

INVESTIGAÇÃO DO GENE DO AMBLYOMIN-X COMO CANDIDATO A DNA TERAPÊUTICO ANTITUMORAL

VICTOR DAL POSOLO CINEL; ANA MARISA CHUDZINSKI-TAVASSI; CARLOS DEOCESANO-PEREIRA; MARCOS VINICIUS BURI; MELISSA REGINA FESSEL

Introdução: O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento celular descontrolado e é uma das principais causas de morte no mundo. Proteínas derivadas da biodiversidade têm sido exploradas como uma abordagem promissora no tratamento do câncer. Uma proteína recombinante tipo kunitz derivada do carrapato *Amblyomma sculptum*, o Amblyomin-X (AMB), demonstrou atividade antitumoral seletiva em células tumorais. No entanto, sua produção em larga escala utilizando sistemas bacterianos enfrenta desafios devido à sua estrutura complexa. Uma abordagem alternativa para superar esses desafios de produção envolve a expressão da molécula terapêutica diretamente nas células do paciente. **Objetivo:** Avaliar plasmídeos que expressam o gene AMB endereçado para diferentes compartimentos celulares para uso como DNA terapêutico antitumoral em células de melanoma humano. **Métodos:** Foram sintetizados plasmídeos codificando o AMB ou eGFP (controle) direcionados para: secreção, retículo endoplasmático (RE), mitocôndria e sem endereçamento específico. A transfecção foi padronizada em células de melanoma humano SKMEL28 e a produção do AMB foi verificada por RT-PCR e Western Blot. O potencial antitumoral foi avaliado por MTT e pela atividade das Caspases 3/7. Plasmídeos coexpressando AMB e E2-Crimson foram utilizados para avaliar células E2-Crimson+ por citometria de fluxo. Análises de bioinformática foram realizadas em busca de possíveis sítios de destruição na sequência da proteína. **Resultados:** A eficiência de transfecção foi de $\pm 50\%$ em células SKMEL28. A produção de AMB foi induzida a nível de RNAm por todos os plasmídeos, mas apenas o AMB secretado e o AMB direcionado ao RE foram detectados a nível proteico. A transfecção não modulou a viabilidade celular ou a atividade das Caspases 3/7. Análises de bioinformática sugerem que o AMB pode estar sendo degradado por ubiquitinação/sumoilação. **Conclusão:** Embora todos os plasmídeos foram capazes de induzir a transcrição do AMB em células SKMEL28, apenas o AMB secretado e o AMB direcionado ao RE foram identificados a nível proteico. Sob as condições avaliadas, nenhum dos plasmídeos apresentou efeito antitumoral em células SKMEL28. Nas próximas etapas, serão realizadas mutações dirigidas nos sítios de degradação previstos para avaliar se, quando intactos, o AMB mitocondrial e o AMB sem endereçamento específico são capazes de induzir um efeito antitumoral.

Palavras-chave: Terapia gênica, Kunitz, Câncer, Melanoma, *Amblyomma sculptum*.