JOSENILSON CAMPOS DE OLIVEIRA

PAPEL DO IRS-1 NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA

Campinas – SP 2009

JOSENILSON CAMPOS DE OLIVEIRA

PAPEL DO IRS-1 NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA

Tese de Doutorado apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr José Barreto Campello Carvalheira

Campinas – SP UNICAMP 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira - CRB-8ª / 6044

Oliveira, Josenilson Campos de OL4p Papel do IRS-1 no desenvolvimento do câncer de próstata / Josenilson Campos de Oliveira. Campinas, SP : [s.n.], 2009. Orientador : José Barreto Campello Carvalheira Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Câncer de próstata. 2. Receptor de insulina. 3. Proteína AKT de Oncogene. I. Carvalheira, José Barreto Campello. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. II. Título.

Título em inglês : IRS-1 Influence in prostate neoplasm

Keywords: • Prostate neoplasm

- Insulin receptor
- Oncogene protein v-AKT

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Área de concentração: Clínica Médica

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira Prof. Dr. Wilson Nadruz Júnior Prof. Dr. Marco Antonio Carvalho Filho Profa. Dra. Rosangela Maria Neves Bezerra Profa. Dra. Maria Esméria Corezola do Amaral

Data da defesa: 16-03-2009

Banca examinadora da tese de Doutorado Josenilson Campos de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira

Membros:
1. Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior When herdry pri
2. Prof. Dr. Marco Antonio Carvalho Filho
3. Prof ^a . Dr ^a . Rosangela Maria Neves Bezerra hayn fiftur
4. Profª. Drª. Maria Esméria Corezola do Amaral MElfmanal
5. Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 16/03/2009

Dedico este trabalho...

À minha mãe e falecido pai, exemplos, que em sua simplicidade, vendo minha vida como mares nunca antes navegados, me estimulam nos bons momentos e me sustentam nos difíceis;

Aos meus irmãos, cada um ao seu modo em diferentes momentos me ouviram e me aconselharam;

À Cris, minha querida companheira, por ter feito da sua vida minha vida;

Ao meu orientador, estimulante exemplo de trabalho e honestidade intelectual.

AGRADECIMENTOS

Esta pós-graduação é para mim o ponto mais distante de uma caminhada iniciada há muito. Durante a elaboração da presente tese, relembrando a caminhada, ficaram aparentes para mim fatores que me identificam. Reconhecer os responsáveis é conseqüência. Creio que se me sobrasse justiça, faltariam páginas para o agradecimento.

As condições prévias necessárias para cumprir as exigências do curso agradeço a muitos, amigos, professores e colegas de tempos passados, mas que ainda permanecem.

As condições concomitantes a realização do presente trabalho agradeço aos amigos e profissionais de diferentes setores: Laboratório de Oncologa Molecular, Laboratório de Biologia Molecular e Laboratório de Bioenergética e Fisiologia Mitocondrial, Fac. Ciências Médicas da Unicamp; Laboratório de Terapia Gênica, Hemocentro da Unicamp; Laboratório de Gastroenterologia Experimental, Gastrocentro da Unicamp, e Laboratório de Transmissão do Sinal Molecular, Instituto de Biologia da Unicamp.

Muitas instituições, ou seria melhor, pessoas em instituição, propiciaram-me orientação e tenacidade. Em especial, o Coluni e a UFV, pela formação básica de excelente qualidade, bem como por seus valores humaníticos, a que todo cidadão brasileiro deveria ter acesso, a Unicamp, por me proporcionar formação em Medicina e Pós-graduação em Clínica Médica, e a Fapesp, pelo apoio financeiro nesta última etapa.

A todos, meu mais sincero Obrigado!

"Sou como você me vê... Posso ser leve como uma brisa ou forte como uma ventania, depende de quando e como você me vê passar."

Clarice Lispector

"Quando tudo tiver sido dito, tudo ainda ficará por dizer, sempre restará tudo a dizer."

André Gorz

RESUMO

A regulação adequada da via de sinalização PI 3-quinase-Akt é essencial para a prevenção da carcinogênese. Dados recentes caracterizaram uma alça de retroalimentação negativa na qual a *mammalian target of rapamycin* (mTOR), bloqueia a ativação adicional da via Akt/mTOR por meio da inibição da função do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1). Entretanto, a inibição potencial do IRS-1 durante o tratamento com rapamicina não foi estudado. No presente estudo, demonstramos que um oligonucleotídeo anti-sense direcionado ao IRS-1 e a rapamicina antagonizam sinergicamente a ativação da mTOR *in vivo* e induzem supressão tumoral, por meio de inibição da proliferação e indução de apoptose, em enxertos de células de câncer de próstata. Estes dados demonstram que a inclusão de agentes que bloqueiam o IRS-1 potencializam o efeito da inibição da mTOR no crescimento de enxertos de células de câncer de próstata.

ABSTRACT

Proper activation of phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway is critical for the prevention of tumorigenesis. Recent data have characterized a negative feedback loop wherein mammalian target of rapamycin (mTOR), blocks additional activation of the Akt/mTOR pathway through inhibition insulin receptor substrate 1 (IRS-1) function. However, the potential of IRS-1 inhibition during rapamycin treatment has not been examined. Herein, we show that IRS-1 antisense oligonucleotide and rapamycin synergistically antagonize the activation of mTOR *in vivo* and induced tumor suppression, through inhibition of proliferation and induction of agents that blocks IRS-1 potentiate the effect of mTOR inhibition in the growth of prostate cancer cell xenografts.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT/PKB	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog / Protein Kinase B Proteína homóloga celular do oncogene retroviral v-akt / Proteína quinase B
АМРК	AMP-activated Protein Kinase Proteína quinase ativada por AMP
ASO	Antisense oligonucleotide Oligonucleotídeo antisense
АТР	<i>Adenosine triphosphate</i> Trifosfato de adenosina
Bad	<i>Bcl-2-associated Death Promoter</i> Promotor de morte associado à Bcl-2
BCR/ABL	Breakpoint Cluster Region/Abelson
CaMKKβ	Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase kinase- β Quinase β da proteína quinase dependente de Ca2+/calmodulina
Csk	C- <i>terminal Src kinase</i> Quinase C-terminal de Src
2-DG	2-deoxi-glucose 2-deoxi-D-glicose
DOK	<i>Docking Protein</i> Proteína ancoradoura
Domínio PH	<i>Pleckstrin Homology Domain</i> Domínio de homologia Pleckstrin
Domínio PTB	<i>Phoshotyrosine-binding domain</i> Domínio de ligação de fosfotirosina
Domínio SH2	<i>Src-homology 2 domain</i> Domínio de homologia Src 2
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> Receptor do fator de crescimento epidermal
elF4E	<i>Eukaryotic Initiation Factor 4E</i> Fator de iniciação 4E em eucarioto

FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> Soro Fetal Bovino
FDA	Food and Drug Administration
FRAP	FKBP12-rapamycin Associated Protein Proteína associada à FKBP12-rapamicina
FKBP12	<i>FK506-binding Protein 12 kDa</i> Proteína ligante de FK506 12 kDa
GIST	<i>Gastrintestinal Stromal Tumors</i> Tumores estromais gastrointestinais
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i> Proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento
HSP90	<i>Heat shock protein 90 kDa</i> Proteína de estresse 90 kDa
IGF1R	<i>Insulin-like Growth Factor 1 Receptor</i> Receptor do fator de crescimento análogo à insulina 1
IL	Interleucina
IR	<i>Insulin Receptor</i> Receptor de insulina
IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i> Substrato do receptor de insulina
ΙΚΚα	IkappaB kinase α Quinase IkappaB α
JAK	<i>Janus kinase</i> Quinase Janus
JNK	<i>Jun N-terminal Kinase</i> Quinase N-terminal Jun
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
МАРК	Mitogen-activated Protein Kinase Proteína quinase ativada por mitógeno

Mdm2	Mouse Double Minute 2
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i> Alvo da rapamicina em mamífero
6-MP	6-Mercaptopurina
МТТ	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NSCLC	<i>Non-small Cell Lung Cancer</i> Câncer de pulmão de células não-pequenas
PBS	Phosphate Buffer Saline Tampão fosfato salino
PDGFRβ	Platelet-derived Growth Factor Receptor β Receptor β do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase Quinase de fosfatidilinositol-3
P70S6K	70 kDa ribosomal protein S6 kinase Quinase S6 da proteína ribossomal 70kDa
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog deleted from chromosome 10
RAFT	Rapamycin and FKBP12 Target
RAPT	<i>Rapamycin Target</i> Alvo da rapamicina
Rheb	Ras homolog enriched in brain
SCID	Severe Combined Immunodeficiency Imunodeficiência severa combinada
SEP	Sirolimus Effector Protein
SHP2	Src Homology Region 2-Containing Protein Tyrosine Phosphatase-2 Proteína tirosina fosfatase contendo região 2 homóloga de Src

SV40 T Antigen	<i>Simian Virus 40 T antigen</i> Antígeno T do vírus símio 40
TSC	<i>Tuberosis Sclerosis Complex</i> Complexo da esclerose tuberosa
ΥΑΡ	Yes-associated Protein Proteína associada a Yes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Gráfico 1	Tipos de câncer mais incidentes, estimados para o ano de 2008, na população brasileira	20
	Figura 2	Sinalização do receptor de andógeno em células prostáticas normais e neoplásica. FC - fator de crescimento (andromedina); PSA -antígeno prostático específico; RA – receptor de andrógeno	26
	Figura 3	Estrutura Molecular do IRS-1	30
	Figura 4	As proteínas IRS são centrais para várias funções celulares	32
	Figura 5	A complexidade da via de antiapoptose emergindo da Akt	36
-	Figura 6	Feed back negativo dependente do IRS-1	39

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA	
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP	iv
Título em inglês : IRS-1 Influence in prostate neoplasm	iv
Keywords: • Prostate neoplasm	iv
Insulin receptor.	iv
• Oncogene protein v-AKT	iv
Titulação: Doutor em Clínica Médica	iv
Área de concentração: Clínica Médica	iv
Banca examinadora:	iv
RESUMO	ix
ABSTRACT	X
LISTA DE ILUSTRACÕES	. 15
I. INTRODUCÃO	. 18
1.1. Tratamento do Câncer: Perspectiva Histórica	. 18
1.2. A Quimioterania Moderna	. 23
1.3. Terapia Alvo: Revolução no Tratamento Ouimioterápico	. 30
1 4 Câncer de Próstata	34
1 4 1 Epidemiologia	34
1 4 2 Fatores de Risco	36
1 4 3 Terania inicial no câncer de próstata metastático	38
1.4.4 Endocrinologia	30
1.4.5 Tratamento do câncer de próstata hormônio resistente	41
1.5 A Via IR S/PI3-quinase/AKT/AMPK/mTOR	42
1.5.1 Os Substratos do recentor de Insulina	$\frac{1}{42}$
1.5.2 Avia PI3-Kinase/Akt/mTOR	48
1.5.2. A Via AMPK/mTOR	51
1.5.5. A Via Alvii Kiiri OK	53
II OBIETIVOS	56
Π. ΟΔΙΕΠΙΟΟΣ	. 50
2.1 Material:	. 50
2.2 A nimois	. 30
3.2. Allilliais:	. 39
2.4. Improgramminitação	. 39
2.5. A nélica Drotéica por Immunchlatting	. 39
2.6 Análice de Gressimente de enverte turnerel:	. 00
2.7. Testemente des enimeties	. 01
3./. I ratamento dos animais:	. 62
3.8. Histopatologia tumoral:	. 62
3.9. PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)	. 62
3.10. Tunel (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin –d UTP Nick End	(0)
Labeling)	. 63
3.11. Analise dos dados	. 63
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	. 65
V. CONCLUSOES	. 74
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	. 76
VII. ANEXO 1	. 83

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1.1. Tratamento do Câncer: Perspectiva Histórica

Falar das doenças e da sua história é naturalmente, para os espíritos contemporâneos, conceder ao cancro um lugar de realce. Com efeito, embora cada vez mais curável, embora ficando longe das doenças cardiovasculares, a segunda das principais causas de morte, o cancro é aquele mal que não se pode olhar de frente. Ele é, para o nosso final de século XX, a tuberculose e a sífilis para o século XIX: o arquétipo da nossa impotência no controle da doença e da morte. É assim que cada época investe numa doença a sua angústia diante da fragilidade da condição humana e procura por todos os meios negá-la, ocultá-la, afastá-la do seu horizonte e, último recurso, fugir daqueles que são atingidos por ela [1].

Dentre os muitos desafios da medicina, nenhum teve um início mais controverso que o do tratamento do câncer. Embora os processos neoplásicos sejam reconhecidos há séculos, pouco se sabia a respeito dos mecanismos biológicos de transformação e progressão tumoral até os adventos da medicina molecular na metade do século XX [2].

Tumores malignos e benignos são mencionados nos mais antigos escritos egípcios. Óleo de castor (feito a partir de testículos de castor), orelhas de porco e outros órgãos de animais estavam entre os ingredientes dos tratamentos usados por Imhotep (2.600 a.C.) para combater tais tumores, conforme descrito nesses textos. O Papiro de George Ebers (datado de 1.600 a.C.) descreve cerca de 700 curas, enquanto que o de Edwin Smith (o qual acredita-se ser uma cópia de um texto de 3.000 a.C.) é um guia cirúrgico para tratamento de diversas doenças, dentre elas o câncer [3-5].

Hipócrates (460 - 375 a.C.) e Claudius Galeno (129 ou 131-201 d.C.) revolucionaram o conhecimento médico por acreditarem que a doença é um processo natural físico e não de causa sobrenatural [6]. Hipócrates nomeou um grupo de doenças por "*karkinos*" e "*karkinoma*", que o latim traduzirá câncer (caranguejo), definido como um "tumor duro, não inflamatório, com tendência à recidiva ou generalização, conduzindo a desenlace fatal" [1]. Em Roma, Aulus Cornealius Celsus (25 aC – 50 dC), mantém os ensinamentos de Hipócrates e descreve as quatro características da infamação (edema, dor, rubor e calor), mas sem distinção de tumores neoplásicos [3, 4].

Galeno atribuiu a etiologia do câncer a um desequilíbrio da bílis negra, um dos quatro fluidos corporais (sangue, fleuma, bile amarela e bile negra) [1, 7]. Tal idéia, que perdurará durante os quinze séculos seguintes, caracteriza o câncer como uma doença geral, cujas manifestações são apenas locais. Galeno removeu alguns tumores cirurgicamente, mas acreditava que o câncer não devia ser tratado. O câncer tornou-se um diagnóstico reconhecido e a Idade Média não questionou o Tratado dos Tumores de Galeno, permanecendo os cirurgiões medievais divididos e céticos quanto à intervenção cirúrgica [3].

Foi durante a Renascença, no século XVI, que novos ensinamentos, agora difundidos pela imprensa, suplantaram os de Galeno. Ambroise Paré (1509? – 1590), o cirurgião mais conhecido da época, retoma a etiologia do desequilíbrio humoral, explicando as metástases como manifestações locais do humor negro e recomendava cirurgia apenas se o tumor fosse completamente removido [6]. Apesar dos estudos de Da Vinci, Durer e Vesalius em Anatomia, manteve-se a teoria humoral como explicação para o câncer. Ainda assim,

alquimistas prepararam uma séria de pastas a base de Arsênio para seu tratamento [3, 4].

Invenções e descobertas nessa fase deram novo tom à Medicina. O microscópio, o telescópio e outros instrumentos foram inventados. A circulação contínua do sangue, descrita pioneiramente por William Harvey, no séc. XVII, pôs abaixo a Teoria Humoral. Tal fato levou a pesquisa do tratamento do câncer a um novo patamar. A descrição da estrutura celular tecidual, feita por Robert Hooke, trouxe a noção de que os organismos e suas partes, incluindo tumores, eram grupos de células. Noção essa que se tornou largamente aceita no século XVIII. Diferentes partes do corpo começaram a ser investigadas como formadoras do câncer. Com a descrição de Gaspare Aselli, em 1662, em Milão, do sistema linfático, as anormalidades linfonodais circunvizinhas foram examinadas como possíveis causas do câncer. Assim, Descartes (1596-1650) "torna já não a bílis negra, mas a linfa a responsável pelo câncer" [1].

Embora ainda muito arriscadas devido à ausência da anestesia e de anti-sépticos, remoções de linfonodos foram realizadas pelo famoso cirurgião alemão, Wilhelm Fabricius Hildanus, em cirurgias contra o câncer de mama. Mastectomias radicais foram feitas por Johann Scultetus.

O século XVII deu caráter obscuro ao câncer, o qual perdurou por dois séculos, com Sennert (1572-1637) afirmando que se trata de um mal contagioso. Houve exclusão e recusa em recolher cancerosos em muitos hospitais. Assim, em 1740, em Reims (França) é fundado um hospital de cancerosos para aliviar suas misérias físicas e morais.

No período entre 1733 e 1788 foram realizados os primeiros experimentos sistemáticos contra o câncer, levando a Oncologia ao grau de

especialidade médica. Nesse período surgiam os primeiros centros de Oncologia. O médico francês Claude Gendron concluiu que o câncer surgia localmente no corpo como uma massa em crescimento. Ele acreditava que apenas procedimentos cirúrgicos podiam tratar a patologia. Fatores ambientais passaram a ser investigados como possíveis causadores de câncer. O câncer em limpadores de chaminés e os efeitos carcinogênicos do tabaco começaram a ser examinados. Também nesse período, o professor alemão, Hermann Boerhaave, acreditava que inflamações poderiam originar tumores.

No século XIX ocorreram profundas mudanças científicas e sociais. Muitas dessas mudanças contribuíram para o desenvolvimento da pesquisa em Oncologia, tais como, Darwin e a Evolução, Pasteur e a Bacteriologia, Virchow e a Patologia Celular, Ehrlich e a quimioterapia, Morton e a Anestesia, Lister e a Antisepsia, Röntgen e os Raios-X, os Curie e o Rádio [3, 6, 8, 9]. Sucessivamente, doença do organismo, depois do tecido, o câncer torna-se uma doença da célula e do nó celular [1].

O primeiro quarto do século XX, a Oncologia se afirma através da pesquisa experimental e são descritos novos agentes carcinógenos. Entre os carcinógenos estavam os vírus, agentes químicos e físicos e os cromossomos anormais de Theodor Boveri. Na década de 1940, Charles Huggins inicia a primeira terapia sistêmica contra o câncer, a terapia anti-androgênica por ablação, o que lhe resultou o Prêmio Nobel de Medicina em 1966 [10]. Raios-X foram usados eficazmente para destruir células cancerígenas, mas o tratamento do câncer era essencialmente cirúrgico [3]. Pela primeira vez na história de uma doença, realizam-se, num mesmo espaço, a concentração e a

coordenação de especialidades médicas e terapêuticas diferentes: raios X, cirurgia e quimioterapia.

Em 1953, James Watson e Francis Crick possibilitaram o início do entendimento molecular da doença e da saúde [11]. Inicia-se a busca pelo entendimento molecular do câncer. Em 1955, o Congresso americano funda o Programa Nacional de Quimioterapia do Câncer, caracterizado pelo empirismo empregado no *screening* de compostos que mostrassem alguma atividade antitumoral [12]. Na década de 70, tal programa possibilitou a descoberta de quarenta e cinco agentes quimioterápicos contra trinta diferentes tipos de câncer [2, 13]. Também nesta década, após a descoberta da Transcriptase Reversa, começou a ganhar campo a Engenharia Genética. Genes foram seqüenciados e alguns oncogenes e proto-oncogenes identificados. A ligação entre vírus e câncer tornou-se mais clara. Começaram as investigações acerca das propriedades antineoplásicas do sistema imune.

Durante os anos 80 pesquisadores descreveram como genes suprimiam o crescimento tumoral, como fatores ambientais tais como a radiação e o fumo os afetavam, bem como foram capazes de transferir genes entre diferentes espécies.

O Projeto Genoma Humano teve início em 1991. A ligação entre câncer e fatores ambientais, bem como estilo de vida, é reforçada em programas de prevenção e detecção precoce. A pesquisa com o uso da Bioinformática e dos Anticorpos Monoclonais se acelera, possibilitando o advento da terapia alvo-determinada no início do século XXI.

Segundo Goff [1], mais do que qualquer outra doença, o câncer evidencia dois aspectos do mundo contemporâneo, por um lado, o fato de a

descoberta científica estar contextualizada social e culturalmente; por outro lado, a verificação de que as grandes descobertas já não podem ser questões de homens isolados, mas sim de equipes trabalhando as diversas disciplinas e elucidando-se mutuamente.

1.2. A Quimioterapia Moderna

O início da era moderna da quimioterapia pode ser vinculado diretamente com a descoberta dos efeitos do Gás Mostarda. Em 1942, Louis Goodman e Alfred Gilman, ambos farmacologistas, convenceram seus colaboradores a tratar um paciente portador de Linfoma não-Hodgkin com o Gás Mostarda. Propuseram que este reagente deveria destruir tumores, com base em achados da autópsia de soldados que morreram na Primeira Guerra Mundial após o contato com o Gás Mostarda. As vítimas apresentavam profunda hipoplasia medular e mielossupressão, razões pelas quais doses de reagente similar deveriam causar a regressão de Linfomas e Leucemias. Também realizaram experimentos em ratos inoculados com Leucemias. No paciente em questão, o tratamento de fato resultou em regressão tumoral, entretanto em poucas semanas a doença recrudesceu, mas o paradigma de que drogas poderiam ser administradas sistemicamente para induzir regressão tumoral estava estabelecido [2, 9].

Em estudos seguintes, os mesmos cientistas definiram a ação molecular do componente do Gás Mostarda, demonstrando a formação de um agente alquilante intermediário, o anel etileno-imônio, o qual reagiria com sítios doadores de elétrons nas proteínas e ácidos nucléicos. Os resultados destas pesquisas permitiram que novo princípio fosse estabelecido: tumores são mais

suscetíveis a determinadas toxinas que os tecidos normais. No entanto, o motivo subjacente ainda não era conhecido. Estudos posteriores revelaram que o reagente formava uma ligação covalente com o DNA, feita através de sítios específicos de alquilação nas bases purínicas, levando a *crosslinking* de extremidades e induzindo apoptose. Outros agentes alquilantes foram desenvolvidos nos 20 anos seguintes. Ciclofosfamida, Clorambucil e outros se tornaram drogas *standard* para o tratamento de pacientes com Linfomas e Leucemias. Goodman e seus colaboradores notaram também nestes experimentos pioneiros que os tumores tornavam-se rapidamente resistentes a estas drogas, uma observação que antecipou a experiência clínica com o uso da monoterapia [2].

Uma segunda abordagem para o tratamento do câncer teve início logo após a segunda guerra mundial, quando Sydney Farber, patologista da escola de medicina de Harvard, investigou o efeito do Ácido Fólico em pacientes com Leucemia. Esta vitamina, descoberta em 1937 por Lucy Wills, parecia estimular a proliferação de células de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) quando administrada a crianças com este câncer. Tal fato levou à síntese de agentes análogos do ácido fólico, Aminopterina e depois o Metotrexato, que foram os primeiros agentes quimioterápicos a induzir remissão tumoral em crianças com LLA. As remissões foram de curta duração, mas o princípio era evidente: antifolatos podiam suprimir a proliferação de células malignas e podiam restabelecer o funcionamento normal da medula óssea.

O Metotrexato mostrou atividade antineolplásica contra outros tumores, incluindo mama, ovário e bexiga. Mas, em 1958, o Metotrexato usado

isoladamente, foi capaz de curar o Coriocarcinoma. Pela primeira vez um tumor sólido foi curado por quimioterapia sistêmica em humanos [2].

Outras drogas antileucêmicas surgiram na década de 1950, com os trabalhos de George Hitchings e Gertrude Elion, que estudaram análogos purínicos, como a 6-Mercaptopurina (6-MP). Tais pesquisadores demonstraram que pequena mudança em um componente necessário à sobrevida celular, inibindo passos que precediam à síntese "*de novo*" de RNA e de DNA, poderia coibir o crescimento das células tumorais. Paralelamente, foram descobertos os alcalóides da Vinca, originalmente descritos como agentes antidiabetes, estas drogas eram capazes também de bloquear a proliferação das células tumorais. O efeito antitumoral dos alcalóides da Vinca decorre da ação dessas drogas em inibir a polimerização de microtúbulos do fuso acromático, interrompendo, portanto, a divisão celular.

Em 1960, Frank Schabel e Howard Skipper analisaram a cinética do crescimento tumoral, bem como criaram ensaios *in vivo* para quantificação da citotoxidade. Eles mostraram que diferentes doses da droga anticancer destruíam uma fração de células do tumor e que, dependendo da droga, a célula deveria ser exposta ao quimioterápico durante um período particular do ciclo celular. Assim, inibidores da síntese de DNA, e o metotrexato foram mais efetivos durante a divisão celular, enquanto as drogas que danificavam fisicamente o DNA, como os agentes alquilantes, matavam as células em todas as fases do ciclo celular. Estas pesquisas também mostraram que a citotoxidade é dose dependente, e demonstraram que a combinação das terapias é eficaz na prevenção da resistência às drogas. Finalmente, Schabel e

Skipper foram os primeiros a sugerir que altas doses de quimioterápicos poderiam ser usadas para curar pacientes com tumores refratários [2].

Clinicamente a combinação quimioterápica começou a ser usada no tratamento de crianças com LLA. Esta abordagem foi estendida para o tratamento dos Linfomas na década de 60 quando o Gás Mostarda, a Vincristina, Procarbazina e a Prednisona – regime quimioterápico conhecido como regime MOPP – foram usadas conjuntamente no tratamento de linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin com êxito. Finalmente, em 1965, a combinação do Metotrexato (um antifolato), a Vincristina (alcalóide da vinca), 6-MP (6-Mercaptopurina) e Prednisona – os quais juntos foram referidos como regime POMP – induziu remissão de longo prazo em crianças com LLA. Tal como na antibioticoterapia da Tuberculose e da Endocardite Infecciosa, a combinação das drogas provou ser mais efetiva na prevenção da resistência das células tumorais a terapêutica.

De acordo com resultados obtidos em modelos animais, os agentes quimioterápicos são mais efetivos quando usados combinados em pacientes com tumores de pequeno volume. De forma que mesmo drogas com atividade mais modesta, como o 5-Fluorouracil, um inibidor da síntese de DNA, pode diminuir a taxa de recidiva se usada como adjuvante ao tratamento de pacientes com câncer de cólon. Dados semelhantes foram obtidos no tratamento de tumores de outros sítios como no caso do câncer de mama. Em geral, a combinação quimioterápica das drogas provou ser mais eficiente do que a monoterapia tanto no tratamento do câncer metastático quanto no tratamento adjuvante.

Em 1956, C. Gordon Zubrod, estabeleceu um programa amplo nos Estados Unidos para a coleta e teste de atividade anticancer de plantas e algas marinhas. Este programa resultou na descoberta dos taxanos (em 1964) e das camptotecinas (em 1966). Ambas as drogas encontraram grandes dificuldades no seu desenvolvimento. Paclitaxel® (Taxol), um dos principais taxanos usados atualmente, cuja promoção de morte celular ocorre através dos seus efeitos em microtúbulos, era inicialmente de difícil síntese e virtualmente insolúvel, só tendo sua ação comprovada 23 anos após sua descoberta e seu uso clínico iniciado em 1991 [10].

A Camptotecina também apresentou problemas durante seu desenvolvimento. Derivada de uma planta ornamental chinesa, a Camptotecina age através da inibição da Topoisomerase I. Inicialmente, o agente tinha pequena atividade antitumoral e alta toxicidade renal por apresentar maior atividade em pH ácido. Em 1996, análogo estável da Camptotecina, o Irinotecano, foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do câncer de cólon [2].

De forma geral, o período de 1970 a 1980 caracterizou-se pelo sucesso na descoberta de novos quimioterápicos. Nesse período, vários compostos usados como agentes quimioterápicos atualmente foram descritos: a Cisplatina, essencial na cura do câncer de testículo e base no tratamento de carcinomas epidermóides; as nitrosuréias, tratamento de gliomas; a fludarabina, tratamento de Leucemia linfocítica crônica; as epipodofilotoxinas, como a doxorrubicina, droga em que se baseia o tratamento do câncer de mama [2].

Contudo, na década de 80, o progresso no desenvolvimento do tratamento quimioterápico tornou-se mais lento. Grandes estudos clínicos realizados com drogas já existentes mostravam apenas ganhos marginais, além disso, os modelos animais de Leucemia e tumores sólidos, que eram essenciais para o *screening* de drogas na época não se mostravam bons preditores das respostas clínicas. Em 1985, começou-se a produzir grupos monotônicos de antimetabólitos, alquilantes, antimitóticos e inibidores de topoisomerase. Análogos destas drogas determinaram pequena melhora na eficácia dos tratamentos, gerando pouco entusiasmo para clínicos e pacientes, atentos a novas classes de agentes [12].

Em resposta às irrisórias descobertas desse período e tendo em vista que importantes agentes haviam sido descobertos de produtos naturais, o Instituto Nacional do Câncer dos EUA iniciou programa em que os testes de *screening* de drogas passaram a ser feitos com 60 diferentes linhagens de tumores humanos. Plantas, organismos marinhos e outros agentes descobertos na natureza foram buscados mundo afora e tiveram seus extratos testados nessas linhagens tumorais. O sucesso de tal programa foi parcial, a maioria dos agentes antimitóticos e inibidores que demonstraram ação eram de classes descritas previamente. Ocasionalmente uma nova classe de agente antitumoral era descoberta, como a Geldanomicina, inibidora da proteína da Chaperona 90 (*heat-shock protein-90*), importante na regulação da degradação protéica, e Flavopiridol, que inibe uma quinase reguladora do ciclo celular [2, 14]. Ambas as drogas ainda em ensaios clínicos. Talvez o maior legado de tal programa tenham sido as novas técnicas de *screening*, de alta velocidade na

realização, ainda muito utilizados, como o teste de citotoxicidade baseado na função mitocondrial MTT.

1.3. Terapia Alvo: Revolução no Tratamento Quimioterápico

Enquanto as atenções estavam voltadas para a descoberta dos agentes citotóxicos no final de 1980, concomitantemente, as abordagens da Genética e da Biologia Molecular propiciaram melhor entendimento sobre as vias de sinalização que regulam atividades celulares. As vias de sinalização conectavam o núcleo a receptores celulares diversos, caracterizando circuitos em sistemas de controle da proliferação e morte celulares. Muitas dessas vias encontram-se radicalmente alteradas em células de câncer. Pesquisas enfocando o reparo desses defeitos moleculares em células de câncer deram início à era da Terapia Alvo [15].

Em decorrência disso, os cientistas atualmente praticam uma ciência diferentemente daquela praticada nos últimos 30 anos. Tal diferença é aparente no nível técnico, mas a mudança mais profunda ocorre em nível conceitual. A célula do câncer é vista agora como o resultado evolutivo de diversas mutações que se acumulam e interagem entre si [16] e com o meio extracelular [17], o que diminui as potencialidades de um agente antitumoral de efeito único. O "plano de ataque" traduz-se em uma estratégia multifocal de modulação de sinal molecular [18].

Assim, no início dos anos 90, o crescente número de alvos (fatores de crescimento, moléculas de sinalização, proteínas do ciclo celular, moduladores de apoptose e moléculas promotoras da angiogênese), associado ao reconhecimento do câncer como segunda causa de morte não transmissível no mundo, transformaram o desenvolvimento da cura do câncer, um negócio mal

investido sustentado por órgãos governamentais de pesquisa, numa indústria bilionária.

A explosão da pesquisa em transmissão do sinal intracelular vem decifrando os mecanismos básicos de sinalização de um grande número de receptores de membrana celular [19]. O seqüenciamento do genoma humano permitiu a identificação de diferentes membros de várias vias de sinalização. Nesse sentido, 11,2% dos genes que podem ter sua função predita estão diretamente envolvidos na transmissão do sinal molecular [20]. Isto é um número subestimado do total de genes envolvidos, pois 41,7% dos genes no genoma humano não têm sua função predita, e muitos genes são importantes em múltiplas funções, tais como ancoramento celular e participação da matriz extracelular, que não foram classificados na categoria de genes envolvidos na sinalização celular [21].

Um dos mais interessantes aspectos da transmissão do sinal intracelular descoberto na última década é a constatação de que a maioria das vias de sinalização é intricada e complexa, tendo múltiplas vias de reverberação, o que é denominado *cross-talk [22]*. Dessa forma, para entender uma única via de sinalização é necessário que se entenda globalmente a rede de interação entre as vias de sinalização [23, 24]. Diferentes vias de sinalização podem controlar ou afetar a mesma função celular e uma única via de sinalização pode regular diferentes funções celulares. Muitas vias de sinalização com diversas ações podem interagir em múltiplos níveis, o que mostra preservação e alto grau evolutivo no fino ajuste, bem como confere robustez biológica, das respostas celulares a estímulos seqüenciais ou concomitantes. Tal fato é observado de forma particular na modulação do

metabolismo e do crescimento celular, bem como na resposta de resistência a estímulos nocivos, fundamentais na sobrevivência celular [25].

A elucidação das vias de crescimento celular mostra que algumas dessas vias estão alteradas no câncer humano. Características de uma célula como defeito na apoptose, auto-suficiência de fatores de crescimento, insensibilidade a sinais que inibem o crescimento, angiogênese, replicação ilimitada e metastatização [16, 26] vêm sendo paulatinamente relacionadas a alterações em vias de sinalização. Isso tem levado à procura de inibidores específicos dessas vias [27]. Embora múltiplos inibidores de sinalização estejam atualmente em desenvolvimento ou já em ensaios clínicos, apenas alguns mostram eficácia moderada [28, 29]. Uma razão óbvia para isso é que vias distintas apresentam *cross-talk*. Assim, uma via compensatória pode emergir ou ganhar força após o bloqueio de uma via específica, o que se expressa clinicamente por resistência à droga [30-33].

Embora a rede de sinalização seja de alta complexidade e redundância, existem obstáculos a essas vias, isto é, existem proteínas onde os sinais convergem e, se bloqueados, podem impedir diversos processos celulares. Proteínas adaptadoras, isto é, que se ligam a múltiplos elementos de uma cascata de sinalização e coordenam a sinalização celular, bem como quinases intracelulares podem ser candidatos ideais como alvos moleculares para o bloqueio da sinalização celular.

Inovações na tecnologia aumentaram o sucesso dos inibidores para alvos específicos. A Química Combinatória gerou milhares de estruturas para screening de inibidores *in vitro*. Aquelas com melhor atividade têm sua especificidade e/ou biodisponibilidade melhoradas quimicamente. O agente

quimioterápico buscado deveria ser metabolicamente estável, apresentar meia vida longa em modelo animais e em humanos e apresentar baixa taxa de depuração por enzimas da família do Citocromo P₄₅₀. As moléculas candidatas deveriam ser bem absorvidas por via oral, o que não ocorria com os quimioterápicos descobertos entre 1970 e 1980, e apresentar baixa toxicidade à medula óssea e ao epitélio intestinal.

Um dos eventos marcantes da era da terapia alvo foi o desenvolvimento do Mesilato de Imatinib (Gleevec®), uma estrutura relativamente simples que detém as características do quimioterápico ideal. O Imatinib é um inibidor potente da quinase BCR-ABL, que está envolvida na patogênese da Leucemia Mielóide Crônica. Em humanos, a taxa de remissão da doença chega a 90%. O Imatinib também inibe a tirosina quinase c-KIT e o receptor β do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGFR- β). Estas características do Imatinib permitiram seu uso no tratamento de Tumores do Estroma Gastrintestinal (GIST) e da Síndrome Hipereosinofílica [34].

Uma segunda classe de drogas são aquelas que inibem a ligação do ATP a quinase do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), que apesar de apresentarem uma menor atividade antitumoral do que o Imatinib fazem parte do arsenal de quimioterapias alvo-direcionadas, ou Terapia Alvo. O Gefitinib (Iressa®) induz remissão em 10-15% dos casos de carcinoma pulmonar de células não-pequenas (NSCLC) e potencializa outras drogas quimioterápicas [35]. O Cetuximab (Erbitux®) é um anticorpo monoclonal contra o domínio extracelular do EGFR e é indicado na terapia combinada do Câncer de Cólon [36].

Além dessas classes, os inibidores da angiogênese estão em franco desenvolvimento na terapia clínica e o Bevacizumab (Avastin®) atualmente é usado na terapia combinada contra Câncer de Cólon; o SU-11248 (Sutent®), utilizado no tratamento do Câncer Renal e o Bayer 43-9006 (Sorafenib®), usado no tratamento do Câncer Renal e Hepatocarcinoma.

Há mais de 80 anos, clínicos dependem da classificação histológica dos tumores para ditar as escolhas terapêuticas [9]. A tendência atual é de que o tratamento seja ainda mais específico, isto é, os pacientes são selecionados para determinado tipo de tratamento com base nas características moleculares do tumor. Esta abordagem confere vantagens enormes na eficiência e custo dos tratamentos quimioterápicos, bem como na segurança e conforto ao doente oncológico.

1.4. Câncer de Próstata

1.4.1 Epidemiologia

O câncer de próstata é a neoplasia mais comum do homem e sua incidência vem aumentando continuamente nas últimas décadas. Isso se deve a dois fatores principais: aumento da perspectiva de vida e o estilo de vida ocidental, caracterizado por dieta altamente calórica e sedentarismo. Interessante ressaltar que, embora globalmente represente 9,7% dos tumores no homem, esta distribuição difere entre os países desenvolvidos, onde alcança 15,3%, enquanto nos países em desenvolvimento apresenta apenas 4,3%. No mundo, o número de casos estimados no ano 2.000 foi de 513.000 com 201.000 mortes [37]. No Brasil, o câncer de próstata é o tumor mais comum do homem com estimativa para o ano de 2008 de 49.530 casos novos (52 casos novos/100.000 homens), representando a segunda causa de óbito, precedido apenas pelo câncer de pulmão (Fig. 1) [38].

Estados Unidos, Canadá, Brasil, países escandinavos, Austrália e África do Sul têm alta incidência de câncer de próstata e altas taxas de mortalidade, entretanto estas são marcadamente menores nos países asiáticos. As diferenças raciais são bastante evidentes dentro dos Estados Unidos, onde a população negra apresenta maior incidência e mortalidade por câncer de próstata, cerca de 70% acima da população branca. Esta, por sua vez, tem taxas consideravelmente mais altas que a população de origem asiática [37].



Gráfico1. Tipos de câncer mais incidentes, estimados para o ano de 2008, na população brasileira [38].

É importante ressaltar que embora a incidência do câncer clínico seja tão discrepante entre as populações, o achado de câncer latente em estudos de autópsias é semelhante ao redor do mundo [39]. Registra-se que a migração de indivíduos de áreas de baixo risco de câncer de próstata para países de alto risco aumenta de maneira importante a incidência da neoplasia, denotando importante influência ambiental e dos hábitos de vida no desenvolvimento da mesma [40].

1.4.2. Fatores de Risco

A idade, a hereditariedade e o estilo de vida são os principais fatores de risco para o câncer de próstata, que excepcionalmente ocorre antes dos 40 anos. Estudos de autópsia demonstram câncer de próstata em 15% a 30% dos homens ao redor de 50 anos e em 80% dos homens aos 80 anos [41].

O câncer hereditário corresponde de 5 a 10% dos casos, sendo maior tal probabilidade quanto menor a idade de manifestação da doença. Acreditase que em indivíduos que apresentam câncer de próstata antes dos 50 anos, 40% sejam causados por herança de algum oncogene. Em 1956, Morganti *et al.* identificaram os primeiros agregados familiares, mas só em 1996 Smith *et al.* encontraram o primeiro gene localizado no cromossomo 1 (1q24-25), denominado HPC1 (*hereditary prostate cancer 1*) [42]. Em 1998, um segundo lócus foi descrito no cromossomo 1 (1q42-43) denominado PCAP (*predisposing for prostate cancer*) [43, 44].

O câncer de próstata decorre de alterações na proliferação e na diferenciação do epitélio da glândula. O crescimento e a manutenção do epitélio prostático normal são regulados pela testosterona e vitamina D. O

andrógeno estimula a proliferação celular enquanto os metabólitos da vitamina D inibem. Ambas as vias interagem em vários níveis com o eixo do fator de crescimento do insulina-símile (IGF-1), sendo que perturbações nas mesmas têm sido relacionadas ao câncer de próstata [45].

O IGF-1 é produzido predominantemente pelo fígado sob a ação do hormônio do crescimento (GH). Ele é responsável por aumento da proliferação celular e pela inibição da apoptose no câncer prostático. No estado de restrição calórica, fortemente protetora contra o desenvolvimento de neoplasias, os níveis de IGF-1 e insulina encontram-se diminuídos. Por outro lado, pacientes obesos tendem a apresentar maiores níveis de insulina e de IGF-1 o que favoreceria o crescimento de implantes de tumores de próstata [41, 46-49].

Outro fator envolvido na patogênese do câncer de próstata é a testosterona. Ela difunde-se nas células do epitélio e do estroma prostático, onde é reduzida pela 5- α -redutase para sua forma mais ativa a 5- α -deidrotestosterona (DHT). A DHT se liga ao receptor de andrógeno, ativando os elementos de resposta dos genes-alvo promovendo proliferação celular. O receptor androgênico é um membro da família dos fatores de transcrição. Polimorfismos desse gene têm sido relacionados a maior ou menor predisposição ao câncer de próstata [50].

Suspeita-se que os hábitos alimentares também tenham papel importante na promoção do câncer de próstata. O consumo de gorduras altamente saturadas, principalmente aquelas presentes em carnes vermelhas e em laticínios, seria um dos fatores predisponentes para o desenvolvimento do câncer. Aminas heterocíclicas, provenientes do cozimento em altas
temperaturas e por tempo prolongado de carnes vermelhas, parecem ter efeito carcinogênico sobre a próstata. Por outro lado, Hanash *et al.* [51] demonstraram baixa incidência de câncer de próstata nos sauditas (3,1/1000.000 habitantes), mesmo sob dieta rica em gordura saturada.

Alguns elementos são tidos como protetores, tais como a vitamina E, o selênio, a dieta rica em fibras e o exercício físico [52, 53]. Mais recentemente, tem-se estudado o papel protetor do licopeno, substância antioxidante presente em grande quantidade no tomate, na goiaba e na melancia. Estudos correlacionaram essa substância à redução da proliferação celular [54].

1.4.3. Terapia inicial no câncer de próstata metastático

Atualmente, temos amplo arsenal terapêutico disponível para o câncer de próstata [55]. Para pacientes com doença localizada (sem evidência clínica ou radiológica de disseminação metastática) existem algumas opções disponíveis que variam entre as estratégias de vigilância e a prostatectomia radical. As estratégias de vigilância podem ser adequadas para pacientes que podem tolerar psicologicamente conviver com câncer não tratado, haja vista o fato de muitos homens com câncer de próstata morrerem de outras causas. Essa abordagem terapêutica está indicada para pacientes que têm uma expectativa de vida limitada por outras patologias, aqueles com dados clínicos que pressupõem doença indolente e para aqueles que querem evitar os efeitos colaterais de uma terapia radical [56]. As opções de tratamento com intenção curativa são: prostatectomia radical; radioterapia externa e braquiterapia. Nesse contexto as terapias de privação androgênica podem ser usadas como adjuvante ou neoadjuvante às terapias definitivas [55].

Após o tratamento, o seguimento da doença é feito através de exame físico e dosagem do antígeno prostático específico (PSA). Um aumento consistente do PSA após a terapia com intenção curativa é um problema clínico comum, o qual pode representar câncer pélvico persistente ou doença metastática incurável. Através de uma variedade de avaliações, o clínico tenta identificar os pacientes em que a probabilidade da doença está confinada a pelve é alta o suficiente para justificar a toxicidade de uma ressecção numa segunda tentativa de alcançar a cura [55].

Para pacientes com doença metastática documentada, ou para aqueles em que a impressão clínica indica pequena chance de cura para justificar a toxicidade inerente ao tratamento cirúrgico, a terapia de privação androgênica, seja por castração cirúrgica ou farmacológica, terapia antiandrogênica, ou uma combinação desses, é o tratamento padrão [55].

1.4.4. Endocrinologia

A glândula prostática é dependente de andrógenos para o desenvolvimento e manutenção de sua integridade [57]. A ausência congênita do receptor de andrógeno acarreta hipoplasia prostática [58]. Uma semana após a castração a próstata de ratos atrofiam como, resultado de apoptose das células epiteliais [59]. Os andrógenos também funcionam como promotores do crescimento tumoral. Estudos com eunucos mostraram que a próstata permanece pequena e, tanto hipertrofia benigna da próstata como câncer de próstata, não se desenvolvem naqueles [60]. Camundongos transgênicos com hiperexpressão do receptor de andrógenos apresentam maior *turnover* celular e desenvolvem neoplasia intraepitelial prostática [61]. Embora seja clara a

necessidade de andrógenos para o desenvolvimento do câncer prostático, tem sido difícil demonstrar correlação entre os níveis séricos de testosterona e o desenvolvimento do câncer de próstata. A correlação entre incidência de câncer de próstata e níveis séricos dos andrógenos atualmente é controversa e não foi demonstrada de forma conclusiva [62-67].

Na próstata de um indivíduo adulto a ação androgênica acontece de forma parácrina com efeitos nos diferentes tipos celulares. A ligação do andrógeno ao seu receptor nas células do estroma prostático resulta na dimerização do receptor com consegüente ativação nuclear (Fig. 2A). Nas células do estroma, o receptor de andrógeno ativa a secreção de fatores de crescimento (andromedinas) [68]. Essas andromedinas se ligam a receptores citoplasmáticos das células epiteliais desencadeando proliferação e crescimento do epitélio prostático. No núcleo das células epiteliais, o receptor de andrógenos estimula a transcrição de uma série de genes, incluindo o antígeno prostático específico (PSA). A ativação do receptor nuclear pelos andrógenos não resulta em crescimento e proliferação celular, na verdade essa ação até diminui a atividade das andromedinas [68]. Durante a carcinogênese ocorre uma grande alteração das vias de sinalização dos andrógenos (Fig. 2B). O receptor de andrógeno ao se ligar ao núcleo deixa de inibir o crescimento celular. Ao invés, o receptor de andrógeno passa a funcionar de forma autócrina, no qual o receptor de andrógeno passa a estimular o crescimento das células malignas [69].



Figura 2. Sinalização do receptor de andrógeno em células prostáticas normais e neoplásica. FC - fator de crescimento (andromedina); PSA - antígeno prostático específico; RA – receptor de andrógeno. Figura adaptada de Isaacs JT & Isaacs, WB [70].

1.4.5. Tratamento do câncer de próstata hormônio resistente

A despeito dos avanços no tratamento radioterápico e na melhoria das técnicas cirúrgicas, aproximadamente 40% dos pacientes apresentam recidiva bioquímica e uma proporção razoável desses homens evolui para doença andrógeno resistente, que apresenta comumente sintomatologia importante, decréscimo na qualidade de vida e morte por câncer de próstata. Neste cenário tornam-se necessárias terapias que visam melhorar a qualidade de vida, atenuar os sintomas e aumentar a sobrevida global para essa população que apresenta doença de cunho mais agressivo [71].

A visão do papel da quimioterapia no tratamento do câncer de próstata até a década de 90 estava associada a um grande pessimismo, em virtude das baixas taxas de resposta e elevada toxicidade dos agentes estudados. Os estudos clínicos realizados contribuíram para tal percepção, à medida que

incluíam um significativo número de pacientes com doença extremamente avançada e que apresentavam limitada expectativa de vida e sintomas muito relevantes.

Em 1996, Tannock et al. [72] mudaram esse conceito a publicarem o primeiro estudo randomizado que demonstrava com clareza que a Mitoxantrona tinha lugar na paliação da dor (29% versus 12%, p<0,01) de pacientes com doença androgênio dependente. Em virtude dos dados segundo os quais a quimioterapia com Mitoxantrona seria benéfica somente na paliação dos sintomas, novas estratégias com o objetivo de alterar a história natural da doença, com aumento na sobrevida dos doentes, mostraram-se necessárias. Assim, atualmente o tratamento do câncer de próstata androgênio resistente apresentou avanço com a utilização de Docetaxel administrado a cada três semanas (Sobrevida global de 18,9 meses versus 16,5 meses no braço tratado com Mitoxantrona, p=0,009) [73]. Assim, apesar dos avanços alcançados com a introdução do Docetaxel no arsenal terapêutico, o prognóstico de indivíduos com câncer prostático hormônio-resistente ainda é ruim. Nesse contexto, urge a descoberta de alvos específicos para o tratamento do câncer de próstata avançado.

1.5. A Via IRS/PI3-quinase/AKT/AMPK/mTOR

1.5.1. Os Substratos do receptor de Insulina

Os substratos do receptor de insulina (IRS) são uma família de seis (IRS-1 a IRS-6) proteínas adaptadoras de sinalização intracelular estruturalmente relacionadas que integram e coordenam numerosos sinais extracelulares com a célula [74]. Inicialmente identificados como intermediários

do receptor de insulina (IR), são moléculas centrais responsáveis pela maioria das ações do IGF-IR, IR, RET e JAKs (através dos receptores de interleucinas e interferons) [75-79].

O IRS-1, primeira proteína a ser identificada e clonada, foi originalmente descrito em hepatoma murino, mostrando ser ativado por IGFR e IR, e posteriormente foi descrito em tecidos tais como cérebro, miocárdio, músculo, adipócito, rins, ovários e glândulas mamárias (Fig.3). Codificado pelo éxon 2q36-37, apresenta peso molecular de 132 kDa, mas devido a fosforilação em serina, migra em gel de poliacrilamida com peso aparente de 185 kDa. Sua expressão é induzida por hormônios esteróides e inibida por citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β. Estruturalmente, o IRS-1 contém porção amino-terminal (NH₂) altamente conservada, portando domínio PH (*pleckstrin homology*), seguido imediatamente por um domínio PTB (*phoshotyrosine-binding*), que se liga a domínios justamembrana do IR e IGFR. A porção carboxi-terminal (COOH) contém múltiplos resíduos de tirosina e de serina que, como domínios SH2 (*src-homology 2*), se tornam sítios de ancoragem para proteínas com domínio PTB. Importante notar que os IRS não possuem domínios SH2 ou SH3 [74, 80].



Figura 3: Estrutura Molecular do IRS-1

A sobrevivência de camundongos *nockout* para IRS-1 levou ao isolamento do IRS-2. O IRS-2 é codificado por dois éxos na região cromossômica 13q34.1 e apresenta peso molecular de 145 kDa,mas apresenta homologia estrutural significativa com o IRS-1, cuja porção N-terminal (75%) é altamente conservada. Entretanto, a ligação do IRS-2 exige um domínio central específico localizado entre os aminoácidos 591 e 733 (em adição ao domínio PTB), que não está presente no IRS-1. Interessantemente, a porção carboxiterminal (35%) é pouco conservada, mas contém resíduos de fosforilação em tirosina similares ao do IRS-1. O IRS-2 apresenta expressão nos mesmos tecidos e controlada por fatores semelhantes aos implicados na do IRS-1 [80].

Outros membros da família IRS têm expressão restrita quanto à espécie e aos tecidos. O IRS-3 é expresso apenas em roedores. IRS-4 é limitado ao cérebro e ao timo. O camundongo *knock-out* para IRS-3 e 4 apresenta alteração de fenótipo leve ou inaparente. IRS-5 e IRS-6 (também

chamados DOK1 e DOK2), apresentam maior similaridade entre si que com os demais IRS [74].

Os IRS não possuem atividade tirosina quinase, mas são fosforilados após ligarem-se aos seus receptores ativados. A auto-fosforilação carboxiterminal em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios SH2 incluindo a PI 3–quinase (p85), Fyn, Grb2, Nck, Csk e SHP2, cada uma dessas moléculas iniciará uma via de sinalização diferente que contribuirá para o efeito biológico final das proteínas IRS [81].

A ativação das proteínas IRS é conhecida por ser crítica para a mitogênese celular. Células 32D murinas que não expressam IRS-1 perdem sua capacidade de proliferar quando tratadas com interleucina-4 (IL-4) ou insulina [82]. A expressão de IRS-1 nessas células, entretanto, restabelece a resposta mitogênica a insulina ou IL-4. Em células de hepatoma [83] e células de ovário de hamster [84] a expressão de um oligonucleotídeo antisense (ASO) para o IRS-1 reduz a taxa de crescimento e a incorporação de timidina em resposta à insulina.



Figura 4. As proteínas IRS são centrais para várias funções celulares.

Apesar de os IRS não apresentarem atividade quinase intrínseca e de exigirem ativadores à montante, vários estudos demonstraram que essas proteínas adaptadoras são oncogênicas podendo induzir transformação maligna. D' Ambrosio *et al.* inicialmente mostraram que a hiperexpressão do IRS-1 induziu carcinogênese em fibroblastos derivados de embrião de camundongos [85]. Estudo subseqüente também mostrou que o aumento da expressão do IRS-1 em células NIH3T3 induz transformação neoplásica através da interação com o Grb2 e SHP2, que ativam a via de sinalização da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Não obstante, fibroblastos transfectados com IRS-1 formam colônias em ágar e são altamente tumorigênicos quando inoculados em camundongos NUDE [86, 87].

Ainda que os IRS tenham se mostrado carcinogênicos, sua atuação se mostra necessária a carcinogenicidade de outros numerosos oncogenes. IRS podem diretamente se ligar a oncogenes tais como antígeno: SV40T [88], Tantígeno do JC vírus [89], oncoproteína Ret [78], oncoproteína BCR-ABL [90], TRK-T1 [91] e ETV6-NTRK3 [92]. Estes oncogenes não apenas se associam diretamente aos IRS como são também dependentes da fosforilação em tirosina nos IRS para exercerem sua atividade mitogênica e carcinogênica. A inibição das proteínas IRS ou eliminação de sua fosforilação em tirosina pode impedir a transformação induzida por esses mesmos oncogenes [88, 89, 93, 94].

Ativação constitutiva das proteínas IRS é um fenômeno comum em vários tumores humanos incluindo: lipossarcomas, miossarcomas, carcinoma cortical adrenal, tumor de Wilms, leiomiossarcomas, e rabdomiossarcomas [95]. Os IRS são também importantes mediadores da angiogênese tumoral em células de câncer de pâncreas [96]. IRS-1 apresenta-se constitutivamente ativado no câncer de mama . Embora a maioria dos estudos sobre o potencial carcinogênico dos IRS estar focada no IRS-1, também foram relatados indícios de que o IRS-2 possui tal potencial [74].

Os mecanismos pelos quais os IRS transformam as células são pouco entendidos, não estão totalmente claros que sinais desencadeiam a ativação dos IRS, bem como quais efetores envolvidos. Estudos recentes implicam a interação de micro-RNAs com os IRS [97].

A atuação das proteínas IRS integra e coordena sinais externos, citoplasmáticos e nucleares de múltiplas vias, muitas das quais são importantes não apenas o desenvolvimento normal, mas também durante a tumorigênese.

Assim, a ativação das proteínas IRS pode ser um mecanismo mais geral da mediação da transformação tumoral mediada por oncogenes.

1.5.2. Avia PI3-Kinase/Akt/ mTOR

Uma das principais moléculas ativadas pelas proteínas IRS é a PI 3quinase , esta enzima é importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e transporte de glicose estimulado pela insulina [98-100]. A PI-3 quinase foi originalmente identificada como dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A ligação dos sítios YMXM e YXXM (onde Y = tirosina, M = metionina e X = qualquer aminoácido) fosforilados das proteínas IRS ao domínio SH2 da subunidade p85 da PI 3quinase ativa o domínio catalítico associado [101]. A enzima catalisa fosforilação dos fosfoinositídeos na posição 3 do anel de inositol produzindo fosfatidilinositol 3 monofosfato, fosfatidilinositol 3,4 difosfato e fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato [102].

A via de sinalização iniciada após a ativação da PI 3-quinase também é importante para a prevenção de apoptose. A Akt (ou PKB) destaca-se como uma das principais proteínas alvo da PI 3-quinase para esse efeito [103, 104].

A Akt, homóloga celular do oncogene retroviral v-akt, é uma quinase serina/treonina de 60 kDa composta por três domínios funcionais: um domínio catalítico, um domínio N-terminal PH2 e um domínio hidrofóbico C-terminal. Há três isoformas Akt1 (PKBα), Akt2 (PKBβ) e Akt3 (PKBγ) (GenBank: NM_005163, NM_001626 e NM_005465) com grande similaridade [105]. Akt é ativada fosforilação de dois resíduos críticos: Thr-308 (Akt1), no domínio

catalítico e Ser-473, no domínio hidrofóbico C-terminal. A ativação ocorre por produtos lipídicos da PI 3-quinase em seu domínio PH, o que induz mudança conformacional da molécula, expondo o seguimento de ativação do domínio catalítico. Isto recruta a proteína quinase dependente de 3-fosfoinositídeo (PDK1) para a proximidade do seguimento de ativação permitindo a fosforilação de Thr-308 (Thr-309 para Akt2 e Thr-305 para Akt3) e conseqüentemente ativando a Akt. Esforços para delinear a base molecular dos efeitos antiapoptose da Akt tomaram várias direções [106] (Fig. 5).

Como uma quinase, a tendência natural da Akt é adicionar um grupamento fosfato em substratos, assim, Bad e caspase 9, proteínas que levam a morte celular, foram os primeiros alvos fosforilados pela Akt descritos [107]. Em seguida vieram outros reguladores da morte celular como o IKK α , a família dos fatores de transcrição tipo *forkhead*, o Mdm2 e YAP [107]. Assim bloqueando a Akt seria esperada a indução de morte celular em vários níveis. Entretanto, se algum desses candidatos poderiam ser responsabilizados pela a ação antiapoptose da Akt na sobrevida de células cancerosas ainda não é claro.



Figura 5. A complexidade da via de antiapoptose emergindo da Akt

Mais recentemente, a atenção foi direcionada para um diferente ramo da via PI 3-quinase/Akt, na qual figura o complexo mTOR. O mTOR é regulada pela proteína Rheb, que por sua vez é controlada pelo supressores tumorais TSC [108]. Wendel et al. [109] usando um modelo animal de linfoma de células B para explorar as conseqüências da inibição da Akt estabeleceram a sinalização da Akt através do mTOR e eIF4E como um importante mecanismo de oncogênese e resistência a drogas quimioterápicas convencionais.

Um dos mecanismos regulatórios da via PI3K/Akt/mTOR encontra-se no supressor tumoral PTEN (*phosphatase and tensine homolog deleted on chromosome ten*). A fosfatase inibe a ativação da Akt/PKB de forma específica por bloquear a via de transdução de sinal mediada pela PI3K, antagonizando a atividade da PI3K através da desfosforilação do PIP3 [110]. O PTEN encontrase mutado ou deletado em diversos tumores, incluindo câncer de próstata e de mama (LI et al., 1997). A expressão diminuída do PTEN está associada a tumores de maior gradação (Gleason 7-10) e estádio (T3b e T4), sugerindo que alterações na proteína correlacionam-se com a progressão do tumor [111].

1.5.3. A Via AMPK/mTOR

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) é um heterotrímero consistindo de uma subunidade catalítica (α 1 ou α 2) e duas Subunidades regulatórias (β 1 ou β 2 e γ 1, γ 2, ou γ 3). AMPK é sensível ao *status* energético da célula através de quatro pares de domínios cistationa- β -sintase que estão presentes na subunidades γ e que alostericamente se ligam ao AMP e ao ATP. A ligação do AMP é necessária para a fosforilação por outras quinases. São conhecidas atualmente duas quinases capazes de fosforilar a AMPK: LKB1, que transduz sinais gerados pela mudança no *status* energético celular e a quinase β da proteína quinase dependente de Ca2+/calmodulina (CaMKK β), que é sensível ao cálcio intracelular [112].

A atividade do mTOR parece ser dependente do nível do ATP intracelular. O aumento na relação ADP/ATP ativa AMPK, a qual fosforila e ativa o TSC2, levando à inibição da atividade do mTOR. A ativação do mTOR através da fosforilação do TSC2 pela Akt e a inibição pela AMPK mostram-se como integrantes de um mesmo sistema de controle fino do mTOR [113].

A ativação do complexo mTOR e da p70S6K1 levam a fosforilação do IRS-1 em resíduos inibitórios, terminando por inibir a sinalização da via PI3quinase /Akt/ mTOR. Em adição ao complexo mTOR e a P70S6K1, outras quinases tais como JNK e IKK-β igualmente fosforilam o IRS-1 em sítios inibitórios em situações patológicas, tais como a Inflamação e o Diabetes

Mellitus [113]. A fosforilação da Akt estimulada por insulina ou IGF pode ser resgatada pelo tratamento com rapamicina, evento que ocorre em paralelo à restauração dos níveis do IRS-1.

Também foi descrito que a AMPK fosforila o IRS-1 em Ser794, inibindoo. Privação de glicose, hipóxia e inibição da produção de ATP estimulam a fosforilação do IRS-1 em Ser794 através da subunidade α2 da AMPK, de forma dependente do LKB1, enquanto que estresse oxidativo e a 2-deoxi-glicose (2-DG) estimulam tal fosforilação do IRS-1 através da α1 da AMPK, de forma dependente da CaMKKβ [112] (Fig. 6).



Figura 6. Feed back negativo dependente do IRS-1.

As células desenvolveram mecanismos adaptativos que aumentam as chances de sobrevivência frente à depleção energética. Nesse contexto, na situação de privação energética comum em células tumorais, a inibição na sinalização da via da PI3-quinase provocada pela ativação da AMPK seria contrabalanceada pela inibição do mTOR e P70S6K, também observada no tratamento com rapamicina, mantendo a via ativada em níveis basais que garantiriam sobrevida.

1.5.1 A Rapamicina

O macrolídeo antibiótico Rapamicina é um produto da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, a qual foi isolada do solo da Ilha de Páscoa (conhecida localmente como Rapa Nui). Embora, descrito originalmente como agente antifúngico, durante a década de setenta, tal composto foi aplicado posteriormente como supressor do sistema imune. A Rapamicina (Rapamune ou Sirolimus) foi aprovada pelo *FDA* como imunossupressor em 1999 e pelo Comitê Europeu em 2000. Apesar de apresentar atividade antitumoral contra diversos tipos de tumor, durante o previamente citado programa de *screening* do *National Cancer Institute*, seu desenvolvimento como agente antitumoral foi lento, haja vista as dificuldades na formulação de análogo estável [114, 115]. Recentemente, diferentes análogos da Rapamicina, tais como CCI-779 (Temsirolimus; Wyeth), RAD001 (Everolimus; Novartis) e AP23573 (Ariad Farmacêutica), foram aprovados pelo *FDA* e encontram-se em ensaio clínico com pacientes oncológicos [116].

Todos os análogos supracitados têm o mecanismo de ação único da Rapamicina. Com diferentes solubilidades e propriedades farmacocinéticas, ligam-se à proteína ligante de imunofilina FK502 (FKBP12), de 12 kDa, e esse complexo inibe uma proteína serina/treonina quinase denominada TOR (*Target Of Rapamycin*). Outras denominações para a TOR são: FRAP (*FKBP12rapamycin associated protein*), RAFT (*rapamycin and FKBP12 target*), RAPT (rapamycin target) ou SEP (*sirolimus effector protein*) [117].

TOR foi inicialmente identificada em Saccharomyces cerevisiae e subseqüentemente em células de mamíferos (mTOR) e é descrita atualmente como controlador central do crescimento e proliferação celular, permitindo o progresso da fase G1 para S do ciclo celular [116]. Embora a Rapamicina e seus análogos sejam os mais específicos inibidores de quinase conhecidos, é irônico que a mTOR controle diversos eventos celulares, tais como transcrição, tradução e estabilidade protéica, o que levou à elucidação de importantes vias de sinalização molecular, bem como interações entre diferentes vias.

Assim, a via de sinalização IRS/PI3-quinase/Akt/AMPK/mTOR, que, entre outras funções, apresentou-se como via de ação anabólica, inibitória a apoptose e estimuladora do crescimento celular, mostra-se como relevante candidato para o controle de crescimento e indução de apoptose em células tumorais.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

O objetivo geral foi delinear a via IRS/PI 3-quinase/Akt/mTOR em linhagem de células tumorais prostáticas que não expressam o PTEN, descrever suas respostas a estímulos externos, tais como a quimioterapia convencional e, em seguida, estabelecer o papel do IRS-1 pra o desenvolvimento de células tumorais em cultura e em modelos animais préclínicos de câncer prostático.

Segue o detalhamento do objetivo geral:

- Caracterizar a via de sinalização IRS-1/PI 3-quinase/Akt/mTOR em linhagens de células tumorais prostáticas investigando a possibilidade de ativação constitutiva dessas proteínas.
- Estabelecer o papel do IRS-1 no crescimento e apoptose de células PC-3 (linhagem de câncer prostático que expressa IRS-1, mas não o PTEN) através do bloqueio da via IRS-1/PI3-quinase/Akt/mTOR, com oligonucleotídeos antisense do IRS-1, associado ou não a rapamicina (inibidor da mTOR).
- Estabelecer o papel do IRS-1 no desenvolvimento tumoral através de bloqueio da via IRS-1/PI3-quinase/Akt/mTOR, com oligonucleotídeo antisense do IRS-1 associado ou não a rapamicina no desenvolvimento de tumores em modelo pré-clínico, camundongos SCID com implante de células PC-3.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material:

Os reagentes e os aparelhos para o gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizados são da *Bio-Rad* (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), aprotinina, e o ditiotreitol (DTT) aplicados foram da Sigma *Chemical Co.* (St. Louis, MO, USA). A proteína A marcada com iodo radioativo (¹²⁵I) foi fornecida pela *Amersham* (Aylesbury, UK). A membrana de nitrocelulose (BA85, 0,2µm) da *Schleicher & Schuell.* Os anticorpos anti-IRS-1 (sc-711) e antifosfotirosina (sc-508) empregados são da *Santa Cruz Technology* (Santa Cruz, CA); o anticorpo anti-PI 3-quinase (06-195) proveio da UBI (Lake Placid, NY) e os anticorpos anti-Akt fosfoserina 473 (9271L), anti-Akt (9272), anti-proteína S6 ribosomal (2212), anti-fosfo-proteína S6 ribosomal (2215), anti-poli (ADP-ribose) polimerase (9548), anti-4E-BP1 (9452), eIF4E (9742) da *Cell Signaling technology* (Beverly, MA, USA).

Os oligonucleotídeos fosfotioados específicos para o IRS-1 (sense, 5'-ACC CAC TCC TAT CCC G-3' e antisense, 5'-CGG GAT AGG AGT GGG T-3') foram sintetizados pela Invitrogen Corp. (Carls-bad, CA). A sequência do oligonucleotídeo antisense foi submetida a análise pelo software BLAST (<u>www.ncbi.nlm.nih.gov</u>) e ajustada somente para a seqüência codificante do IRS-1 humano.

3.2. Animais:

Os camundongos utilizados para o estudo são da linhagem SCID. Os animais são alimentados com ração autoclavada padronizada pelo biotério central da Unicamp e receberam água esterilizada *ad libitum*. Todos os estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas.

3.3 Cultura e tratamento das células:

As células de linhagem de adenocarcinoma de próstata (PC-3) são provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC), Filadélfia, PA, USA. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640, contendo 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) e mantidas a 37°C em incubadora úmida de CO₂ (5,0%), de acordo com as recomendações da ATCC.

Para os experimentos, as células foram cultivadas na presença ou não dos agentes inibitórios: ASO IRS-1, rapamicina ou a associação desses.

O ASO IRS-1 foi diluído em água estéril e estocado a -80°C. A Rapamicina será diluída inicialmente em etanol a 100%, estocada a -20°C e em seguida diluída em solução aquosa de 5,2% de Tween e 5,2% de PEG 400 (Etanol 2%) imediatamente antes do uso.

3.4. Imunoprecipitação:

Amostras controles e tratadas contendo 1 x 10⁷ células foram obtidas e ressuspendidas no tampão de lise (1% Triton X-100, 100mM Tris (pH 7.4), 100mM pirofosfato de sódio, 100mM fluoreto de sódio, 10mM EDTA, 10mM ortovanadato de sódio, 2mM fenilmetilsulfonilflorideo (PMSF), e 0,1 mg/ml de Aprotinina) e incubadas por 30 minutos a 4°C. O material insolúvel foi então removido por centrifugação durante 45 minutos a 12.000 rpm em 70.Ti rotor

(Beckman), a 4°C. A determinação protéica foi realizada através do método de Bradford [118] usando o reagente da Bio-Rad e BSA como padrão. O volume das amostras foi normalizado por concentração protéica e as referidas amostras permaneceram sob agitação contínua, a 4°C durante 12 horas. A seguir, foram acrescentados 50µl de proteína A-Sepharose 6MB para precipitação do complexo proteína A-anticorpo, a qual é mantida sob agitação contínua por duas horas. As amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 12.000 rpm a 4°C, o sobrenadante desprezado e o precipitado lavado três vezes com solução tampão específico para lavagem.

3.5. Análise Protéica por Immunoblotting:

Os precipitados obtidos, após ressuspensos em tampão de Laemmli [119] contendo DTT 100mM e aquecidos em água fervente por 5 minutos, foram submetidos a eletroforese gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), o gel teve de ser balizado por marcador de alto peso molecular da *Bio-Rad*. A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da Bio-Rad, com solução tampão para eletroforese previamente diluída. O SDS-PAGE sempre submetido a 30 volts inicialmente até a passagem pela fase de empilhamento (*stacking*) e 100 volts até o final do gel de resolução (*resolving*).

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de um aparelho também da *Bio-Rad* por 90 minutos a 120 volts, como descrito por Towbin [120].

As membranas com as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora (leite desnatado Molico 5%, Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,02%) por duas horas a temperatura ambiente a fim de diminuir a

ligação inespecífica dos anticorpos à membrana de nitrocelulose. Após terem sido lavadas em solução basal, estas membranas foram então incubadas com anticorpos específicos. Mantidas a 4°C *overnight* sob agitação contínua. Após este procedimento as membranas foram, novamente, lavadas com solução basal. A seguir, as membranas foram incubadas com 60µl de proteína A marcada com ¹²⁵I, durante duas horas, à temperatura ambiente e novamente lavadas.

A proteína A marcada com iodo radioativo se liga aos anticorpos e pode ser detectada e visualizada em autoradiografias usando intensificadores, e mantidos a -80°C por 12 a 48 horas. As bandas das autoradiografias foram analisadas através de densitometria óptica. A partir de então foi realizada a análise dos dados, comparando-se a amostra controle com a outra em experimento de maneira que haja controle intra-experimento.

3.6. Análise do Crescimento do enxerto tumoral:

As células (1,0 x 10⁶) ressuspensas em 200µl do meio de cultura sem soro fetal bovino foarm inoculadas *sc* na região dorsal de camundongos do tipo SCID (5-7 semanas). Quando os tumores alcançavam o volume médio de 50-100mm³ os camundongos recebiam tratamento diário com os agentes inibitórios em estudo. Os controles receberam o veículo de administração. Os tumores foram mensurados semanalmente e seus volumes calculados através da fórmula: Volume Tumoral = (Largura)² x Comprimento x 0,52. Os animais eram pesados diariamente.

3.7. Tratamento dos animais:

Após a formação dos tumores os animais foram tratados diariamente com ASO IRS-1 (100 ng/kg *ip*), rapamicina (4mg/kg *ip*) ou associação desses de acordo com a análise da ativação constitutiva das proteínas da via IRS/PI 3guinase/Akt/mTOR, bem como a AMPK, durante 28 dias.

3.8. Histopatologia tumoral:

Os tumores dos animais sacrificados no decorrer deste estudo, foram fixados em formol na concentração de 10% e identificados de acordo com os tratamentos recebidos. Cortes seriados do tecido, na espessura de 5µm, foram realizados em micrótomo e recuperados em lâminas de vidro previamente tratadas com solução aquosa de poli-L-lisina 0,01%, em banho-maria. Os cortes permaneceram na estufa a 60°C para desparafinização e seguiram após com a técnica de imunoistoquímica, cuja finalidade foi avaliar a proliferação celular através de dois distintos anticorpos que indicam atividades proliferativa em diferentes fases do ciclo celular.

Após a incubação com o anticorpo primário foi realizada a técnica de imunoperoxidase com o objetivo de visualizar a proliferação celular, usando-se o kit LSAB+, Peroxidase, código k0690 (Dako Cytomation), seguindo o protocolo do fabricante.

3.9. PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)

Foi usado o DAKO EnVision+ System (3,3'-diaminobenzidina) Kit, seguindo o protocolo do fabricante. O PCNA clone PC10 foi usado na diluição de 1:150 e forneceu coloração acastanhada quando positiva.

3.10. Tunel (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin –d UTP Nick End Labeling)

No presente estudo foi utilizado o *TUNEL Apoptosis Detection Kit (DNA Fragmentation/Fluorescence Staining)* (catálogo 17-141) e a técnica empregada é a indicada no protocolo do fabricante.

3.11. Análise dos dados

Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA e *post hoc* de Bonferroni, com intervalo de confiança de 95%.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão da presente tese são apresentados na forma do artigo: "Antineoplastic effect of rapamycin is potentiated by inhibition of IRS-1 signaling in prostate cancer cells xenografts", publicado no Journal of Cancer Research Clinical Oncology, v. 134, p. 833-839, 2008.

ORIGINAL PAPER

Antineoplastic effect of rapamycin is potentiated by inhibition of IRS-1 signaling in prostate cancer cells xenografts

Josenilson C. Oliveira · Kellen K. Souza · Marília M. Dias · Marcel C. Faria · Eduardo R. Ropelle · Marcelo B. S. Flores · Mirian Ueno · Lício A. Velloso · Sara T. Saad · Mario J. A. Saad · José B. C. Carvalheira

Received: 30 May 2007 / Accepted: 8 January 2008 © Springer-Verlag 2008

Abstract Proper activation of phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway is critical for the prevention of tumorigenesis. Recent data have characterized a negative feedback loop, wherein mammalian target of rapamycin (mTOR) blocks additional activation of the Akt/mTOR pathway through inhibition insulin receptor substrate 1 (IRS-1) function. However, the potential of IRS-1 inhibition during rapamycin treatment has not been examined. Herein, we show that IRS-1 antisense oligonucleotide and rapamycin synergistically antagonize the activation of mTOR in vivo and induced tumor suppression, through inhibition of proliferation and induction of apoptosis, in prostate cancer cell xenografts. These data demonstrate that the addition of agents that blocks IRS-1 potentiate the effect of mTOR inhibition in the growth of prostate cancer cell xenografts.

Keywords Protein kinases · Phosphatidylinositol 3-kinase · Insulin receptor substrate 1 · Rapamycin · Prostate neoplasms

Introduction

Prostate cancer is a major health problem in the world, and the available treatment options have proven to be inadequate

Josenilson C. Oliveira and Kellen K. Souza contributed equally to this paper.

S. T. Saad · M. J. A. Saad · J. B. C. Carvalheira (⊠) Departament of Internal Medicine, FCM-UNICAMP,

Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas,

SP 13081-970, Brazil

e-mail: carvalheirajbc@uol.com.br

in controlling the mortality and morbidity associated with this disease (Jemal et al. 2007; Petrylak et al. 2004; Tannock et al. 2004). Research efforts in the last decade have shown that molecular targeted-therapy is a promising approach that could expand the arsenal against prostate cancer.

The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway is a key regulator of cell growth and proliferation, and increasing evidence suggests that its deregulation is associated with human diseases, including cancer and diabetes (Sabatini 2006; Ueno et al. 2005). The mTOR pathway integrates signals from nutrients, energy status and growth factors to regulate many processes, including autophagy, ribosome biogenesis and metabolism (Dennis et al. 2001; Sabatini 2006). Thus, rapamycin and several analogs, such as CCI-779 and RAD001, are currently undergoing clinical evaluation as anticancer agents (Huang and Houghton 2002; Majumder et al. 2004).

The insulin and IGF-1 receptors are tyrosine kinases, which phosphorylates the insulin receptor substrate (IRS) upon ligand binding. Phosphorylated IRS, in turn, acts as a protein scaffold that activates the phosphatidylinositol (PI) 3-kinase/Akt cascade (Yenush and White 1997). The production of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) by PI 3-kinase recruits the serine/threonine kinases PDK1 and Akt to the plasma membrane, by binding to its N-terminal pleckstrin homology (PH) domain. At the membrane, Akt is phosphorylated by PDK1-mediated phosphorylation (Lawlor and Alessi 2001). Akt phosphorylates many proteins with important physiological roles, including TSC2, inhibiting its GTPase activating protein effect towards the small G-protein Rheb (Inoki et al. 2003). The accumulation of the GTP-bound Rheb leads to the activation of mTOR through an as yet unknown mechanism.

Inactivation of the tumor-suppressor gene, PTEN, occurs in glioblastoma multiforme, endometrial cancer and prostate

J. C. Oliveira \cdot K. K. Souza \cdot M. M. Dias \cdot M. C. Faria \cdot

E. R. Ropelle \cdot M. B. S. Flores \cdot M. Ueno \cdot L. A. Velloso \cdot

cancer, among others (Sansal and Sellers 2004). The suppressor-tumor function of PTEN is linked to its lipid phosphatase activity; loss of this activity leads to accumulation of its substrate, PIP3, and activation of the PI 3-kinase signaling pathway (Maehama and Dixon 1998). One consequence of PTEN loss is hyper-phosphorylation downstream Akt substrates (Cross et al. 1995; del Peso et al. 1997; Kops et al. 1999; Nakamura et al. 2000). Phosphorylation of these proteins can lead to enhanced cell survival, increased cell proliferation and altered cellular metabolism.

Recent studies have shown that many kinases, including rapamycin-sensitive enzymes, promote serine/threonine phosphorylation of IRS-1 that inhibits their function and promotes their degradation (Mothe and Van Obberghen 1996; Rui et al. 2001). Insulin- or IGF-stimulated Akt phosphorylation could be rescued by rapamycin treatment, coincident with restored IRS protein levels. The rapamycin-mediated rescue is blunted by reducing IRS-1 expression with specific siRNAs, and rendered unnecessary by overex-pression of IRS-1. Thus, chronic hyperactivation of mTOR by inactivation of TSC1–TSC2 stimulates components of the protein synthesis pathway, while inhibiting the IRS branch of the insulin/IGF-1 signaling cascade (Harrington et al. 2004; Shah et al. 2004; Ueno et al. 2005).

To clarify the role of mTOR *feedback* in prostate cancer, we studied the potential of the IRS-1 antisense oligodeoxinucleotide (ASO) as an inhibitor of proliferation during rapamycin treatment, using the PC-3 cell line, which is reported to be PTEN-negative.

Materials and methods

Antibodies, chemicals and buffers

The reagents and apparatus for sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting were obtained from Bio-Rad (Richmond, CA). Tris-[hydroxymethyl]amino-methane (Tris), phenvlmethylsulfonylfluoride (PMSF), dithiothreitol (DTT), Triton X-100, Tween 20 and glycerol were obtained from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was obtained from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Aprotinin was obtained from Bayer (São Paulo, SP, Brazil). Ketamin was obtained from Parke-Davis (São Paulo, SP, Brazil); diazepam and sodium thiopental were obtained from Cristália (Itapira, SP, Brazil). Protein A-Sepharose 6 MB, nitrocellulose membrane (Hybond ECL, 0.45 µm) and ¹²⁵I-Protein A were obtained from Amersham (Buckinghamshire, UK). Anti-IRS-1 and anti-IRS-1 phosphoserine 307-specific antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Antiphospho-Akt (Ser473) and anti-phospho-p70 S6K (Thr421/ Ser424) antibodies were obtained from New England Biolabs (Beverly, MA, USA). Rapamycin was obtained from LC Laboratories (Woburn, MA, USA).

Phosphorothioate-modified oligonucleotides

Sense and antisense phosphorothioate oligonucleotides specific for IRS-1 (sense (SO), 5'-ACC CAC TCC TAT CCC G-3' and antisense (ASO), 5'-CGG GAT AGG AGT GGG T-3') were produced by Invitrogen (Carlsbad, CA). The antisense oligonucleotide sequences were submitted to BLAST analyses (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) and matched only for the human IRS-1 coding sequence.

Cell culture

The human prostate cancer cell line PC-3 was obtained from ATCC, Philadelphia, PA, USA. Cells were cultured in RPMI containing 10% fetal bovine serum and glutamine without addition of antibiotics or fungicides; they were maintained at 37°C, 5% CO₂.

Human tumor xenograft models

SCID mice were provided by the State University of Campinas-Central Breeding Center (Campinas, SP, Brazil). SCID mice, 5-6 weeks old and weighing approximately 20–25 g, were implanted with 1.0×10^6 PC-3 cells into the dorsal subcutis of male mice. Mice were weighed twice weekly, and tumor measurements were taken by calipers daily starting on day 0. These tumor measurements were converted to tumor volume (V) using the formula $(V = W^2 \times L \times 0.52)$, where W and L are the smaller and larger diameters, respectively, and plotted against time. When the tumors were between 50 and 100 mm³, the animals were pair-matched into treatment and control groups. Each group contained eight mice, each of which was ear tagged and followed individually throughout the experiment. Initial doses were given on the day of pair matching (day 0). Rapamycin and IRS-1 ASO were administered via i.p. injection daily at the doses indicated. On termination, the mice were weighed and killed, and their tumors were excised. Treatment-related toxicity was evaluated by means of serial weight measurements. All experiments were approved by the Ethics Committee of the State University of Campinas.

Tumor extracts

Mice were anesthetized with sodium amobarbital (15 mg/kg body weight, i.p.), and were used 10–15 min later, i.e. as soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes. Tumors were removed, minced coarsely and

homogenized immediately in extraction buffer (1% Triton-X 100, 100 mM Tris, pH 7.4, containing 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF and 0.1 mg of aprotinin/ml) at 4°C with a Polytron PTA 20S generator (Brinkmann Instruments model PT 10/35) operated at maximum speed for 30 s. The extracts were centrifuged at 15,000 rpm and 4°C in a Beckman 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA) for 45 min to remove insoluble material, and the supernatants of these tissues were used.

Protein analysis by immunoblotting

The whole tissue extract was treated with Laemmli sample buffer (Laemmli 1970) containing 100 mM DTT and heated in a boiling water bath for 4 min after which they were subjected to SDS-PAGE (6% bis-acrylamide) in a Bio-Rad miniature slab gel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA, USA). For total extracts, similar sized aliquots (200 µg protein) were subjected to SDS-PAGE.

Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 90 min at 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean), as described by Towbin et al. (1979), except for the addition of 0.02% SDS to the transfer buffer to enhance the elution of high molecular mass proteins. Nonspecific protein binding to the nitrocellulose was reduced by preincubating the filter overnight at 4°C in blocking buffer (5% nonfat dry milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blot was incubated with the indicated antibodies, diluted in blocking buffer (0.3% BSA instead of nonfat dry milk) overnight at 4°C and then washed for 60 min with blocking buffer without milk. The blots were subsequently incubated with 2 µCi of ¹²⁵I-protein A (30 µCi/µg) in 10 ml of blocking buffer for 2 h at room temperature and then washed again for 30 min as described above. ¹²⁵I-Protein A bound to the antiphosphotyrosine and antipeptide antibodies was detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film with Cronex Lightning Plus intensifying screens at -80° C for 12–48 h. Band intensities were quantified by optical densitometry of developed autoradiographs (Scion Image software, Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

Immunohistochemistry

To detect proliferating cell nuclear antigen (PCNA), microwave post fixation was carried out using a domestic oven (Panasonic Junior, Sao Jose dos Campos, SP, Brazil) at 700 W, which was delivered to slides immersed in 0.01 mol/l citrate buffer, pH 6.0, in twice doses during 7 min separated by a break of 2 min, which allowed for buffer replenishment. The slides were allowed to cool to room temperature before being removed from the oven. Sections were then incubated at room temperature for 1 h with primary antibody PC10 (Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, USA) diluted 1:150. Biotinylated horse mouse antihuman (Dako) antibodies for PC10 were applied for 1 h at room temperature. The slides were then incubated with avidin–biotin complex (ABC) reagent (Vector) for 30 min followed by the addition of diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma) as a substrate-chromogen solution. After hematoxylin counterstaining and dehydration, the slides were mounted in Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). The experiments were done, at least, in triplicate for each mouse.

A TUNEL apoptosis detection kit (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Place, NY, USA) was used for DNA fragmentation fluorescence staining according to the manufacturer's protocol. Following the extraction, the tissue extracts were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M NaH₂PO₄, pH 7.4, and incubated with a reaction mix containing biotin-dUTP and terminal deoxynucleotidyl transferase for 60 min. Fluorescein-conjugated avidin was applied to the sample, which was then incubated in the dark for 30 min. Positively stained fluorescein-labeled cells were visualized and photographed by fluorescence microscopy.

Statistical analysis

All groups were studied in parallel. Comparisons between different groups were performed by employing ANOVA, as appropriate. The level of significance adopted was P < 0.05.

Results

Effects of treatment with rapamycin and/or IRS-1 ASO, on Akt/mTOR signaling pathway in PC-3 xenografts

To evaluate IRS-1 ASO activity, we performed experiments using samples from PC-3 xenografts, immunoblotted with anti IRS-1 (Fig. 1a). There was an evident decrease in IRS-1 protein levels within 48 h after ASO treatment, which was maximal at 72 h after IRS-1 ASO treatment, representing a reduction in the IRS-1 protein level of \sim 75% (Fig. 1a, upper panel). The ASO-mediated IRS-1 inhibition in PC-3 xenografts was dose dependent (Fig. 1b). The inhibition of IRS-1 protein levels was detected after the injection of 0.4 nmol/kg, while inhibition was observed with 0.8 nmol/kg of IRS-1 ASO, representing a reduction in the IRS-1 protein level of \sim 70% (Fig. 1b, upper panel). There was no change in IRS-1 protein levels after IRS-1 sense oligonucleotide (SO) treatment (Fig. 1a, b, middle panel).

Immunoblotting experiments were conducted to determine the effects of rapamycin, IRS-1 ASO, and the combination of both on IRS-1 serine phosphorylation in PC-3



Fig. 1 Phosphorylation status of IRS-1, Akt and p70S6k proteins after treatment with rapamycin and IRS-1 antisense oligonucleotide (IRS-1 ASO) alone, and with the combination of rapamycin and IRS-1 ASO. (**a**, *upper panel*) The time course was performed with SCID mice treated i.p. with 0.4 nmol/kg of IRS-1 ASO, as indicated. At the time-points indicated, after the treatment, they were anesthetized and a fragment from xenograft was removed. Similar treatments were carried out with the IRS-1 SO (**a**, *middle panel*). Loading control with anti- α -tubulin antibodies (**a**, *lower panel*). **b** In a dose response experiment, SCID mice were treated i.p. with varying doses of IRS-1 ASO or with vehi-

xenografts (Fig. 1c). Thus, with isolated rapamycin, there was a significant decrease in IRS-1 serine phosphorylation when compared to the control group. The isolated IRS-1 ASO inhibited partially the IRS-1 serine phosphorylation, while the simultaneous treatment with rapamycin and the IRS-1 ASO showed inhibition of IRS-1 serine phosphorylation similar to the treatment with rapamycin alone. There was an increase in IRS-1 protein levels with rapamycin treatment. On the other hand, the isolated administration of IRS-1 ASO strongly decreased IRS-1 protein levels. We observed that IRS-1 ASO blocked the effect of rapamycin on IRS-1 protein expression (Fig. 1d). Isolated rapamycin induced increases in the serine phosphorylation of Akt, compared to the control group. The IRS-1 ASO induced decreases in the phosphorylation of Akt protein; in addition, we observed that IRS-1 ASO blocked the effect of rapamycin on Akt phosphorylation (Fig. 1e). There were no changes in Akt protein levels. Conversely, the isolated

cle, as indicated. After 72 h, they were anesthetized, and fragments from xenograft and liver were removed. Similar treatments were carried out with the IRS-1 SO (**b**, *middle panel*). Loading control with anti- α -tubulin antibodies (**b**, *lower panel*). **c**-**f** Representative Western blots of five independent experiments showing PC-3 lysates. The lysates were immunoblotted (IB) with anti-IRS-1 phospho-serine⁽³⁰⁷⁾ (**c**), anti-IRS-1 antibodies (**d**), anti-phospho-Akt (pAkt) (**e**, *upper panel*), anti-Akt (**e**, *lower panel*), anti-phospho-p70S6k (p-p70S6k) (**f**, *upper panel*) and anti-p70S6k antibodies (**f**, *lower panel*). *Bars* represent means \pm SEM. [#]*P* < 0.05 versus rapamycin and **P* < 0.05 versus control

treatment with rapamycin induced a great decrease in p70S6k phosphorylation; ASO treatment decreased p70S6k phosphorylation to a small extent compared to rapamycin. The association of both treatments acted synergistically in the reduction of p70S6k phosphorylation, which was significantly lower than each compound alone. There were no changes in p70S6k protein levels.

Effects of treatment with rapamycin and/or IRS-1 ASO on growth of PC-3 xenografts

As shown in Fig. 2, exposure of PC-3 xenografts to isolated IRS-1 ASO resulted in a weak decrease in tumor growth during the experimental period. Rapamycin-treated group showed an important decrease in growth, with a very low velocity of growth. Meanwhile, the combination of rapamycin and IRS-1 ASO enhanced the inhibitory effect on tumor growth, resulting in no important change in tumor



Fig. 2 Growth curves for xenografts derived from PC-3 cells. Rapamycin (4 mg/kg i.p.), IRS-1 ASO (0.4 nmol) or the combination of rapamycin and IRS-1 ASO (4 mg/kg and 0.4 nmol, respectively) were injected daily in mice bearing PC-3 xenografts. Control mice received a similar schedule of the vehicle solution. Points and means for at least eight tumors

volume in the frame shift period of study. No substantial weight loss was observed in any of the groups throughout the 30 days of analysis.

Effects of treatment with rapamycin and/or IRS-1 ASO on proliferation and apoptosis of PC-3 xenografts

We performed immunohistochemistry to detect PCNA, a proliferation index (Fig. 3a). The observed percent of PCNA-positive cells was $45.9 \pm 5.2\%$ in the control group. IRS-1 ASO and rapamycin administration significantly reduced the percent of positive cells to $36.6 \pm 6.8\%$ and $24.5 \pm 4.7\%$, respectively (P < 0.05, for both). The group treated with the combination of rapamycin and IRS-1 ASO

was found to be $4.3 \pm 3.2\%$ in positive cells. Compared to the control group, the combination of rapamycin- and IRS-1 ASO-treated group showed $\pm 90\%$ of reduction in positive cells (*P* < 0.001). IRS-1 ASO plus rapamycin enhanced the effectiveness of rapamycin by 570%.

To analyze the mechanism responsible for the growth inhibition of PC-3 cells by rapamycin and IRS-1 ASO, the effects of rapamycin and/or IRS-1 ASO on programmed cell death was examined. Thus, DNA fragmentation was measured by TUNEL assay in PC-3 xenografts (Fig. 3b). In relation to the control group, the IRS-1 ASO- and rapamycin-treated groups showed about 4- and 23-fold greater positive cells, respectively (P < 0.05, for both). The combination of rapamycin and IRS-1 ASO promoted a 37-fold increase in apoptotic cell number, when compared to the control group (P < 0.001), and an up to 2-fold increase compared with that of rapamycin (P < 0.05).

Discussion

PTEN alterations have been robustly implicated in human prostate cancer, with PTEN deletions and/or mutations of at least one allele observed in up to 60% of primary prostate cancers, while homozygous PTEN inactivation is more frequently associated with metastatic prostate tissues (Cairns et al. 1997; Gray et al. 1995; Suzuki et al. 1998). In the present study, we show that IRS-1 ASO and rapamycin cooperatively antagonize the activation of mTOR in vivo and act synergistically in tumor suppression in PC-3 prostate cancer xenografts, which do not express PTEN. Our results show that IRS-1 ASO alone reduces the activation of PI 3-kinase pathway, while rapamycin alone reduces the activation of mTOR. Combined treatment with rapamycin

Fig. 3 Effects of vehicle, rapamycin (4 mg/kg i.p.), IRS-1 ASO (0.4 nmol/kg) or the combination of rapamycin and IRS-1 ASO (4 mg/kg and 0.4 nmol, respectively) on cell proliferation (**a**) and on apoptosis (**b**) in PC-3 xenografts. *Bars* represent means \pm SEM calculated from PCNA and TUNEL positive cells counted in four fields. #*P* < 0.05 versus rapamycin and **P* < 0.05 versus control



and IRS-1 ASO leads to a quantitative inhibition of molecular signaling through the PI 3-kinase pathway. In accordance with these data, the proliferation of PC-3 xenografts after treatment with IRS-1 ASO combined with rapamycin was more pronounced than treatment with each alone.

Tyrosine-phosphorylated IRS-1 proteins are known to bind efficiently a number of SH2 domain-containing proteins involved in activation of downstream signaling pathways, including PI 3-K p85, GRB2, SHP-2, Nck and Crk (for review, see Saltiel and Kahn 2001). There is increasing interest in the potential role of IRS-1 in oncogenesis. Overexpression of IRS-1 in NIH3T3 fibroblasts leads to increased activation of the Ras-MAPK cascade and cell transformation (Ito et al. 1996; Tanaka et al. 1996). IRS-1 overexpression also contributes to the progression of hepatocellular carcinoma, possibly by inhibiting transforming growth factor β 1-mediated apoptosis (Tanaka and Wands 1996). Although the LNCaP prostate cancer cell line does not express IRS-1 or IRS-2, introduction of either protein in combination with IGF-IR converts these cells to a more aggressive phenotype (Reiss et al. 2000). A recent study examining endogenous IRS-1 shows that it is constitutively tyrosine-phosphorylated in a wide range of human tumor samples, suggesting that IRS-1 activation may be a common phenomenon in tumors (Chang et al. 2002). Moreover, a relationship between IRS-1 activation and fusion oncoproteins has already been established. TRK-T1 (Miranda et al. 2001) and BCR-ABL (Traina et al. 2003) have both been shown to bind IRS-1 and to be associated with increased IRS-1 tyrosine phosphorylation. Therefore, IRS-1 activation may be a more general mechanism for transformation. We found that inhibition of IRS-1 by IRS-1 ASO can lead to a decrease in the growth of PC-3 xenografts. Our data demonstrate that lowering IRS-1 content leads to a decrease in the number of docking sites for maximal activation of PI 3-kinase-Akt-mTOR cascade, as shown by a reduction of Akt and p70S6k phosphorylation, respectively,

further suggesting that IRS-1 is important for PC-3 xenografts growth.

The primary pathway by which most growth factors and cytokines activate mTOR and its downstream targets appears to be the PI 3-kinase/Akt pathway (for review, see Fingar and Blenis 2004). Recent reports have shown that, in absence of TSC2 or in hiperinsulinemic situations, IRS-1 increases its serine phosphorylation in parallel with a reduction in its protein levels. Importantly, all the studies found that long term treatment with rapamycin completely restores IRS-1 protein levels and the insulin/IGF-1 responsiveness of PI 3-kinase Akt pathway (Harrington et al. 2004; Shah et al. 2004; Ueno et al. 2005). In agreement with these studies, our results show an increase in IRS-1 serine phosphorylation as well as a reduction in protein levels in PC-3 xenografts; moreover, the treatment with rapamycin restored IRS-1 levels and activity in the PC-3 xenografts as demonstrated. Furthermore, PC-3 xenografts treated with both IRS-1 ASO and rapamycin exhibit a strong attenuation of the PI 3-kinase pathway. Altogether, these data suggest that loss of PTEN expression in PC-3 xenografts triggers a feedback inhibition of Akt signaling, which is reversed by rapamycin and IRS-1 ASO can overcome.

In addition to the down-regulation of the PI 3-kinase/Akt pathway, continuous treatment with IRS-1 ASO for 4 weeks resulted in significant tumor growth delay, and the treatment with IRS-1 ASO plus rapamycin strongly inhibited cell proliferation and induced apoptosis. The suppression of the PI 3-kinase/Akt pathway in these tumors might potentially result in the reduction of protein synthesis, cell growth and proliferation downstream of mTOR through inactivation of p70S6k and activation of 4E-BP1 (Fingar and Blenis 2004; Fingar et al. 2002; Jefferies et al. 1997).

Based on these results, we propose a model for the synergism between IRS-1 ASO and rapamycin in suppressing growth in PC-3 cells lacking PTEN (Fig. 4a). According to



Fig. 4 Model for IRS-1 ASO and rapamycin synergism in PC-3 xenografts. **a** mTOR feedback in PC-3 xenografts. The activated mTOR inhibits IRS-1 signaling towards PI 3-kinase. **b** Rapamycin treatment. Rapamycin inhibits mTOR and activates IRS-1 signaling towards PI 3-

kinase. c Treatment with combination of IRS-1 ASO and rapamycin. The simultaneous treatment with IRS-1 ASO and rapamycin delivers an additional signal, which leads to enhanced apoptosis and diminished proliferation

this model, rapamycin alone induces mTOR inhibition, which is rapidly followed by IRS-1 activation (Fig. 4b). IRS-1 ASO, in turn, inhibits the expression of IRS-1 and has the same role as mTOR feed back. Thus, the combination of IRS-1 ASO with rapamycin provides an additive signal inhibition, which leads to enhanced apoptosis and diminished proliferation (Fig. 4c).

In conclusion, our data demonstrate that the addition of agents that block IRS-1 potentiate the effect of mTOR inhibition in the growth of PC-3 xenografts.

Acknowledgments These studies were supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq). We thank Dr. Nicola Conran for English language editing.

References

- Cairns P, Okami K, Halachmi S et al (1997) Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. Cancer Res 57:4997– 5000
- Chang Q, Li Y, White MF, Fletcher JA, Xiao S (2002) Constitutive activation of insulin receptor substrate 1 is a frequent event in human tumors: therapeutic implications. Cancer Res 62:6035–6038
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature 378:785–789
- del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. Science 278:687–689
- Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC, Thomas G (2001) Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. Science 294:1102–1105
- Fingar DC, Blenis J (2004) Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. Oncogene 23:3151–3171
- Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J (2002) Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. Genes Dev 16:1472–1487
- Gray IC, Phillips SM, Lee SJ, Neoptolemos JP, Weissenbach J, Spurr NK (1995) Loss of the chromosomal region 10q23–25 in prostate cancer. Cancer Res 55:4800–4803
- Harrington LS, Findlay GM, Gray A et al (2004) The TSC1–2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. J Cell Biol 166:213–223
- Huang S, Houghton PJ (2002) Inhibitors of mammalian target of rapamycin as novel antitumor agents: from bench to clinic. Curr Opin Investig Drugs 3:295–304
- Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL (2003) Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. Genes Dev 17:1829–1834
- Ito T, Sasaki Y, Wands JR (1996) Overexpression of human insulin receptor substrate 1 induces cellular transformation with activation of mitogen-activated protein kinases. Mol Cell Biol 16:943–951
- Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G (1997) Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. EMBO J 16:3693–3704
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ (2007) Cancer statistics, 2007. CA Cancer J Clin 57:43–66
- Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM (1999) Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. Nature 398:630–634

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685
- Lawlor MA, Alessi DR (2001) PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? J Cell Sci 114:2903–2910
- Maehama T, Dixon JE (1998) The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. J Biol Chem 273:13375–13378
- Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R et al (2004) mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. Nat Med 10:594–601
- Miranda C, Greco A, Miele C, Pierotti MA, Van Obberghen E (2001) IRS-1 and IRS-2 are recruited by TrkA receptor and oncogenic TRK-T1. J Cell Physiol 186:35–46
- Mothe I, Van Obberghen E (1996) Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. J Biol Chem 271:11222–11227
- Nakamura N, Ramaswamy S, Vazquez F, Signoretti S, Loda M, Sellers WR (2000) Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. Mol Cell Biol 20:8969–8982
- Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH et al (2004) Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. N Engl J Med 351:1513–1520
- Reiss K, Wang JY, Romano G et al (2000) IGF-I receptor signaling in a prostatic cancer cell line with a PTEN mutation. Oncogene 19:2687–2694
- Rui L, Fisher TL, Thomas J, White MF (2001) Regulation of insulin/ insulin-like growth factor-1 signaling by proteasome-mediated degradation of insulin receptor substrate-2. J Biol Chem 276:40362–40367
- Sabatini DM (2006) mTOR and cancer: insights into a complex relationship. Nat Rev Cancer 6:729–734
- Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature 414:799–806
- Sansal I, Sellers WR (2004) The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. J Clin Oncol 22:2954–2963
- Shah OJ, Wang Z, Hunter T (2004) Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. Curr Biol 14:1650–1656
- Suzuki H, Freije D, Nusskern DR et al (1998) Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic prostate cancer tissues. Cancer Res 58:204–209
- Tanaka S, Ito T, Wands JR (1996) Neoplastic transformation induced by insulin receptor substrate-1 overexpression requires an interaction with both Grb2 and Syp signaling molecules. J Biol Chem 271:14610–14616
- Tanaka S, Wands JR (1996) Insulin receptor substrate 1 overexpression in human hepatocellular carcinoma cells prevents transforming growth factor beta1-induced apoptosis. Cancer Res 56:3391–3394
- Tannock IF, de Wit R, Berry WR et al (2004) Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. N Engl J Med 351:1502–1512
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76:4350– 4354
- Traina F, Carvalheira JB, Saad MJ, Costa FF, Saad ST (2003) BCR-ABL binds to IRS-1 and IRS-1 phosphorylation is inhibited by imatinib in K562 cells. FEBS Lett 535:17–22
- Ueno M, Carvalheira JB, Tambascia RC et al (2005) Regulation of insulin signalling by hyperinsulinaemia: role of IRS-1/2 serine phosphorylation and the mTOR/p70 S6K pathway. Diabetologia 48:506–518
- Yenush L, White MF (1997) The IRS-signalling system during insulin and cytokine action. Bioessays 19:491–500

V. CONCLUSÕES
V. CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho são:

- A via PI 3-quinase/Akt/mTOR encontra-se constitutivamente ativada no Câncer de Próstata;
- Tal via apresenta resposta exacerbada ao estímulo insulínico in vivo;
- A inibição do IRS-1 é sinérgica à inibição da mTOR, no bloqueio da via PI 3-quinase/Akt/mTOR;
- A inibição da via IRS-1/PI 3-quinase/Akt/mTOR é capaz de inibir o crescimento tumoral prostático;
- O bloqueio combinado é mais eficaz na inibição do crescimento tumoral;
- A inibição da via correlaciona-se com a taxa de mitose tumoral bem como com a taxa de apoptose tumoral.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Goff, J.L., *As Doenças têm História*. 1997, Lisboa, Portugal: Terramar.
- 2. Chabner, B.A. and T.G. Roberts, Jr., *Timeline: Chemotherapy and the war on cancer*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(1): p. 65-72.
- 3. National Cancer Institute, ed. *Closing in on Cancer: Solving a 5000-Year-Old Mystery*. 1998.
- 4. Hajdu, S.I., *Greco-Roman thought about cancer*. Cancer, 2004. **100**(10): p. 2048-51.
- 5. Hajdu, S.I., 2000 years of chemotherapy of tumors. Cancer, 2005. **103**(6): p. 1097-102.
- 6. Nicoli Aldini, N., M. Fini, and R. Giardino, *From Hippocrates to Tissue Engineering: Surgical Strategies in Wound Treatment.* World J Surg, 2008.
- 7. Karpozilos, A. and N. Pavlidis, *The treatment of cancer in Greek antiquity*. Eur J Cancer, 2004. **40**(14): p. 2033-40.
- 8. Bernier, J., E.J. Hall, and A. Giaccia, *Radiation oncology: a century of achievements*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(9): p. 737-47.
- 9. Strebhardt, K.U., A., *Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**: p. 473-480.
- 10. Denmeade, S.R. and J.T. Isaacs, *A history of prostate cancer treatment*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(5): p. 389-96.
- 11. Watson, J.D. and F.H. Crick, *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid.* Nature, 1953. **171**(4356): p. 737-8.
- Frei, E., 3rd, *The National Cancer Chemotherapy Program*. Science, 1982.
 217(4560): p. 600-6.
- 13. von Eschenbach, A.C., *A vision for the National Cancer Program in the United States*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(10): p. 820-8.
- 14. Whitesell, L., et al., *Benzoquinonoid ansamycins possess selective tumoricidal activity unrelated to src kinase inhibition.* Cancer Res, 1992. **52**(7): p. 1721-8.
- 15. Kohn, E.C., M.A. Sandeen, and L.A. Liotta, *In vivo efficacy of a novel inhibitor of selected signal transduction pathways including calcium, arachidonate, and inositol phosphates.* Cancer Res, 1992. **52**(11): p. 3208-12.
- 16. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
- 17. Hu, M., et al., *Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition*. Cancer Cell, 2008. **13**(5): p. 394-406.
- McCarty, M.F., *Targeting multiple signaling pathways as a strategy for* managing prostate cancer: multifocal signal modulation therapy. Integr Cancer Ther, 2004. 3(4): p. 349-80.
- Gough, N.R. and L.B. Ray, *Mapping cellular signaling*. Sci STKE, 2002.
 2002(135): p. EG8.
- Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001.
 291(5507): p. 1304-51.
- 21. Venter, J.C., *Genomic impact on pharmaceutical development*. Novartis Found Symp, 2000. **229**: p. 14-5; discussion 15-8.
- 22. To, M.D., et al., *Crosstalk between Pten and Ras signaling pathways in tumor development*. Cell Cycle, 2005. **4**(9): p. 1185-8.
- Arkin, A.P., Synthetic cell biology. Curr Opin Biotechnol, 2001. 12(6): p. 638-44.

- 24. Levchenko, A., *Computational cell biology in the post-genomic era*. Mol Biol Rep, 2001. **28**(2): p. 83-9.
- 25. Kitano, H., *Cancer as a robust system: implications for anticancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(3): p. 227-35.
- 26. Cui, X. and A.V. Lee, *Regulatory nodes that integrate and coordinate signaling as potential targets for breast cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(1 Pt 2): p. 396S-401S.
- 27. Zwick, E., J. Bange, and A. Ullrich, *Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies*. Endocr Relat Cancer, 2001. **8**(3): p. 161-73.
- 28. Omuro, A.M., S. Faivre, and E. Raymond, *Lessons learned in the development* of targeted therapy for malignant gliomas. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(7): p. 1909-19.
- 29. Wiedmann, M.W. and K. Caca, *Molecularly targeted therapy for gastrointestinal cancer*. Curr Cancer Drug Targets, 2005. **5**(3): p. 171-93.
- 30. Borja-Cacho, D., et al., *Molecular targeted therapies for pancreatic cancer*. Am J Surg, 2008. **196**(3): p. 430-41.
- Carracedo, A., et al., *Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer*. J Clin Invest, 2008. 118(9): p. 3065-74.
- 32. Mellinghoff, I.K. and C.L. Sawyers, *The emergence of resistance to targeted cancer therapeutics*. Pharmacogenomics, 2002. **3**(5): p. 603-23.
- 33. Kim, R., *Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy*. Cancer, 2005. **103**(8): p. 1551-60.
- 34. Druker, B.J., et al., *Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1031-7.
- 35. Kris, M.G., et al., *Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial.* JAMA, 2003. **290**(16): p. 2149-58.
- Cunningham, D., et al., *Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2004. 351(4): p. 337-45.
- 37. Eble, J., et al., *Tumours of the testis and paratesticular tissue. Pathology & Genetics of Tumours of The Urinary System and Male Genital Organs. World Heatlh Organization Classification of Tumours.* . IACR Press, Lyon, France, 2004: p. 162-215.
- 38. INCA, *Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil.* 2007, Rio de Janeiro.
- Breslow, N., et al., Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. The International Agency for Research on Cancer, Lyons, France. Int J Cancer, 1977. 20(5): p. 680-8.
- 40. Grulich, A.E., et al., *Cancer mortality in African and Caribbean migrants to England and Wales.* Br J Cancer, 1992. **66**(5): p. 905-11.
- 41. Ruijter, E., et al., *Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma*. Endocr Rev, 1999. **20**(1): p. 22-45.
- 42. Smith, J.R., et al., *Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome I suggested by a genome-wide search*. Science, 1996. **274**(5291): p. 1371-4.
- 43. Berthon, P., et al., *Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43.* Am J Hum Genet, 1998. **62**(6): p. 1416-24.

- Eeles, R.A., et al., *Linkage analysis of chromosome 1q markers in 136 prostate cancer families. The Cancer Research Campaign/British Prostate Group U.K. Familial Prostate Cancer Study Collaborators.* Am J Hum Genet, 1998. 62(3): p. 653-8.
- 45. Russell, P.J., S. Bennett, and P. Stricker, *Growth factor involvement in progression of prostate cancer*. Clin Chem, 1998. **44**(4): p. 705-23.
- 46. Chan, J.M., et al., *Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study.* Science, 1998. **279**(5350): p. 563-6.
- 47. Price, D.K., M.E. Franks, and W.D. Figg, *Genetic variations in the vitamin D* receptor, androgen receptor and enzymes that regulate androgen metabolism. J Urol, 2004. **171**(2 Pt 2): p. S45-9; discussion S49.
- 48. Stattin, P., et al., *Plasma insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-binding proteins, and prostate cancer risk: a prospective study.* J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(23): p. 1910-7.
- 49. Wolk, A., et al., *Insulin-like growth factor 1 and prostate cancer risk: a population-based, case-control study.* J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(12): p. 911-5.
- 50. Gelmann, E.P., *Molecular biology of the androgen receptor*. J Clin Oncol, 2002. **20**(13): p. 3001-15.
- 51. Hanash, K.A., et al., *Prostatic carcinoma: a nutritional disease? Conflicting data from the Kingdom of Saudi Arabia.* J Urol, 2000. **164**(5): p. 1570-2.
- Helzlsouer, K.J., et al., Association between alpha-tocopherol, gammatocopherol, selenium, and subsequent prostate cancer. J Natl Cancer Inst, 2000.
 92(24): p. 2018-23.
- 53. Tymchuk, C.N., et al., *Role of testosterone, estradiol, and insulin in diet- and exercise-induced reductions in serum-stimulated prostate cancer cell growth in vitro*. Nutr Cancer, 2002. **42**(1): p. 112-6.
- 54. Heber, D. and Q.Y. Lu, *Overview of mechanisms of action of lycopene*. Exp Biol Med (Maywood), 2002. **227**(10): p. 920-3.
- 55. Loblaw, D.A., et al., *American Society of Clinical Oncology recommendations* for the initial hormonal management of androgen-sensitive metastatic, recurrent, or progressive prostate cancer. J Clin Oncol, 2004. **22**(14): p. 2927-41.
- 56. Klotz, L., *Expectant management with selective delayed intervention for favorable risk prostate cancer*. Urol Oncol, 2002. **7**(5): p. 175-9.
- 57. Taplin, M.E. and S.M. Ho, *Clinical review 134: The endocrinology of prostate cancer*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(8): p. 3467-77.
- 58. Griffin, J.E., *Androgen resistance--the clinical and molecular spectrum*. N Engl J Med, 1992. **326**(9): p. 611-8.
- 59. Kyprianou, N. and J.T. Isaacs, *Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration*. Endocrinology, 1988. **122**(2): p. 552-62.
- 60. Wu, C.P. and F.L. Gu, *The prostate in eunuchs*. Prog Clin Biol Res, 1991. **370**: p. 249-55.
- 61. Stanbrough, M., et al., *Prostatic intraepithelial neoplasia in mice expressing an androgen receptor transgene in prostate epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10823-8.
- 62. Ahluwalia, B., et al., *Blood hormone profiles in prostate cancer patients in highrisk and low-risk populations.* Cancer, 1981. **48**(10): p. 2267-73.
- 63. Drafta, D., et al., *Plasma steroids in benign prostatic hypertrophy and carcinoma of the prostate.* J Steroid Biochem, 1982. **17**(6): p. 689-93.

- 64. Ghanadian, R., C.M. Puah, and E.P. O'Donoghue, *Serum testosterone and dihydrotestosterone in carcinoma of the prostate*. Br J Cancer, 1979. **39**(6): p. 696-9.
- 65. Nomura, A., et al., *Prediagnostic serum hormones and the risk of prostate cancer*. Cancer Res, 1988. **48**(12): p. 3515-7.
- 66. Osegbe, D.N. and J.O. Ogunlewe, *Androgen concentration in blacks with benign and malignant prostatic disease*. J Urol, 1988. **140**(1): p. 160-4.
- 67. Zumoff, B., et al., *Abnormal levels of plasma hormones in men with prostate cancer: evidence toward a "two-disease" theory.* Prostate, 1982. **3**(6): p. 579-88.
- 68. Litvinov, I.V., A.M. De Marzo, and J.T. Isaacs, *Is the Achilles' heel for prostate cancer therapy a gain of function in androgen receptor signaling*? J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(7): p. 2972-82.
- 69. Gao, J., J.T. Arnold, and J.T. Isaacs, *Conversion from a paracrine to an autocrine mechanism of androgen-stimulated growth during malignant transformation of prostatic epithelial cells.* Cancer Res, 2001. **61**(13): p. 5038-44.
- 70. Isaacs, J.T. and W.B. Isaacs, *Androgen receptor outwits prostate cancer drugs*. Nat Med, 2004. **10**(1): p. 26-7.
- 71. Jemal, A., et al., *Cancer statistics*, 2006. CA Cancer J Clin, 2006. **56**(2): p. 106-30.
- Tannock, I.F., et al., Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. J Clin Oncol, 1996. 14(6): p. 1756-64.
- 73. Tannock, I.F., et al., *Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(15): p. 1502-12.
- 74. Dearth, R.K., et al., *Oncogenic transformation by the signaling adaptor proteins insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2.* Cell Cycle, 2007. **6**(6): p. 705-13.
- 75. Saad, M.J., et al., *Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulinsensitive tissues of the intact rat.* J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 22100-4.
- 76. Myers, M.G., Jr., et al., *IRS-1 is a common element in insulin and insulin-like growth factor-I signaling to the phosphatidylinositol 3'-kinase*. Endocrinology, 1993. **132**(4): p. 1421-30.
- 77. Sun, X.J., et al., *Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein.* Nature, 1991. **352**(6330): p. 73-7.
- 78. Melillo, R.M., et al., *The insulin receptor substrate (IRS)-1 recruits* phosphatidylinositol 3-kinase to Ret: evidence for a competition between Shc and IRS-1 for the binding to Ret. Oncogene, 2001. **20**(2): p. 209-18.
- 79. Burfoot, M.S., et al., *Janus kinase-dependent activation of insulin receptor substrate 1 in response to interleukin-4, oncostatin M, and the interferons.* J Biol Chem, 1997. **272**(39): p. 24183-90.
- 80. Sesti, G., et al., *Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders*. FASEB J, 2001. **15**(12): p. 2099-111.
- 81. Carvalheira, J.B., H.G. Zecchin, and M.J. Saad, *Vias de sinalização da insulina*. Arq Bras Endocrinol Metab, 2002. **46**(4): p. 419-425.
- 82. Wang, L.M., et al., *IRS-1: essential for insulin- and IL-4-stimulated mitogenesis in hematopoietic cells.* Science, 1993. **261**(5128): p. 1591-4.
- 83. Taouis, M., et al., Insulin receptor substrate 1 antisense expression in an hepatoma cell line reduces cell proliferation and induces overexpression of the

Src homology 2 domain and collagen protein (SHC). Mol Cell Endocrinol, 1998. **137**(2): p. 177-86.

- Waters, S.B., K. Yamauchi, and J.E. Pessin, *Functional expression of insulin receptor substrate-1 is required for insulin-stimulated mitogenic signaling*. J Biol Chem, 1993. 268(30): p. 22231-4.
- 85. D'Ambrosio, C., et al., *Transforming potential of the insulin receptor substrate 1*. Cell Growth Differ, 1995. **6**(5): p. 557-62.
- 86. Ito, T., Y. Sasaki, and J.R. Wands, *Overexpression of human insulin receptor* substrate 1 induces cellular transformation with activation of mitogen-activated protein kinases. Mol Cell Biol, 1996. **16**(3): p. 943-51.
- 87. Tanaka, S., T. Ito, and J.R. Wands, *Neoplastic transformation induced by insulin receptor substrate-1 overexpression requires an interaction with both Grb2 and Syp signaling molecules.* J Biol Chem, 1996. **271**(24): p. 14610-6.
- 88. Fei, Z.L., et al., Association of insulin receptor substrate 1 with simian virus 40 large T antigen. Mol Cell Biol, 1995. **15**(8): p. 4232-39.
- 89. Khalili, K., et al., *T-antigen of human polyomavirus JC cooperates withIGF-IR signaling system in cerebellar tumors of the childhood-medulloblastomas.* Anticancer Res, 2003. **23**(3A): p. 2035-41.
- 90. Traina, F., et al., *BCR-ABL binds to IRS-1 and IRS-1 phosphorylation is inhibited by imatinib in K562 cells.* FEBS Lett, 2003. **535**(1-3): p. 17-22.
- 91. Miranda, C., et al., *IRS-1 and IRS-2 are recruited by TrkA receptor and oncogenic TRK-T1*. J Cell Physiol, 2001. **186**(1): p. 35-46.
- 92. Lannon, C.L., et al., A highly conserved NTRK3 C-terminal sequence in the ETV6-NTRK3 oncoprotein binds the phosphotyrosine binding domain of insulin receptor substrate-1: an essential interaction for transformation. J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 6225-34.
- 93. Ogihara, T., et al., 14-3-3 protein binds to insulin receptor substrate-1, one of the binding sites of which is in the phosphotyrosine binding domain. J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 25267-74.
- 94. DeAngelis, T., et al., *Transformation by the simian virus 40 T antigen is regulated by IGF-I receptor and IRS-1 signaling*. Oncogene, 2006. **25**(1): p. 32-42.
- 95. Chang, Q., et al., Constitutive activation of insulin receptor substrate 1 is a frequent event in human tumors: therapeutic implications. Cancer Res, 2002.
 62(21): p. 6035-8.
- 96. Neid, M., et al., *Role of insulin receptor substrates and protein kinase C-zeta in vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression in pancreatic cancer cells.* J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 3941-8.
- 97. Shi, B., et al., *Micro RNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cells.* J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 32582-90.
- 98. Folli, F., et al., *Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat.* J Biol Chem, 1992. **267**(31): p. 22171-7.
- 99. Saad, M.J., et al., *Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone- treated rats.* J Clin Invest, 1993. **92**(4): p. 2065-72.
- 100. Shepherd, P.R., B.T. Nave, and K. Siddle, *Insulin stimulation of glycogen* synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of

phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. Biochem J, 1995. **305**(Pt 1): p. 25-8.

- 101. Backer, J.M., et al., *Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation*. Embo J, 1992. **11**(9): p. 3469-79.
- 102. Lietzke, S.E., et al., *Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains*. Mol Cell, 2000. **6**(2): p. 385-94.
- 103. Carvalheira, J.B., et al., *Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats.* Diabetologia, 2003. **46**(12): p. 1629-40.
- 104. Thirone, A.C., et al., Regulation of Cbl-associated protein/Cbl pathway in muscle and adipose tissues of two animal models of insulin resistance. Endocrinology, 2004. 145(1): p. 281-93.
- 105. Zhang, X., et al., *Kinetic mechanism of AKT/PKB enzyme family*. J Biol Chem, 2006. **281**(20): p. 13949-56.
- 106. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 489-501.
- 107. Basu, S., et al., Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. Mol Cell, 2003. 11(1): p. 11-23.
- 108. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *Rheb fills a GAP between TSC and TOR*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(11): p. 573-6.
- 109. Wendel, H.G., et al., *Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy*. Nature, 2004. **428**(6980): p. 332-7.
- 110. Cantley, L.C. and B.G. Neel, *New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinaseyAKT pathway.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999. **96**.
- 111. McMenamim, M.E., et al., *Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage.* Cancer Res, 1999. **59**(17).
- 112. Tzatsos, A. and P.N. Tsichilis, *Energy depletion inhibits phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling and induces apoptosis via AMP-activated protein kinase-dependent phosphorylation of IRS-1 at Ser-794.* J Biol Chem, 2007. **282**(25).
- Hahn-Windgassen, A., et al., *Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity*. J Biol Chem, 2005.
 280(37).
- 114. Bjornsti, M.A. and P.J. Houghton, *The TOR pathway: a target for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(5): p. 335-48.
- 115. Yang, Q. and K.L. Guan, *Expanding mTOR signaling*. Cell Res, 2007. **17**(8): p. 666-81.
- 116. Sabatini, D.M., *mTOR and cancer: insights into a complex relationship*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(9): p. 729-34.
- 117. Petroulakis, E., et al., *mTOR signaling: implications for cancer and anticancer therapy*. Br J Cancer, 2006. **94**(2): p. 195-9.
- 118. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
- 119. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(259): p. 680-5.
- 120. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins* from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.

VII. ANEXOS

VII. ANEXO 1

Segue em anexo o artigo "Chronic Treatment with Irinotecan activates the PI3K/AKT/mTOR Pathway in HT-29 Colon Cancer Xenografts", o qual encontra-se submetido a periódico para publicação.

CHRONIC TREATMENT WITH IRINOTECAN ACTIVATES THE PI3K/AKT/mTOR PATHWAY IN HT-29 COLON CANCER XENOGRAFTS

Running title: Irinotecan activates the PI3K/Akt/mTOR pathway

Kellen K. Souza, Josenilson C. Oliveira, Eduardo R. Ropelle, Marília M. Dias, Guilherme Z. Rocha, Felipe O. Costa, Alexandre B. Cardoso, Hernandes F. Carvalho, Lício A. Velloso, Mario J. A. Saad, José B. C. Carvalheira.

Departamento de Clínica Médica, FCM, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Financial support: Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq)

Please address correspondence to: José B. C. Carvalheira, M.D., Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP, Brazil, 13081-970, Fax: +55 19 35218950, e-mail: carvalheirajbc@uol.com.br

KEYWORDS: HT-29; mTOR; IRS-1; Irinotecan, aspirin

Abstract

Resistance of tumors to chemotherapeutic agents is a common clinical problem in human cancer. Recently, the blocking of the PI3-kinase signaling pathway was shown to enhance apoptosis induced by SN-38, an active form of irinotecan. To gain further insight into the molecular events of the irinotecan-associated increase in the PI3-kinase signaling pathway, aspirin and rapamycin were used to modulate this signaling pathway. We herein report that aspirin is able to further inhibit IRS-1 serine phosphorylation induced by irinotecan through targeting of JNK and NFκB. Thus, agonist activation of the IRS-1/PI 3-kinase pathway blocked the growth-inhibitory effect of irinotecan in HT-29 colon cancer xenografts; our data also demonstrate a synergistic effect of mTOR inhibition and irinotecan on tumor growth. Activation of the PI3-kinase/Akt/mTOR pathway may, thus, contribute to refractoriness for treatment with irinotecan.

1. Introduction

Resistance of tumors to chemotherapies is a common clinical problem in human cancer [1]. Resistance to chemotherapies may already exist before the initiation of therapy due to the overexpression of the multidrug resistance gene product, MDR1, which functions in the export of a variety of chemotherapies [2]. Moreover, chemoresistance (acquired or inducible) may develop in response to chemotherapies by mostly unknown mechanisms.

Irinotecan, a derivative of camptothecin, is a major antitumor agent known to cause cellular damage via inhibition of the nuclear enzyme, topoisomerase I [3, 4]. Over the last decades these compounds have been successfully used as anticancer agents in the clinic, in particular against metastatic colorectal cancer [5]. Numerous reports on topoisomerase inhibitors show that irinotecan potently activates NF- κ B and the cytotoxicity generated by irinotecan is enhanced considerably by inactivation of NF- κ B [6, 7]. Recently, the blocking of the PI3-kinase/Akt pathway was shown to enhance apoptosis induced by SN-38, an active form of irinotecan, in human hepatoma cells [8]. Activation of Akt leads to the stimulation of antiapoptotic pathways, promoting cell survival. Akt also regulates the mammalian target of the rapamycin (mTOR)-S6K-S6 pathway to control cell growth in response to growth factors and nutrients [9].

A number of mechanisms may contribute to the deregulation of the PI3-kinase signaling pathway, including serine phosphorylation of IRS proteins by protein kinases such as c-jun N terminal kinase (JNK) [10-12] and IKK. Ser³⁰⁷ is located next to the phosphotyrosine-binding (PTB) domain in IRS-1 and its phosphorylation inhibits the interaction of the PTB domain with the phosphorylated NPEY motif in the activated receptor, causing a reduction in the signaling through the PI3-kinase pathway [13].

To further understand the molecular mechanism underlying chemoresistance to irinotecan, we examined the serine kinases listed above in HT-29 xenografts after irinotecan chronic treatment. Our results show that IKK is activated by irinotecan, in addition, there is a reduction in JNK activation and these alterations are correlated to a reduced phosphorylation of IRS-1 serine residues that leads to an increase in PI3kinase/Akt/mTOR pathway signaling; moreover, our data also demonstrate a synergistic effect of mTOR inhibition and irinotecan on tumor growth.

2. Materials and methods

2.1. Antibodies, Chemicals and Buffers

The reagents and apparatus for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, CA). Tris-[hydroxymethyl]amino-methane (Tris), phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), dithiothreitol (DTT), Triton X-100, Tween 20, glycerol and aspirin were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Aprotinin was from Bayer (São Paulo, SP, Brazil). Ketamin was from Parke-Davis (São Paulo, SP, Brazil), Diazepam and sodium thiopental were from Cristália (Itapira, SP, Brazil), Irinotecan was from Novartis and rapamycin was from LC Laboratories (Woburn, MA, USA). Protein A-Sepharose 6 MB, nitrocellulose membrane (Hybond ECL, 0.45µm) and [¹²⁵]I-Protein A were from Amersham (Buckinghamshire, UK). Anti-phospho-JNK, anti-phospho-c-jun, anti-AKT antibody for immunoblotting was from Santa Cruz (CA, USA). Anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-PI3K, antiphosphoserine IRS-1 307, antiphosphotyrosine antibody for immunoblotting was from Upstate Biotechnology (NY, USA). P-p70S6K, p70S6K, eIF4E, p-eIF4E and p-AKT antibodies for immunoblotting were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA).

2.2. Cell culture

The human colon cancer cell line HT-29 was obtained from ATCC, Philadelphia, PA, USA. Cells were cultured in RPMI containing 10% fetal calf serum and glutamine with the addition of penicillin/streptomycin and amphotericin B. Cell lines were maintained at 37°C, 5% CO2.

2.3. Human Tumor Xenograft Models

SCID mice were provided by the State University of Campinas - Central Breeding Center (Campinas, SP, Brazil). SCID mice, 5-6 weeks old and with a body weight of approximately 20–25 grams were implanted with 1×10^{6} HT-29 cells into the dorsal subcutis of male mice. When the tumors were between 50 and 100 mm³, the animals were pair matched into treatment and control groups. Each group contained eight mice, each of which was ear tagged and followed individually throughout the experiment. Initial doses were given on the day of pair matching (day 0). Aspirin (294mg/kg) was administered via gavage daily, rapamycin (25µg) was given once a day by i.p injection and irinotecan (50 mg/kg) once a week by i.p injection. Tumor measurements were taken by calipers daily, starting on day 0. These tumor measurements were converted to tumor volume (V) using the formula (V = $W^2 \times L \times L$ 0.52), where W and L are the smaller and larger diameters, respectively, and plotted against time. Upon termination, the mice were weighed and sacrificed, and their tumors were excised. Treatment-related toxicity was evaluated by means of serial weight measurements. All experiments were approved by the Ethics Committee of the State University of Campinas.

2.4. Tumor extracts

Mice were anesthetized with sodium amobarbital (15 mg/kg body weight, i.p.) and were used 10-15 min later, i.e. as soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes. Tumors were removed, minced coarsely and homogenized immediately in extraction buffer (1% Triton-X 100, 100 mM Tris, pH 7.4, containing 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF and 0.1 mg of aprotinin/ml) at 4 °C with a Polytron PTA 20S generator (Brinkmann Instruments model PT 10/35) operated at maximum speed

for 30 sec. The extracts were centrifuged at 15,000 rpm and 4°C in a Beckman 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA) for 45 min to remove insoluble material, and the supernatants of these tissues were used.

2.5. Protein analysis by immunoblotting

The whole tissue extracts or 1.0×10^6 cells were treated with Laemmli sample buffer [14] containing 100 mM DTT and heated in a boiling water bath for 4 min after which they were subjected to SDS-PAGE (6% bis-acrylamide) in a Bio-Rad miniature slab gel apparatus (Mini-Protean). For total extracts, similar sized aliquots (200µg protein) were subjected to SDS-PAGE.

Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 90 min at 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean), as described by Towbin et al. [15], except for the addition of 0.02% SDS to the transfer buffer to enhance the elution of high molecular mass proteins. Non-specific protein binding to the nitrocellulose was reduced by pre-incubating the filter overnight at 4° C in blocking buffer (5% non-fat dry milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blot was incubated with the indicated antibodies, diluted in blocking buffer (0.3% BSA instead of non-fat dry milk) overnight at 4° C and then washed for 60 min with blocking buffer without milk. The blots were subsequently incubated with 2.0 µCi of ¹²⁵I-protein A (30 µCi/µg) in 10 ml of blocking buffer for 2 h at room temperature and then washed again for 30 min as described above. ¹²⁵I-Protein A bound to the antiphosphotyrosine and anti-peptide antibodies was detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film with Cronex Lightning Plus intensifying screens at -80°C for 12-48 h. Band intensities were quantitated by optical densitometry (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco; model GS 300) of the developed autoradiographs.

2.6. Determination of NF KB activation

NF κ B p50 activation was determined in nuclear extracts from tumor tissue by ELISA (Pierce Biotechnology-89858), according to the recommendations of the manufacturer.

2.7. Immunohistochemistry.

To detect Ki-67, microwave postfixation was carried out using a domestic oven (Panasonic Junior) at 700 W, which was delivered to slides immersed in 0.01 mol/l citrate buffer, pH 6.0, in two 7-min doses separated by a 2-min break, which allowed for buffer replenishment. The slides were allowed to cool to room temperature before being removed from the oven. Sections were then incubated at room temperature for 1 h with primary monoclonal mouse anti-human Ki-67 clone MIB-1 (Dako Cytomation) (diluted 1:150). The antibodies for Ki-67 were applied overnight. The slides were then incubated with avidin-biotin complex LSAB+ Kit (Dako Cytomation) for 30 min followed by the addition of diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma Aldrich) as a substrate-chromogen solution. After hematoxylin counterstaining and dehydration, the slides were mounted in Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). The experiments were performed at least in triplicate for each mouse.

2.8. TUNEL assay

Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin –d UTP Nick End Labeling (TUNEL) staining was performed using a commercial apoptosis detection kit (Upstate-17 141), according to the recommendations of the manufacturer.

2.9. Statistical analysis

All groups of animals were studied in parallel. Comparisons between different groups were performed by employing ANOVA, as appropriate. The level of significance adopted was P<0.05.

3. Results

3.1. Aspirin and irinotecan synergize to increase the PI3-kinase signaling pathway

Immunoblotting experiments were conducted to determine the effects of aspirin, irinotecan, and the combination of both on IRS-1 tyrosine phosphorylation in HT-29 xenografts. We observed that treatment with aspirin alone induced a significant increase in IRS-1/2 tyrosine phosphorylation when compared to the control group. Irinotecan alone also induced IRS-1 tyrosine phosphorylation. The association of both treatments acted synergistically in the increase of IRS-1 phosphorylation, which was significantly greater than for each compound when utilized alone (Fig. 1A and B upper panels). The same membranes, used to detect tyrosine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2, were reblotted with antibodies against the p85 subunit of PI3-kinase. The PI3-kinase association with IRS-1 and IRS-2 paralleled the changes in the phosphorylation of these proteins (Figure 1A and B middle panels). The protein expressions of IRS-1 and IRS-2 in the HT-29 xenografts were quantitated by immunoprecipitation and immunoblotting with anti-IRS-1 or anti-IRS-2 antibodies and we did not detect differences in the protein expression between the different treatments (Figure 1A and B lower panels). Consistent with these results, we observed an increase in Akt phosphorylation after treatment with aspirin and irinotecan and a synergistic effect of this association (fig. 1C).

3.2. Mechanisms of synergy between aspirin and irinotecan

It has been reported that aspirin could inhibit IRS-1 serine phosphorylation [16], but the effect of irinotecan has not been determined. To address this issue, we tested Ser³⁰⁷ phosphorylation in HT-29 xenografts that were chronically treated with these drugs. As shown in figure 2A, there was a significant reduction in IRS-1 serine phosphorylation in mice treated with aspirin and irinotecan, with no alterations in IRS-1 protein levels (Fig. 2A lower panel) in HT-29 xenografts. The combined used of aspirin and irinotecan enhanced the effect of either drug used alone.

JNK activation was determined by monitoring phosphorylation of JNK (Thr¹⁸³ and Tyr¹⁸⁵) and c-Jun (Ser⁶³), which is a substrate of JNK. JNK phosphorylation was detected in control animals, however a significant decrease was observed in animals treated with aspirin or irinotecan (Fig 2B). JNK phosphorylation was reduced by 65-80% in mice treated with aspirin plus irinotecan. Consistent with JNK inactivation, c-Jun phosphorylation was reduced by aspirin and irinotecan treatment in a similar fashion to JNK phosphorylation (Fig 2C). On the other hand, NF κ B was induced by irinotecan treatment and reversed by aspirin (Fig. 2D).

Immunoblotting experiments were conducted to determine the effects of aspirin, irinotecan, and the combination of both on p70S6K and eIF4E phosphorylation in HT-29 xenografts. We observed that treatment with aspirin alone induced a significant increase in the phosphorylation of these kinases tyrosine when compared to the control group. Irinotecan alone also induced p70S6K and eIF4E tyrosine phosphorylation. The association of both treatments acted synergistically to increase p70S6K and eIF4E phosphorylation, which was significantly greater than for each compound when used alone (Fig.3 A and B). Conversely, rapamycin treatment blocked the effects of irinotecan on p70S6K phosphorylation (Fig. 3C).

3.3. mTOR antagonist and irinotecan synergistic effect on colon cancer xenografts

To further extend these studies, we investigated whether modulating the IRS-1/PI3-kinase/mTOR pathway could change the effects of irinotecan on colon cancer xenografts. As shown in Figure 4A, exposure of HT-29 xenografts to aspirin or irinotecan treatment resulted in a decrease in tumor growth during the experimental period. However, the association of aspirin with irinotecan enhanced tumor growth, related to the treatment with the isolated drugs in the frame shift period of study. No substantial weight loss was observed in any of the groups throughout the thirty days of analysis. We then treated the mice with rapamycin and irinotecan at doses that reduce tumor growth *in vivo* for each agent alone. Although tumor growth was reduced in mice treated with each agent alone, tumors still increased by 5-fold (figure 4B). In striking contrast, growth of the tumors in animals treated with the combination was completely arrested. It is important to note that the combination did not appear to have an overall increased toxic effect, since a difference in weights of the mice was not observed (data not shown). These data demonstrate that combining the mTOR inhibitor rapamycin with irinotecan dramatically reduces tumor growth *in vivo*.

To support the results observed for the growth of HT-29 xenografts, we performed TUNEL staining on paraffin-embedded sections from the xenografted tumors of mice treated with aspirin, irinotecan and rapamycin. Figure 4C and D shows that irinotecan, aspirin and rapamycin alone increased the number of TUNEL-positive cells compared to sections from control-treated-tumors. However, the combinations did not change the number of TUNEL- positive cells compared to either treatment alone. Next we performed immunohistochemistry to detect Ki-67 (Figs. 4C and 4E). Following inoculation of HT29 colon cancer cells and establishment of tumors (50-100mm³), mice were treated with aspirin, irinotecan and rapamycin alone, or in combination, for 30 days. While aspirin alone did not have a significant effect on the Ki-67-positive cells, compared to sections from control-treated-tumors, there was a significant increase in the Ki-67-positive cells in the sections from mice treated with the combination of aspirin and irinotecan, compared to sections from the ki-67-positive cells in the sections from the sections from irinotecan-treated-tumors. In striking contrast, there was a significant decrease in the Ki-67-positive cells in the sections from

mice treated with the combination of rapamycin and irinotecan, compared to sections from irinotecan-treated-tumors.

4. Discussion

Many cancer cells either show chemo- or radioresistance or acquire resistance after therapy [17, 18]. Increased concentrations of cytotoxic drugs and higher dosages of irradiation fail to improve the pharmacotherapeutic response in resistant cancer cells. Thus, research efforts are aimed at determining the regulatory events involved in chemo- and radioresistance. We herein describe that agonist activation of the IRS-1/PI3-kinase pathway blocked the growth-inhibitory effect of irinotecan in HT-29 colon cancer xenografts; our data also demonstrate a synergistic effect of mTOR inhibition and irinotecan on tumor growth. Activation of the PI3-kinase/Akt/mTOR pathway may, thus, contribute to refractoriness to treatment with irinotecan.

Although there may be many mechanisms by which chemoresistance is achieved in tumors, our data indicate, in accordance with a previous report [8], that a main pathway involved in inducible resistance to irinotecan, besides the activation of the transcription factor NF- κ B within tumor cells, is the activation of the PI3-kinase signaling pathway. Our results show that decreased serine phosphorylation of IRS-1 may be one of the mechanisms implicated in the activation of PI3-kinase signaling. Serine phosphorylation of IRS proteins is believed to be a major mechanism of suppression of IRS-1 activity [19, 20].

Three recent studies provide clear evidence that aspirin enhances the signaling through PI3-kinase [16, 21, 22]. In these studies, aspirin was found to reduce serine phosphorylation of IRS-1. Our results show a marked reduction in IRS-1 serine phosphorylation after aspirin or irinotecan treatment in parallel with an increase in Akt and p70S6k phosphorylation. Taken together, these data suggest that irinotecan mediates an increase in the PI3-kinase signaling pathway, at least in part, by reducing

IRS-1 serine phosphorylation and increasing IRS-1 tyrosine phosphorylation and that this effect is amplified by aspirin. These three studies also provided the first evidence that IKK may be a target for aspirin enhancing the signaling through the PI3-kinase pathway [16, 21]. In accordance with the results obtained by ricchi et al in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells [23] we observed that aspirin inhibited irinotecan-induced IKK and NF κ B activity in HT-29 xenografts, and that this inhibition contributed to the prevention of IRS-1 serine phosphorylation.

JNK is a serine kinase that is responsible for activation of the transcription factors, c-Jun and ATF2, by phosphorylating these two proteins [24, 25] and are implicated in cell-death pathways stimulated by environmental stress and TNF- α . Recently, JNK has been linked to the regulation of signaling through PI 3-kinase by several studies [11, 13, 26-28]. It has been suggested that JNK contributes to reduced signaling through PI3-kinase by phosphorylating IRS-1 at serine 307, and this phosphorylation leads to the inhibition of IRS-1 function [11, 13, 26, 27]. It has recently been observed that aspirin inhibits JNK activity [29, 30]. In this study, we observed that aspirin amplified the effect of chronic treatment in JNK activity, and that this activation was accompanied by an increase in IRS-1 serine phosphorylation at Ser³⁰⁷, indicating that this serine kinase is one of the causes of irinotecan-induced chemoresistance.

The mechanism by which chronic treatment with irinotecan results in a reduced activation of JNK is not completely known. Major recent discoveries have revealed that the NF- κ B cell-survival pathway cross-talks with the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway, substantially blunting this pathway [31, 32]. Two JNK inhibitory proteins have been discovered. In one model, activation of NF- κ B mediates transcriptional increase of a protein called gadd45b/myd118, which then lowers JNK signaling induced by the

TNF- α receptor [31]. The other protein (NF- κ B-induced X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis) is switched on by TNF- α in an NF- κ B-dependent manner and also blunts JNK activation [32]. Another possibility is the presence of a direct cross-talk between PI3-kinase/Akt and JNK pathways. The ability of Akt to suppress the JNK pathway has been observed in a variety of cell systems [33-35]. Akt has been shown to suppress the JNK pathway by phosphorylating and negatively regulating ASK1 [36], MLK3 [37] and MKK4 [38]. In addition, Akt has also been suggested to prevent JNK activation by directly interacting with JIP1 and preventing the recruitment of upstream kinases to JNK [39]. These results may be clinically relevant, since one of the mechanisms proposed for the proapoptotic effect of irinotecan is the activation of JNK [40, 41] and, even with inhibition of irinotecan-induced NF κ B activity by aspirin the combined treatment with aspirin, and irinotecan results in an increased growth of HT-29 xenografts and a reduction in IRS-1 serine phosphorylation.

The effectiveness of the combination of irinotecan and rapamycin in HT-29 colon cancer xenografts suggests that blocking mTOR may circumvent irinotecan resistance by inhibiting the PI3-kinase/Akt/mTOR signaling pathway. Cells acquire irinotecan resistance by several mechanisms, mTOR inhibition by rapamycin may overcome this resistance by encoding major components of protein synthesis machinery and controlling translation of mRNA with secondary structure (often GC rich) [42-44]. These mRNAs are known to encode proteins related to proliferation. In this study, we have shown that, in HT-29 xenografts, the phosphorylation of p70S6K is increased by irinotecan alone, but decreased with the combined treatment of irinotecan and rapamycin, indicating that rapamycin can block the translational initiation. These results correspond with our growth inhibitory findings, which show that the addition of mTOR inhibitor significantly augments the growth inhibitory effect of irinotecan HT-29

xenografts. Overall, our findings support the notion that the inhibition of protein translational machinery by rapamycin may overcome irinotecan resistance.

In summary, aspirin treatment blocked the effect of irinotecan inhibition of tumor growth by increasing IRS/PI3-kinase/Akt/mTOR pathway activity. In contrast, mTOR inhibition and irinotecan synergizes to suppress tumor growth in colon cancer xenografts. Overall, these results provide important new insights into the mechanism of irinotecan-induced chemo-resistance.

Acknowledgments

The authors thank Mr. Luiz Janeri, Jósimo inheiro and Márcio A da Cruz for technical assistance. This study was supported by grants from FAPESP and CNPq.

REFERENCES

- 1. Fisher, D.E., *Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold*. Cell, 1994. **78**(4): p. 539-42.
- Baldini, N., Multidrug resistance--a multiplex phenomenon. Nat Med, 1997.
 3(4): p. 378-80.
- 3. Schaid, D.J., *The complex genetic epidemiology of prostate cancer*. Hum Mol Genet, 2004. **13 Spec No 1**: p. R103-21.
- 4. Hahn, W.C. and R.A. Weinberg, *Modelling the molecular circuitry of cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(5): p. 331-41.
- 5. Garcia-Carbonero, R. and J.G. Supko, *Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins.* Clin Cancer Res, 2002. **8**(3): p. 641-61.
- 6. Piret, B. and J. Piette, *Topoisomerase poisons activate the transcription factor NF-kappaB in ACH-2 and CEM cells*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(21): p. 4242-8.
- 7. Wang, C.Y., et al., *Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB.* Nat Med, 1999. **5**(4): p. 412-7.
- 8. Koizumi, N., et al., *Blocking of PI3K/Akt pathway enhances apoptosis induced by SN-38, an active form of CPT-11, in human hepatoma cells.* Int J Oncol, 2005. **26**(5): p. 1301-6.
- 9. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
- Barreiro, G.C., et al., Aspirin inhibits serine phosphorylation of IRS-1 in muscle and adipose tissue of septic rats. Biochem Biophys Res Commun, 2004. 320(3): p. 992-7.
- 11. Lee, Y.H., et al., *c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade.* J Biol Chem, 2003. **278**(5): p. 2896-902.
- 12. Prada, P.O., et al., Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. Endocrinology, 2005. **146**(3): p. 1576-87.
- 13. Aguirre, V., et al., *Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action.* J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 1531-7.
- 14. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(259): p. 680-5.
- 15. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins* from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
- 16. Yuan, M., et al., *Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta.* Science, 2001. **293**(5535): p. 1673-7.
- 17. Hickman, J.A., *Apoptosis induced by anticancer drugs*. Cancer Metastasis Rev, 1992. **11**(2): p. 121-39.
- 18. Kerr, J.F., C.M. Winterford, and B.V. Harmon, *Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy.* Cancer, 1994. **73**(8): p. 2013-26.
- 19. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.* Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.

- 20. Saltiel, A.R. and J.M. Olefsky, *Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes*. Diabetes, 1996. **45**(12): p. 1661-9.
- 21. Kim, J.K., et al., *Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate*. J Clin Invest, 2001. **108**(3): p. 437-46.
- 22. Hundal, R.S., et al., *Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes*. J Clin Invest, 2002. **109**(10): p. 1321-6.
- 23. Ricchi, P., et al., *Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on colon carcinoma Caco-2 cell responsiveness to topoisomerase inhibitor drugs.* Br J Cancer, 2002. **86**(9): p. 1501-9.
- 24. Derijard, B., et al., *JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain.* Cell, 1994. **76**(6): p. 1025-37.
- 25. Minden, A., et al., Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. Cell, 1995. **81**(7): p. 1147-57.
- 26. Aguirre, V., et al., *The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307).* J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 9047-54.
- 27. Rui, L., et al., *Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways.* J Clin Invest, 2001. **107**(2): p. 181-9.
- 28. Hirosumi, J., et al., *A central role for JNK in obesity and insulin resistance*. Nature, 2002. **420**(6913): p. 333-6.
- 29. Jiang, G., et al., Salicylic acid reverses phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA)and tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced insulin receptor substrate 1 (IRS1) serine 307 phosphorylation and insulin resistance in human embryonic kidney 293 (HEK293) cells. J Biol Chem, 2003. **278**(1): p. 180-6.
- 30. Gao, Z., et al., Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. J Biol Chem, 2003. **278**(27): p. 24944-50.
- 31. De Smaele, E., et al., *Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling*. Nature, 2001. **414**(6861): p. 308-13.
- 32. Tang, G., et al., *Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes*. Nature, 2001. **414**(6861): p. 313-7.
- 33. Galvan, V., et al., *Type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) signaling inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1).* J Biol Chem, 2003. **278**(15): p. 13325-32.
- 34. Levresse, V., et al., *Akt negatively regulates the cJun N-terminal kinase pathway in PC12 cells.* J Neurosci Res, 2000. **62**(6): p. 799-808.
- 35. Okubo, Y., et al., *Insulin-like growth factor-I inhibits the stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase.* J Biol Chem, 1998. **273**(40): p. 25961-6.
- 36. Kim, A.H., et al., *Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signalregulating kinase 1.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(3): p. 893-901.
- 37. Barthwal, M.K., et al., *Negative regulation of mixed lineage kinase 3 by protein kinase B/AKT leads to cell survival.* J Biol Chem, 2003. **278**(6): p. 3897-902.
- 38. Park, H.S., et al., *Akt (protein kinase B) negatively regulates SEK1 by means of protein phosphorylation.* J Biol Chem, 2002. **277**(4): p. 2573-8.
- 39. Kim, A.H., et al., *Akt1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis*. Neuron, 2002. **35**(4): p. 697-709.
- 40. Catley, L., et al., Proteasomal degradation of topoisomerase I is preceded by c-Jun NH2-terminal kinase activation, Fas up-regulation, and poly(ADP-ribose)

polymerase cleavage in SN38-mediated cytotoxicity against multiple myeloma. Cancer Res, 2004. **64**(23): p. 8746-53.

- 41. Malathi, K., et al., *HPC1/RNASEL mediates apoptosis of prostate cancer cells treated with 2',5'-oligoadenylates, topoisomerase I inhibitors, and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand.* Cancer Res, 2004. **64**(24): p. 9144-51.
- 42. Chung, J., et al., *Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases.* Cell, 1992. **69**(7): p. 1227-36.
- 43. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, *Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR*. Genes Dev, 2001. **15**(7): p. 807-26.
- 44. Jefferies, H.B., et al., *Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k*. Embo J, 1997. **16**(12): p. 3693-704.

Figure 1



Figure 2



Figure 3



Figure 4







FIGURE LEGENDS

Figure 1. Aspirin and irinotecan synergize to induce the activation of the IRS/PI3-kinase/Akt pathway. After thirty days of treatment, HT-29 xenografts were prepared, as described in Methods. (A) The lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-IRS-1 antibodies and immunoblotted (IB) with antiphosphotyrosine (α PY), with anti PI 3-kinase or with anti-IRS-1 antibodies. (B) The lysates were immunoprecipitated (IP) with anti IRS-2 antibodies and immunoblotted (IB) with antiphosphotyrosine (α PY), with anti PI 3-kinase or with anti-IRS-1 antibodies. (C) The lysates were immunoblotted (IB) with antiphosphotyrosine (α PY), with anti PI 3-kinase or with anti IRS-2 antibodies. (C) The lysates were immunoblotted (IB) with pAkt (A-upper panel) and Akt (A-lower panel). Data (mean ± SEM; n = 5) are expressed as relative to control. # P<0.05, vs. control; * P<0.05, vs. other groups.

Figure 2. Effects of aspirin and irinotecan on IRS-1 serine phosphorylation and on JNK and NFκB activities. Mice were treated with either vehicle or aspirin plus vehicle or irinotecan plus vehicle or aspirin. HT-29 xenografts were then lysed and the proteins were separated by SDS-PAGE and blotted with phosphoserine-specific IRS-1 antibodies (A-upper panel), with IRS-1 antibodies (A-lower panel), phospho-JNK (Bupper panel), JNK (B-lower panel), or phospho-c-jun (C), and NF κB p50 activation was determined in nuclear extracts from tumor tissue by ELISA (D). Data (mean ± SEM; *n* = 5) are expressed as relative to control. # *P*<0.05, *vs.* control; * *P*<0.05, *vs.* other groups.

Figure 3. Irinotecan activates mTOR pathway. (A-B) Mice bearing HT-29 xenografts were treated with irinotecan or aspirin alone or in combination. Activation of mTOR was determined by phospho-p70S6K (A-upper panel), p70S6K (A-lower panel), and peIF4E (B-upper panel), eIF4E (B-lower panel). (C) Mice bearing HT-29 xenografts were treated with irinotecan or rapamycin alone or in combination. Activation of mTOR was determined by phospho-p70S6K
(C-upper panel), p70S6K (C-lower panel). Data (mean \pm SEM; n = 5) are expressed as relative to control. # *P*<0.05, *vs*. control; * *P*<0.05, *vs*. other groups.

Figure 4. Rapamycin and irinotecan synergize in vivo to reduce tumor growth. 1.0 x 106 HT-29 cells were injected subcutaneously into the flank of Scid mice. Once the tumor reached 50-100 mm3, treatments were initiated. (A) Irinotecan, aspirin, or the association of aspirin with irinotecan was injected in mice bearing HT-29 xenografts. (B) Control, irinotecan, rapamycin or in combination. Control mice received a similar schedule of the vehicle solution. Tumor growth was measured daily. n = 8 mice per group, mean ± SEM. (C-E) Average TUNEL and Ki-67-positive cells per fields, 4 fields per tumor section, mean ± SEM.