



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS COM A RESISTÊNCIA QUÍMICA DE CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA

Augusto Santana Nascimento

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Willian Fernando Zambuzzi

**BOTUCATU – SP
2016**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS COM A
RESISTÊNCIA QUÍMICA DE CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA**

AUGUSTO SANTANA NASCIMENTO

WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Willian Fernando Zambuzzi

**BOTUCATU – SP
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Nascimento, Augusto Santana.

Mecanismos moleculares envolvidos com a resistência química de células tumorais de mama / Augusto Santana Nascimento. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Willian Fernando Zambuzzi
Capes: 20804008

1. Mamas - Câncer. 2. Drogas - Resistência. 3. Análise de microarranjo. 4. Tumores - Crescimento.

Palavras-chave: Câncer de mama; Jak-Stat; PKC; PepChip; Resistência.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha esposa, Ana Paula, por estar sempre ao meu lado, me ajudando nos momentos mais difíceis e por ser minha grande incentivadora. Também à minha família por ter me dado base e grandes exemplos para concluir mais essa etapa de minha vida.

Ao meu orientador, Willian Zambuzzi, pelo voto de confiança, apoio e amizade criada e fortalecida ao longo dessa trajetória.

Ao Renato Milani pelos interactomas que nos norteou ao longo do trabalho e Rodrigo Augusto da Silva pelo auxílio com as análises dos gráficos.

Agradeço também à Carmen V. Ferreira-Halder, por ter nos oferecido seu laboratório e conhecimento para realizarmos experimentos, juntamente com Luisa Peres Leite, por ter colaborado com os blottings.

Ao Maikel P. Peppelenbosch pelo suporte material e apoio para confecção e análise dos PepChips.

À UNESP pelo incentivo e espaço de aprendizado proporcionado no qual o trabalho pôde ser realizado de maneira satisfatória.

Por fim, agradeço ao meu grande amigo e também companheiro de laboratório, Célio Fernandes, pela colaboração diária e boas risadas que compartilhamos.

Muito obrigado!

RESUMO

Embora algum progresso tenha sido alcançado nos últimos anos, ainda são necessários estudos capazes de desvendar os mecanismos moleculares envolvidos com o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) em células tumorais. Com esta finalidade, estabelecemos o perfil quinômico (através do microarranjo de peptídeos, PepChip) das linhagens MCF7 e MCF7Res, fenótipo parental e resistente respectivamente, de células de câncer de mama. Os resultados obtidos pelo microarranjo de peptídeos e posteriormente, validados por *western blotting*, apontaram o envolvimento da via de sinalização Jak-Stat e isoformas de PKC no processo de resistência das células de câncer de mama. Além disso, mostramos envolvimento de p42/44-mapk, Ras e um aumento na expressão de MMP-9. Estes resultados mostram o potencial agressivo destas células resistentes, visto que estas vias estão envolvidas em mecanismos responsáveis pela proliferação e invasão celular. Como as proteínas Jak1 e Jak2 mostraram-se envolvidas, decidimos avaliar níveis de fosforilação de Stats 1, 2, 3, 5 e 6 e mostramos que todas estavam *up*-fosforiladas nas células resistentes. Baseado nestes resultados, decidimos avaliar através de um ensaio funcional, o papel de Jak2 no fenótipo resistente e, desta forma, avaliamos a viabilidade das células MCF7Res em pré-tratamento com 2 concentrações subtóxicas do inibidor de Jak2 (5 μ M e 10 μ M) e nossos resultados claramente mostraram que, inibindo Jak2, as células MCF7Res ficam mais sensíveis a daunorrubicina, aumentando a taxa de morte celular frente à resposta ao quimioterápico. Baseado nos resultados obtidos pelo fosfoproteoma concluímos que o fenótipo MDR envolve metabolismo específico em células tumorais de mama, onde isoformas de PKCs e sinalização Jak-Stat exercem função de destaque. Assim, estes dados apontam o potencial uso de inibidores de Jak2 como estratégia para o tratamento de pacientes não responsivos a terapias convencionais.

Palavras Chaves: Câncer de Mama; Resistência; PepChip; PKC; Jak-Stat.

ABSTRACT

Although some progress has been achieved in recent years, it is still necessary studies to unravel the molecular mechanisms involved in multidrug resistance (MDR) phenotype in tumor cells. For this purpose, we established kinomic profile (by peptides microarray, PepChip) of MCF7 and MCF7Res lineages, parental and resistant phenotype, respectively, of breast cancer cells. The results obtained by microarray of peptides and subsequently validated by *western blotting* indicated the involvement of the Jak-Stat pathway signaling and PKC isoforms in the process of resistance of breast cancer cells. Furthermore, we show involvement of p42/44-MAPK, Ras and an increase in MMP-9 expression. These results show the potential of these aggressive resistant cells, since these pathways are involved in the mechanisms responsible for cell proliferation and invasion. As Jak1 and Jak2 protein shown to be involved, we decided to assess phosphorylation levels of Stats 1, 2, 3, 5 and 6, and show that all were up-phosphorylated in resistant cells. Based on these results, we decided to evaluate by a functional assay, Jak2 role in the resistant phenotype, and thus, evaluate the viability of MCF7Res cells pre-treated with 2 subtoxic concentrations of Jak2 inhibitor (5 μ M and 10 μ M) and our results have clearly shown that inhibiting Jak2, the MCF7Res cells become more sensitive to daunorubicin, increasing the rate of cell death forward the response to chemotherapy. Based on the results obtained by fosfoproteoma we conclude that the MDR phenotype involves specific metabolism in breast tumor cells, where PKCs isoforms and Jak-Stat signaling exercise prominent role. Thus, these data indicate the potential use of Jak2 inhibitors as a strategy for treatment of patients unresponsive to conventional therapies.

Key Words: Breast Cancer; Resistance; PepChip; PKC; Jak-Stat.

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt - Proteína Quinase B

ATP - Adenosina Trifosfato

Bcl - Linfoma de células B

BCRP - Proteínas de resistência de tumor de mama

BSA - Albumina Sérica Bovina

CK2 - Caseína quinase 2

DAG - Diacilglicerol

ERK - Quinase regulada por sinal extracelular

ER - Receptor de Estrógeno

GSK3 β - Glicogênio Sintase Quinase 3 Beta

HER2 - *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*

IL - Interleucina

INCA - Instituto Nacional do Câncer

IP3 - Inositol Trifosfato

JAK - *Janus kinase*

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno

MCF7Res - MCF/ resistente à Adriamicina

MDR - Resistência a múltiplas drogas

MEK - Quinase ativadora da MAP quinase

MMPs - Metaloproteinases de matriz

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Tampão fosfato salino

PGp - Glicoproteína P

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase

PIAS - Proteína inibidora da STAT ativada

PIP2 - Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKC - Proteína quinase C

PKD - Proteína quinase D

PLC γ - Fosfolipase C γ

PTP - Proteína tirosina fosfatase

PVDF - Fluoreto de polivinilideno

RTK - Receptor tirosina quinase

SDS - *Dodecil sulfato de sódio*

SFB - Soro Fetal Bovino

SH2 - Src-homólogo 2

SOCS - Supressores de sinalização de citocinas

STAT - Transdutores de sinal ativadores da transcrição

TBS - Tampão Tris Salino

TBST - Tampão Tris Salino com Tween

Transportadores ABC - *ATP-binding cassette transporters*

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo topológico da proteína BCRP na membrana	5
Figura 2. Layout do “Pepchip Kinomics	9
Figura 3. Estrutura dos domínios das isoformas da proteína quinase C (PKC)	11
Figura 4. Esquema de ativação de PKC	12
Figura 5. Representação esquemática da transdução de sinal da Jak e Stat	15
Figura 6. Regulação da via de sinalização celular Jak-Stat	18
Figura 7. Teste de viabilidade celular avaliado pela função mitocondrial	26
Figura 8. Imagens representativas dos PepChips	28
Figura 9. Quinases que apresentaram maiores diferenças entre as linhagens avaliadas	30
Figura 10. Rede de proteínas que ilustra interações entre isoformas de proteína quinase C e proteínas encontradas com perfis de fosforilação alterados	31
Figura 11. Expressão e fosforilação diferencial de PKC α , pPKC $\alpha\beta$ II, total-PKC, pPKC pan- β II, PKD/PKC μ , pPKD/PKC μ , PKC δ , pPKC $\delta\theta$, PKC ζ e PLC γ	36
Figura 12. Expressão diferencial de Ras, p44/42 MAPK, GSK3 β e MMP-9	39
Figura 13. Rede de proteínas que ilustra interações entre isoformas de proteína quinase C e proteínas encontradas com perfis de fosforilação alterados conhecidos para ser fosforilada por elas	41
Figura 14. Expressão diferencial de Jak-Stat	43
Figura 15. Viabilidade celular de células de câncer de mama após tratamento com inibidor de Jak	45
Figura 16. Efeito do inibidor de Jak na resposta ao quimioterápico	47
Figura 17. Mecanismos de transdução de sinal envolvidos com a resistência de células tumorais de mama	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais proteínas quinases moduladas diferencialmente nas células de câncer de mama resistentes à adriamicina

29

SUMÁRIO

RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
LISTA DE SIGLAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. MATERIAL.....	21
3.2. CULTURA DE CÉLULAS.....	21
3.3. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR (MTT).....	21
3.4. ANÁLISE DO PERFIL QUINÁSICO DAS CÉLULAS.....	22
3.5. VALIDAÇÃO DA ATIVIDADE DAS QUINASES.....	23
3.6. ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS DO PEPCHIP.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5. CONSTATAÇÕES.....	49
6. CONCLUSÃO.....	50
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	51
8. REFERÊNCIAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

A cada ano, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima o número de novos casos e de mortes decorrentes ao câncer. No caso de câncer de mama, estima-se que 1,7 milhões de novos casos foram diagnosticados no ano de 2012 pelo mundo (FERLAY et al., 2014). É uma das causas de morte mais relevante entre as mulheres, sendo responsável sozinho por aproximadamente 25% dos casos de câncer e 15% das mortes (TORRE et al., 2015), tornando-se o segundo tipo mais frequente de câncer no mundo e o mais frequente na população feminina. Segundo estimativas do INCA (Instituto Nacional do Câncer), para 2016 são esperados 57.960 novos casos de câncer de mama no Brasil, com risco estimado de 56,20 casos por 100 mil mulheres (“Estimate/2016 - Cancer Incidence in Brazil”). Na população brasileira é a primeira causa de morte por câncer entre as mulheres, com 12,66 óbitos/100.000 mulheres em 2013 (“Atlas On-line de Mortalidade”- INCA). As regiões Sudeste e Sul são as que apresentam as maiores taxas, com 14,25 e 13,70 óbitos/100.000 mulheres em 2013, respectivamente.

Em relação ao tratamento vigente, a quimioterapia e a terapia hormonal têm sido os principais protocolos terapêuticos utilizados nas últimas décadas (BARGINEAR et al., 2008). Com os avanços no conhecimento das bases moleculares das vias de sinalização de vários cânceres, iniciou-se uma nova era na busca do entendimento destas doenças, levando em consideração sobretudo ao tratamento, onde é possível caracterizar reguladores das propriedades malignas das células cancerígenas, tornando-os alvos moleculares e terapêuticos (MOHAMED et al., 2013). Desta forma, além de quimioterápicos tradicionais, a utilização de anticorpos (imunoterapia) tem surgido como tratamento alternativo (KANG et al., 2014). Alguns já estão sendo utilizados na prática clínica como o trastuzumab,

pertuzumab e o docetaxel, que são anticorpos contra HER2, receptor tirosina quinase que é um importante regulador do crescimento das células de câncer de mama (SWAIN et al., 2015).

Embora algum progresso ter sido alcançado nos últimos anos, já frutos do progresso científico e acadêmico, muitas ainda são as perguntas referente aos mecanismos moleculares que levam a resistência ao tratamento químico destas células. Brevemente, sabe-se que varia de paciente para paciente, trazendo um efeito individualizado, e que concentrações cada vez maiores são necessárias para que tenham os mesmos efeitos. No entanto, estes tratamentos oferecem uma carga de efeitos colaterais agressivos, comprometendo outras funções e aspectos psicológicos e sociais. Sendo assim, justifica-se a busca por moléculas intracelulares envolvidas com a resposta aos tratamentos quimioterápicos, bem como proteínas envolvidas com a resistência a estes tratamentos; só assim novas drogas e/ou dosagens serão propostas, com resultados clínicos satisfatórios e diminuição de efeitos colaterais.

Baseado neste cenário, esta dissertação buscou utilizar microarranjo de peptídeos para entender mecanismo global de quinases envolvido com a resistência a quimioterápico. Para tanto, utilizou-se linhagens de células tumorais de mama, resistentes ou não, a daunorrubicina.

RESISTÊNCIA À MÚLTIPLAS DROGAS (MDR)

Um dos principais obstáculos no tratamento de pacientes com câncer é aquisição de resistência a agentes quimioterápicos, especialmente quando a quimioterapia ainda é a

principal conduta terapêutica de escolha. Por esta razão, a elucidação dos diversos mecanismos que conferem resistência a fármacos com diferentes alvos e estruturas químicas e o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para o câncer têm sido as principais metas de estudo de diversos grupos de pesquisa. A resistência a quimioterápicos pode se manifestar clinicamente logo nos estágios iniciais de tratamento, constituindo o fenômeno de resistência “*de novo*” ou ser induzida durante o processo quimioterápico quando células mais “sensíveis” são eliminadas. Em consequência, observa-se que resistência genética pode ser induzida tanto pelo próprio tratamento com agentes anti-neoplásicos ou emergir como um evento espontâneo.(KAPPELMAYER et al., 2004; SZAKÁCS et al., 2006).

Como um mecanismo de caráter multifatorial, o fenótipo MDR tem sido associado a uma série de alterações celulares incluindo alterações no ciclo celular, aumento na eficiência de reparo do DNA, redução de apoptose e alteração no metabolismo de drogas (SZAKÁCS et al., 2006). Entre os vários mecanismos identificados o mais comumente encontrado envolve o aumento do efluxo de drogas citotóxicas hidrofóbicas através de um sistema dependente de energia, mediado por membros da superfamília de transportadores ABC (“ATP-binding cassette transporters”). Existem 48 membros desta superfamília que foram classificados em 7 famílias como ABC A-G, e 16 transportadores ABC estão envolvidos em doenças humanas. Entre estes, ABCB1 (P-glicoproteína/MDR1), ABCC1 (MRP1) e ABCG2 (BCRP1) são os principais transportadores de fármacos que têm sido amplamente implicados na resistência a drogas em vários cânceres (AMIRI-KORDESTANI et al., ; CHOI; YU, 2014; LI et al., 2015). Estes transportadores são encontrados em vários cânceres, incluindo pulmão, mama e pâncreas, e sua sobre expressão é inversamente correlacionada com a sobrevida do paciente. Vários estudos demonstraram que o tratamento

com medicamentos quimioterapêuticos, aumenta a expressão de transportadores ABC *in vitro*. Consistente com isto, as amostras de pacientes tratados com quimioterapia tem demonstrado uma expressão elevada de transportadores ABC. (ARNASON; HARKNESS, 2015; BAGULEY, 2010; KRUH; BELINSKY, 2003; MURRAY et al., 2012; WEEN et al., 2015)

O membro mais bem conhecido da família é a proteína de membrana da P-glicoproteína codificada pelo gene MDR1, porém outros transportadores funcionalmente semelhantes têm sido correlacionados com a diminuição da eficácia de uma variedade de diferentes agentes quimioterápicos.(MURRAY et al., 2012)

A proteína de resistência do câncer de mama (BCRP), pertencente à subfamília G, membro 2 (ABCG2). É um transportador ABC identificado como uma das causas moleculares da resistência a múltiplas drogas (MDR) em células cancerosas diversas. BCRP funciona fisiologicamente como uma parte de um mecanismo de autodefesa para o organismo, aumentando a eliminação de substâncias tóxicas e xenobióticos do interior das células. BCRP reconhece e transporta numerosos medicamentos anticancerígenos incluindo quimioterápicos, assim, a expressão de BCRP em células cancerosas causa diretamente MDR pelo efluxo ativo de drogas anticâncer. (NAKANISHI; ROSS, 2012; NI et al., 2010)

Fig. 1.

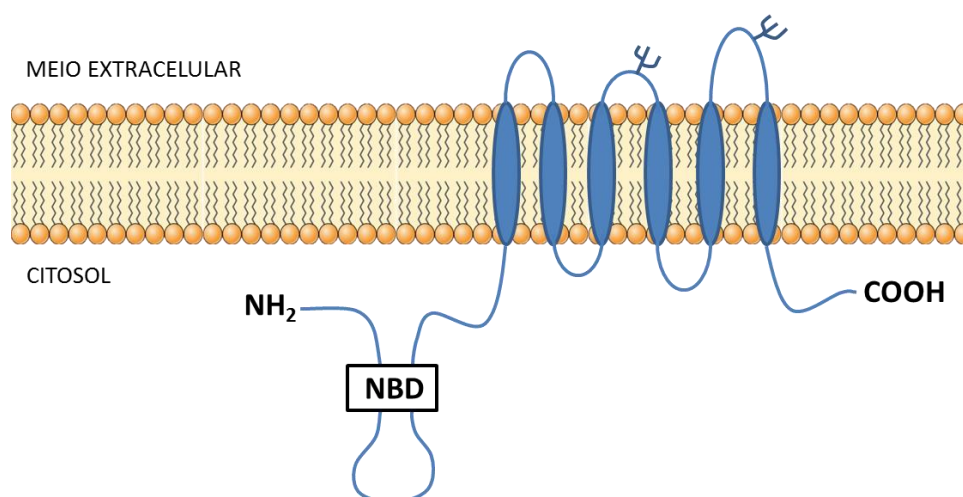


Fig. 1. Modelo topológico da proteína BCRP na membrana. A proteína BCRP contém um domínio de ligação ao nucleotídeo (NBD), seguido por 6 alfa-hélices transmembrana.

A estratégia para o desenvolvimento de drogas antitumorais se baseia no fato de que células cancerosas apresentam uma taxa de replicação muito maior do que células não tumorais e, portanto sofrerão mais os efeitos tóxicos da quimioterapia, porém essa abordagem também prejudica muito as células não tumorais, debilitando o paciente e em muitos casos a droga que inicialmente era eficaz passa a não fazer mais efeito, pois o organismo cria resistência. Por esse motivo estudos mais recentes estão procurando desvendar quais são os mecanismos moleculares que estão diferencialmente presentes entre as células tumorais e não tumorais, e assim desenvolver drogas que atuem precisamente nas células cancerosas, preservando as células saudáveis.

METABOLISMO CELULAR: PROTEÍNAS QUINASES COMO ALVOS PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

A atividade/função de uma proteína, bem como sua localização celular pode ser drasticamente alterada pela ligação covalente de certos grupos à cadeia polipeptídica,

modificando grandemente a sua conformação. A fosforilação de proteínas é catalisada por proteínas quinases, que transferem o grupo fosfato terminal do ATP para resíduos específicos de serina, treonina ou de tirosina, formando uma ligação éster fosfórico. As tirosina-quinases (TK) desempenham um papel importante nas vias que regulam a proliferação de células de câncer, a apoptose, a angiogênese e a metástase, sendo sua atividade aberrante implicada em vários tipos de cânceres (ANREDDY et al., 2014). Em cada tecido há determinadas proteínas que são potenciais substratos de proteínas quinases. A fosforilação pode transformá-las de inativas em ativas, ou vice-versa. As próprias proteínas quinases também estão sujeitas a regulação, podendo ser ativadas por mecanismos diversos. No contexto celular, a modificação pós-tradução por fosforilação/desfosforilação representa o principal tipo de modulação de proteínas em células eucarióticas. Sendo, portanto, finamente regulada pela ação oposta das proteínas quinases e proteínas fosfatases. Alteração nesta regulação está associada com várias doenças como diabetes, sistema imune, neurodegenerativas e câncer. (NIKOLIĆ, 2008; SHENG; QIAO; PARDEE, 2009; ZHANG; YANG; GRAY, 2009)

Receptores tirosina quinase (RTK) são mediadores importantes de vias de transdução de sinal intracelulares. Três vias de sinalização citoplasmática que são ativadas por RTKs desempenham papéis cruciais na proliferação celular e homeostase. Estes incluem a via Ras/Raf MAPK, a via de fosfoinositol-3-quinase/Akt (PI3K/Akt), e a via Jak-Stat (ANREDDY et al., 2014). Inibidores dos receptores tirosina quinase estão em estágio avançado de desenvolvimento, alguns já estão em testes com humanos e outros já são liberados para tratamento de câncer (DHILLON, 2015; FISCHGRÄBE; WÜLFING, 2008; MARTIN; LÓPEZ-TARRUELLA, 2016; MOREIRA; KAKLAMANI, 2010). Um ponto

negativo, em termos de eficiência terapêutica, é que tem sido reportado que a maioria dos pacientes inicialmente responsivos ao tratamento adquire fenótipo MDR (*Multi Drug Resistance*) e alguns outros pacientes já apresentam resistência no primeiro tratamento.

Diante disso, tem-se definido o câncer de mama como uma doença heterogênea em termos do tipo celular e tecido de origem, e uma doença da desregulação de múltiplas vias envolvidas nos processos celulares fundamentais, como a morte, proliferação e diferenciação, apresentando características peculiares a cada novo caso (CAI-MCRAE; ZHONG; KARANTZA, 2015). É bem sabido que as aberrações na estrutura do genoma e defeitos de manutenção e reparação são essenciais para a iniciação e progressão do tumor, acelerando a acumulação de genótipos favoráveis em células pré-malignas em evolução (PEREIRA et al., 2016). Assim, uma melhor compreensão da biologia do câncer utilizando caracterização genômica e proteômica de espécimes clínicos humanos, linhagens celulares bem estabelecidas e modelos animais é o primeiro passo lógico para prosseguir, quem sabe até ao nível da célula individual (AMIR et al., 2013). Técnicas de biologia molecular e microarranjos têm permitido a identificação não somente de novos subtipos do câncer de mama, mas também auxiliado no prognóstico e estabelecimento de novos alvos potenciais para o tratamento. (GROSS et al., 2015)

MICROARRANJOS DE PEPTÍDEOS (KINOMA/PEPCHIP)

A predominância da fosforilação de proteínas como regulador do metabolismo celular tem chamado a atenção de alguns pesquisadores à proporem estratégias que possam descrever eventos de fosforilação celular e fornecer um mapa geral e descritivo da atividade

quinásica celulares, para relacionar com a progressão da doença e permitir um tratamento mais específico (BOJA; RODRIGUEZ, 2014; HU et al., 2011; VERSTEEG et al., 2000). Estes resultados apresentam-se como uma promissora ferramenta dentro do desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico, prognóstico e tratamento. Classicamente, o estudo de diferentes vias de sinalização normalmente se dá pela análise do tamanho do fragmento fosforilado/desfosforilado de proteínas, o qual é realizado basicamente por western blotting. Porém, essa técnica é trabalhosa e não permite a análise de várias proteínas ao mesmo tempo e, portanto, é limitante para estudos clínicos e também torna extremamente morosa a identificação de novos potenciais alvos moleculares (PARIKH et al., 2010; ZHU; SNYDER, 2001). Neste sentido, o grupo do Prof. Maikel Peppelenbosch (Groningen University – Holanda) desenvolveu uma técnica chamada kinoma ou PepChip, que se baseia na utilização de um microarranjo de peptídeos (sequência consenso/substrato de quinase) que permite analisar ao mesmo tempo a atividade de 1.172 quinases (DIKS; PEPPELENBOSCH, 2004a), como esquematizado na **Fig. 2**.

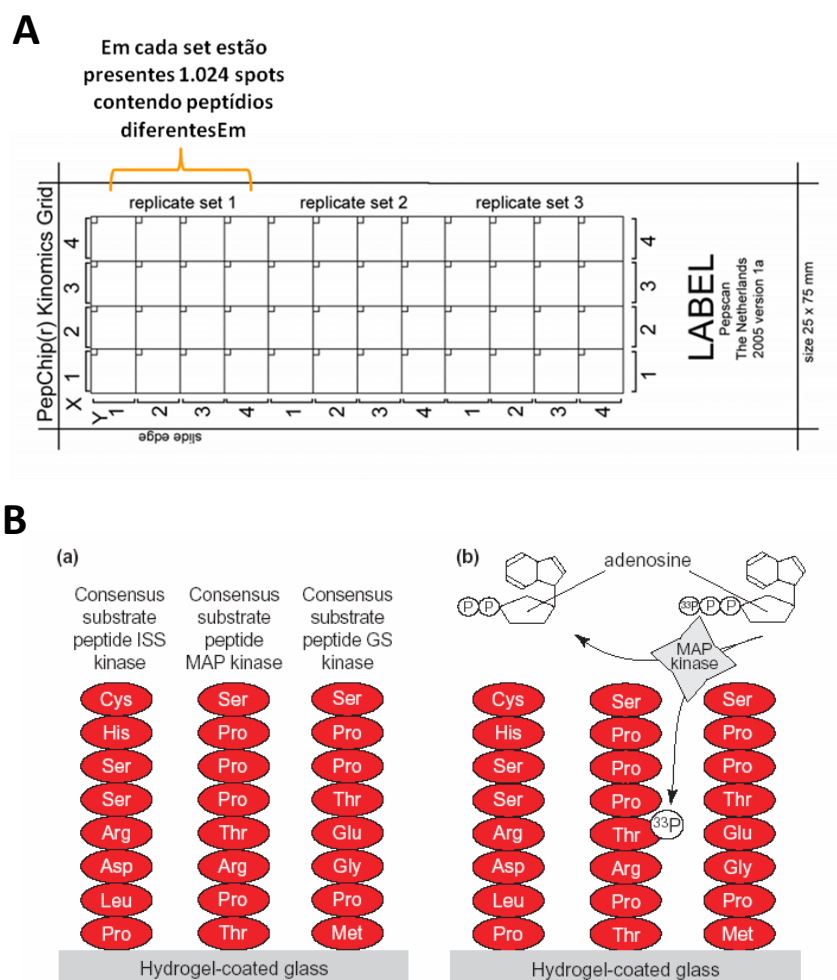


Fig. 2. Layout do “Pepchip Kinomics”. (A) Em cada set estão presentes 1.172 peptídeos, onde os mesmos são numerados de 1 a 1.172. (B) Os substratos para as proteínas quinases estão ligados ao slide e para a dosagem enzimática é utilizado ATP(33Pγ).

Um microarranjo de proteínas, também conhecido como chip de proteína, é uma superfície sólida (tipicamente de vidro) em que milhares de proteínas diferentes (por exemplo, antígenos, anticorpos, enzimas, substratos, etc.) são imobilizadas em localizações espaciais discretas, formando uma matriz de alta densidade de pontos de proteína. São geralmente compostos de biomoléculas bem caracterizadas com atividades de ligação específicas, como anticorpos, marcados com um ATP radioativo que emite fluorescência

para os substratos fosforilados pelas atividades de quinases na amostra, utilizados para analisar os componentes de amostras biológicas complexas (por exemplo, soro e os lisados celulares) ou para determinar se uma amostra contém uma proteína específica de interesse. Eles têm sido usados para criar perfis de expressão de proteínas, a identificação de biomarcadores, marcador de superfície celular/perfil de glicosilação, diagnóstico clínico e análise de segurança ambiental e de alimentos. (EKINS, 1989; HU et al., 2011)

BIOLOGIA DAS PKCS E SUA INSERÇÃO NO CONTEXTO TUMORAL

As PKCs (Proteína Quinase C) são serina/treonina quinases dependentes de cálcio e fosfolipídios que regulam uma grande variedade de processos celulares através da participação na via de sinalização da fosfoinositida (IGUMENOVA, 2015). Foi a primeira enzima identificada como um receptor para diacilglicerol (DAG), um lipídio que é gerado como um produto de ativação da fosfolipase C (PLC), um transdutor de sinal bem conhecido de diversos receptores. Devido às propriedades bioquímicas e homologias de sequências, PKCs são divididas em três subfamílias: em primeiro lugar, PKCs clássicas ou convencionais (cPKC), compostas por PKC α , PKC β I, PKC β II e PKC γ , que são cálcio dependentes e ativadas tanto por fosfatidilserina (PS) e DAG. Em segundo lugar, “novas” PKCs (nPKC), compostas pelas PKC δ , PKC ϵ , PKC ζ e PKC θ , que são cálcio independente e reguladas pela DAG e PS, e, finalmente, PKCs atípicas (aPKC), composta por PKC ξ e PKC λ , que são independentes de cálcio e não requerem DAG para a ativação, embora PS pode regular a sua atividade (NEWTON, 1995; WAY; CHOU; KING, 2000). A **Fig. 3** ilustra os domínios das isoformas de PKC.

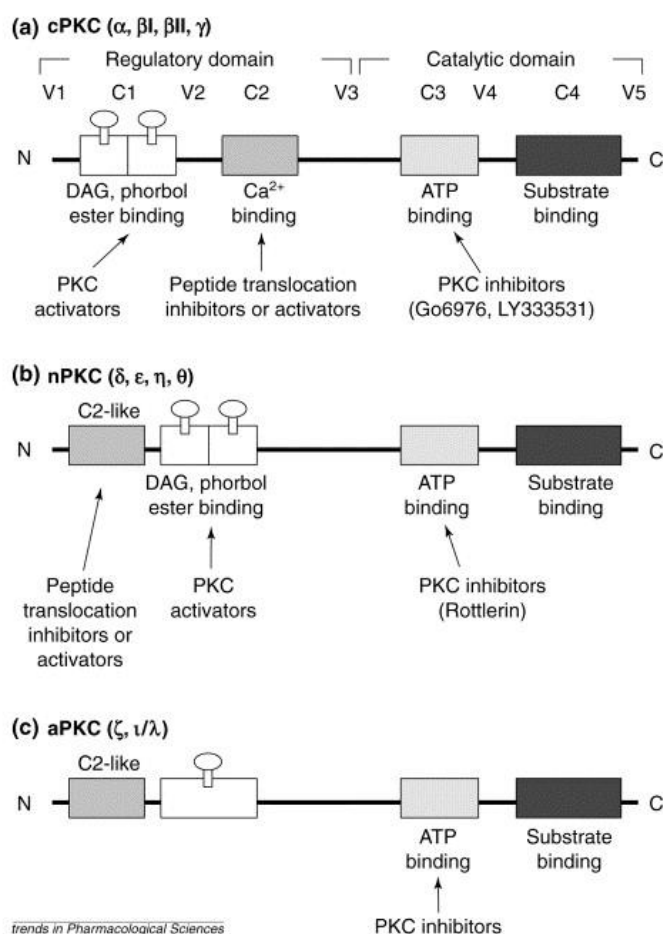


Fig. 3. Estrutura dos domínios das isoformas da proteína quinase C (PKC). Representação esquemática que mostra a homologia de sequências entre as isoformas das estruturas primárias de proteína quinase C (PKC). A estrutura de PKC pode ser dividida em um domínio de regulação N-terminal (N) e um domínio catalítico C-terminal (C). A estrutura convencional (cPKC) compreende quatro regiões conservadas (C1-C4) e cinco regiões variáveis (V1-V5). A região C1 (C1A e C1B) está envolvida na ligação de diacilglicerol (DAG) e ativador composto de forbol-éster, enquanto que a região de C2 é responsável pela ligação ao Ca^{2+} . Regiões C3 e C4 são os sítios de ligação para o ATP e o substrato da PKC, respectivamente. A nova PKC (nPKC) e a atípica (aPKC) ambos possuem uma região C2-like dentro de V1. Muitos inibidores seletivos para isoformas de PKC, tais como os indolocarbazoles e bisindolylmaleimides, interagem no sítio de ligação da ATP (ou C3), ao passo que muitos agentes de ativação atuam na região forbol-éster/DAG (ou C1). Inibidores peptídicos e ativadores de translocação de PKC tem como alvo a região C2 de cPKC e a região V1 de nPKC. **Fonte:** (WAY; CHOU; KING, 2000)

Sob condições fisiológicas, ocorre a ativação de PKC em resposta a vários fatores de crescimento. O fator de crescimento mediado pela ativação de fosfolipase C (PLC) desempenha um papel central na ativação de cPKC e nPKC. PLC gera DAG e inositol trifosfato (IP_3) a partir de fosfolípidios da membrana plasmática, DAG ativa tanto cPKC e

nPKC e IP_3 libera Ca^{2+} das reservas intracelulares que potencializa a ativação de cPKC (PATTERSON et al., 2005). Estruturalmente, estas enzimas são formadas por quatro domínios conservados, classificados como C1-C4. A maioria do domínio C1 N-terminal abriga o domínio de ligação de diacilglicerol, também chamado de domínio regulatório, que consiste em repetidas regiões ricas em cisteína que se estendem N-terminalmente a um segmento curto chamado domínio de pseudo-substrato que é crítico para a ativação de enzimas. O domínio C2 contém a região de ligação de cálcio enquanto que o domínio C3 é responsável pela ligação do ATP enquanto o domínio C4 contém o domínio catalítico. Na forma inativa pensa-se que o domínio de pseudo-substrato da região de C1 interage com o domínio C4 prevenindo a enzima de ligações inespecíficas (MARTINY-BARON; FABBRO, 2007). A ativação dessas enzimas envolve uma transição na forma latente auto inibida presente no citosol para a forma ativa associada à membrana (IGUMENOVA, 2015), conforme ilustrado na **Fig. 4**.

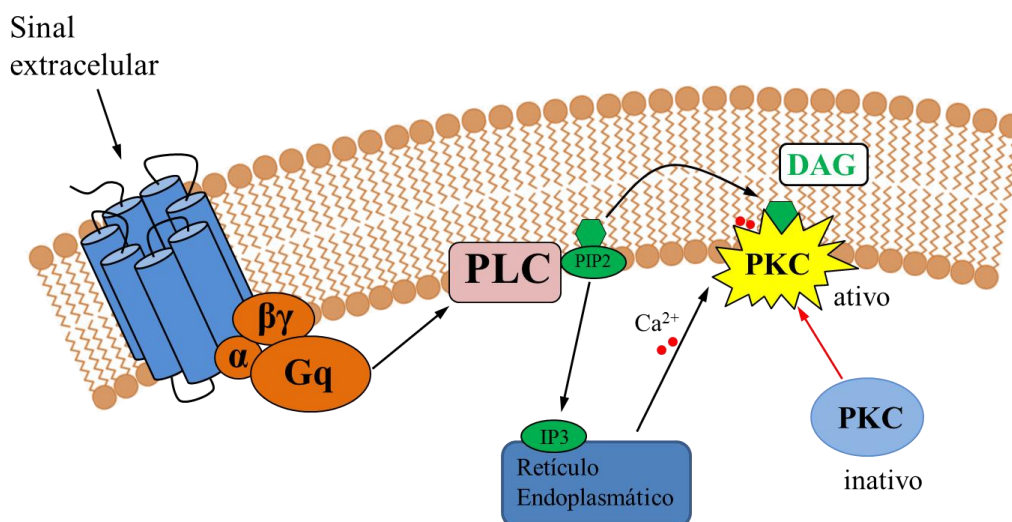


Fig. 4. Esquema de ativação de PKC. PKC fica em sua forma latente no citosol até ser ativada por sinais, tais como aumento na concentração de diacilglicerol (DAG) ou íons de cálcio (Ca^{2+}). PKCs são ativadas por receptores de fator de crescimento que estimulam a fosfolipase C (PLC), uma enzima que hidrolisa fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) para gerar DAG ligado à membrana e inositol trifosfato (IP3), o IP3 liga-se aos receptores do retículo endoplasmático, causando uma rápida liberação de cálcio das reservas intracelulares.

Sabe-se que a produção de DAG é estimulada após ativação de múltiplas cascatas de sinalização celular, e DAGs produzidos por estes mecanismos atuam como mensageiros secundários importantes para modular a função de proteínas alvo. Porém o promotor de tumor forbol éster, um composto natural que mimetiza o DAG ativa prolongadamente PKCs, desregulando a enzima (BROSE; BETZ; WEGMEYER, 2004). Como o forbol éster está envolvido com a biologia tumoral, tem-se sugerido que as PKCs estão relacionadas com a transformação das células e carcinogênese. O papel da PKC em cânceres não é aparentemente devido a mutações em genes de PKC, ao contrário da maioria dos genes envolvidos na carcinogênese, tais como oncogenes e supressores tumorais, mas seu papel parece resultar da sua ação como receptor para agentes promotores de tumor ou da sua ação como alvo dos receptores de fator de crescimento. Além disso, é conhecido que elas regulam diversos outros processos celulares, envolvidos tanto com a promoção quanto com a progressão tumoral, como mitogênese, adesão celular, apoptose, sobrevivência, angiogênese, invasão e metástase (KOIVUNEN; AALTONEN; PELTONEN, 2006). De fato, a super expressão de várias PKCs tem sido relatada em diversas linhagens celulares. Vários estudos indicam que um aumento nos níveis das PKCs pode ser encontrado na transformação maligna de diversos cânceres e na progressão da doença. (BONONI et al., 2011; DOWLING et al., 2016; FIELDS; MURRAY, 2008)

A dificuldade de se estudar as PKCs nesses processos tumorais é devido à existência das diferentes isoformas, pois cada uma atua de maneira diferente em cada tipo celular. A contribuição de cada isoenzima de PKC para a transformação maligna é apenas parcialmente compreendida, mas é evidente que cada PKC desempenha um papel diferente na progressão do câncer. (URTREGER; KAZANIETZ; BAL DE KIER JOFFÉ, 2012)

Neste cenário, justifica-se intensificar as investigações acerca destes mecanismos de sinalização celular em diferentes linhagens tumorais, a fim de se conhecer as isoformas envolvidas nos diferentes mecanismos biológicos relacionados com a sobrevivência tumoral. A partir daí, uma nova etapa se instala através de uma busca mais racional de terapias as quais posicionam determinadas isoformas das PKCs como possíveis e potenciais alvos terapêuticos no combate às características fenotípicas das células tumorais, tais como adesão, proliferação e resistência às terapias tradicionais.

VIA JAK-STAT

A via de transdução de sinal Janus Kinase (Jak) e transdutores de sinal ativadores da transcrição (Stat) são ativados em resposta a um grande número de citocinas, fatores de crescimento e hormônios, e está envolvida em várias funções dentro do corpo. Esta via de sinalização é estimulada pela interação de ligantes com os seus receptores, provocando a ativação do receptor e transfosforilações de moléculas Jak associadas ao receptor. Quando estes receptores são ativados, resíduos específicos de tirosina no receptor são então fosforilados pela Jak, servindo como sítio de ligação para uma família de fatores de transcrição localizadas no citoplasma, conhecidas como Stats. Moléculas Stat fosforiladas formam dímeros e translocam-se para o núcleo, onde ocorrerá a ativação e controle da transcrição de determinados genes (LADYMAN; GRATTAN, 2013). A **Fig. 5** exemplifica essa sinalização.

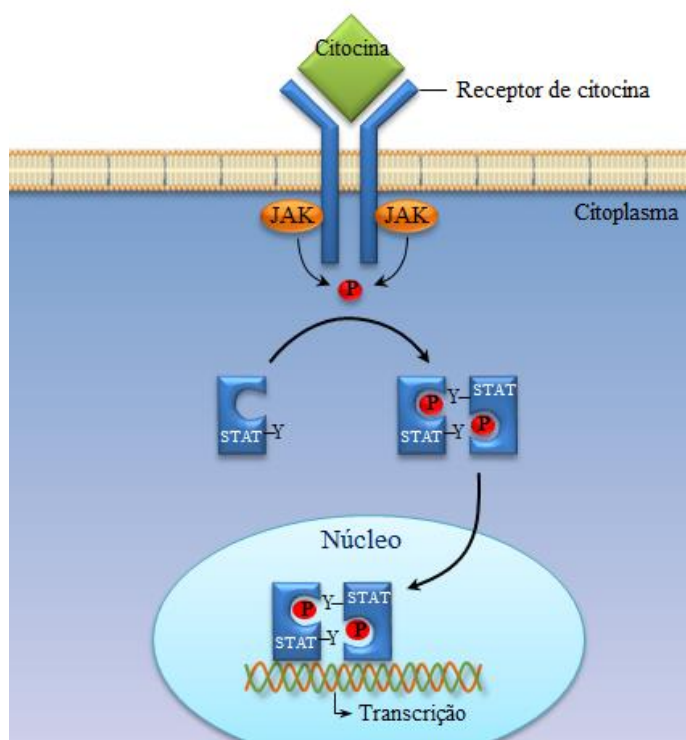


Fig. 5. Representação esquemática da transdução de sinal da Jak e Stat. A ativação da Jak após estimulação por citocinas resulta na fosforilação das Stats, que assim sofrem dimerização e translocação para o núcleo, onde ativa a transcrição gênica.

Em células de mamíferos foram identificados quatro membros Jak (Jak1, Jak2, Jak3 e TYK2). Jaks são proteínas relativamente grandes com pesos moleculares de aproximadamente 120-140 KDa cujas sequências de vários domínios primário foram inicialmente organizados em sete domínios Jak-homólogos (JH) que refletem regiões distintas de elevada homologia de sequência. Estudos de estrutura subsequentes indicaram que Jak contém quatro domínios distintos: Domínio N-terminal 4.1, Ezrin, radixin, moesina (FERM) e Src-homólogo 2 (SH2), seguido pelos domínios pseudoquinase e quinase C-terminal. Os domínios SH2 e FERM constituem o módulo de ligação ao receptor, enquanto que o pseudoquinase, que não possui os resíduos catalíticos essenciais, é pensado ser um regulador da atividade quinásica. É geralmente aceito que a ativação de Jak é iniciada pela

ligação da citocina ao seu receptor cognato dímero, um acontecimento que desencadeia uma mudança de conformação do dímero receptor e reposicionamento das Jak associadas. Tal evento leva a um rearranjo da posição dos domínios da Jak, provocando transfosforilação de tirosinas e uma elevação na atividade catalítica. No entanto, os mecanismos moleculares precisos que impulsionam especificidades dos receptores de Jak e os eventos sequenciais que conduzem à ativação de Jak dentro do complexo receptor-Jak ainda permanecem em grande parte elusivos (BABON et al., 2014; LIONGUE; WARD, 2013). Já entre as Stats, sete membros são conhecidos em mamíferos (Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b e Stat6). Todas as Stats compartilham certos domínios funcionais, entre eles, o domínio SH2 desempenha um papel importante na associação entre Stats e os receptores. As diferenças nos domínios SH2 das diferentes Stats determina a seletividade da mesma se ligar a vários receptores de citocinas. Uma tirosina conservada é rapidamente fosforilada por Jaks ativadas, permitindo que as proteínas Stat formem dímeros, com base na interação entre o domínio SH2 de uma Stat e a tirosina fosforilada no outro. Assim, os dímeros são estabilizados por interações bivalentes. (IMADA; LEONARD, 2000; XU; QU, 2008)

A via Jak-Stat tem alguns reguladores negativos que modulam a sinalização, como a proteína tirosina fosfatase (PTP), supressores de sinalização de citocinas (SOCS), proteína inibidora da Stat ativada (PIAS). O mapeamento do genoma humano revelou mais de 100 fosfatases pertencentes à família de PTP que é ainda dividida em quatro subfamílias com base na especificidade para o substrato. Todos os membros da superfamília PTP contém um sítio ativo altamente conservado de sequência C(X)5R conhecido como um motivo de assinatura de PTP e estruturas nucleares semelhantes feitas de uma folha β paralela central com α hélices laterais contendo uma β -loop- α -loop que engloba o motivo de assinatura

PTP. Embora PTPs tenham semelhança estrutural, a diversidade funcional é conseguida através de domínios de regulação e subunidades (SHARMA et al., 2016). SHP-1 é uma das PTPs mais caracterizadas, contendo dois domínios SH2, um domínio catalítico de PTP, e uma região C-terminal. Os domínios SH2 podem se ligar a qualquer Jak fosforilada ou receptores fosforilados para facilitar a desfosforilação destas moléculas de sinalização ativadas. A região do C-terminal contém vários resíduos de tirosina que servem como locais de ancoragem para outras proteínas de sinalização quando fosforiladas. (LABBÉ; HARDY; TREMBLAY, 2012)

A família SOCS contém oito proteínas: CEI, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6 e SOCS7. Cada SOCS consiste de uma região N-terminal com comprimento e sequência variáveis, um domínio SH2 central responsável pela ligação aos receptores de citocinas, Jak e outros substratos, e um domínio C-terminal que facilita a degradação de proteínas de sinalização do receptor de citocina. O SOCS completa um ciclo de feedback negativo na via Jak-Stat: Stats ativadas estimulam a transcrição dos genes SOCS. No sentido inverso, as proteínas SOCS se ligam a Jaks fosforiladas e seus receptores para desligar a via. SOCS pode ligar fosfotirosinas sobre os receptores para bloquear o recrutamento de Stats para o receptor, ou também podem ligar-se diretamente a Jak ou receptores para inibir especificamente a atividade de Jak quinase. Além disso, SOCS pode facilitar a ubiquitinação de Jak e dos receptores. A ubiquitinação desses alvos diminui sua estabilidade, orientando-as para a degradação proteassômica. (CAI et al., 2015; YOSHIMURA et al., 2005)

Proteínas PIAS incluem PIAS1, PIAS3, PIASx, e PIASy. Proteínas PIAS contém um domínio SAF-A/B, ácido e PIAS (SAP), um domínio RING-finger de ligação a zinco, e uma região C-terminal menos conservada rica em serina/treonina. O domínio C-terminal está envolvido na ligação de proteínas alvo. Proteínas PIAS podem ligar-se a dímeros de Stat ativada e impedi-los de se ligar ao DNA (RAWLINGS; ROSLER; HARRISON, 2004).

A **Fig. 6** exemplifica a atuação dos reguladores negativos da via Jak-Stat.

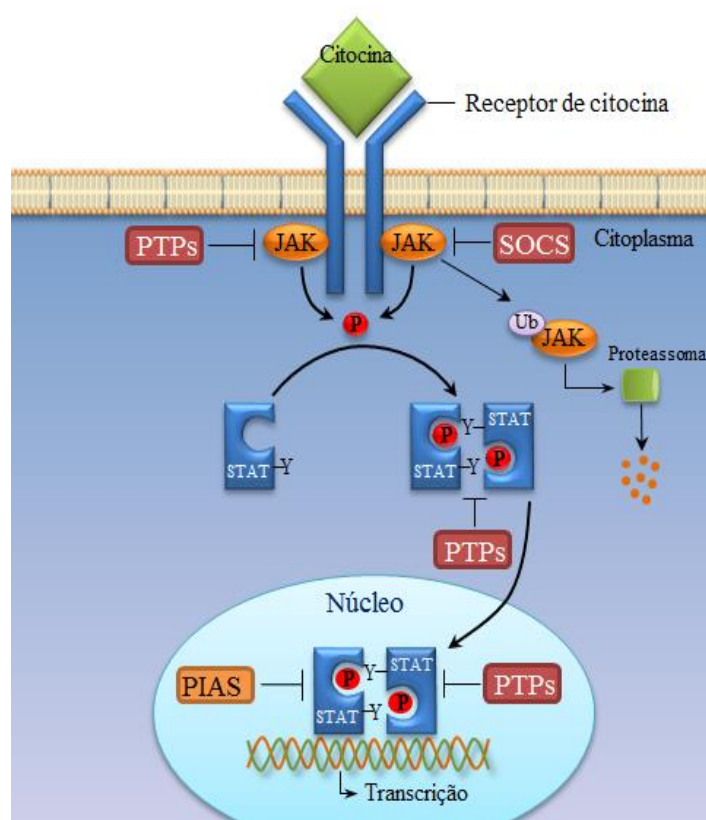


Fig. 6. Regulação da via de sinalização celular Jak-Stat. A via de transdução de sinal da Jak e Stat é regulada em diversos níveis. As Jaks podem ser reguladas negativamente pelas proteínas supressoras do sinal de citocina e PTPs. Sabe-se também, que as Jaks são reguladas por outras proteínas do metabolismo celular. A proteína inibidora da Stat ativa (PIAS) interage com as Stats em resposta a estimulação por citocinas e inibe sua atividade transcritiva por diversos mecanismos.

Nas últimas décadas, os estudos sobre as Jak-Stat descobriram vias altamente conservadas que ligam citocinas sinalizando para a regulação dos mecanismos celulares

essenciais, tais como a proliferação, invasão, sobrevivência, inflamação e imunidade. A sinalização aberrante de Jak-Stat tem sido identificada como colaboradora para a progressão do câncer e desenvolvimento metastático (THOMAS et al., 2015). Inibição da via Jak-Stat é atualmente uma das estratégias terapêuticas mais promissoras no câncer de próstata (PCA), doenças malignas hematopoiéticas e sarcomas. (PENCIK et al., 2016)

2. OBJETIVO

A proposta geral deste trabalho foi estabelecer um perfil quinômico diferencial de células de câncer de mama resistentes à daunorrubicina e seu respectivo controle, com o intuito de estabelecer quinases envolvidas com o fenótipo resistente. Os objetivos específicos foram:

- Obter o perfil quinásico dos lisados totais dos dois modelos celulares através do pepchip (microarranjo de peptídeos);
- Identificar as quinases diferencialmente ativas;
- Validar o pepchip através do western blotting;
- Estabelecer alguns interactomas diante das proteínas identificadas pelo Pepchip

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material: as células de câncer (linhagens MCF7 e MCF7Res) de mama foram gentilmente cedidas pelo Dr. João Ernesto de Carvalho (CPQBA – UNICAMP) e Prof. Carmen Verissima Ferreira-Halder (IBB-UNICAMP). O Pepchip foi adquirido e desenvolvido junto ao grupo do Prof. Maikel Peppelenbosch, Erasmus Medical Center of Rotterdam, Holanda. Os anticorpos foram adquiridos a partir da *Cell Signaling, Co.*

3.2. Cultura das células: o cultivo das células MCF7 e MCF7Res foi realizado em meio RPMI-1640, contendo 100U/mL de penicilina e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em garrafas de 75 cm² e tratadas em placas de 24 ou 96 poços, obedecendo a proporção de 5x10⁴ células/mL. Para obtenção de amostra suficiente para os testes de Western blotting e PepChip, as células foram cultivadas em placas de Petri de 100mm de diâmetro. Em todos os experimentos as células foram mantidas à 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

3.3. Validação do modelo de resistência: as células foram plaqueadas (4x10⁴ células/ml) em placas de 96 poços (100µL/poço) e, na semi-confluência, tratadas com diferentes concentrações de daunorrubicina: 0,25, 1, 10, 60, 125, 250, 500 e 1000 µM. Após o período de 24 horas de tratamento, o meio contendo o quimioterápico foi substituído por um meio contendo MTT (0,5 mg/ml) diluído em meio RPMI sem suplementações. Após 3 horas de incubação (em condições normais de cultivos das células) a solução de MTT foi removida e o formazan (composto de cor azulada, produto da redução do MTT) foi extraído com etanol absoluto. A medida de absorbância foi realizada a 570nm, em microleitor de placa.

3.4. Análise do perfil quinômico das células MCF7 e MCF7Res através do microarranjo de peptídeos (PepChip): o PepChip foi adquirido e realizado junto ao grupo do Prof. Maikel Peppelenbosch, com colaboração da Prof. Carmen V. Ferreira-Halder e Luisa L. Peres. Os slides do PepChip utilizados possuem as dimensões de 25 x 75 mm e são subdivididos em 3 sets, como mostrado na **Figura 2A**. Cada set contém 1.024 peptídeos artificiais sintetizados biotecnologicamente, os quais são substratos para as quinases ativas presentes nas células em estudo (**Figura 2B**). Para esta análise, as células (10^7) foram lavadas com PBS gelado e em seguida lisadas com tampão de lise (200 μ L), a saber: Hepes 20 mM, pH 7,7; MgCl₂ 2,5 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; *p*-nitrofenilfosfato 20 mM; O-Vanadato 1 mM; DTT 1 mM; PMSF 1 mM; aprotinina 10 μ g/ml; leupeptina 10 μ g/ml. O lisado foi então centrifugado e em seguida filtrado, para evitar eventuais debris celulares. O filtrado (50 μ L) foi somado a 10 μ L do meio de reação [ATP(³³P γ) 2.000 μ Ci/mL, ATP 50 μ M, glicerol 50%, Brij-35 3%, albumina 0,25 mg/mL, Mg²⁺ 60 mM], e os 60 μ L colocados sobre o slide e sobreposto com uma lamínula, com o intuito de espalhar uniformemente a amostra sobre o slide. Após o tempo de reação a 37°C, os slides foram então lavados com as seguintes soluções: NaCl 2M/ triton X-100 1%, PBS/triton X-100 1% e por último com água deionizada. Posteriormente os slides foram secos ao ar em temperatura ambiente e deixados expostos em cassete específico (phosphoscreen) por 72h. Após este período o phosphoscreen foi escaneado e em seguida a imagem analisada para a obtenção da intensidade dos *spots* (radioatividade), comparando-se as duas linhagens aqui avaliadas. A análise comparativa entre as duas linhagens foi realizada no programa disponibilizado pela ServiceEx (The Netherlands) e/ou PepMatrix, conforme descrito abaixo.

3.5. Validação da atividade das quinases foi feita por Western blotting: as células (10^7) foram lisadas com 200µl de tampão de lise apropriado e deixadas em banho de gelo por 2h para perfeito lisado celular. Em seguida o extrato foi clarificado por centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos e a concentração de proteína determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). O precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado tampão de amostra na proporção de 1:1 [Tris-HCl 100 mM (pH 6.8), DTT 200 mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,1% e glicerol 20%]. As amostras foram fervidas por 5 min e aplicadas em gel de poliacrilamida 10%), em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Após a corrida, realizou-se a transferência para membranas de PVDF, quando então foram bloqueadas com leite (2%) ou com BSA (3%) diluído em tampão Tris contendo Tween 20 (0,05%) (TBST) e incubadas “overnight” com os anticorpos primários (1:1.000). Em seguida as membranas foram lavadas com TBST e incubadas com anticorpos secundários (1:5.000) por 1h. Após, as membranas foram lavadas 3x em tampão TBS, incubadas por 1 minuto com tampão de quimiluminescência e as bandas detectadas por filmes de raio-x.

3.6. Análise dos dados obtidos do PepChip: os arquivos DAT gerados pelo aplicativo ScanAlyze, após alinhamento do *grid* e otimização da localização dos *spots*, foram submetidos à metodologia PepMatrix, desenvolvida para análise estatística qualitativa das replicações de cada chip, pelo grupo coordenado pelo Prof. Eduardo Galembeck e Dr. Renato Milani, ambos do Departamento de Bioquímica/UNICAMP. A metodologia envolve três conceitos agrupados em dois índices: desvio-padrão (SD), média (A) e mediana (M), sendo que um dos índices é composto pela razão SD/A e o outro pela razão A/M. Os parâmetros utilizados para os índices foram: $SD/A < 50\%$ e $80\% < A/M < 120\%$, buscando selecionar apenas os spots que apresentem variações entre as replicatas dentro desses

limites, para os dois chips. Após a seleção, foram calculados o *Fold-Change* (definido como a razão entre as médias ou medianas de intensidade de cada spot do tratamento em relação aos spots controle); o Teste F, de modo a determinar se as variâncias entre as amostras eram comparáveis e o Teste *t* apropriado em relação às variâncias de cada amostra (homoscedástico para variâncias semelhantes e heteroscedástico para variâncias diferentes). A partir do Teste *t* foram selecionados os *spots* que apresentaram diferença significativa no valor da média ($p < 0,05$) e procedeu-se à análise dos substratos e quinases correspondentes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A resistência a quimioterápicos tem despertado muita atenção nos últimos anos devido à baixa eficiência clínica a alguns tipos de tumores em pacientes. Neste sentido, a identificação de moléculas responsáveis pela promoção deste fenótipo resistente permitirá um melhor planejamento para busca racional e direcionada de drogas capazes de modular estes eventos, melhorando assim, os resultados clínicos de pacientes acometidos com câncer, contribuindo também para uma melhor qualidade de vida do paciente. Com o desenvolvimento desta dissertação, nosso objetivo foi identificar potenciais alvos terapêuticos, responsáveis pela aquisição de resistência em células tumorais de câncer de mama humano, usando como modelo biológico duas linhagens celulares: MCF7 e MCF7 resistente à Adriamicina (MCF7Res). Com esta finalidade, decidimos fazer uso de uma valiosa ferramenta para determinação da atividade global de Quinases, um microarranjo de peptídeos desenvolvido pelo grupo do Prof. Maikel Peppelenbosch e com quem temos mantido colaborações.

Inicialmente, confirmamos o fenótipo resistente da MCF7Res ao quimioterápico daunorrubicina pela técnica de redução do MTT. (**Fig. 7**).

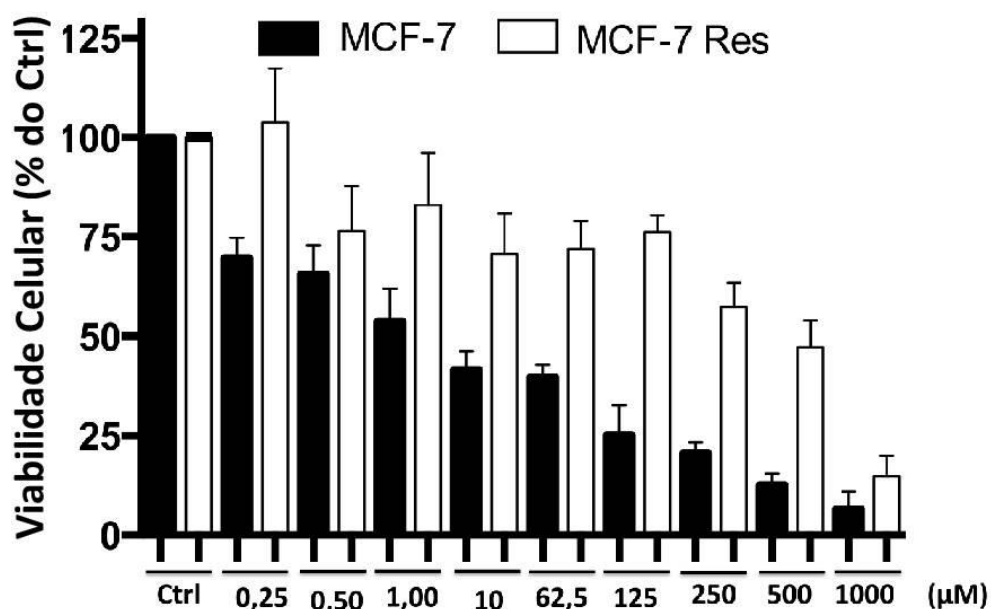


Fig. 7. Teste de viabilidade celular avaliado pela função mitocondrial. Com o intuito de verificarmos a resistência celular das linhagens, as células foram tratadas com diferentes concentrações da daunorrubicina por 24 horas. Em seguida a viabilidade das células foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT como descrito em materiais e métodos. De fato, nossos resultados nos mostram que houve diferença na viabilidade das linhagens avaliadas, sendo com maior sensibilidade ao tratamento as células MCF7, quando comparadas a MCF7Res. Esse resultado valida nosso modelo.

Desenvolvido inicialmente como uma ferramenta para investigação científica na área molecular, o PepChip tem despertado interesse e potencial aplicação no diagnóstico clínico, principalmente pela possibilidade de, em uma mesma análise, estabelecer o perfil quinômico celular e/ou tecidual em condições controladas (DIKS; PEPPELENBOSCH, 2004b; VOSHOL et al., 2009). Neste trabalho a utilização desta ferramenta foi para compararmos o perfil quinômico entre as 2 linhagens de câncer de mama (MCF7, MCF7Res), com o intuito de definirmos proteínas diferencialmente ativas, categorizando-as como potenciais alvos terapêuticos para a reversão deste mecanismo de resistência a quimioterápicos.

A **Fig. 8** mostra de forma representativa a intensidade dos spots, após o tempo de exposição e captura da imagem dos chips correspondentes aos dois lisados celulares, MCF7 e MCF7Res, respectivamente (**Fig. 8A e B**) e após sobreposição das imagens (**Fig. 8C**). Cada *spot* representa a intensidade de irradiação emitida pela sequência consenso fosforilada pelas quinases presentes no lisado celular. A partir deste resultado, as imagens foram analisadas como descrito detalhadamente no item 3.5 (Material e Métodos).

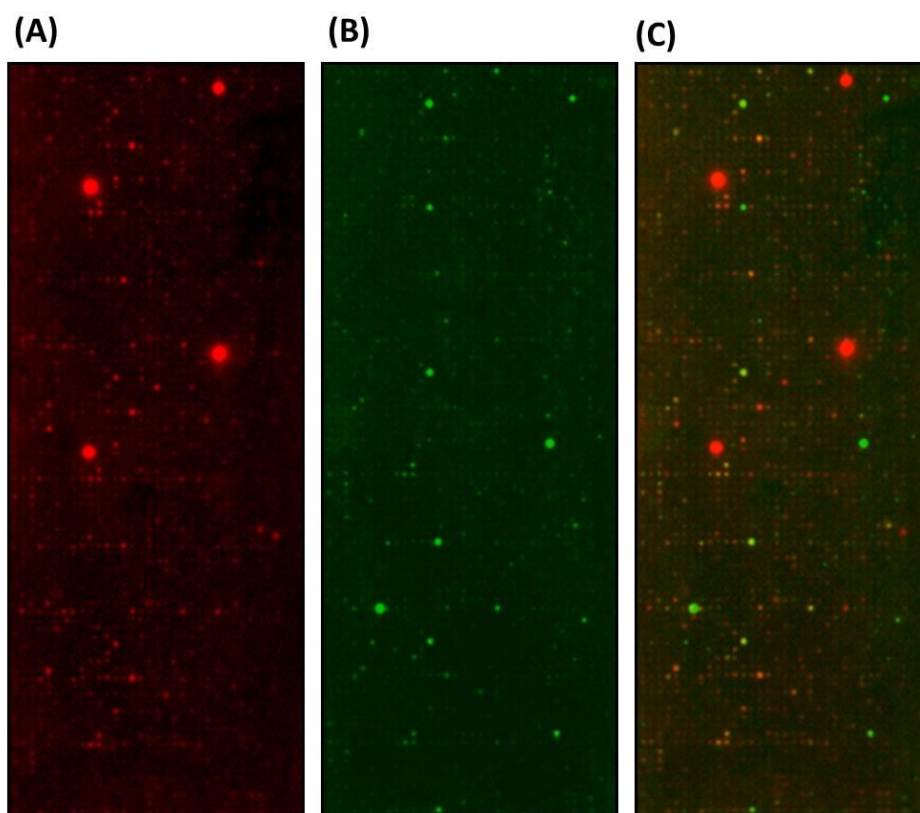


Fig. 8. Imagens representativas dos PepChips. A partir das imagens é possível avaliar a atividade diferencial de quinases entre os dois tipos celulares. Cada spot representa um motivo específico o qual foi fosforilado por uma quinase endógena presente no lisado celular. O grupamento fosfato incorporado pela quinase ao peptídeo provém de ATP radioativo, como descrito em materiais e métodos. (A) MCF7, (B) MCF7Res e (C) Sobreposição.

Após obtenção, as imagens foram analisadas e, desta maneira, a **Tabela 1** mostra as principais quinases diferencialmente ativas nas células MCF7 e MCF7Res, bem como seus substratos fisiológicos; além disso, os dados globais estão sumarizados na **Fig. 9**.

Tabela 1. Principais proteínas quinases moduladas diferencialmente nas células de câncer de mama resistentes à adriamicina.

Mediana (fold change)	teste t	Quinase	Peptídeo (Substrato)
0,25186173	0,00037	EphB2	TFII-I
0,40020274	0,00322	PKA	RhoA
0,66325455	0,0046	MAPK10	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
2,02534723	0,00544	PKC	Guanine nucleotide binding protein, alpha Z polypeptide
2,76073495	0,00571	PKCalpha;PKCbetaII;PKCdelta	p47-phox
0,67603389	0,008	PKCepsilon	Solute carrier family anion exchange, member 3
0,46522744	0,00802	GSK3beta	Glycogen synthase 1
1,9268315	0,00878	CK2	Serum response factor
0,49120297	0,00979	CK2	SPIB transcription factor
0,55158899	0,01016	PKC;RHO_kinase;CAMKII	Glial fibrillary acidic protein
2,39940513	0,01091	na	Mixed kinase substrate peptides
0,39457185	0,01132	RPL10	Ribosomal protein L10
0,46346903	0,01484	MAP3K11	MAP3K11
0,60669863	0,03001	Insulin_receptor	IRS 2

Outras quinases diferencialmente ativadas neste modelo podem ser observadas no gráfico trazido na **Fig. 9**, onde as mesmas estão apresentadas em *fold-change* em relação ao grupo controle, onde as células não foram desafiadas pelo fenótipo resistente.

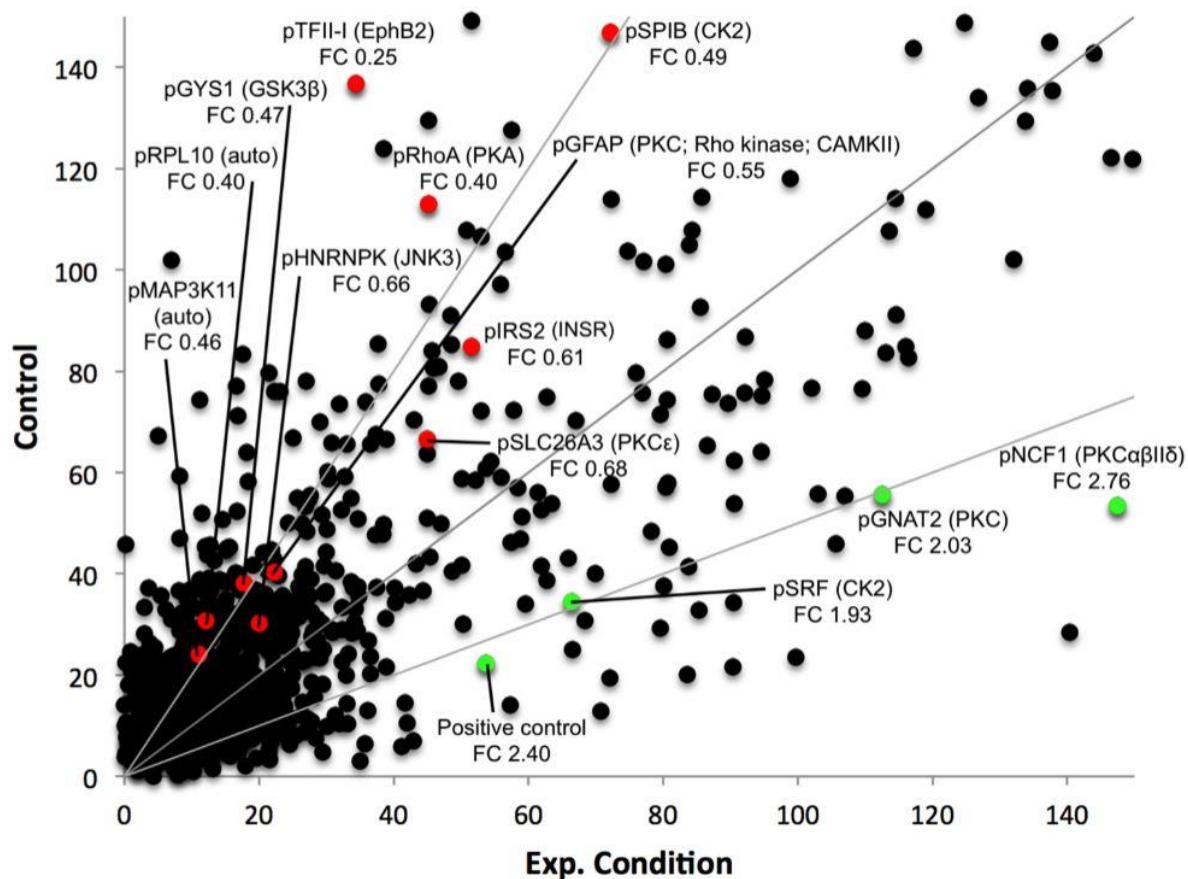


Fig. 9. Quinases que apresentaram maiores diferenças entre as linhagens avaliadas. Consideram-se confiáveis aquelas quinases que possuem valor de p menor que 0,05. Através deste gráfico, ainda, é possível verificar o *Fold-Change* (FC) entre as linhagens. Proteínas estão representadas pelos nomes de seus substratos, seguido pelo nome da quinase.

Baseado nos fosfoproteomas diferenciais, foi possível propor interactomas gerais reunindo as principais proteínas encontradas, buscando conhecer as principais vias de transdução de sinais envolvidas durante aquisição do fenótipo MDR em células de câncer de mama (**Fig. 10**).

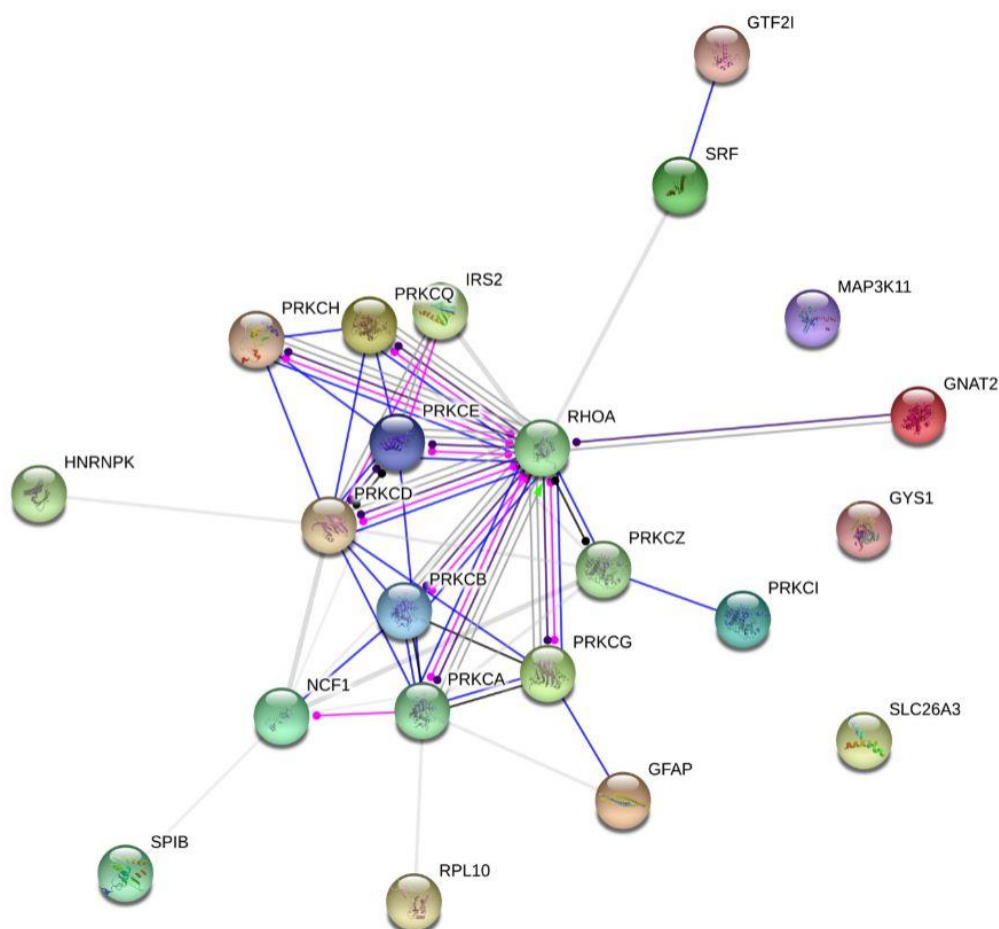


Fig. 10. Rede de proteínas que ilustra interações entre isoformas de proteína quinase C e proteínas encontradas com perfis de fosforilação alterados. As linhas azuis indicam ligação, linhas verdes indicam ativação e linhas vermelhas indicam a inibição, enquanto linhas roxas indicam catálise, linhas cor de rosa indicam modificação pós-tradução, linhas amarelas indicam regulação transcricional e linhas pretas indicam uma reação genérica. As setas indicam uma ação positiva, barras indicam uma ação negativa e rótulas indicam uma interação direcional de natureza desconhecida. As proteínas são representadas por nomes de genes. A rede foi gerada por STRING 10.0 (SZKLARCZYK et al., 2015)

ISOFORMAS DE PKCS ESTÃO DIFERENCIALMENTE FOSFORILADAS NAS LINHAGENS AVALIADAS

Nossos resultados do microarranjo de peptídeos mostraram que houve variações consideráveis quanto ao envolvimento de PKCs durante aquisição do fenótipo resistente. As isoformas de PKC merecem destaque devido a papéis fundamentais em vários processos celulares (COLUCCIO LESKOW; A. KRASNAPOLSKI; J. URTREGER, 2011; DOWLING; KIELY, 2015). Como muito bem documentado na literatura, as PKCs são críticas proteínas transdutoras de sinais ativadas por diacilglicerol, um dos principais segundo mensageiros intracelulares e cálcio (MARENGO et al., 2011; NEWTON, 1995). Desde a década de 90, as isoformas de PKC têm sido apontadas como tendo papel decisivo na carcinogênese e transformação maligna de tumores (BLUMBERG et al., 1994; CAPONIGRO; FRENCH; KAYE, 1997), colocando-as como potenciais alvos para o seu tratamento. (MARENGO et al., 2011; MOCHLY-ROSEN; DAS; GRIMES, 2012)

PKC compreende uma família de proteínas serina/treonina quinases com ampla distribuição tecidual que respondem a uma variedade de estímulos, incluindo fatores de crescimento e hormônios, os quais aceleram a proliferação de células tumorais, inclusive o tumor mamário (MCCRACKEN et al., 2003). Neste cenário, PKC apresenta-se como um potencial alvo molecular para intervenção farmacológica. A super-expressão e atividade aumentada de PKC têm sido reportadas em tecidos mamários cancerosos em comparação com o tecido mamário normal (MCCRACKEN et al., 2003; SLEDGE; GÖKMEN-POLAR, 2006). Estes dados corroboram com os dados apontados pelo Pepchip, o que o coloca em uma condição de ser explorado como uma ferramenta de diagnóstico. Posteriormente a esta

primeira etapa, mostrando que houve envolvimento de PKC, uma análise mais minuciosa mostrou que as atividades das isoformas desta proteína quinase podem contribuir para a agressividade do tumor (URTREGER; KAZANIETZ; BAL DE KIER JOFFÉ, 2012). Conforme identificado pelo Pepchip, nosso resultado mostra que há um aumento na expressão de PKC em células resistentes a daunorrubicina, no entanto, níveis de fosforilação nos trarão um melhor cenário deste envolvimento. Com o propósito de se conhecer o envolvimento das diferentes isoformas de PKC em células de câncer de mama resistente, decidimos verificar o perfil de expressão e fosforilação de suas diferentes isoformas por western blotting.

Com o propósito de validação do PepChip, a **Fig. 11** mostra que, de fato, a PKC total está significativamente mais expressa nas células MCF7Res quando comparada a MCF7 (grupo controle), resultado esse obtido a partir de análise de *Western Blotting*. Neste caso o controle interno do experimento foi a β -Actina, sem mudança significativa na expressão.

Dentre as PKCs avaliadas, a isoforma α/β II foi a que apresentou a diferença mais significativa entre as duas linhagens estudadas. Assim, nosso resultado mostra que tanto a fosforilação quanto a expressão desta proteína estão aumentados nas células resistentes de câncer de mama (**Fig. 11**). Em termos fisiológicos, sabe-se que esta isoforma é expressa em vários tecidos e está associada com proliferação celular, apoptose, adesão e mobilidade celular (MARTINY-BARON; FABBRO, 2007). A expressão elevada de PKC α foi sugerida como um preditor do fracasso do tratamento com tamoxifeno, que se encaixa com a observação de que as amostras tumorais de pacientes com níveis elevados PKC α são

geralmente negativas para expressão do receptor de estrogênio (ER), e estes pacientes respondem menos à terapia endócrina. Super-expressão de PKC α em células MCF7 também exibem motilidade aumentada, o que foi atribuído a uma diminuição da expressão de E-caderina e β -catenina, e alta expressão de MMP-2/MMP-9.

Especificamente, a PKC beta II (PKC β II) uma variante da PKC β , tem sido implicada em tumorigênese em modelos humanos e de roedores, é o mediador predominante de proliferação vascular endotelial induzida pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é um estimulador conhecido da angiogênese de tumores e do crescimento de câncer de mama, e que medeia seus efeitos mitogênicos parcialmente através da ativação da PLC γ (SLEDGE; GÖKMEN-POLAR, 2006). Há evidências crescentes de que os inibidores seletivos de PKC β são eficazes no câncer de mama, tanto a nível pré-clínico e clínico. Neste sentido, tem sido descrito que o potente inibidor de PKC β enzastaurin suprime tanto o crescimento tumoral quanto a angiogênese induzida por tumor em ratos portadores de xenoinxertos de câncer de mama. (URTREGER; KAZANIETZ; BAL DE KIER JOFFÉ, 2012)

Verificamos também que houve diminuição de expressão, porém aumento de fosforilação de PKD (ou PKC μ) nas células resistentes (**Fig. 11**). Análises de amostras de câncer da mama humano têm demonstrado que, em alguns dos tumores mais altamente invasivos, a expressão de PKD1 é completamente perdida. Porém, PKD2 e PKD3 que são basalmente expressa na mama normal passam a ser super-expressos em câncer de mama avançado e agressivo. Sabe-se que PKD possui um domínio rico em cisteína na porção N-terminal que apresenta uma alta afinidade para diacilglicerol (DAG). DAGs ligam-se nas

PKDs, controlando sua localização citoplasmática. Sua super-expressão está correlacionada com a resistência de vários tipos celulares, aumento da proliferação e metástase, promove a sobrevivência através da ativação da via PI3K-AKT, regula positivamente BCL-x, BAX, BCL-2 e favorece a proliferação celular através da ativação de RAF1-MEK-ERK. (DURAND; BORGES; STORZ, 2015)

A isoforma delta (PKC δ) obteve um aumento de expressão nas células não resistentes. Como visto na literatura, ela possui propriedades contraditórias, aparecendo tanto como inibidor de crescimento e pró-apoptótico, como promotor de proliferação (KILEY et al., 1999; LU et al., 1997). Além disso, mostramos que a PKC zeta (PKC ζ) foi negativamente controlada nas células resistentes (**Fig. 11**). Estes resultados, preliminares, precisam de maior atenção para que se possa esclarecer o principal papel destas enzimas.

Por fim, mostramos que PLC- γ estava ativada nas células resistentes (**Fig. 11**). Sabemos que esta enzima está diretamente centrada na liberação de DAG, o qual, como discutido anteriormente, é um dos responsáveis pela ativação de PKCs, juntamente com cálcio.

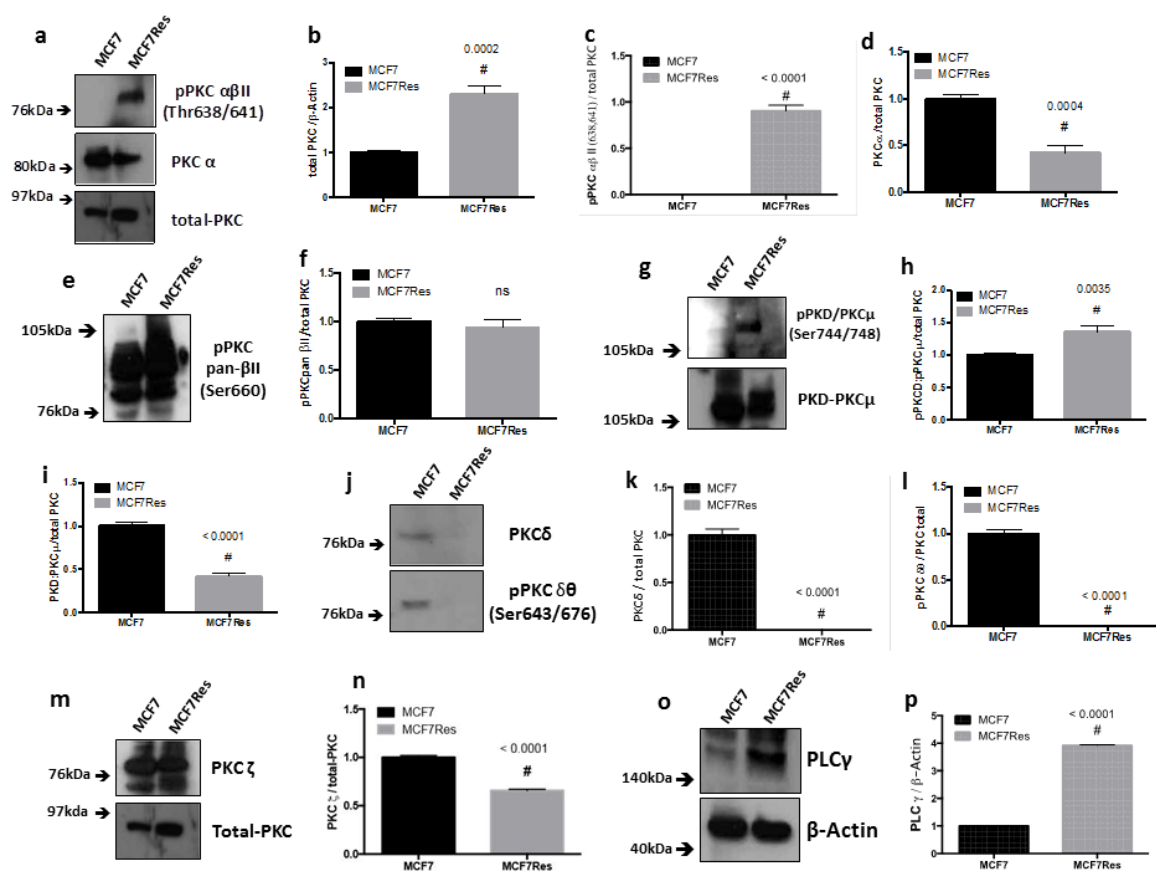


Fig. 11. Expressão e fosforilação diferencial de PKCα, pPKCαβII, total-PKC, pPKC pan-βII, PKD/PKCμ, pPKD/PKCμ, PKCδ, pPKCδθ, PKCζ e PLCγ. As células foram cultivadas sob condições clássicas de rotina. Na semi-confluência, as células foram lisadas usando tampão de lise convencional (descrito em M&M), cujo conjunto de proteínas fora resolvido em gel de SDS-PAGE e, após transferência em membrana de PVDF, estas foram identificadas de modo específico através do uso de anticorpo primário específico, em protocolo de *Western blotting*. β-Actina foi utilizada como *loading sample* (aproximadamente 75 μg de proteína por corrida). **a.** Blotting representativo das proteínas total-PKC, PKCα e pPKCαβII. O gráfico **b** representa os valores arbitrários obtidos pela análise densitométrica das bandas de total-PKC normalizados pelos valores médios das respectivas bandas de β-Actina. Os gráficos **c** e **d** representam os valores arbitrários obtidos pela análise densitométrica das bandas de pPKCαβII e PKCα normalizados pelos valores médios das respectivas bandas de total-PKC. **e.** Blotting representativo da proteína pPKC pan-βII. O gráfico **f** representa os valores arbitrários obtidos pela análise densitométrica das bandas de pPKC pan-βII normalizados pelos valores médios das respectivas bandas de total-PKC. **g.** Blotting representativo das proteínas pPKD/PKCμ e PKD/PKCμ. Os gráficos **h** e **i** representam os valores arbitrários obtidos pela análise densitométrica das bandas de pPKD/PKCμ e PKD/PKCμ normalizados pelos valores médios das respectivas bandas de total-PKC. **j.** Blotting representativo das proteínas pPKCδθ e PKCδ. Os gráficos **k** e **l** representam os valores arbitrários obtidos pela análise densitométrica das bandas de pPKCδθ e PKCδ normalizados pelos valores médios das respectivas bandas de total-PKC. **m.** Blotting representativo da proteína PKCζ. O gráfico **n** representa os valores arbitrários obtidos pela análise densitométrica das bandas de PKCζ normalizados pelos valores médios das respectivas bandas de total-PKC. **o.** Blotting representativo da proteína PLCγ. O gráfico **p** representa os valores arbitrários obtidos pela análise densitométrica das bandas de PLCγ normalizados pelos valores médios das respectivas bandas de β-Actina. Diferença estatística está representada pelo #, sob comparação de *test t-student*.

Além da PKC, outra proteína que merece atenção, a partir dos dados obtidos do Pepchip, foi a Caseína Quinase 2 (CK2). A CK2 é uma proteína constitutivamente ativa, independente de segundos mensageiros ou eventos de fosforilação, e ainda não há um potencial modelo reconhecido para explicar como essa quinase é regulada dentro das células. Estudos têm demonstrado que a CK2 se apresenta em concentrações elevadas em diversos casos de câncer, e que a sua inibição promove um aumento da sensibilidade de células de câncer de mama à apoptose (FILHOL et al., 2015; TREMBLEY et al., 2010). Outros trabalhos citam que o fato da CK2 atuar como modulador positivo da proteína quinase Akt e, portanto mediar processos que garantem a sobrevivência das células tumorais, se torna interessante o estudo dessa quinase como um possível alvo para combater o câncer de mama (DI MAIRA et al., 2005; GRAY et al., 2014). Diante destes resultados na literatura, a atividade de CK2 no pepchip também é revelada como biomarcador do fenótipo resistente destas células à daunorrubicina.

Outros grupos de pesquisa demonstraram que a PKC regula positivamente o crescimento tumoral através da ativação da via Ras/Raf/Mek_{1/2}/Erk_{1/2} e que sua ativação favorece a secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs), que tem sido associadas com a invasão de células tumorais e metástase devido a capacidade destas proteases hidrolisar uma variedade de proteínas da matriz extracelular (KARROUM et al., 2010; LIU et al., 2002). Desta maneira, decidimos avaliar, por western blotting, como esta a expressão de Ras, ERK e MMP-9 nas linhagens de câncer de mama estudadas nesta dissertação e nossos resultados mostraram que de fato houve um aumento nos níveis de expressão das proteínas Ras e Erk1/2 nas células resistentes (**Fig. 12**). Estes resultados validam nossa hipótese que, para a aquisição de resistência em células tumorais de mama, há aumento na expressão de vias

canônicas responsáveis por mecanismos responsáveis pela sobrevivência e proliferação celulares. Além disso, a maior expressão de MMP-9 também merece atenção; ainda, a **Fig. 12** mostra que em células resistentes a daunorrubicina houve um aumento em sua expressão e que, por ser uma importante gelatinase de matriz e participar de mecanismos de rearranjo dos componentes da matriz extracelular, poderia estar comprometida com fenótipo resistente e agressivo destas células. O aumento na expressão de MMP-9 pode estar associado ao aumento da atividade de Caveolina e proteínas de rearranjo do citoesqueleto, obtidos no Pepchip, uma vez que, para exercer função no compartimento extracelular, MMPs são secretadas fazendo uso de um intenso mecanismo de rearranjo de filamentos do citoesqueleto. Ainda quanto a MMPs, cabe uma nota técnica importante: avaliamos a expressão de MMP-9 e não podemos especular quanto sua atividade, para isso novos ensaios são necessários, como a Zimografia, onde é possível determinar sua atividade em gel de acrilamida em condição nativa.

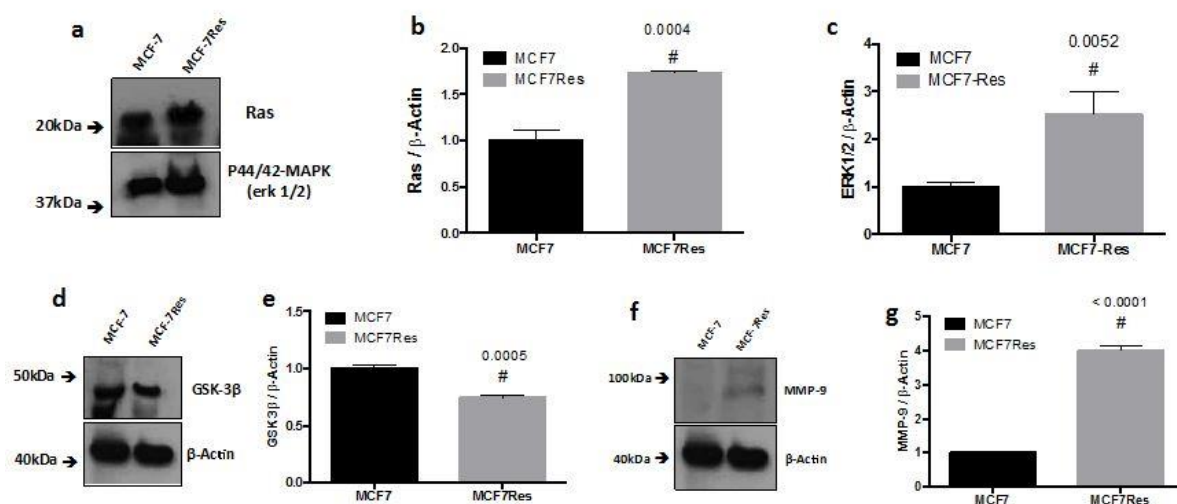


Fig. 12. Expressão diferencial de Ras, p44/42 MAPK, GSK3 β e MMP-9. As células foram cultivadas sob condições clássicas de rotina. Na semi-confluência, as células foram lisadas usando tampão de lise convencional (descrito em M&M), cujo conjunto de proteínas fora resolvido em gel de SDS-PAGE e, após transferência em membrana de PVDF, estas foram identificadas de modo específico através do uso de anticorpo primário específico, em protocolo de *Western blotting*. **a.** Blotting representativo das proteínas Ras e p44/42-MAPK (Erk 1/2). **d.** Blotting representativo das proteínas GSK3 β e β -actina. **f.** Blotting representativo das proteínas MMP-9 e β -actina. A proteína Ras (p=0,0004), p44/42 MAPK(p=0,0052), GSK3 β (p=0,0005) e MMP-9 (p<0,0001) foram diferencialmente expressas entre as duas linhagens estudadas. β -actina foi utilizada como *loading sample* (cerca de 75 μ g de proteína por corrida). Os gráficos **b**, **c**, **e** e **g** representam os valores arbitrários obtidos pela análise densitométrica das bandas de Ras, p44/42 MAPK, GSK3 β e MMP-9, respectivamente, normalizadas pelos valores médios das respectivas bandas de β -actina. Diferença estatística está representada pelo #, sob comparação de *test t-student*.

ENVOLVIMENTO DA VIA JAK-STAT NO FENÓTIPO RESISTENTE

Baseado nos dados do Pepchip, verificamos o envolvimento de proteínas envolvidas com a via de Jak-Stat em células resistentes. Assim, buscamos estabelecer um interactoma destas proteínas (**Fig. 13**) através de um software chamado STRING, que é um banco de dados de conhecidas e previsíveis interações proteína-proteína (SZKLARCZYK et al., 2015). O banco de dados STRING contém informações de várias fontes, incluindo dados experimentais, métodos de previsão computacionais e coleções de textos públicos. Nosso interactoma mostra, de fato, forte envolvimento de proteínas da via Jak-Stat. Posteriormente desta etapa *in silico*, decidimos avaliar a fosforilação de Jak e Stat e mostramos que estas proteínas estão *up*-fosforiladas em células com fenótipo resistente.

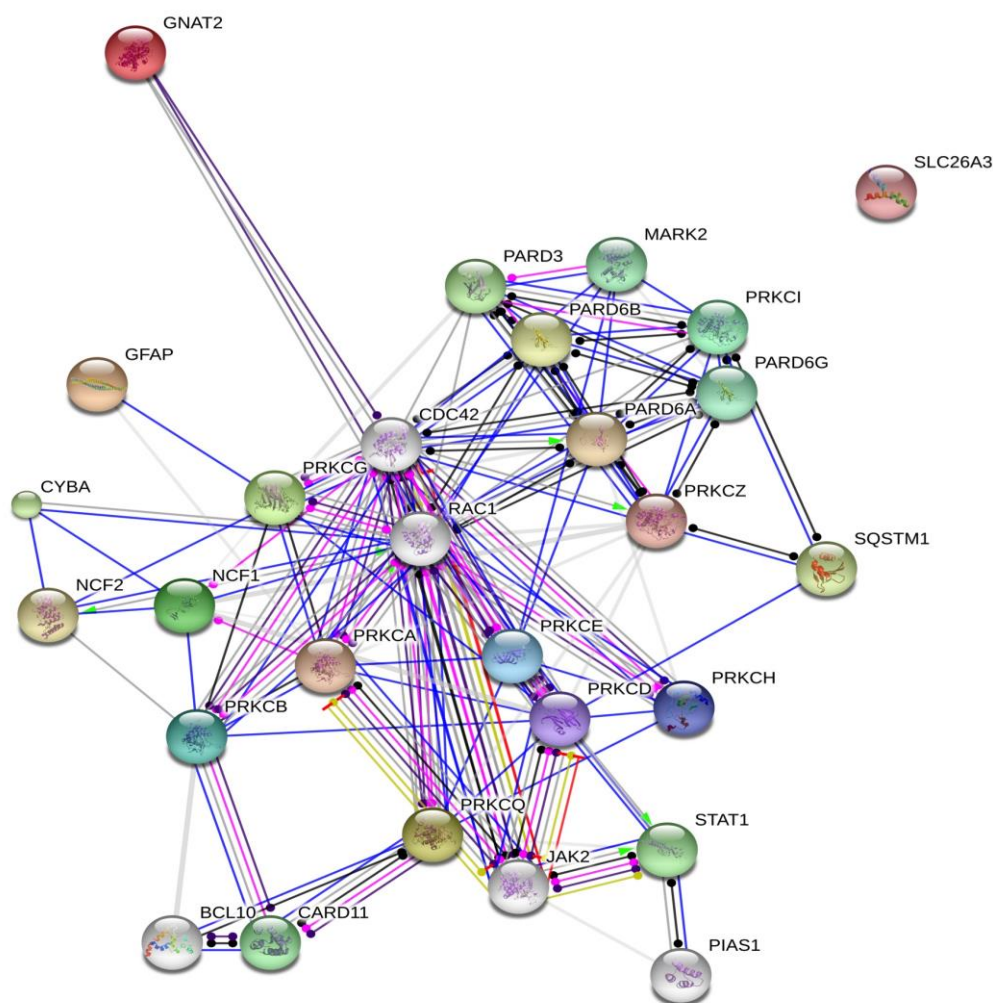


Fig. 13. Rede de proteínas que ilustra interações entre isoformas de proteína quinase C e proteínas encontradas com perfis de fosforilação alterados conhecidos para ser fosforilada por elas. A rede foi aumentada para incluir parceiros de interação relevantes para proteínas descritas anteriormente. As linhas azuis indicam ligação, linhas verdes indicam ativação e linhas vermelhas indicam a inibição, enquanto linhas roxas indicam catálise, linhas cor de rosa indicam modificação pós-tradução, linhas amarelas indicam regulação transcricional e linhas pretas indicam uma reação genérica. As setas indicam uma ação positiva, barras indicam uma ação negativa e rótulas indicam uma interação direcional de natureza desconhecida. As proteínas são representadas por nomes de genes. A rede foi gerada por STRING 10.0 (SZKLARCZYK et al., 2015).

Surpreendentemente, a **Fig. 14** mostra que as Stats 1, 2, 3, 5 e 6 estavam *up*-fosforiladas nas células resistentes. Além disso, verificamos que ambas as proteínas Jak1 e Jak2 apresentaram níveis elevados de fosforilação naquele mesmo grupo de células. Estes resultados claramente apontam para a importância da via Jak-Stat durante a instalação do fenótipo resistente em células de câncer de mama.

Sabe-se que estas proteínas são de extrema importância em várias vias de sinalização celular, mediando diversos eventos biológicos como crescimento, diferenciação, senescência e apoptose celular. Quando funcionando de maneira inapropriada e interagindo de forma defeituosa, as Jaks e as Stats estão associadas a diversas desordens, como o câncer (COSTA-PEREIRA; BONITO; SECKL, 2011).

Na etiologia do câncer, as Stats 3 e 5 são as mais estudadas pois são utilizadas na regulação da proliferação, inflamação, desenvolvimento embriogênico, angiogênese e sobrevivência, sendo estas características associadas diretamente com a malignidade do tumor. Stat3 é persistentemente ativada em várias células tumorais, onde dirige a expressão de citocinas promotoras de tumor, tais como IL-6, IL-23 e VEGF. Ademais, a Stat3 também é conhecida por promover a codificação para expressão de proteínas mediadoras da proliferação celular como ciclina D1 e ciclina B2, e também de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-xL, além de inibir fatores supressores de tumor, como IL-12 (SEAVEY; DOBRZANSKI, 2012).

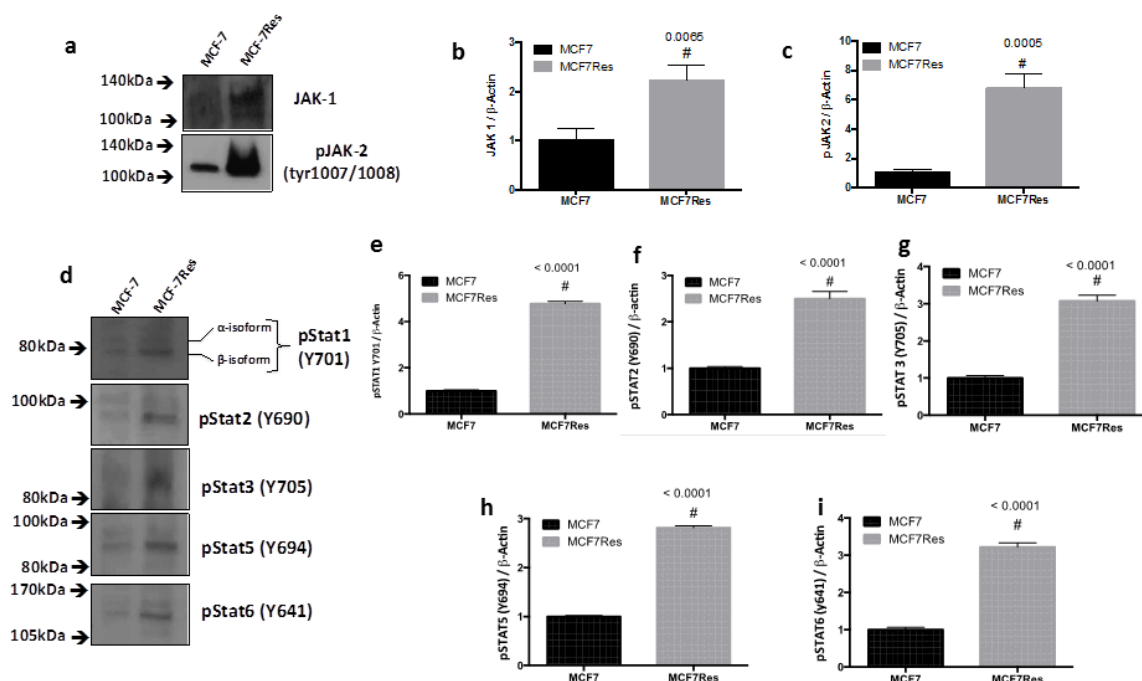


Fig. 14. Expressão e fosforilação diferencial de Jak-Stat. As células foram cultivadas sob condições clássicas de rotina. Na semi-confluência, as células foram lisadas usando tampão de lise convencional (descrito em M&M), cujo conjunto de proteínas fora resolvido em gel de SDS-PAGE e, após transferência em membrana de PVDF, estas foram identificadas de modo específico através do uso de anticorpo primário específico, em protocolo de *Western blotting*. **a.** Blotting representativo das proteínas Jak1 e pJak2. **d.** Blotting representativo das proteínas pStat1, pStat2, pStat3, pStat5 e pStat6. As proteínas Jak1 ($p=0,0065$), pJak2 ($p=0,0005$), pStats 1, 2, 3, 5 e 6 ($p<0,0001$) estavam diferencialmente expressas entre as 2 linhagens estudadas. β -Actina foi utilizada como *loading sample* (aproximadamente 75 μ g de proteína por corrida). Gráficos **b**, **c**, **e**, **f**, **g**, **h** e **i** representam os valores arbitrários obtidos pela análise densitométrica das bandas de Jak1, pJak2, pStat1, pStat2, pStat3, pStat5 e pStat6, respectivamente, normalizados pelos valores médios das respectivas bandas de β -Actina. Quando normalizado pela β -Actina, as proteínas Jak1, pJak2, pStat1, pStat2, pStat3, pStat5 e pStat6 apresentaram diferença estatística entre as duas linhagens. Diferença estatística está representada pelo #, sob comparação de *test t-student*.

Após detectarmos a significativa diferença da ativação de Jak-Stat entre as linhagens avaliadas, decidimos inibir esta via através do tratamento das células com um inibidor específico de Jak2. Como mostrado anteriormente, Jak é uma proteína quinase responsável por fosforilar e ativar Stat (*vide Figura 5*).

O inibidor usado atua especificamente na Jak2 e interfere diretamente na fosforilação de Stat3, além de interferir em vias envolvendo a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), a qual está envolvida com a sobrevivência celular via modulação da atividade de Akt.

Inicialmente, mostramos que as concentrações do inibidor utilizadas (5 μ M e 10 μ M) para o pré-tratamento das células não eram citotóxicas (**Fig. 15**) na linhagem resistente. Note que após tratamento de 24 horas com o inibidor as células se mantiveram viáveis na mesma proporção que o grupo controle.

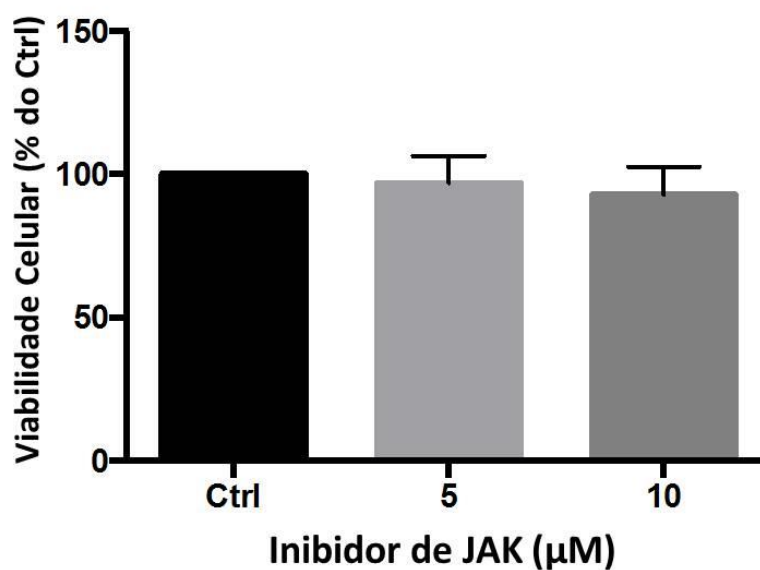


Fig. 15. Viabilidade celular de células de câncer de mama após tratamento com inibidor de Jak. As células MCF7Res foram tratadas com 5 μM e 10 μM do inibidor e, após tratamento por 24 horas, verificamos que não houve efeito citotóxico detectável pela técnica de redução de MTT, quando comparado ao grupo controle, onde as células MCF7Res não receberam nenhum tipo de tratamento.

Após a certificação de que as concentrações do inibidor utilizadas eram subtóxicas nas células de câncer de mama (MCF7Res), decidimos fazer um pré-tratamento das células resistentes com estas 2 concentrações do inibidor por 2 horas, e logo após, tratamento com Daunorrubicina (quimioterápico) por 24 horas. Cabe ressaltar que durante as 24 horas de tratamento com Daunorrubicina (Dauno), mantivemos as concentrações indicadas do inibidor de Jak.

De forma bastante interessante, quando usamos o inibidor de Jak, as células resistentes ficaram mais sensíveis ao quimioterápico (**Fig. 16**), o que nos mostra claramente o envolvimento da via Jak-Stat na aquisição e principalmente na manutenção do fenótipo resistente. Cabe ressaltar que o tratamento inibe, de forma específica, a proteína tirosina quinase Jak2, porém, existem outras isoformas desta proteína que também poderiam ativar outras Stats. Assim, uma inibição geral das isoformas de Jak poderia proporcionar uma maior sensibilidade ao quimioterápico, resultando em uma maior efetividade do tratamento.

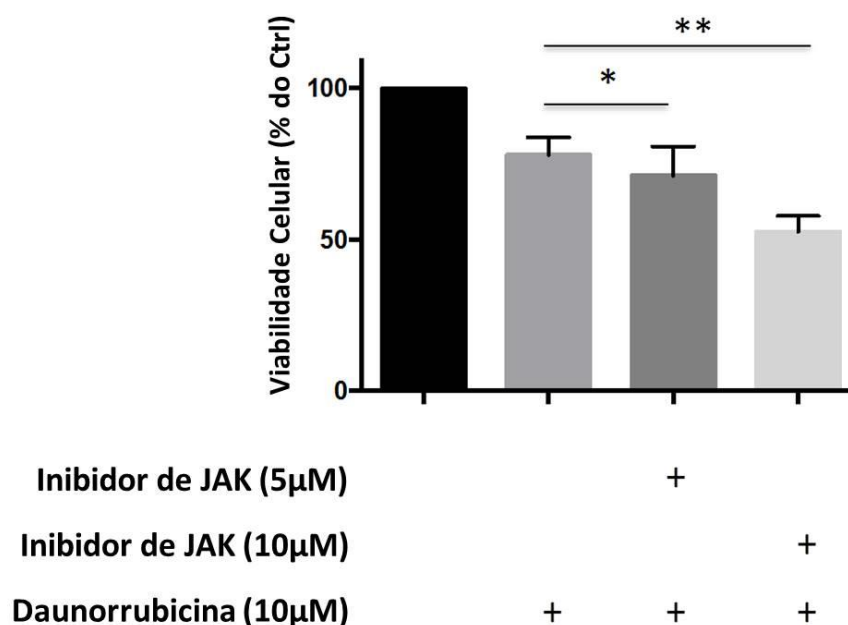


Fig. 16. Efeito do inibidor de Jak na resposta ao quimioterápico. As células MCF7Res foram pré-tratadas com 5µM ou 10µM do inibidor de Jak2 [(E)-3-(6-bromopyridin-2-yl)-2-cyano-N-((S)-1-phenylethyl) acrylamide, WP1066] por 2 horas. Após, as células foram tratadas com Daunorrubicina (Dauno) por 24 horas. Após o tratamento, verificamos a viabilidade celular pela redução de MTT. Assim, mostramos que a inibição de Jak2 proporciona uma maior sensibilidade ao quimioterápico. Ambas as concentrações utilizadas sensibilizaram significativamente [5 µM (* $p < 0,05$) e 10 µM (** $P < 0,001$)] a resposta de células quimicamente resistentes a daunorrubicina.

MECANISMO DE TRANSDUÇÃO DE SINAL ENVOLVIDO COM O FENÓTIPO RESISTENTE EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA

À luz do que foi apresentado com a execução deste projeto, foi possível estabelecer um modelo de sinalização celular em células fenotipicamente modificada pela resistência a adriamicina. Neste sentido, a **Fig. 17** nos mostra esta interação, salientando àquelas que, possivelmente, apresentam-se como potenciais alvos terapêuticos para reversão da resistência a quimioterapia.

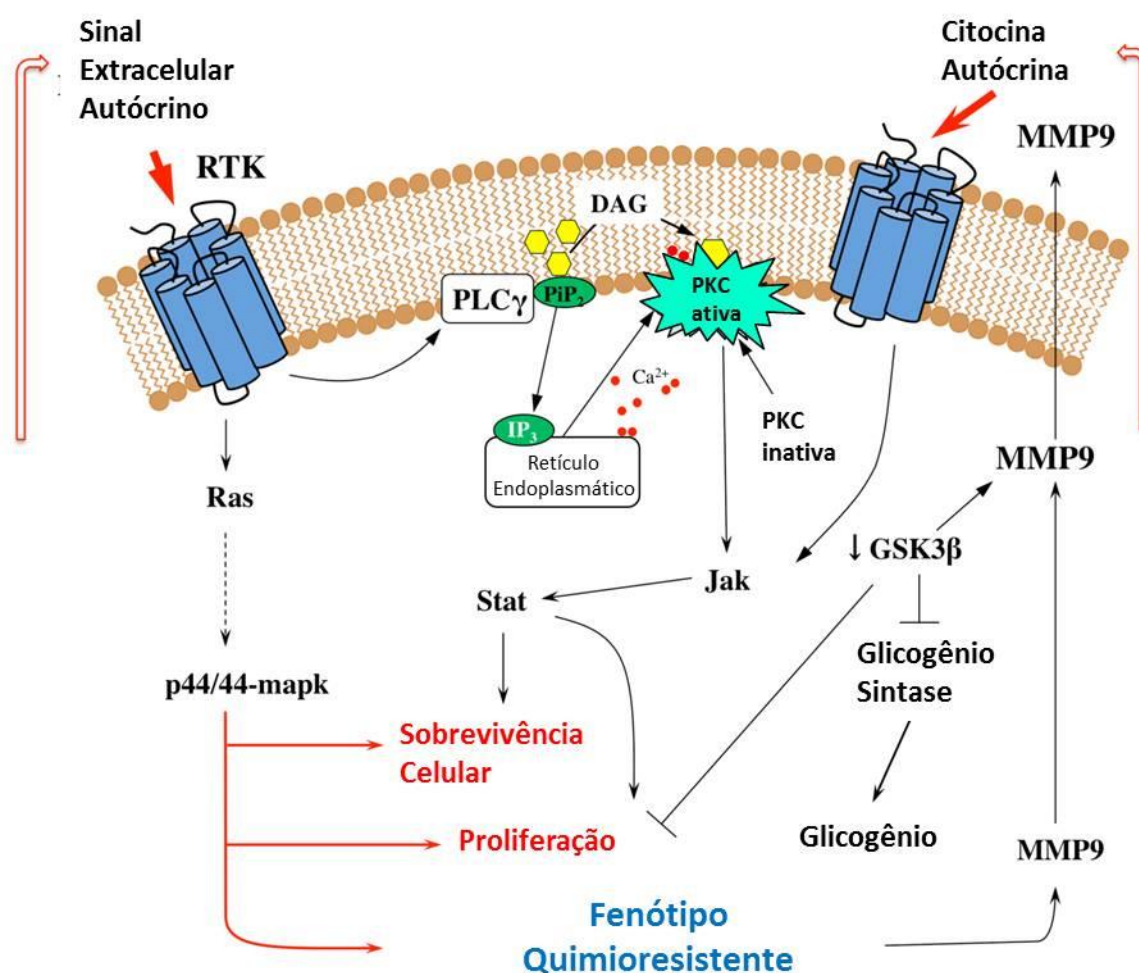


Fig. 17. Mecanismos de transdução de sinal envolvidos com a resistência de células tumorais de mama. Proposta esquemática da ativação da via de sinalização Jak-Stat e ativação de PKC relacionadas com a aquisição de resistência a agentes quimioterápicos. Todas as proteínas relacionadas no esquema foram de alguma forma avaliadas neste trabalho. Assim, a partir do Pepchip, foi possível prever um mapa metabólico do fenótipo resistente destas células.

5. CONSTATAÇÕES

Os resultados obtidos com a execução do projeto permitiram-nos constatar:

- ✓ O PepChip surge como uma promissora ferramenta para identificação de alvos para fins terapêuticos;
- ✓ A via Jak-Stat está mais ativa nas células resistentes;
- ✓ A expressão de MMP-9 sugere uma maior agressividade das células resistentes;
- ✓ As diferentes isoformas das PKCs mostram perfil de atividade diferente.
- ✓ A ativação da via Jak-Stat proporciona maior resistência a quimioterápicos em células de câncer de mama;
- ✓ Jak2 é um potencial alvo terapêutico para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento.

6. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos pelo fosfoproteoma concluímos que o fenótipo MDR envolve metabolismo específico em células tumorais de mama, onde isoformas de PKCs e sinalização Jak-Stat exercem funções de destaque. Assim, estes dados apontam o potencial uso de inibidores de Jak2 como estratégia para o tratamento de pacientes não responsivos a terapias convencionais.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados obtidos, pretendemos:

- Analisar o efeito de inibidores de diferentes membros da via Jak-Stat na aquisição do fenótipo resistente;
- Analisar o efeito de inibidores de diferentes isoformas de PKC na aquisição do fenótipo resistente;
- Avaliar, através de imunohistoquímica, a expressão de PKCs em tecidos obtidos de pacientes acometidos com diferentes níveis de agressividade tumoral.

8. REFERÊNCIAS

- AMIR, E. D. et al. viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 545–52, jun. 2013.
- AMIRI-KORDESTANI, L. et al. Targeting MDR in breast and lung cancer: discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies. **Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 15, n. 1–2, p. 50–61, jan. .
- ANREDDY, N. et al. Tyrosine kinase inhibitors as reversal agents for ABC transporter mediated drug resistance. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 9, p. 13848–77, 4 jan. 2014.
- ARNASON, T.; HARKNESS, T. Development, Maintenance, and Reversal of Multiple Drug Resistance: At the Crossroads of TFPI1, ABC Transporters, and HIF1. **Cancers**, v. 7, n. 4, p. 2063–82, jan. 2015.
- Atlas On-line de Mortalidade.** Disponível em:
<<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>>. Acesso em: 17 fev. 2016.
- BABON, J. J. et al. The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. **The Biochemical journal**, v. 462, n. 1, p. 1–13, 15 ago. 2014.
- BAGULEY, B. C. Multiple drug resistance mechanisms in cancer. **Molecular biotechnology**, v. 46, n. 3, p. 308–16, nov. 2010.
- BARGINEAR, M. F. et al. Implications of applied research for prognosis and therapy of breast cancer. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 65, n. 3, p. 223–34, mar. 2008.
- BLUMBERG, P. M. et al. Protein kinase C in signal transduction and carcinogenesis. **Progress in clinical and biological research**, v. 387, p. 3–19, jan. 1994.
- BOJA, E. S.; RODRIGUEZ, H. Proteogenomic convergence for understanding cancer pathways and networks. **Clinical proteomics**, v. 11, n. 1, p. 22, 2014.
- BONONI, A. et al. Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. **Enzyme research**, v. 2011, p. 329098, jan. 2011.
- BROSE, N.; BETZ, A.; WEGMEYER, H. Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway in mammals. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 14, n. 3, p. 328–340, 2004.
- CAI, B. et al. The Specific Roles of JAK/STAT Signaling Pathway in Sepsis.

Inflammation, v. 38, n. 4, p. 1599–1608, 13 ago. 2015.

CAI-MCRAE, X.; ZHONG, H.; KARANTZA, V. Sequestosome 1/p62 facilitates HER2-induced mammary tumorigenesis through multiple signaling pathways. **Oncogene**, v. 34, n. 23, p. 2968–2977, 4 jun. 2015.

CAPONIGRO, F.; FRENCH, R. C.; KAYE, S. B. Protein kinase C: a worthwhile target for anticancer drugs? **Anti-cancer drugs**, v. 8, n. 1, p. 26–33, jan. 1997.

CHOI, Y. H.; YU, A.-M. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 5, p. 793–807, jan. 2014.

COLUCCIO LESKOW, F.; A. KRASNAPOLSKI, M.; J. URTREGER, A. The Pros and Cons of Targeting Protein Kinase c (PKC) in the Management of Cancer Patients. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, n. 11, p. 1961–1973, 1 nov. 2011.

COSTA-PEREIRA, A. P.; BONITO, N. A.; SECKL, M. J. Dysregulation of janus kinases and signal transducers and activators of transcription in cancer. **American journal of cancer research**, v. 1, n. 6, p. 806–16, 2011.

DHILLON, S. Palbociclib: First Global Approval. **Drugs**, v. 75, n. 5, p. 543–551, 20 abr. 2015.

DI MAIRA, G. et al. Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, n. 6, p. 668–677, 1 jun. 2005.

DIKS, S. H.; PEPPELENBOSCH, M. P. Single cell proteomics for personalised medicine. **Trends in Molecular Medicine**, v. 10, n. 12, p. 574–577, 2004a.

DIKS, S. H.; PEPPELENBOSCH, M. P. Single cell proteomics for personalised medicine. **Trends in molecular medicine**, v. 10, n. 12, p. 574–7, dez. 2004b.

DOWLING, C. M. et al. Protein kinase C beta II suppresses colorectal cancer by regulating IGF-1 mediated cell survival. **Oncotarget**, v. 7, n. 15, p. 20919–20933, 2016.

DOWLING, C. M.; KIELY, P. A. Targeting Protein Kinase C Downstream of Growth Factor and Adhesion Signalling. **Cancers**, v. 7, n. 3, p. 1271–91, 2015.

DURAND, N.; BORGES, S.; STORZ, P. Functional and therapeutic significance of protein kinase D enzymes in invasive breast cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 22, p. 4369–4382, 8 nov. 2015.

EKINS, R. P. Multi-analyte immunoassay. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 7, n. 2, p. 155–168, jan. 1989.

Estimate/2016 - Cancer Incidence in Brazil. Disponível em:

<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2016.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, 13 set. 2014.

FIELDS, A. P.; MURRAY, N. R. Protein kinase C isozymes as therapeutic targets for treatment of human cancers. **Advances in enzyme regulation**, v. 48, p. 166–78, 2008.

FILHOL, O. et al. Protein kinase CK2 in breast cancer: the CK2 β regulatory subunit takes center stage in epithelial plasticity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 17, p. 3305–3322, 20 set. 2015.

FISCHGRÄBE, J.; WÜLFING, P. Targeted therapies in breast cancer: established drugs and recent developments. **Current clinical pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 85–98, maio 2008.

GRAY, G. K. et al. Therapeutic CK2 inhibition attenuates diverse prosurvival signaling cascades and decreases cell viability in human breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 5, n. 15, p. 6484–96, 15 ago. 2014.

GROSS, S. et al. Targeting cancer with kinase inhibitors. **The Journal of clinical investigation**, v. 125, n. 5, p. 1780–9, maio 2015.

HU, S. et al. Functional protein microarray technology. **Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine**, v. 3, n. 3, p. 255–68, 2011.

IGUMENOVA, T. I. Dynamics and Membrane Interactions of Protein Kinase C. **Biochemistry**, v. 54, n. 32, p. 4953–4968, 18 ago. 2015.

IMADA, K.; LEONARD, W. J. The Jak-STAT pathway. **Molecular Immunology**, v. 37, n. 1, p. 1–11, 2000.

KANG, J. C. et al. Engineering multivalent antibodies to target heregulin-induced HER3 signaling in breast cancer cells. **mAbs**, v. 6, n. 2, p. 340–53, jan. .

KAPPELMAYER, J. et al. Progress in defining multidrug resistance in leukemia. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 4, n. 2, p. 209–17, mar. 2004.

KARROUM, A. et al. Matrix metalloproteinase-9 is required for tubular network formation and migration of resistant breast cancer cells MCF-7 through PKC and ERK1/2 signalling pathways. **Cancer Letters**, v. 295, n. 2, p. 242–251, 2010.

KILEY, S. C. et al. Increased protein kinase C δ in mammary tumor cells: relationship to

transformation and metastatic progression. **Oncogene**, v. 18, n. 48, p. 6748–6757, 19 nov. 1999.

KOIVUNEN, J.; AALTONEN, V.; PELTONEN, J. Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. **Cancer Letters**, v. 235, n. 1, p. 1–10, 2006.

KRUH, G. D.; BELINSKY, M. G. The MRP family of drug efflux pumps. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7537–52, 20 out. 2003.

LABBÉ, D. P.; HARDY, S.; TREMBLAY, M. L. Protein Tyrosine Phosphatases in Cancer: Friends and Foes! In: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [s.l: s.n.]. v. 106p. 253–306.

LADYMAN, S. R.; GRATTAN, D. R. JAK-STAT and feeding. **JAK-STAT**, v. 2, n. 2, p. e23675, 1 abr. 2013.

LI, S. et al. Mouse ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters Conferring Multi-Drug Resistance. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 15, n. 4, p. 423–32, 2015.

LIONGUE, C.; WARD, A. C. Evolution of the JAK-STAT pathway. **JAK-STAT**, v. 2, n. 1, p. e22756, 1 jan. 2013.

LIU, J.-F. et al. FGF-2 and TPA induce matrix metalloproteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the Ras/ERK pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 293, n. 4, p. 1174–1182, 2002.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

LU, Z. et al. Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C delta. **Molecular and cellular biology**, v. 17, n. 6, p. 3418–28, jun. 1997.

MARENGO, B. et al. Protein kinase C: an attractive target for cancer therapy. **Cancers**, v. 3, n. 1, p. 531–67, 2011.

MARTIN, M.; LÓPEZ-TARRUELLA, S. Emerging Therapeutic Options for HER2-Positive Breast Cancer. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, v. 36, p. e64–e70, 2016.

MARTINY-BARON, G.; FABBRO, D. Classical PKC isoforms in cancer. **Pharmacological research**, v. 55, n. 6, p. 477–86, jun. 2007.

MCCRACKEN, M. A. et al. Protein kinase C delta is a prosurvival factor in human breast tumor cell lines. **Molecular cancer therapeutics**, v. 2, n. 3, p. 273–81, mar. 2003.

MOCHLY-ROSEN, D.; DAS, K.; GRIMES, K. V. Protein kinase C, an elusive therapeutic

target? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 11, n. 12, p. 937–57, dez. 2012.

MOHAMED, A. et al. Targeted therapy for breast cancer. **The American journal of pathology**, v. 183, n. 4, p. 1096–112, out. 2013.

MOREIRA, C.; KAKLAMANI, V. Lapatinib and breast cancer: current indications and outlook for the future. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 10, n. 8, p. 1171–1182, 10 ago. 2010.

MURRAY, S. et al. Taxane resistance in breast cancer: mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. **Cancer treatment reviews**, v. 38, n. 7, p. 890–903, nov. 2012.

NAKANISHI, T.; ROSS, D. D. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. **Chinese journal of cancer**, v. 31, n. 2, p. 73–99, fev. 2012.

NEWTON, A. C. Protein kinase C: structure, function, and regulation. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 48, p. 28495–8, 1 dez. 1995.

NI, Z. et al. Structure and Function of the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). **Current Drug Metabolism**, v. 11, n. 7, p. 603–617, 1 set. 2010.

NIKOLIĆ, M. The Pak1 kinase: an important regulator of neuronal morphology and function in the developing forebrain. **Molecular neurobiology**, v. 37, n. 2–3, p. 187–202, jan. .

PARIKH, K. et al. Kinome profiling of clinical cancer specimens. **Cancer research**, v. 70, n. 7, p. 2575–8, 1 abr. 2010.

PATTERSON, R. L. et al. Phospholipase C-gamma: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. **Trends in biochemical sciences**, v. 30, n. 12, p. 688–97, 2005.

PENCIK, J. et al. JAK-STAT signaling in cancer: From cytokines to non-coding genome. **Cytokine**, 2016.

PEREIRA, B. et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. **Nature communications**, v. 7, p. 11479, 2016.

RAWLINGS, J. S.; ROSLER, K. M.; HARRISON, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. **Journal of cell science**, v. 117, n. Pt 8, p. 1281–3, 15 mar. 2004.

SEAVEY, M. M.; DOBRZANSKI, P. **The many faces of Janus kinase** **Biochemical Pharmacology**, 2012.

SHARMA, Y. et al. Protein tyrosine phosphatase SHP-1: resurgence as new drug target for

- human autoimmune disorders. **Immunologic Research**, v. 64, n. 4, p. 804–819, 24 ago. 2016.
- SHENG, S.; QIAO, M.; PARDEE, A. B. Metastasis and AKT activation. **Journal of cellular physiology**, v. 218, n. 3, p. 451–4, mar. 2009.
- SLEDGE, G. W.; GÖKMEN-POLAR, Y. Protein kinase C-beta as a therapeutic target in breast cancer. **Seminars in oncology**, v. 33, n. 3 Suppl 9, p. S15-8, jun. 2006.
- SWAIN, S. M. et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. **The New England journal of medicine**, v. 372, n. 8, p. 724–34, 19 fev. 2015.
- SZAKÁCS, G. et al. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 3, p. 219–34, mar. 2006.
- SZKLARCZYK, D. et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic acids research**, v. 43, n. Database issue, p. D447-52, jan. 2015.
- THOMAS, S. J. et al. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. **British journal of cancer**, v. 113, n. 3, p. 365–71, 28 jul. 2015.
- TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 4 fev. 2015.
- TREMBLEY, J. H. et al. Emergence of protein kinase CK2 as a key target in cancer therapy. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 36, n. 3, p. 187–95, 2010.
- URTREGER, A. J.; KAZANIETZ, M. G.; BAL DE KIER JOFFÉ, E. D. Contribution of individual PKC isoforms to breast cancer progression. **IUBMB Life**, v. 64, n. 1, p. 18–26, jan. 2012.
- VERSTEEG, H. H. et al. A new phosphospecific cell-based ELISA for p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK), p38 MAPK, protein kinase B and cAMP-response-element-binding protein. **The Biochemical journal**, v. 350 Pt 3, p. 717–22, 15 set. 2000.
- VOSHOL, H. et al. Antibody-based proteomics. **FEBS Journal**, v. 276, n. 23, p. 6871–6879, dez. 2009.
- WAY, K. J.; CHOU, E.; KING, G. L. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 5, p. 181–187, 2000.
- WEEN, M. P. et al. The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 96, n. 2, p. 220–56, dez.

2015.

XU, D.; QU, C.-K. Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, p. 4925–32, 2008.

YOSHIMURA, A. et al. Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins. **Arthritis Research & Therapy**, v. 7, n. 3, p. 100, 2005.

ZHANG, J.; YANG, P. L.; GRAY, N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 1, p. 28–39, jan. 2009.

ZHU, H.; SNYDER, M. Protein arrays and microarrays. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 1, p. 40–45, 2001.