 2016.

RATNER, N. et al. **The “neuro” of neuroblastoma: Neuroblastoma as a neurodevelopmental disorder***Annals of Neurology*, 2016.

RIBEIRO, J. M. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 161, n. 2, p. 332–344, 1985.

ROSS, R. A. et al. A distinct gene expression signature characterizes human neuroblastoma cancer stem cells. **Stem Cell Research**, v. 15, n. 2, p. 419–426, 2015.

ROSS, R. A.; SPENGLER, B. A. **Human neuroblastoma stem cells***Seminars in Cancer Biology*, 2007.

SAKAMURU, S.; ATTENE-RAMOS, M. S.; XIA, M. HHS Public Access. **Methods Mol Biol**, v. 1473, p. 17–22, 2016.

SAYERS, T. J. **Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy***Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2011.

SEGAWA, K.; NAGATA, S. **An Apoptotic “Eat Me” Signal: Phosphatidylserine Exposure***Trends in Cell Biology*, 2015.

SHIPLEY, M. M.; MANGOLD, C. A.; SZPARA, M. L. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. **Journal of Visualized Experiments**, n. 108, 2016.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7–30, 2017.

SIMONS, S. M. et al. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 65, n. 6, p. 443–450, 2011.

SNIGDHA, S. et al. Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death. **Neurosci Bull**, v. 28, n. 1, p. 14–24, 2012.

SOUSA, A. C. P. et al. Exploring the anti-tumoral effects of tick saliva and derived components. **Toxicon**, v. 102, p. 69–73, 2015.

SOUSA, A. C. P. et al. Anti-neoplastic activity of *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma parvum* and *Rhipicephalus sanguineus* tick saliva on breast tumor cell lines. **Toxicon**, v. 148, p. 165–171, 2018.

SOUZA, J. G. DE et al. Promising pharmacological profile of a Kunitz-type inhibitor in murine renal cell carcinoma model. v. 7, n. 38, 2016.

STRASSER, A.; CORY, S.; ADAMS, J. M. **Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases***EMBO Journal*, 2011.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 9, p. 621–632, 2010.

THIELE, C. J. **Neuroblastoma Cell Lines**. [s.l: s.n.]. v. 1

TWEDDLE, D. A et al. p53 cellular localization and function in neuroblastoma: evidence for defective G(1) arrest despite WAF1 induction in MYCN-amplified cells. **The American journal of pathology**, v. 158, n. 6, p. 2067–2077, 2001.

VALENZUELA, J. G. et al. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. **The Journal of experimental biology**, v. 205, n. Pt 18, p. 2843–2864, 2002.

VAN VLIET, A. R.; VERFAILLIE, T.; AGOSTINIS, P. **New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling***Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 2014.

VERBRUGGE, I.; JOHNSTONE, R. W.; SMYTH, M. J. SnapShot: Extrinsic apoptosis pathways. **Cell**, v. 143, n. 7, 2010.

WALTON, J. D. et al. Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 6, n. 6, p. 838–45, 2004.

WEYHENMEYER, B. et al. **Targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family members for the treatment of cancer***Experimental Oncology*, 2012.

WIKEL, S. Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: Host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. NOV, 2013.

ZAMBELLI, V. O. et al. **Harnessing the knowledge of animal toxins to generate drugs***Pharmacological Research*, 2016.

ZEMBRUSKI, N. C. L. et al. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. **Analytical Biochemistry**, v. 429, n. 1, p. 79–81, 2012.

ZERIN, T. et al. Effects of formaldehyde on mitochondrial dysfunction and apoptosis in SK-N-SH neuroblastoma cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 31, n. 6, p. 261–272, 2015.