Luciano José Megale Costa

**Modulação da sinalização celular e do complexo
de início de tradução como estratégias para o
tratamento do carcinoma de células renais**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Patologia
Orientador: Prof. Dr. Auro del Giglio

**São Paulo
2005**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Luciano José Megale

Modulação da sinalização celular e do complexo de início de tradução como estratégias para o tratamento de carcinoma de células renais / Luciano José Megale Costa. -- São Paulo, 2005.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Auro Del Giglio.

Descritores: 1.NEOPLASIAS RENAIS 2.P42 MAP QUINASE 3.GENES
ERB B-1 4.SIROLIMO 5.TRADUÇÃO GENÉTICA 6.WESTERN BLOTTING
7.REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

USP/FM/SBD-303/05

***Aos meus queridos pais e irmãos, a quem
se estende qualquer mérito que eu tenha.***

***A minha amada Ana, com quem tudo
compartilho e a quem tudo devo.***

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Auro del Giglio pela sua atenciosa orientação em todas as etapas de minha carreira médica. Aprendi com você que a confiança do mestre é sempre a maior e a melhor motivação para o aprendiz. É essa atitude que faz de você não somente um brilhante médico e professor, mas um líder entre seus pares. Sua dedicação ao trabalho e ao conhecimento me servem e continuarão a servir de exemplo. Esta tese não inicia nem encerra meu aprendizado, nossa amizade ou nossa colaboração.

Ao Dr. Harry Drabkin e ao Dr. Robert Gemmill por me receberem com tanto entusiasmo em seu laboratório e por todas as oportunidades criadas junto ao programa de câncer renal da Universidade do Colorado, inclusive a viabilização do presente trabalho. Reconheço a insistência e a exigência como mecanismos valiosos de aprimoramento e de sucesso. Devo a vocês meu apreço por biologia tumoral e minha crença de que não se conquistam melhoras no tratamento do câncer sem o trabalho árduo para o entendimento de sua natureza molecular. Trabalhar com vocês é um privilégio e uma imensa satisfação.

Ao Prof. Dr. Raymundo Soares Azevedo Neto, coordenador do Programa de Pós Graduação do Departamento de Patologia, pela oportunidade criada e pela sua valiosa orientação em diversas etapas do meu doutorado.

Ao Dr Paulo Carneiro, professor do Departamento de Patologia da FMUSP, pela valiosa experiência didática que adquiri ao participar de sua disciplina como bolsista do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

A Sra. Liduvina Barros, secretária do Departamento de Patologia da FMUSP, por cuidar de pequenos, mas imprescindíveis detalhes e pelo inestimável apoio em todas as etapas da minha pós-graduação.

A Sra. Jan Jacobson, pela imensa dedicação na manutenção das linhagens celulares. Esse trabalho não teria sido possível sem sua ajuda.

Aos queridos Fabiana e Lucas pela inestimável ajuda na fase final desta tese.

A minha amada Ana, por me oferecer irrestrito suporte e manter-me no meu caminho a despeito de qualquer dificuldade. Devo a você qualquer êxito que tenha alcançado ou venha a alcançar. Obrigado ainda por dedicar longas horas de minucioso trabalho revisando esta tese.

Suporte Financeiro

Coordenação de Aperfeiçoamento para Pessoal de Nível Superior (CAPES) através do programa de bolsas de demanda social.

University of Colorado Cancer Center através do programa de *seed grants*.

Sumário

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Aspectos clínicos do CCR metastático.....	03
1.1.1 Diagnóstico.....	03
1.1.2 Fatores de prognóstico.....	05
1.1.3 Tratamento convencional do CCR.....	07
1.1.3.1 Quimioterapia convencional.....	08
1.1.3.2 Citocinas.....	09
1.1.3.3 Transplante de células tronco.....	12
1.2 Aspectos moleculares do CCR e o desenvolvimento de tratamentos biológicos.....	14
1.2.1 CCR e o gene <i>VHL</i>	14
1.2.2 Outros genes associados ao CCR.....	20
1.2.3 Receptor do fator de crescimento epitelial e sua importância no CCR.....	21
1.2.4 Sistema de quinases proteicas ativadas por mitógenos.....	25
1.2.5 Inibidores de quinases proteicas com ação no CCR.....	28
1.2.6 Complexo de início de tradução.....	31
2 OBJETIVOS.....	42
3 MÉTODOS.....	44

3.1 Linhagens celulares.....	45
3.2 Inibidores e drogas.....	47
3.3 Western blotting.....	48
3.4 Reação de Polimerase em Cadeia.....	51
3.5 Ensaios de crescimento.....	55
3.6 Análise estatística.....	57
4. RESULTADOS.....	59
4.1 Efeito da inibição da via de MAPK na fosforilação de RPS6.....	60
4.2 Efeito da inibição de MAPK na fosforilação de 4EBP1.....	66
4.3 Efeito da inibição de MAPK no nível de mRNA de 4EBP1 e 4EBP2.....	68
4.4 Efeito <i>in vitro</i> de rapamicina e gefitinibe na fosforilação de RPS6, ERK1/2 e AKT.....	68
4.5 Efeito de gefitinibe na ativação de ERK1/2, ERK5 e AKT mediada por EGF em CCR.....	70
4.6 Efeito da rapamicina, UO126 e gefitinibe no crescimento <i>in vitro</i> de culturas celulares de CCR.	76
5.DISCUSSÃO.....	82
5.1 Características do estudo, sua relevância e suas limitações.....	83
5.2 Efeitos da inibição de MAPK em CCR.....	86
5.3 Importância de EGFR.....	90
5.4 Complexo de início de tradução como alvo promissor no tratamento do câncer renal.....	93
5.5 Trabalhos futuros.....	94

6. CONCLUSÕES.....	97
7. REFERÊNCIAS.....	100

Apêndice

Resumo

Costa, LJM. Modulação da sinalização celular e do complexo de início de tradução como estratégias para o tratamento do carcinoma de células renais. [tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2005. 124p.

Introdução: O carcinoma de células renais (CCR) representa uma causa crescente de mortalidade por câncer. Apesar da sua curabilidade em estádios iniciais, agentes citotóxicos e imunomodulatórios têm homogeneamente alcançado nenhum ou pouco benefício no tratamento do CCR avançado. Um melhor entendimento da biologia tumoral pode levar ao desenvolvimento de terapias mais eficientes e dirigidas aos mecanismos moleculares de manutenção do tumor. Sinalização aumentada através do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR), sistema de quinases proteicas ativadas por mitógenos (MAPK) e via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) assim como estimulação do complexo de início de tradução (CIT) foram caracterizados em linhagens celulares e amostras tumorais de CCR. Nós investigamos o efeito de um inibidor de EGFR (gefitinibe), de um inibidor de MAPK (UO126) e de um inibidor do CIT (rapamicina) nos intermediários de sinalização celular e nos elementos do CIT assim como no crescimento *in vitro* de linhagens celulares de CCR. **Métodos:** Linhagens celulares de CCR (PRC3, WT8, SKRC-02, SKRC-17, SKRC-39, SKRC-45, ACHN e KRCY) foram mantidas em condições ideais para a cultura de células de mamíferos e expostas a drogas e/ou inibidores nas concentrações e por períodos de tempo variáveis. A fosforilação de intermediários da sinalização celular foi determinada utilizando-se western blots. Nível de mRNA para genes de interesse foram determinados por qRT-PCR. Crescimento celular

foi avaliado por método colorimétrico em diferentes concentrações de gefitinibe, UO126 e rapamicina, isoladamente ou em combinação. Resultados: UO126 levou a defosforilação não apenas de intermediários de MAPK como também de substratos do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) revelando sinalização cruzada entre essas vias. Nós identificamos ainda que ERK5 é a quinase potencialmente responsável por esta sinalização cruzada. No entanto, tratamento com UO126 não afetou o nível de mRNA para o substrato de mTOR 4EBP1. Gefitinibe foi capaz de bloquear a sinalização iniciada por EGF na via de PI3K em todas as linhagens wt-PTEN e de bloquear a sinalização através de ERK1/2 e ERK5 ao menos parcialmente em todas as linhagens celulares. Rapamicina mostrou-se um potente inibidor do crescimento na maioria das linhagens celulares de CCR e tal efeito foi freqüentemente amplificado com a combinação com UO126 ou gefitinibe. Conclusão: EGFR, MAPK e CIT são alvos promissores no tratamento do CCR.

Descritores: Neoplasias Renais; P42 MAP Quinase; Genes erb B-1; Sirolimo; Tradução Genética; Western Blotting; Reação em Cadeia da Polimerase.

Summary

Costa, LJM. Cell signaling and translation initiation complex modulation as strategies to the treatment of renal cell carcinoma. [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2005. 124p.

Background: Renal cell carcinoma (RCC) is an increasing cause of cancer mortality. Despite its curability in early stages, conventional cytotoxic and immunomodulatory agents have been homogeneous in providing minimal or no benefit in the treatment of advanced RCC. Better understanding of tumor cell biology may lead to development of more efficient targeted therapies. Signaling intensification through epithelial growth factor receptor (EGFR), mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway and overactivation of the translation initiation complex (TIC) has been previously characterized in RCC cell lines and tumor samples. We investigated the effect of an EGFR inhibitor (gefitinib) as well as a MAPK inhibitor (UO126) and a TIC inhibitor (rapamycin) in the intermediates of cell signaling, in the elements of TIC and in the *in vitro* growth of RCC cell lines. Methods: RCC cell lines (PRC3, WT8, SKRC-02, SKRC-17, SKRC-39, SKRC-45, ACHN and KRCY) were maintained on standard mammalian cells culture conditions and exposed to drugs and/or inhibitors in variable concentrations and for variable periods of time as required in each experiment. Phosphorylation status of signaling intermediates were determined using western blots. Levels of mRNA for genes of interest were determined by qRT-PCR. Cell growth was assessed by colorimetric method in control conditions or in different concentrations of gefitinib, UO126 or rapamycin, alone or in combination. Results: UO126 caused dephosphorylation not only of MAPK intermediates but also of mammalian target of rapamycin (mTOR) substrates revealing crosstalk between these pathways. We also

identified ERK5 as a kinase potentially responsible for such cross talk. However, treatment with UO126 did not affect mRNA levels of the downstream target of mTOR 4EBP1. Gefitinib was able to block EGF signaling through PI3K in all wt-*PTEN* cell lines and the signaling through ERK1/2 and ERK5 at least partially in all cell lines. Rapamycin was found to be a potent growth inhibitor in most RCC cell lines and such effect was often increased by its combination with UO126 or gefitinib. Conclusion: EGFR, MAPK and CIT are promising targets for the treatment of RCC.

Key words: Renal Neoplasms; p42 MAP Kinase ; Genes, erbB-1; Sirolimus; Translation, Genetic ; Western blotting; Polymerase Chain Reaction.

Esta tese está de acordo com:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Descritores: Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) para língua portuguesa, Bireme.

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Abreviaturas dos títulos dos periódicos: *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

“O que nos impede, na maioria das vezes, de ter o que queremos, de ser o que sonhamos, de fazer o que pensamos e aceitar com o coração é a ousadia que não cultivamos.”

Clarice Lispector

“I do not know what I may appear to the world; but to myself I seem to have been only like a boy playing on the seashore, and diverting myself in now and then finding of a smoother pebble or a prettier shell than ordinary, whilst the great ocean of truth lay all undiscovered before me.”

Sir Isaac Newton

Introdução

1 Introdução

O câncer renal é uma neoplasia relativamente incomum, mas cuja incidência vem aumentando em todo o mundo nas últimas décadas. Mais freqüente no ocidente, representa cerca de 2% dos neoplasias malignas primárias diagnosticadas anualmente nos EUA, onde estima-se que 36160 pacientes serão diagnosticados com câncer renal em 2005 e 12660 irão morrer com a doença (Ries et al., 2005).

No Brasil, segundo dados do Registro de Câncer de São Paulo, onde o câncer representa uma das principais causas de mortalidade, o câncer renal representou 1,5% das neoplasias diagnosticadas no ano de 1993 entre homens e 0,9% entre mulheres e as taxas de incidência no mesmo ano foram de 6,0/100000 e 3,0/100000 para homens e mulheres, respectivamente (Ministério da Saúde, 1999).

Exceto por formas mais raras (como tumor de Willms) e principalmente por formas hereditárias, trata-se de um tumor do idoso, com a maioria dos casos sendo diagnosticados nas sétima e oitava décadas de vida, afetando mais freqüentemente homens (62% dos casos) do que mulheres (Ries et al., 2005).

Pouco se sabe sobre a etiologia do câncer renal. Tabagismo parece ser o principal fator ambiental associado (McLaughlin et al., 1984; Mellempgaard et al., 1994). Outras condições associadas ao câncer renal incluem exposição a

analgésicos (Gago-Dominguez et al., 1999) e insuficiência renal crônica levando ao desenvolvimento de doença renal policística adquirida (Doublet et al., 1997). Em sua maioria, contudo, os tumores se apresentam de forma esporádica, sem que qualquer fator de risco conhecido ou história familiar relevante possam ser identificados.

1.1 Aspectos clínicos do CCR metastático

1.1.1 Diagnóstico

Cerca de 75% dos CCR pertencem ao subtipo carcinoma de células claras, assim denominado pela sua aparência à microscopia óptica, com presença de abundantes depósitos citoplasmáticos de glicogênio, de coloração clara (Grignon et al., 2005). Os demais casos se distribuem entre os subtipos papilar (tipos 1 e 2), cromofóbico e oncocítico, além do carcinoma de células transicionais da pelve renal.

Assim como as demais neoplasias, o estadiamento do CCR segue o padrão TNM, detalhado no quadro 1 (Guinan et al., 1997).

Quadro 1 – Estadiamento do câncer renal

Tumor primário (T)	
T0	Não há evidências do tumor primário.
T1	Tumor confinado ao rim, com <7cm no maior diâmetro.
T2	Tumor confinado ao rim, com > 7cm no maior Diâmetro
T3a	Tumor envolvendo tecidos perinéricos, mas restrito à fascia de Gerota.
T3b	Tumor envolvendo a veia cava abaixo do diafragma.
T3c	Tumor envolvendo a veia cava, estendendo-se acima do diafragma.
T4	Invasão de estruturas adjacentes como músculo ou intestino.
Linfonodos (N)	
N0	Não há evidências de envolvimento linfonodal.
N1	Linfonodo único, ipsilateral.
N2	Metástase em mais que um linfonodo regional
Metástase (M)	
M0	Ausência de metástases
M1	Presença de metástase à distância
Estágio TNM	
I	T1N0M0
II	T2N0M0
III	T1N1M0, T2N1M0, T3N0M0, T3N1M0,
IV	T4N0M0, T4N1M0, qualquer N2, qualquer M1

Cerca de 30 % dos pacientes se apresentam com doença metastática, sendo os sítios mais comuns de metástase os pulmões (75%), tecidos moles

(36%), ossos (20%) e fígado (18%) (Maldazys et al., 1986). Comumente, os sintomas associados são relacionados ou ao tumor primário (dor, hematúria) ou a manifestações sistêmicas da doença, como anorexia, perda ponderal, fadiga e febre.

Tomografia computadorizada de tórax e abdomen, assim como cintilografia óssea são parte da avaliação inicial do paciente com doença metastática. Tais estudos permitem antecipar complicações clínicas e fornecem parâmetros quantitativos para monitorização de resposta à terapia. Tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética do encéfalo são indicados na presença de sintomas neurológicos. Outros testes clínicos possuem valor prognóstico e serão discutidos abaixo.

1.1.2 Fatores de prognóstico

Fatores de prognóstico constituem um pilar fundamental na prática da oncologia. Permitem que médico e paciente avaliem o mais adequadamente possível a gravidade da condição e julguem como diferentes intervenções podem modificar o risco de determinado desfecho.

Vários modelos prognósticos têm sido propostos. Dentre eles destaca-se o de uma série envolvendo 670 pacientes com CCR metastático tratados

predominantemente com baixas doses de citocinas (interleucina 2 e/ou interferon alfa) com sobrevida média de 10 meses. Nessa série, a proporção de pacientes vivos após 1 ano foi de 42%, após 2 anos, 20% e após 3 anos, 11%. Variáveis associadas com sobrevida mais curta em análise multivariada foram índice de função global de Karnofsky <80%, nível de desidrogenase láctica aumentado (>1,5 o limite superior de normalidade), anemia, nível corrigido de cálcio sérico >10 mg/dL e ausência de nefrectomia prévia. Estes cinco fatores de prognóstico combinados permitiram o estabelecimento de 3 grupos: pacientes sem nenhum desses fatores (risco favorável) tiveram sobrevida média de 20 meses, enquanto pacientes com 1 ou 2 desses fatores (risco intermediário) tiveram sobrevida média de 10 meses e aqueles com 3 ou mais fatores (alto risco) tiveram sobrevida média de 4 meses (Motzer et al., 1999).

Outro importante sistema prognóstico foi desenvolvido na Universidade da Califórnia em Los Angeles (UCLA), denominado *UCLA Integrated Staging System* (UISS). Tal sistema baseou-se em 814 pacientes submetidos a nefrectomia unilateral para tratamento de CCR naquela instituição entre 1989 e 2000, sendo que 346 (42%) apresentavam metástase à distância ou para linfonodos regionais. Esses pacientes receberam, em sua maioria, tratamento sistêmico com imunoterapia. Pacientes com doença metastática foram divididos em 3 categorias de acordo com o risco (baixo, intermediário e alto) definido de acordo com a classificação TNM, grau histológico do tumor de acordo com a classificação de Fuhman e índice de função global conforme

definido pela ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*). Entre os pacientes com doença metastática, a sobrevida em 1 ano foi de 85,3%, 62,8% e 20,2% e a sobrevida em 3 anos foi de 51,1%, 31,1% e 0% para os riscos baixo, intermediário e alto, respectivamente (Zisman et. al., 2002).

Mais recentemente, diversos autores têm tentado integrar dados da biologia tumoral a sistemas de prognóstico. Nesta iniciativa destacam-se a utilização de reação de polimerase em cadeia com transcriptase reversa (RT-PCR) para avaliação da expressão de múltiplos genes e sua organização em *clusters* (Yao et al., 2005) e o desenvolvimento da técnica de imunohistoquímica para a detecção de anidrase carbônica XI (CA IX) como importante preditor de resposta a terapia com interleucina 2 (Bui et al., 2003).

No entanto, é necessário enfatizar que tais sistemas prognósticos precisam ser revalidados ou mesmo novos sistemas prognósticos precisam ser desenvolvidos para incorporar as novas opções terapêuticas, também chamadas de tratamentos biológicos, que se encontram em pleno desenvolvimento.

1.1.3 Tratamento convencional do CCR

1.1.3.1 Quimioterapia convencional

Diversos agentes citotóxicos já foram usados como monoterapia ou terapia combinada no tratamento do CCR metastático. Diferentes classes de drogas têm sido uniformes em induzir nenhuma ou mínima resposta, com taxa média de resposta em torno de 6% (Yagoda et al., 1995). Vimblastina e 5-FU são as drogas mais ativas entre as previamente testadas e 5-FU foi testado em combinação com imunoterapia sem qualquer evidência de melhora nos resultados (Ravaud et al., 1998).

Novos agentes podem, teoricamente, melhorar as taxas de resposta no CCR com menor toxicidade. Gemcitabina, irinotecan, oxaliplatina, paclitaxel, capecitabina e ixabepilone, como drogas isoladas ou em combinação estão atualmente sendo testadas em estudos clínicos de fase 2, podendo tornar-se úteis no futuro, principalmente em combinação com novos agentes biológicos.

Recentemente, a combinação de capecitabina e gemcitabina produziu 15,8% de respostas parciais mas nenhuma resposta completa em 21 pacientes com CCR metastático, incluindo 19 pacientes previamente tratados com imunoterapia ou quimioterapia. A toxicidade mais importante observada foi hematológica, com 57% de neutropenia graus 3 ou 4 (Waters et al., 2004).

1.1.3.2 Citocinas

A ocorrência de raros casos de remissão espontânea em CCR metastático sugere que o sistema imunológico, em algumas circunstâncias, pode reconhecer células tumorais como não-próprias e organizar uma resposta imunológica efetiva (Snow et al., 1982).

Nos anos 80, essa observação levou a uma procura por agentes terapêuticos com potencial de ampliar essa resposta imunológica. Esta busca levou à descoberta de interleucina-2 (Watson et al., 1980), uma molécula naturalmente produzida por linfócitos T auxiliares tipo 1 (TH1) que induz linfócitos CD4 e CD8 a se ativarem e proliferarem, aumentando sua capacidade de reconhecer antígenos e de ampliar a população capaz de induzir citotoxicidade direta.

Tentativas iniciais de utilização de IL-2 como tratamento anti-câncer obtiveram resultados em apenas alguns pacientes com melanoma maligno ou CCR (Rosenberg, 1985). Esses estudos iniciais foram baseados na coleta de células T seguida de sua estimulação *in vitro* com IL-2 com o objetivo de produzir células matadoras ativadas por linfocinas (LAK) e reinfusão dessas células no paciente, seguida de administração sistêmica de altas doses de IL-2.

Quando expostos a IL-2, pacientes desenvolvem febre, erupções cutâneas, congestão de mucosas e uma síndrome de extravasamento capilar

que se caracteriza por edema e hipotensão, freqüentemente requerendo o uso de drogas vasoativas (Margolin et al. 1989). Esta síndrome pode se complicar com insuficiência renal, infecções e eventos coronários agudos. Embora bastante tóxico, o efeito de IL-2 em CCR metastático pode ser dramático, induzindo respostas completas e duradouras que podem, inclusive significar cura em alguns casos. Infelizmente tais respostas não são comuns. Em diferentes séries publicadas, apenas cerca de 15% dos pacientes obtiveram alguma resposta, sendo 5% respostas completas e que podem ser duradoura (Fyfe et al., 1995).

Maior experiência com IL-2, bem como com o melhor manejo das complicações, além de melhor seleção de pacientes, resultou em significativa redução da letalidade (Kammula et al., 1998). A administração de células LAK, um procedimento complexo e oneroso, mostrou-se desnecessária uma vez que o tratamento com altas doses de IL-2 parece ter similar resultados ao mesmo tratamento combinado à administração de células LAK (Rosemberg et al. 1993)

Estudos subsequentes utilizando baixas doses de IL-2 com ou sem interferon alfa (INF-alfa) produziram poucas respostas, em geral parciais e de curta duração (Atkins et al., 2004)

A importância da intensidade de dose de IL-2 foi abordada por um estudo clínico em que pacientes foram alocados aleatoriamente para receber altas doses ou uma dose 10 vezes menor de IL-2 intravenosa. Posteriormente adicionou-se um terceiro grupo tratado com baixas doses de IL-2 subcutânea.

Embora não tenha havido nenhuma morte associada ao tratamento, a morbidade foi maior no grupo que recebeu altas doses de IL-2. Este grupo também obteve maior taxa de resposta quando comparado a baixas doses endovenosas (21 vs. 13%, $P=0,048$) ou baixas doses subcutâneas (21 vs. 10%, $P=0,033$), mas não houve diferença significativa em termos de sobrevida (Yang et al., 2003).

Mais recentemente, um estudo de fase 3 envolvendo 192 pacientes com boa função global comparou altas doses de IL-2 endovenosa com baixas doses de IL-2 e INF-alfa subcutâneo. Houveram mais respostas no grupo que recebeu altas doses de IL-2 (23,2% vs. 9,9%, $P=0,018$) apesar de não haver diferença significativa na sobrevida média (17 vs. 13 meses, $P=0,211$). No entanto, entre os pacientes com nefrectomia prévia ($P=0,04$) ou com metástase hepática ou óssea ($P=0,001$) houve benefício para o grupo que recebeu altas doses de IL-2 (McDermott et al., 2005).

Os interferons (INF) são parte da defesa primária contra agentes infecciosos, vírus em particular. INF-alfa é naturalmente produzido por macrófagos e linfócitos e induz expressão de antígenos celulares de superfície, imunomodulação, assim como efeitos anti-proliferativos.

Em diferentes estudos de fase 2, INF-alfa recombinante produziu respostas objetivas em até 29% dos casos de CCR (Quesada et al., 1989). No entanto, diferente da IL-2, INF-alfa não possui o potencial de induzir curas e respostas completas são muito raras e de curta duração.

Em um estudo randomizado comparando INF-alfa com acetato de medroxiprogesterona, o tratamento com INF-alfa foi associado a uma pequena melhora de sobrevida (8,5 vs. 6 meses), mas pacientes tratados com INF-alfa tiveram mais sintomas e pior qualidade de vida (Medical Research Council Renal Cancer Collaborators, 1999).

Sintomas freqüentemente associados com administração de INF-alfa são mialgia, febre baixa, calafrios, artralgias e cefaléias. A lista de efeitos colaterais menos freqüentes é bastante ampla e pode incluir alopecia, depressão, fenômenos auto-imunes e citopenias (Medical Research Council Renal Câncer Collaborators, 1999).

Baseado nos estudos acima discutidos, podemos concluir que o tratamento com baixas doses de IL-2, endovenoso ou subcutâneo ou o tratamento com INF-alfa são alternativas aceitáveis para pacientes que não têm acesso ou não são elegíveis para estudos clínicos e que não são candidatos ao tratamento com altas doses, visando-se uma pequena chance de cura.

1.1.3.3 Transplante de células tronco

Baseando-se no conhecimento de que elementos do sistema imunológicos podem induzir respostas em CCR e na importância do efeito enxerto-versus-leucemia em pacientes que recebem um transplante alogênico de medula óssea ou de células tronco periféricas, tentativas foram feitas de se obter efeito enxerto-versus-tumor em RCC através de transplante alogênico não mieloablativo de células tronco periféricas.

Em um estudo inicial com 19 pacientes, 3 obtiveram resposta completa e 7 obtiveram resposta parcial. Dois pacientes, no entanto, morreram em consequência de eventos associados ao transplante (Childs et al., 2000). Séries mais recentes não mostraram o mesmo benefício (revisadas por Rini et al., 2004). Considerando-se a pequena chance de benefício, a alta complexidade e a toxicidade associada, o transplante alogênico de células tronco permanece um procedimento experimental e que não deve ser oferecido fora de estudos clínicos.

O desenvolvimento de formas alternativas de terapia celular e esforços para se diminuir a toxicidade associada a este procedimento podem, no futuro, fazer dessa uma melhor opção terapêutica para pacientes com CCR.

1.2 Aspectos moleculares do CCR e o desenvolvimento de tratamentos biológicos

Como previamente discutido, o tratamento do CCR avançado foi marcado nas últimas décadas do século XX por resultados desfavoráveis e ausência de novas opções terapêuticas.

Nos últimos anos, no entanto, o avanço do conhecimento da biologia tumoral e da tecnologia para desenvolvimento e teste de anticorpos monoclonais e “pequenas moléculas” têm trazido para a realidade clínica novas opções terapêuticas, possivelmente mais seguras e mais eficazes.

Os principais aspectos moleculares do CCR serão aqui revistos e discutidos com ênfase na identificação de potenciais alvos para terapia biológica.

1.2.1 CCR e o gene *VHL*

Melhor compreensão da biologia dos CCR foi estabelecida com o estudo de pacientes com Síndrome de von Hippel Lindau (VHL). Dentre as características clínicas mais marcantes dessa síndrome está uma maior

predisposição ao desenvolvimento de CCR, entre outros tumores tais como hemangioblastomas de fossa posterior ou canal medular, hemangiomas de retina, feocromocitomas, cistos pancreáticos, renais, epididimários e cocleares (Lonser et al., 2003).

Os portadores dessa síndrome apresentam perda constitucional de um alelo normal do gene *VHL* presente no cromossomo 3p25 (Seizinger et al., 1988; Latif et al., 1993). Tal perda se dá freqüentemente por mutações *misense* ou *nonsense*, havendo uma correlação entre o tipo e localização da mutação e as manifestações clínicas da síndrome (Hoffman et al., 2001).

A perda funcional do segundo alelo é a característica comum às diversas complicações da síndrome e se dá, freqüentemente, por uma segunda mutação esporádica ou por modificações epigenéticas como, por exemplo, metilação (Brauch et al., 2000; Kondo et al., 2002).

De maneira importante, em pouco mais da metade dos pacientes com CCR, mas que não são portadores da síndrome de von Hippel Lindau, os tumores apresentam perda funcional do gene *VHL* (Gallou et al., 1999; Brauch et al., 2000; Kondo et al., 2002). Na grande maioria desses casos, o *status VHL* (-/-) das células tumorais é o resultado de inativação ou perda somática de ambos os alelos de *VHL*.

A perda de função do gene *VHL* tem efeitos antiapoptóticos, pró-proliferativos e pró-angiogênicos no tecido tumoral. Isso se dá, ao menos em

parte, pelo fato de o gene *VHL* estar intimamente implicado no complexo processo de sinalização intracelular de hipóxia (Figura 1).

A proteína VHL contém dois domínios: um domínio constituído basicamente de hélices alfa que é responsável pela interação com um aglomerado proteico contendo elonguina B, elonguina C, Culina 2, RBX1 e proteína E2 formando o complexo ubiquitina ligase E3 (E3); e um domínio beta responsável pela interação com as diferentes proteínas a serem ubiquitinadas pelo complexo E3, o que confere especificidade ao sistema.

A ubiquitinação consiste na adição da proteína ubiquitina, uma molécula de 85kD altamente conservada em células eucarióticas, a um resíduo de lisina na proteína alvo. Tal marcação serve de sinalização para o proteossomo 26S proceder com a lise de determinada proteína (Kibel et al., 1995; Kishida et al., 1995; Lonergan et al., 1998; Kamura et al., 1999; Pause et al., 1999; Ciechanover et al., 2000).

Dentre os principais alvos de E3 está o fator induzido por hipóxia 1 α (HIF1- α). Essa molécula se localiza no centro do mecanismo de ajuste celular à concentração de oxigênio. Na presença de concentrações fisiológicas de oxigênio, o HIF1- α sofre hidroxilação em um resíduo prolina no domínio de degradação dependente de oxigênio (ODDD) e em um resíduo de asparagina, no domínio de transativação localizado na região C terminal (C-TAD). Essas hidroxilações levam ao “reconhecimento” da proteína pelo complexo E3 levando a ubiquitinação e degradação pelo proteossomo 26S.

Figura 1 – Função de pVHL na ubiquitinação proteica e na regulação da transcrição gênica desencadeada por hipóxia

Na presença de hipóxia, no entanto, tais hidroxilações não acontecem, permitindo o tráfego de HIF1- α para o núcleo da célula onde se dimeriza com HIF- β sofrendo posteriormente redução de um resíduo crítico de cisteína localizado no domínio C-TAD. Após sofrer tais modificações, HIF1- α é capaz de se ligar a elementos responsáveis a hipóxia (HRE) na região promotora de genes importantes para a sobrevivência celular em concentrações sub-fisiológicas de oxigênio.

Entre os genes cuja transcrição é aumentada em resposta à hipóxia estão o da eritropoetina, do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*), do receptor do fator de crescimento de hepatócitos (HGF) MET, de *p21*, da anidrase carbônica 9 e 12, assim como vários genes essenciais à glicólise, formação de colágeno, proliferação e regulação do ciclo celular.

Assim, a perda funcional do gene *VHL* inativa o mecanismo de degradação de HIF1- α , levando ao seu acúmulo e conseqüente aumento na transcrição de genes contendo HREs, sendo esse o passo fundamental na tumorigênese associada ao *VHL*.

O conhecimento do funcionamento do sistema VHL/HIF e principalmente da sua distorção no CCR indica vários potenciais alvos para terapia. Uma estratégia óbvia seria a inibição da produção ou da atividade de HIF, o que

ainda não se mostrou possível em células *VHL* (-/-). Mais próximo da realidade, no entanto, está o desenvolvimento de terapias que modifiquem vias ativadas por genes alvos de HIF, como VEGF e TGF- α .

A produção aumentada de VEGF no CCR com mutação do gene *VHL* e a importância de neo-angiogênese para o desenvolvimento do CCR motivaram estudos clínicos com o anticorpo murino humanizado bevacizumab que é capaz de ligar-se a todas as isoformas de fator de crescimento vascular endotelial A (VEGF-A). Esse anticorpo mostrou-se relativamente seguro no CCR e em outros tumores, sendo que os principais efeitos colaterais são reações transitórias relacionadas à infusão (como febre, calafrios e hipotensão), predisposição a hemorragias, fenômenos trombóticos, hipertensão e proteinúria.

Em um estudo inicial de fase 2 (Yang et al., 2003), pacientes com CCR foram tratados com placebo ou bevacizumab, administrado em 2 diferentes regimes de dose. Quatro dos 39 pacientes tratados com dose alta de bevacizumab tiveram resposta parcial. Respostas não foram verificadas em nenhum dos outros 2 grupos. Bevacizumab também estendeu o tempo para progressão de doença (4,8 vs. 2,5 meses, $P < 0,001$), mas sem impacto na sobrevida.

Outros importantes genes cujas expressões são estimuladas por HIF são o do fator transformador de crescimento α (TGF- α) e seu receptor, o receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) (Smith et al., 2005). A

sinalização por intermédio de EGFR e os modificadores farmacológicos desta via serão amplamente discutidos mais adiante.

1.2.2 - Outros genes associados ao CCR

Outras anormalidades genéticas têm sido descritas em CCR, em especial nos tumores que se apresentam com padrão histológico outro que não o carcinoma de células claras.

A partir da investigação de famílias com CCR do subtipo papilar tipo 1 foi possível identificar a presença do gene *c-MET* no cromossomo 7 como sendo o responsável por uma síndrome de comportamento hereditário (Zbar et al., 1994; Schmidt et al., 1997). Esse gene codifica o receptor para HGF com atividade de tirosina quinase. Mutações neste gene levando a ativação continua da atividade enzimática do receptor foram descritas em casos de CCR hereditário, assim como em casos esporádicos (Schmidt et al., 1999). Em casos esporádicos, nota-se a presença de trisomia do cromossomo 7 com duplicação não aleatória do alelo mutante do *c-MET* (Zhuang et al., 1998).

Pacientes com leiomiomatose hereditária possuem alto risco de desenvolverem leiomiomas uterinos e cutâneos assim como uma forma agressiva de CCR do subtipo papilar tipo 2. O gene responsável por essa

doença foi identificado como sendo o gene da enzima fumarato hidratase, essencial ao ciclo de Krebs (Tomlinson et al., 2002). Indivíduos afetados apresentam mutação germinativa de um alelo e a perda somática do segundo alelo no tecido tumoral. O mecanismo pelo qual este gene leva ao CCR, no entanto, permanece não esclarecido.

Pacientes com a síndrome de Birt Hogg Dubé (BHD) desenvolvem fibrofoliomas do folículo piloso, cistos pulmonares e tumores renais multifocais (Birt et al., 1977). Nessa síndrome, os tumores renais são do subtipo histológico cromofóbico, misto cromofóbico e oncocítico, exclusivamente oncocítico ou, mais raramente, carcinoma de células claras. O gene para BHD foi identificado e, embora acredite-se tratar-se de um gene supressor de tumor, sua função específica é ainda desconhecida (Nickerson et al., 2002). Vários outros genes têm sido implicados na biologia do CCR, destacando-se o gene da esclerose tuberosa tipos 1 e 2 (Benvenuto et al., 2000) e o gene *TRC8* (Gemmell et al., 2002).

1.2.3 Receptor do fator de crescimento epitelial e sua importância no CCR

Expressão aumentada de fatores de crescimento e de seus receptores são características comuns de muitos cânceres, em especial tumores epiteliais. Dentre as mais bem caracterizadas famílias de receptores de fatores de crescimento está a família ErbB (ou HER). Essa constitui-se de quatro diferentes subtipos de proteína transmembrana monoméricas (ErbB1 ou EGFR, ErbB2, ErbB3 e ErbB4), capazes de homodimerizar-se ou heterodimerizar-se mediante contato com a proteína ligante no domínio extracelular. O contato com o fator de crescimento desencadeia a ativação da tirosina quinase do receptor, levando à fosforilação de importantes sinalizadores de ativação celular.

Dentre os sistemas de sinalização intracelular ativados pelo EGFR, destacam-se a via Ras-Raf-MAP-quinase (Alroy et al., 1997) e a via do fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e seu alvo AKT (Liu et al., 1999). Tais vias modulam a apoptose, o ciclo celular e a proliferação celular (Mendelsohn et al., 2000) por mecanismos diversos e que, no CCR, passam pela modulação dos níveis de HIF (Smith et al., 2005).

Apesar de importante, por exemplo, na biologia do câncer de mama, nenhum ligante foi ainda identificado para ErbB2. Por sua vez, ErbB3 diferencia-se dos demais receptores por atuar exclusivamente na formação de heterodímeros com os demais receptores da família ErbB.

Recentemente, grande interesse tem se desenvolvido pelo EGFR, dada a sua importância em tumores de alta prevalência e/ou para os quais

tratamento adequado não está disponível, como câncer de pulmão, cabeça e pescoço, cólon, pâncreas e CCR. Isso tem levado ao desenvolvimento de drogas capazes de inibir a atividade de tirosina quinase e anticorpos monoclonais capazes de bloquear a ligação do fator de crescimento ao domínio extracelular do receptor (Baselga et al., 2005).

Expressão de EGFR é um evento comum e importante em CCR tendo sido demonstrado que a estimulação de EGFR tem efeitos pró-mitóticos em células renais malignas, assim como em células normais provenientes do túbulo renal (Gomella et al., 1989; Humes et al., 1991; Uhlman et al., 1995; de Paulsen et al., 2001). Em uma série envolvendo 168 casos de CCR com diferentes histologias, expressão de EGFR foi encontrada em 68% dos casos, e expressão de um de seus ligantes, TGF- α , foi encontrada em 50% das vezes. Nessa série, expressão de EGFR foi associada a grau histológico mais avançado e pior sobrevida (Uhlman et al., 1995). Sabe-se ainda que a produção de TGF- α é em parte controlada por HIF (Knebelmann et al., 1998), encontrando-se constitucionalmente ativa em células de CCR *VHL* (-/-), conforme demonstrado por Gunaratnam et al., 2003. Nesse estudo, utilizando a linhagem celular 786-0, defectiva para *VHL*, demonstrou-se que a ativação de HIF está estreitamente relacionada ao aumento dos níveis de mRNA para TGF- α e ao crescimento celular soro-independente. Esse fenômeno, contudo, pode ser bloqueado com a utilização de inibidor de EGFR. Tais achados não somente reforçam a importância da ativação de EGFR na manutenção do

câncer renal como também provêm suporte biológico à hipótese de que tratamento com um inibidor de EGFR pode ser efetivo em CCR.

Estudos clínicos envolvendo dois anticorpos monoclonais anti-EGFR (Cetuximab e ABX-EGF) encontraram baixíssimas taxas de resposta clínica de forma que, apesar de alguns estudos clínicos ainda em andamento, tais anticorpos não têm recebido muita atenção (Rowinsky et al., 2004; Motzer et al., 2003).

Outra forma de se neutralizar a atividade de EGFR é pelo bloqueio da atividade de tirosina quinase do receptor, causando desativação das vias de sinalização normalmente ativadas pelo EGFR. Neste sentido, duas diferentes moléculas (gefitinibe e erlotinibe) com tal propriedade foram submetidas a estudos clínicos. De maneira geral, tais drogas apresentam o mesmo perfil de toxicidade, incluindo diarreia, fadiga e acne (Dawson et al., 2004).

Em um estudo de fase 2 envolvendo 21 pacientes tratados com gefitinibe, doença estável foi documentada em 38% dos pacientes, todos eles com doença inicialmente progressiva (Dawson et al., 2004). O efeito de erlotinibe como agente único em CCR não é conhecido e estudos em andamento se concentram na combinação de erlotinibe com outros agentes biológicos.

Em estudo de fase 2 com 63 pacientes com CCR células claras metastático a combinação de bevacizumab e erlotinibe produziu 25% de respostas (incluindo 1 resposta completa) e 61% de doença estável por 8

semanas (Spigel et al., 2005). O tempo médio de sobrevida livre de progressão foi de 11 meses e a sobrevida média ainda não foi alcançada após seguimento médio de 16 meses. Neste estudo os efeitos adversos mais importantes foram sangramento digestivo, diarreia, acne e náusea. Tal combinação está atualmente sendo comparada a tratamento com bevacizumab como monoterapia em um estudo aleatorizado de fase 2.

1.2.4 Sistema de quinases proteicas ativadas por mitógenos

O sistema quinases proteicas ativadas por mitógenos (MAPK) representa o principal mecanismo de sinalização entre estímulos extracelulares e o núcleo. Tal sistema, altamente conservado evolutivamente, responde a vários estímulos, incluindo fatores de crescimento e estresse oxidativo levando a proliferação, apoptose e modulação do ciclo celular (Werlen et al., 2003; Wada et al., 2004). Dessa forma, a via de MAPK é não somente complexa como também ambígua, capaz de propagar sinais com efeitos antagônicos ou mesmo totalmente opostos dependendo do estímulo, do organismo e da interação com outros sistemas intracelulares (Seger et al., 1995; Chang et al., 2001; Wada et al., 2004).

Do ponto de vista bioquímico, as MAPKs são uma série de quinases que, mediante estímulo adequado, propagam um sinal de ativação através da fosforilação seqüencial dos resíduos de serina e/ou treonina. Classicamente, 3 famílias de MAPKs foram identificadas: quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinase NH2-terminal de c-Jun (JNK) e p38. Dentro de cada uma dessas famílias encontram-se subfamílias de quinases, freqüentemente, mas não sempre, com função redundante (Chang et al., 2001; Wada et al., 2004). A figura 2 ilustra as diversas famílias de MAPKs e identifica seus principais ativadores e alvos.

Figura 2 – Sistema de quinases ativadas por mitógenos com principais mediadores e substratos.

Mais recentemente, uma nova família de MAPKs foi identificada e caracterizada como possuindo grande similaridade com ERK1/2 tanto estrutural quanto funcionalmente, exceto pelo seu alto peso molecular, justificando a denominação inicial de grande MAPK1 (BMK1) (Zhou et al., 1995; Kamakura et al., 1999). Posteriormente renomeada ERK5, sua função fisiológica, assim como seu papel no câncer, se mostrou distinto de ERK 1/2, sendo esta uma área de intensa investigação (Kato et al., 1998; English et al., 1999; Dong et al., 2001; Pearson et al., 2001; Mulloy et al., 2003).

Similarmente a outras MAPKs, ERK5 é ativada por estímulos extracelulares, incluindo a ligação de EGF ao seu receptor (Kato et al., 1998; Esparis-Ogando et al., 2002) ou a ligação de Interleucina 6 ao seu receptor, como em linhagens celulares de mieloma múltiplo (Carvajal-Vergara et al., 2005). O mecanismo de sua ativação, contudo, não é totalmente conhecido, havendo evidências tanto no sentido de um mecanismo dependente de Ras, similar ao que acontece para ERK1/2 (English et al., 1999), quanto no sentido de um mecanismo independente de Ras (Carvajal-Vergara et al., 2005).

A ativação de ERK5 tem sido de várias formas implicada em câncer e em fenômenos celulares característicos de transformação maligna. Mulloy et al. demonstraram que a ativação de ERK5 leva ao aumento da transcrição e da

expressão da proteína ciclina D1 com importante impacto na modulação do ciclo celular em linhagens celulares de câncer de mama (Mulloy et al., 2003). Outros autores reportaram que ERK5, assim como seu principal alvo, o fator de transcrição MEF2 induzem proliferação (Kato et al., 1998; Dong et al., 2001; Esparis-Ogando et al., 2002), inibem apoptose (Liu et al., 2003) e participam da ativação de NF- κ B (Pearson et al., 2001), importante fator de transcrição com papel bem caracterizado na manutenção de diversas malignidades (Bharti et al., 2002; Aggarwal, 2004).

1.2.5 Inibidores de quinases proteicas com ação no CCR

Quinases estão presentes e são fundamentais em todas as vias de sinalização no câncer. A semelhança estrutural existente entre a quase uma centena de quinases identificadas no genoma humano, no entanto, faz com que inibidores de quinases apresentem com frequência atividade em múltiplas enzimas pertencentes à mesma via ou a vias paralelas de sinalização.

Há diversas evidências de que a via do RAS/RAF seja importante no CCR. Exemplos incluem deleção no braço curto do cromossomo 3 levando a ativação do RAF (Teyssier et al., 1986), mutações pontuais ativando H-RAS (Fujita et al., 1998) e ativação constitutiva de MAPK (Oka et al., 1995).

O composto Bay 43-9006 (sorafenib) mostrou-se inicialmente capaz de bloquear as quinases C-RAF e B-RAF *in vitro*. No entanto, experimentos posteriores baseados na atividade de quinases mostraram que este composto, em diferentes concentrações, também bloqueia outras quinases como VEGFR2, VEGFR3 e PDGF-B assim como FLT-3 e c-KIT (Ahmad et al., 2004).

Estudos de fase 1 em pacientes com diferentes tumores sólidos revelaram que diarreia, síndrome mão-pé e fadiga são as mais importantes formas de toxicidade. Estudo de fase 2 incluindo 63 pacientes tratados por ao menos 12 semanas obteve 25 respostas e 18 pacientes com doença estável (Ratain et al., 2004). Tal resultado desencadeou um amplo estudo internacional de fase 3 comparando sorafenib a placebo em pacientes refratários a tratamento com citocinas. Recente atualização desse estudo após inclusão de 769 pacientes mostrou apenas 2% de taxa de resposta no braço tratado com sorafenib apesar de significativo prolongamento na sobrevida livre de progressão (24 vs 12 semanas, $p < 0.00001$) (Escudier et al., 2005). Resultados quanto a sobrevida global ainda são aguardados.

Ainda não se sabe qual ou quais dos efeitos anti-quinase de sorafenib são responsáveis pelos resultados no CCR. Além de B-RAF, outros possíveis alvos são VEGFR2 e VEGFR3, uma vez que se sabe que VEGF tem importância fundamental na angiogênese em CCR (Tsuchiya et al., 2001), assim como PDGFR e c-kit.

SU11248 é também um agente anti-quinase oral que bloqueia a atividade de quinase de PDGFR, c-kit e Flt-3. Em estudo de fase 1, fadiga foi o efeito colateral mais comum a limitar a toxicidade e 3 dos 4 pacientes com CCR metastático incluídos tiveram resposta objetiva (Raymound et al., 2003). Dois diferentes estudos de fase 2, um com 63 pacientes e outro com 106 pacientes, foram recentemente reportados avaliando o emprego de SU11248 em pacientes com CCR que haviam progredido após terapia com citocinas. Tais estudos indicaram 40% e 39% de respostas objetivas. A sobrevida mediana foi de 16,4 meses no primeiro estudo e ainda não foi alcançada no segundo estudo (Motzer et al., 2005). Atualmente, um grande estudo internacional de fase 3 está comparando SU11248 com INF-alfa como primeira linha no tratamento do CCR avançado.

O composto oral PTK787/ZK 222584 foi desenvolvido como um inibidor seletivo de VEGFR-1, VEGFR-2, e VEGFR-3. Ele também inibe outras quinases como PDGF e c-Kit mas não possui qualquer atividade no EGFR ou no c-Abl por exemplo (Wood et al., 2000). Considerando que VEGF tem um papel fundamental na angiogênese em CCR, um estudo de fase 1 foi realizado para definir a máxima dose tolerada e a toxicidade, assim como buscar evidências preliminares de atividade do composto em CCR. Os efeitos colaterais mais comuns foram náusea e vômito, fadiga, tontura e cefaléia. Dentre os 37 pacientes avaliados para resposta, 7(19%) tiveram resposta

mínima ou parcial e outros 17 (46%) tiveram doença estável sugerindo que este composto é seguro e ativo em CCR (George et al., 2003).

O inibidor AG-013736 tem ação nos receptores de VEGF do tipo 1 e 2 assim como no receptor de PDGF- β . Em um estudo envolvendo 52 pacientes refratários a tratamento prévio com citocinas, AG-013736 foi capaz de induzir resposta objetiva em 46% dos pacientes com padrão aceitável de toxicidade. Essa droga encontra-se em estágio preliminar de desenvolvimento e aguarda-se o resultado de estudos mais amplos para a confirmação de sua eficácia (Rini et al., 2005).

1.2.6 Complexo de início de tradução

A tradução de moléculas de mRNA em polipeptídeos é um processo complexo e passível de modulação em diversas etapas, mas também um processo altamente conservado na escala evolutiva (Doudna et al., 2002; Ramakrishnan et al., 2002). Tradução pode ser dividida em três etapas, iniciação, elongação e término. Por iniciação entende-se o acoplamento de fatores de iniciação à extremidade 5' da molécula de mRNA, a junção do complexo ternário à subunidade 40S formando a subunidade 43S, a junção de 43S à molécula de mRNA e finalmente à subunidade 60S (formando uma

unidade 80S). Por elongação entende-se o repetitivo processo de acoplamento de novas moléculas de t-RNA carregadas com o aminoácido correspondente ao próximo códon da seqüência e o deslizamento progressivo do ribossomo ao longo da fita de mRNA até chegar a uma seqüência que codifique parada da tradução (UAA, UAG ou UGA). Com isso, ocorre o desacoplamento das unidades ribossômicas 40S e 60S da fita de mRNA (Doudna et al., 2002; Ramakrishnan et al., 2002).

Apesar de a tradução poder ser iniciada em uma porção interna da molécula de mRNA (denominada IRES – *internal ribosomal entry site*) ao invés de em sua extremidade 5', esta última é a mais importante forma de iniciação. Neste processo, o fator 2 de iniciação em eucariontes (eIF2) liga-se a GTP e a uma molécula de Met-tRNA_i^{met} formando o complexo ternário. A ligação do complexo ternário à subunidade 40S requer o fator 1A de iniciação em eucariontes (eIF1A) e o fator 3 de iniciação em eucariontes (eIF3) formando a subunidade 43S. Tal subunidade por sua vez irá ligar-se à extremidade 5' da molécula de mRNA identificada pela terminação (*cap*) m⁷GpppN e já associada a ao fator 4F de iniciação em eucariontes (eIF4F) (Preiss et al., 2003).

A formação de eIF4F é o principal ponto de regulação do complexo de início de tradução (CIT) e resulta da ligação do fator 4E de iniciação em eucariontes (eIF4E) ao fator 4G de iniciação em eucariontes (eIF4G). Embora eIF4E possa ser fosforilada com conseqüente ganho de função (Pyronnet et al., 1999), a regulação da sua atividade se dá principalmente pela ligação com

a proteína ligante 1 do fator de iniciação de tradução em eucarionte 4E (4EBP1), limitando a tradução (Richter et al., 2005), uma vez que tal ligação impede que eIF4E se ligue a eIF4G. Cabe citar que ao menos duas outras moléculas foram identificadas, 4EBP2 e 4EBP3, com atividade e função similares a 4EBP1 (Tsukiyama-Kohara et al., 1996).

O equilíbrio na ligação do fator 4E de iniciação em eucariontes (eIF4E) a 4EBP1 ou a eIF4G é ditado principalmente por dois fatores: a abundância de cada um dos elementos implicados e a fosforilação de 4EBP1. A molécula de 4EBP1 é passível de fosforilação seqüencial em ao menos 6 pontos distintos (Thr37, Thr46, Ser65, Thr70, Ser83 e Ser112) (Fadden et al., 1997; Heesom et al., 1998), tendo como efeito o desacoplamento com a molécula de eIF4E, uma vez que somente as formas menos fosforiladas são capazes de estabelecer ligação estável ao eIF4E.

Embora outras quinases possam fosforilar 4EBP1 (principalmente quinases pertencentes a rede de MAPK), o alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin*- mTOR) é a quinase efetora em quatro destes pontos (Thr37, Thr46, Ser65 e Thr70) (Schalm et al., 2003). A molécula de mTOR ocupa um papel central na regulação da tradução não só por regular a fosforilação de 4EBP1, como também por fosforilar a quinase de RPS6 p70 (p70S6K) levando à fosforilação da proteína ribossômica S6 (RPS6) permitindo sua interação com 43S e estimulando consequentemente a tradução.

A molécula de mTOR apresenta 2549 aminoácidos e uma estrutura complexa, sendo passível de várias interações, conforme detalhado na figura 3. Destacam-se um domínio com atividade de quinase proteica e o domínio HEAT, que permite interação com o cofator RAPTOR essencial para que mTOR exerça sua atividade de quinase. Outro domínio importante é o domínio FRB, localizado bem próximo ao domínio quinase e que interage com a proteína ligante de FK506 12 (FKBP12), sendo esta o transportador e cofator da rapamicina (Chiu et al., 1994) (Figura 3).

Figura 3 – Esquema da estrutura de mTOR destacando-se sua interação com FKBP12, seus sítios de fosforilação, sua interação com raptor e com seus substratos P70S6K e 4EBP1.

Rapamicina, por sua vez é o mais eficiente inibidor conhecido da atividade de mTOR, sendo capaz de bloquear sua atividade quinase em diferentes sistemas. Esta propriedade foi demonstrada não só pelo efeito bioquímico nos alvos de mTOR como também pelo bloqueio de atividades biológicas de mTOR, como proliferação e crescimento (Fingar et al., 2004).

Além da regulação pela disponibilidade de aminoácidos, o que se dá ao menos parcialmente pela interação entre mTOR e mLST8/GβL (Hay et al., 2004), a modulação da atividade de mTOR se dá pela sua interação com a proteína RHEB, uma GTPase ancorada a membrana citoplasmática capaz de promover a atividade quinase de mTOR (Saucedo et al., 2003; Stocker et al., 2003). RHEB sofre inibição pelo complexo formado pelas proteínas hamartina e tuberina (TSC1 e TSC2) implicadas na esclerose tuberosa. Muitos dos reguladores da função de mTOR o fazem direta e indiretamente pela fosforilação de TSC2. Como exemplo, a quinase dependente de AMP (AMPK) é um sinalizador de deprivação energética celular, levando a ganho de função de TSC2 e conseqüente diminuição da atividade de mTOR (Inoki et al., 2003). AKT, por sua vez, é o mais importante regulador de TSC2, levando a diminuição de função de TSC2 e conseqüente aumento da atividade de mTOR (Dan et al., 2002). Mais recentemente, uma conexão entre o sistema de MAPK e fosforilação de TSC2 foi também sugerida (Naegele et al., 2004; Ma et al., 2005). A regulação da atividade de mTOR e conseqüentemente da formação do CIT está detalhada na figura 4, com ênfase no importante papel que AKT

exerce assim como seus modificadores, especialmente PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10*).

O CIT, assim como suas vias de regulação, estão implicados na origem e manutenção de diversos tumores e representam uma possibilidade inovadora de intervenção terapêutica (Bjornsti et al., 2004). Isto se dá, ao menos em parte, pelo fato de uma importante fração de elementos responsáveis pelo crescimento celular, progressão do ciclo celular e resistência à apoptose, como c-myc, ciclina D1 e HIF (Hudson et al., 2002; Gera et al., 2004) serem traduzidos a partir de moléculas de mRNA contendo cap.

O fator de iniciação eIF4E é super expresso em diversos cânceres humanos, principalmente em estágios avançados (De Benedetti et al., 1999; Bjornsti et al., 2004) e há evidência de que eIF4E é, *per si*, oncogênico, sendo capaz de induzir um fenótipo maligno em diferentes tipos celulares (Lazaris-Karatzas et al., 1992). O papel de eIF4E na origem e manutenção de tumores ficou ainda mais claro em modelos experimentais desenvolvidos por Wendel et. al. (2004) e Ruggero et. al. (2004). No primeiro caso, Ruggero et al. utilizaram um modelo de linfoma murino demonstrando que eIF4E coopera com c-myc na indução e manutenção do tumor. O experimento de Wendel et. al. por sua vez demonstrou que a superexpressão de eIF4E simula perfeitamente o efeito de AKT em induzir tumorigênese e resistir a apoptose induzida por drogas citotóxicas com a diferença que, diferente de AKT, o efeito de eIF4E não pode

Figura 4 – Regulação da formação do complexo de início de tradução por sistemas de sinalização intra-celular.

ser inibido por rapamicina. Tal experimento demonstra não somente o papel de eIF4E como fator de transformação, como também o localiza abaixo de AKT e mTOR na sinalização moduladora de tradução.

Embora eIF4E pareça ser o integrador do efeito da sinalização celular na formação e função CIT, mTOR merece destaque por ser o principal regulador da atividade de eIF4E, RPS6 e, principalmente, por ser um alvo evidente e prontamente atingível para terapia anti-tumoral (Chan, 2004).

Apesar de mutações levando a hiperatividade intrínseca de mTOR não terem sido descritas no câncer humano, sua função se encontra ampliada em diversas condições associadas com tumorigênese, como a esclerose tuberosa, mutações com perda de função de PTEN ou mesmo na ativação constitucional de receptores que sinalizam através da via do AKT, com conseqüente estímulo de proliferação, resistência a apoptose e progressão do ciclo celular (Neshat et al., 2001; Tee et al., 2003; Stocker et al., 2003; Avdulov et al., 2004).

Além de um efeito anti-tumoral intrínseco, levando, entre outras coisas, a diminuição na formação de complexos de ciclina/CDK e acúmulo de p27 com conseqüente parada do ciclo celular em G1 (Garber, 2001; Hidalgo et al., 2000), rapamicina e seus análogos parecem ser ainda sinérgicos a diferentes agentes citotóxicos *in vitro* e em modelos animais (Mondesire et al., 2004).

Diversos análogos de rapamicina encontram-se em desenvolvimento, alguns em fase 1 e fase 2 de estudos clínicos, com evidência de atividade em diversos tumores, incluindo CCR (Atkins et al., 2004; Raymond et al., 2004) .

A molécula CCI-779 é um éster hidrossolúvel (e portanto administrável por via endovenosa) de rapamicina. Em um estudo de fase 2 (Atkins et al., 2004), 111 pacientes foram tratados com CCI-779 observando-se 7% de respostas sendo 1 resposta completa. O tempo médio para progressão foi de 5,8 meses e a sobrevida média foi de 15 meses. Os efeitos adversos mais comuns foram erupções cutâneas, mucosite e náusea.

Em um futuro próximo, o desenvolvimento da estratégia de inibição do CIT deve envolver o desenvolvimento de novos análogos da rapamicina como RAD001 e AP23573, assim como a combinação desses agentes a imunoterapia, quimioterapia citotóxica e/ou novos agentes biológicos.

Em síntese, múltiplas intervenções biológicas se encontram em ativo desenvolvimento no tratamento do CCR e seus mecanismos estão sintetizados na figura 5. Dentro deste contexto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de melhor entender a sinalização celular em CCR e sua estrita relação com o CIT a fim de contribuir para o desenvolvimento de novas terapias biológicas.

Figura 5 – Diferente estratégias de tratamento biológico do CCR.

Objetivos

2 Objetivos

1- Caracterizar o efeito *in vitro* da inibição da via de MAPK sobre os elementos do complexo de início de tradução.

2- Caracterizar o efeito *in vitro* do inibidor de EGFR gefitinibe em diversas vias de sinalização celular.

3- Determinar o efeito da inibição de EGFR e da via de MAPK no crescimento de linhagens celulares de CCR de forma isolada ou em combinação com rapamicina.

Métodos

3 Métodos

O presente trabalho foi realizado na *Division of Medical Oncology, University of Colorado Health and Science Center*, como parte de um projeto temático financiado pelo *National Institute of Health* dos EUA.

Experimentos relacionados à modificação da fosforilação proteica foram baseados na cultura de linhagens celulares sob condições especificadas para cada experimento, seguida de realização de *western blotting* e avaliação qualitativa da presença da proteína de interesse.

Para a caracterização do efeito da inibição da via de MAPK sobre a transcrição dos genes 4E-BP1 e 4E-BP2 utilizou-se de reação de polimerase em cadeia quantitativa com o uso de transcriptase reversa (qRT-PCR).

O efeito das drogas UO126 (inibidor de MEK1, MEK2 e MEK5), gefitinibe e rapamicina, isoladamente ou em combinação na inibição do crescimento de linhagem celulares de interesse foi determinado a partir de ensaios de crescimento *in vitro* conforme detalhado abaixo.

3.1 Linhagens celulares

O presente trabalho utilizou 8 linhagens celulares de CCR. As linhagens SKRC-02, SKRC-17, SKRC-39 and SKRC-45 foram obtidas junto ao banco de linhagens celulares tumorais do Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NY, NY e foram mantidas em meio RPMI-1640 com adição de 10% de soro bovino fetal (SBF).

A linhagem ACHN foi mantida em meio McCoy adicionado de 15% de SBF e a linhagem KRCY foi cultivada em meio híbrido contendo 50% de RPMI-1640 e 50% de meio F12, ao qual foi adicionado 15% de SBF.

As linhagens celulares WT8 e PRC3 são derivadas da linhagem 786-O (mutante para VHL) e contêm um vetor controle (PRC3) ou um vetor estável no qual está inserido *wt-VHL* (WT8) de forma que estas linhagens são idênticas exceto quanto à presença de um gene *VHL* funcional. Estas linhagens celulares foram mantidas em meio Dulbecco modificado (DMEM) adicionado de 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1000 µg/ml de G418 em condições padrões, a 37°C em atmosfera umidificada contendo 10% de CO₂.

As demais linhagens celulares foram mantidas nas mesmas condições, exceto pela atmosfera com 5% de CO₂.

Por meio de análise de polimorfismo de microssatélite realizada previamente no mesmo laboratório (Gemmil et al., 2005), as linhagens celulares provaram pertencer a diferentes clones (exceto PRC3 e WT8).

O gene *VHL* foi previamente seqüenciado em todas as linhagens celulares pelo núcleo de seqüenciamento do *University of Colorado Cancer Center* (Quadro 2), como descrito em Gemmill et al., 2005.

Quadro 2 – Seqüência do gene *VHL* nas linhagens celulares utilizadas

Linhagem celular	Status do gene VHL
PRC3	ΔG104-f.s.
SKRC-02	S68P
SKRC-17	S68->parada
SKRC-39	wt
SKRC-45	R82P
KRCY	wt
ACHN	wt

f.s. = *frame shift*.

3.2 Inibidores e drogas

Nos diversos experimentos utilizamos as seguintes drogas e inibidores:

1 -Rapamicina (Sigma, Inc) é um macrolídeo com fórmula química C₅₁H₇₉NO₁₃ e peso molecular de 914.2 d, solúvel em DMSO ou metanol que

possui a capacidade de associar-se a FKBP-12 e inibir a atividade quinase do complexo mTOR-raptor (Chan, 2004).

2 - UO126 (Promega Inc) possui formula molecular $C_{18}H_{16}N_6S_2$ e peso molecular de 380.5 d sendo solúvel em DMSO. UO126 inibe MEK1 e 2 assim como MEK5 (Favata et al., 1998).

3 – Gefitinibe (AstraZeneca, Inc) é um potente e específico inibidor da atividade de tirosina quinase do EGFR, mas que também apresenta atividade inibitória sobre outras quinases (*erbB*-2, PKC, MEK-1 e ERK-2) somente atingida em concentrações não-farmacológicas (Baselga et al., 2000).

3.3 Western blotting

Western blotting é o método fundamental para detecção e avaliação qualitativa de uma proteína em determinada amostra. Esse método fundamenta-se na homogeneização da amostra a ser avaliada (cultura celular ou fragmento de tecido, por exemplo) e tratamento com um tampão que mantenha as propriedades químicas do homogeneizado, mas que também evite proteólise ou defosforilação das proteínas de interesse. Desta forma, após separação por peso molecular aparente em gel de poliacrilamida e transferência para uma membrana permeável, proteínas podem ser detectadas

e sua abundância comparada entre diferentes amostras com o uso de anticorpos marcados. Esse procedimento pode responder, por exemplo, se determinado tratamento ao qual a linhagem celular foi exposta alterou a quantidade da proteína de interesse. Outra possibilidade adicional e explorada neste trabalho é o emprego de anticorpos específicos dirigidos a resíduos fosforilados na proteína de interesse a fim de mostrar alteração de fosforilação com determinado tratamento.

No presente trabalho, após cultivo em placas de *Petri* nas condições adequadas para cada experimento, as culturas celulares foram lavadas com solução tampão (PBS) e então congeladas a -80°C como método de preservação.

Lisados proteicos foram preparados a partir das placas com a adição de quantidade variável de um tampão capaz de prevenir defosforilação e proteólise contendo:

- Aprotinina 5 ug/ml
- Leupeptina 5 ug/ml
- Pepstatina A 1 ug/ml
- PMSF 1 mM
- DTT 5 mM
- NP-40 0,5%
- 1,10-fenantrolina 1 mM
- N-etilmaleimida 10 mM

-Ortovanadato de sódio ativado 1 mM

-NaF 1 mM NaF

-MgCl₂ 2 mM

-NaCl 150 mM

-Tris-HCl com pH 7,2 25 mM.

Após homogeneização mecânica, a concentração total de proteína foi determinada pelo método de Bradford. Amostras contendo 1ug/ul de proteína foram denaturadas com tampão Laemmli a 90°C por 3 minutos. Realizou-se então eletroforese em gel de poliacrilamida com concentrações variáveis entre 6% e 15% de acordo com o peso molecular aparente da proteína de interesse. Para tal, utilizou-se tampão contendo tris 25mM, glicina 200mM e duodecil sulfato de sódio (SDS) 3,5mM e corrente elétrica continua com diferença de potencial fixa de 100 V.

Os produtos de eletroforese foram então transferidos para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) em tampão contendo metanol a 20%, tris 25mM e glicina 150mM por meio de elétrica continua com diferença de potencial fixa em 80V mantida por um período de 80 minutos. As membranas foram então tratadas com PBS contendo 0,1% Tween-20 e 10% de leite em pó livre de gordura por um período de 60 minutos a fim de prevenir ligação inespecífica dos anticorpos a serem aplicados.

Seguiu-se a exposição das membranas a anticorpos primários diluídos na concentração adequada ao anticorpo em questão em solução contendo 5% de albumina sérica bovina por 12 horas a 4°C ou por 4 horas a temperatura ambiente. Após o tratamento com anticorpo primário, as membranas foram lavadas com PBS/0,1% Tween-20 por 15 minutos e expostas a solução com anticorpo secundário diluído para a concentração indicada em PBS contendo 0,1% Tween-20 e 1% de leite em pó livre de gordura por período de 60 minutos.

Todos os anticorpos secundários eram conjugados a *horseradish peroxidase* (HRP) permitindo a emissão de luz mediante contato com o reagente ECL *Lightning Plus* (Amersham, Inc.) por período de 1 minuto. As membranas foram então colocadas em contato com o filme radiográfico *Blue lite autorad film* (iscBioExpress®, Inc) por período de tempo variável e necessário para a detecção do sinal de interesse.

Os anticorpos primários e secundários utilizados estão especificados no quadro 3.

3.4 Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste na amplificação e detecção de uma determinada sequência específica de DNA (*template*) presente na amostra em estudo. Tal método requer que ao menos parte da sequência pesquisada seja conhecida e possa servir como *primer*. A reação requer ainda uma DNA polimerase resistente a altas temperaturas assim como quantidade abundante dos quatro nucleotídeos (A, C, T, G). Desta forma com a alternância programada de temperatura ocorre a separação das fitas de DNA, acoplamento dos *primers*, e adição sequencial de nucleotídeos realizada pela DNA polimerase.

Quadro 3 – Anticorpos primários e secundários utilizados na realização de *western blots*.

Origem	Especificidade	Fornecedor	Concentração	Identificador
Primários				
Coelho	P-S6 ^{S235/236}	Cell signaling	1:2000	2211
Coelho	RPS6	Cell signaling	1:2000	2212
Coelho	P-ERK1/2 ^{T202/Y204}	Cell signaling	1:2000	9141
Coelho	ERK1/2	Promega	1:5000	V1141
Coelho	P-AKT ^{S473}	Cell signaling	1:2000	9271
Coelho	AKT	Cell signaling	1:2000	9272
Coelho	4EBP1	Cell signaling	1:2000	9452
Coelho	P-P70S6K ^{T421/S424}	Cell signaling	1:2000	9204
Coelho	ERK5	Cell signaling	1:2000	3372
Camundongo	α -Tubulina	Lab Vision	1:2000	MS-719
Secundários				
Cabra	Coelho	Cell signaling	1:2000	7074
Cabra	Coelho	PerkinElmer	1:5000	NEF812
Cabra	Camundongo	PerkinElmer	1:5000	NEF822

O método de PCR quantitativo com emprego de transcriptase reversa (qRT-PCR) permite a quantificação de determinado mRNA presente na amostra. Este método se baseia na utilização da enzima transcriptase reversa, permitindo a síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de uma sequência de mRNA. Dessa forma, a quantidade de cDNA sintetizada será proporcional a abundância de mRNA para determinado gene ou sequência e servirá de *template* para a reação de PCR convencional. Na reação de PCR que se segue, a quantidade de DNA sintetizada é proporcional a abundância do template, permitindo a quantificação indireta de determinado mRNA.

O presente trabalho utilizou qRT-PCR para detectar alteração nos níveis de mRNA de 4EBP1 e 4EBP2 após tratamento de linhagens celulares com um inibidor de MAPK. O gene GAPDH foi utilizado como controle. Culturas celulares (PRC3, WT8, ACHN, SKRC-39) com aproximadamente 50% de confluência foram submetidas ao tratamento apropriado (veículo ou UO126) por 24 horas e em seguida lavadas com PBS e congeladas a -80°C . À partir das amostras congeladas, procedeu-se a extração de RNA utilizando-se o kit Rneasy® (Qiagen, Inc.)

A cada uma das placas de *Petri* adicionou-se 350ul do tampão RLT com 1% β -mercapto-etanol. O conteúdo de cada uma das placas foi então coletado em tubo de ensaio de 2ml e então homogeneizado com o uso de vortex por 30 segundos. Adicionou-se a cada uma das amostras 350ul de etanol a 70%. Cada amostra foi então transferida para a mini-coluna Rneasy e centrifugada

por 15s a 8000g. A coluna, contendo então RNA fixado a uma matriz de sílica, foi lavada com 350 ul do tampão RW1 por centrifugação por 15s a 8000g.

Para obtenção de RNA com maior grau de pureza, procedeu-se a digestão do DNA no produto fixado à coluna de sílica. Para tanto, adicionou-se a cada amostra 10ul de Dnase I (Qiagen, Inc.) em 70ul de tampão RDD, permitindo-se incubação por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, lavou-se a coluna com 350 ul do tampão RW1 por centrifugação por 15s a 8000g.

Após a digestão do DNA a coluna foi transferida para um novo tubo de ensaio de 2ml e lavada 2 vezes seguidas com 500ul do tampão RPE por centrifugação por 15s a 8000g. O RNA foi então eluído da coluna de sílica em 50ul de água livre de rnase por centrifugação por 1 minuto a 8000g. A integridade do RNA obtido de cada amostra foi então checado por eletroforese em gel de agarose contendo bromo-deoxi-uridina.

Para a síntese de cDNA, 2ul (aproximadamente 2ug) do produto obtido da extração de RNA foram adicionados a 0,7ul de hexâmeros randômicos e água para um volume final de 13ul. A amostra foi então aquecida a 70°C por 5 minutos seguindo-se resfriamento a 0°C. Adicionou-se a cada amostra 1ul de DTT a 0,1M, 4ul de tampão com concentração 5X e 1 ul de deoxi-nucleotídeo-tri-fosfato (dNTPs) aquecendo-se a solução final a 25 °C por 2 minutos. Em seguida adicionou-se 1ul da enzima SuperscriptII (Qiagen Inc.) e a solução foi mantida a 25°C por 10 minutos e então a 42°C por 50 minutos e a 70°C por 15

minutos. O produto final contendo cDNA foi então mantido em temperatura ambiente até a preparação da reação de qRT-PCR

Para a reação de qRT-PCR utilizou-se 0,5ul do cDNA obtido na etapa anterior. Ao cDNA foi adicionado 1,6mM de Mg^{++} , 200uM de dNTPs, 0,1 uM de *primers* e 0,1 ul da enzima AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Wellesley, MA, USA). Após uma etapa de aquecimento a 95°C por 10 minutos para inativação da DNA polimerase procedeu-se 35 ciclos de qRT-PCR de dois estágios, sendo 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As sequências dos *primers* utilizados foram 4EBP1: forward CCC GGG AGG TAC CAG GAT C, reverse TCT TCT GGG CTA TTG CGC AG; 4EBP2: forward TCT GTT GGA TCG TCG CAA TTC, reverse GCA TCA TCC CCA ACT GCA TG; GAPDH: forward TGC ACC ACC AAC TGG TAG C, reverse GGC ATG GAG TGT GGT CAT GAG. Todas as reações foram realizadas em duplicata. A quantificação do produto da reação de qRT-PCR foi realizada pelo equipamento GeneAmp® 5700 sequence detector (Applied Biosystems).

3.5 Ensaios de crescimento

Culturas celulares foram semeadas em placas de 96 cavidades, com aproximadamente 5000 células por cavidade. Após 24 horas foram adicionados

rapamicina (concentrações finais de 0, 0,2, 1 e 5 nM) em combinação com diferentes concentrações de UO126 (concentrações finais de 0, 2,5, 10 e 40 uM) ou gefitinibe (concentrações finais de 0, 0,05, 0,2 e 1 ug/ml). As placas foram então mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ por um período de 5 dias permitindo crescimento da cultura celular sob ação da(s) droga(s) utilizadas.

Após esse período, mediu-se a quantidade de células viáveis em cada amostra adicionando-se a cada uma das cavidades 20ul de *Cell titer 96*® (Promega, Inc.). Após incubação por 2 a 4 horas nas condições físicas acima descritas, procedeu-se a leitura das placas (figura 6) em leitor óptico padrão (Molecular Devices, Inc.).

Figura 6 – Aparência da placa com 96 cavidades (das quais 54 estão sendo utilizadas) preparada para leitura óptica.

O método colorimétrico acima descrito baseia-se no fato de que o composto MTS presente em *Cell titer 96*® é reduzido por NADPH ou NADH, presente em células viáveis, em um composto formazan, solúvel em meio de cultura celular. A quantidade do produto formazan é medida por absorbância de luz a 490nm e é proporcional à quantidade de células viáveis na amostra.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.6 Análise estatística

Para os ensaios de crescimento, reportou-se o crescimento proporcional para cada combinação de concentração de droga e linhagem celular empregada. O crescimento proporcional foi calculado como sendo a razão entre a média das densidades ópticas obtidas a 490nm e a média das densidades ópticas obtidas nas mesmas condições e na mesma linhagem celular nas amostras controles (sem qualquer tratamento).

O crescimento proporcional para cada droga foi reportado de forma gráfica com indicação dos respectivos desvios padrões.

Para comparação entre crescimento proporcional sob tratamento com diferentes drogas e combinações de drogas em um mesmo grupo utilizou-se análise de variância (ANOVA). Nas circunstâncias em que tal teste estatístico

evidenciou diferença entre os grupos incluídos, procedeu-se a identificação dos pares que apresentam diferença entre si utilizando-se do método de Student-Newman-Keuls para comparação entre múltiplos grupos. Todos os testes foram bicaudados e considerados significantes quando $P < 0,05$.

Os *softwares* NCSS2000 *Stat System* (NCSS, Kaysville, Utah, USA) e *Microsoft Excel*® foram utilizados no processamento estatístico dos dados.

Resultados

4 Resultados

4.1 Efeito da inibição da via de MAPK na fosforilação de RPS6

Com o intuito de investigar se a inibição da via de MAPK poderia interferir com a atividade de mTOR e, mais especificamente, com a formação do CIT, 6 diferentes linhagens celulares (PRC3, WT8, ACHN, SKRC-30, SKRC-17 e SKRC-45) foram tratadas por 24 e 48 com o inibidor de MAPK UO126 ou com o veículo (DMSO) (Figura 7). Notou-se a intensa diminuição na fosforilação de ERK1/2 com o tratamento em todas as linhagens celulares, exceto em SKRC-39 devido à completa ausência de fosforilação de ERK 1/2 nesta linhagem celular. Em 3 destas linhagens celulares (PRC3, WT8 e SKRC-45) notou-se uma diminuição na fosforilação de RPS6 com o passar do tempo (comparação entre DMSO 24h e DMSO 48h) mesmo na ausência de tratamento. Apesar deste efeito, nota-se que tratamento com UO126 levou a decréscimo na fosforilação de RPS6 tanto após 24 quanto após 48 horas, na maioria das linhagens mas não em PRC3. Como esperado, tratamento com UO126 não afetou a fosforilação de AKT.

Quanto ao efeito do tempo na fosforilação de RPS6, fez-se a hipótese que tal fenômeno se daria por inibição induzida pelo aumento de confluência

Figura 7- Efeito do tratamento de 6 linhagens celulares de CCR com UO126 (20uM) sobre a fosforilação de RPS6, ERK 1/2 e AKT. Nota-se o efeito do tempo na fosforilação de RPS6 em algumas linhagens como PRC3, WT8 e SKRC-45 (comparação entre DMSO 24h e DMSO 48h). Observa-se também que tratamento com UO126 levou a decréscimo na fosforilação de S6 tanto após 24 quanto após 48 horas na maioria das linhagens mas não em PRC3. Como esperado, tratamento com UO126 reduziu dramaticamente a fosforilação de ERK 1/2, mas não afetou a fosforilação de AKT.

no meio, com conseqüente inibição de importante vias de sinalização celular ou pelo esgotamento de nutrientes ou fatores de crescimento do meio de cultura. De fato, culturas da linhagem celular WT8 foram mantidas até aproximadamente 70% de confluência (figura 8, painel esquerdo) e à partir de então coletadas após diferentes intervalos de tempo pelas próximas 48h mostraram uma gradativa diminuição da fosforilação de RPS6, apesar da manutenção da fosforilação de ERK1/2 e AKT.

Para melhor diferenciar o efeito da confluência do possível esgotamento de nutrientes do meio, repetiu-se semelhante experimento (figura 8, painel direito) mostrando diminuição da fosforilação de RPS6 após 48 horas. Neste caso, contudo, a substituição do meio de cultura restaurou a fosforilação de RPS6 e mesmo estimulou a fosforilação de ERK1/2, demonstrando que a ausência de algum elemento crítico, e não a confluência da cultura celular é o responsável pelo efeito em RPS6. Observou-se ainda (figura 8, painel direito, amostras 7 e 8) que a adição de SBF aumentou apenas modestamente a fosforilação de RPS6 enquanto a reposição parcial do meio de cultura teve

Figura 8— Efeito da confluência celular e da privação de nutrientes na fosforilação de RPS6. Culturas celulares da linhagem WT8 com 70 % de confluência (painel esquerdo) foram mantidas e coletadas após diferentes períodos de tempo e diferentes graus de confluência. Em experimento semelhante (painel direito), culturas com 70% de confluência foram coletadas imediatamente (amostra 1), ou mantidas por adicionais 48 h em meio de cultura contendo 10% SBF (amostra 2) seguindo-se reposição completa do meio de cultura e coleta após diferentes períodos de tempo (amostras 3-6) ou somente adição de 10% SBF (amostra 7) ou somente reposição parcial do meio de cultura sem adição de SBF (amostra 8).

efeito mais pronunciado. Isso sugere que o esgotamento de algum componente do meio de cultura seja o responsável pela defosforilação de RPS6 observada com o tempo no experimento ilustrado na figura 7.

Para melhor elucidar a latência para a inibição da fosforilação de RPS6 pela inibição de MAPK, culturas de 3 linhagens celulares (WT8, SKRC-39 e SKRC-45) foram tratadas com UO126 ou com veículo por 2 ou por 24 h (figura 9). O efeito em questão foi notado após 24 mas não após 2 horas de tratamento.

Com o intuito de demonstrar que a inibição de MAPK afeta a fosforilação de RPS6 através da inibição de mTOR e de seu alvo, p70S6K, 6 diferentes linhagens celulares foram tratadas com UO126 ou veículo por 24h. Como demonstrado na figura 10, a inibição da fosforilação de RPS6, em todas as 4 das 6 linhagens celulares em que ocorreu, se acompanhou de diminuição da fosforilação de p70S6K.

Figura 9 - Diminuição da fosforilação de RPS6 após 24 h mas não após 2 horas de tratamento com UO 126.

Figura 10 - Fosforilação de P70S6K é inibida por Uo126 e leva a diminuição da fosforilação de RPS6. Culturas celulares foram mantidas por 24 h em meio com UO126 (20uM) ou com equivalente quantidade do veículo (DMSO). (*exposição breve).

4.2 Efeito da inibição de MAPK na fosforilação de 4EBP1

Para demonstrar-se o efeito da inibição de MAPK na fosforilação e no nível de 4EBP1, 4 linhagens celulares (ACHN, SKRC-39, PRC3 e WT8) foram tratadas com UO126 ou veículo por 24 horas (figura 11) e a quantidade e a fosforilação da proteína foram avaliados por western blotting. Como peculiaridade, as formas mais fosforiladas de 4EBP1 apresentam migração eletroforética mais lenta, distinguindo-se como bandas proteicas localizadas acima da banda correspondente à forma não fosforilada. Observou-se mudança no padrão de bandas no sentido das formas menos fosforiladas de 4EBP1 em SKRC-39 e WT8.

Figura 11 – Efeito de UO126 na fosforilação de 4EBP1. Formas mais fosforiladas de 4EBP1 apresentam migração mais lenta permitindo distinção das formas menos fosforiladas.

Figura 12 – Efeito de UO126 no nível de mRNA para 4EBP1 e 4EBP2. Culturas celulares foram mantidas por 24h em meio contendo veículo controle (DMSO) ou UO126 (20uM), mRNA foi quantificado por qRT-PCR e reportado como fração da expressão do gene *GAPDH*.

4.3 Efeito da inibição de MAPK no nível de mRNA de 4EBP1 e 4EBP2

De acordo com um experimento realizado em linhagens celulares de tecido hematopoiético (Rolli-Derkinderen et al., 2003), a inibição do sistema MAPK pode levar ao aumento dos níveis de 4EBP1, com conseqüente alteração do equilíbrio entre 4EBP1, eIF4E e eIF4G e inibição da tradução dependente de cap. Para avaliar se tal fenômeno pode ocorrer em linhagens celulares de CCR, realizamos RT-PCR quantitativo para mensurar o nível de m-RNA para 4EBP1 e 4EBP2 na ausência ou presença de tratamento com UO126 (figura 12). Observou-se que, tanto para 4EBP1 quanto para 4EBP2, não houve mudança na produção de m-RNA em 3 das linhagens celulares (SKRC39, PRC3 e WT8) enquanto que houve aparente diminuição na linhagem ACHN, embora esta diminuição não tenha sido significativa.

4.4 Efeito *in vitro* de rapamicina e gefitinibe na fosforilação de RPS6, ERK1/2 e AKT

Para determinar os efeitos de duas drogas com potencial terapêutico (rapamicina e gefitinibe) sobre a atividade de mTOR (aqui medida indiretamente pela fosforilação de RPS6) e sobre mediadores das vias de MAPK e PI3K as linhagens celulares PRC3 e WT8 foram tratadas por 2 horas com rapamicina, gefitinibe ou veículo (figura 13).

Figura 13 - Efeito de Rapamicina e Gefitinibe na fosforilação de ERK1/2, AKT e RPS6. Culturas celulares foram tratadas por 2 horas com rapamicina (10nM), Gefitinibe (5uM) ou quantidade equivalente do veículo DMSO.

Como esperado, rapamicina inibiu completamente a fosforilação de RPS6 em ambas as linhagens celulares sem qualquer efeito em AKT ou ERK1/2. Gefitinibe, por sua vez, inibiu a fosforilação de ERK1/2 em WT8, mas não em PRC3, como previamente demonstrado (Gemmill et al., 2005), e não afetou a fosforilação de AKT em nenhuma das linhagens celulares examinadas.

4.5 Efeito de gefitinibe na ativação de ERK1/2, ERK5 e AKT mediada por EGF em CCR

Com o intuito de isolar o efeito de EGF na ativação de ERK1/2, ERK5 e AKT em diversas linhagens celulares de CCR e avaliar o efeito do tratamento com gefitinibe e UO126 na inibição destes mediadores, células da linhagem SKRC-17 com aproximadamente 70% de confluência foram transferidas para meio de cultura com ausência de SBF, mantidas por 24 horas e então estimuladas com EGF, em diferentes concentrações e por diferentes períodos de tempo. Como demonstrado na figura 14, máxima fosforilação de ERK5 se deu com a concentração de 20ng/ml e após período de 20 minutos.

Figura 14 - Resposta da fosforilação de ERK5 a diferentes doses e diferentes tempos de tratamento com EGF. Células SKRC-17 foram mantidas em meio sem soro por 24 h. Seguiu-se tratamento com EGF por 10 minutos nas diferentes concentrações indicadas (painel superior), ou tratamento com EGF 10uM pelos diferentes períodos indicados (painel inferior).

Realizou-se em seguida experimento semelhante (figura 15) onde após a deprivação de soro por 24 horas, cultura da linhagem celular *wt-VHL* ACHN e a linhagem mutante SKRC-17 foram estimuladas com EGF(25ng/ml), antecedido ou não de tratamento por 1 hora com gefitinibe (5uM) ou UO126 (20uM), ou estimuladas com HGF (50ng/ml) ou VEGF(10ng/ml).

Nestas condições, EGF levou a importante aumento na fosforilação de ERK1/2 e ERK5 em ambas as linhagens celulares e de AKT na linhagem SKRC-17. Embora o efeito da estimulação com EGF na fosforilação de AKT tenha sido muito maior em SKRC-17, tratamento com gefitinibe foi capaz de inibir totalmente a fosforilação deste mediador em ambas as linhagens

Figura 15 – Efeito da estimulação com EGF(25ng/ml) [precedida ou não de tratamento com Gefitinibe(5uM) ou Uo126(20uM)], HGF(50ng/ml) e VEGF (10ng/ml) na fosforilação de ERK5, AKT e ERK1/2 em células privadas de soro. Linhagens celulares foram mantidas em meio sem adição de soro por 24 h. Drogas ou veículo controle foram adicionados e, após 1 hora, fatores de crescimento ou veículo foram adicionados. Células foram coletadas após 20 minutos da adição de fatores de crescimento. celulares, sendo

mesmo capaz de inibir a fosforilação existente previamente à estimulação com EGF. Como esperado, UO126 não teve qualquer efeito inibitório na fosforilação de AKT induzida por EGF.

Quanto ao sistema MAPK, embora gefitinibe tenha inibido totalmente a fosforilação de ERK1/2 induzida por EGF em ACHN, seu efeito foi muito menor em SKRC-17, demonstrando a diferença na sensibilidade desta via a inibidores de EGFR em diferentes linhagens celulares, possivelmente relacionado ao *status VHL* destas linhagens. De forma interessante, gefitinibe inibiu amplamente a fosforilação de ERK5 em ambas as linhagens celulares, independente do seu efeito em ERK1/2.

Observou-se ainda o importante efeito de HGF na fosforilação de ERK1/2 e AKT em ambas as linhagens celulares e de forma mais importante em SKRC-17. Não se mostrou contudo efeito de VEGF na fosforilação de ERK1/2 em nenhuma das linhagens, embora tal fator de crescimento tenha induzido pequeno aumento da fosforilação de AKT em ACHN.

Figura 16 - Efeito da estimulação com EGF(25ng/ml) [precedida ou não de tratamento com Gefitinibe(5uM) ou Uo126(20uM)], na fosforilação de ERK5, AKT e ERK1/2 em células privadas de soro. Linhagens celulares foram mantidas em meio sem adição de soro por 24 h. Drogas ou veículo controle foram adicionados e, após 1 hora, fatores de crescimento ou veículo foram adicionados. Células foram coletadas após 20 minutos da adição de fatores de crescimento.

Para complementar as informações obtidas do experimento acima, realizou-se experimento semelhante envolvendo quatro outras linhagens celulares (KRCY, SKRC-39, SKRC-02 e SKRC-45) (figura 16).

Observou-se que gefitinibe inibe a ativação de ERK1/2 induzida por EGF em todas as linhagens celulares, exceto em SKRC-39, onde ERK1/2 não foi encontrada em sua forma fosforilada, mesmo após estímulo com EGF, como já previamente descrito (Gemmil et al., 2005). Este efeito, no entanto, foi mais discreto nas linhagens mutantes para *VHL* SKRC-02 e SKRC-45, semelhante ao observado na linhagem SKRC-17.

ERK5 por sua vez apresentou comportamento distinto de ERK1/2 tendo sua fosforilação estimulada por EGF em 2 das linhagens celulares. Tal estímulo foi parcial ou totalmente bloqueado pela ação de gefitinibe ou UO126. Gefitinibe também inibiu a fosforilação de AKT induzida por EGF em todas as linhagens estudadas.

4.6 Efeito da rapamicina, UO126 e gefitinibe no crescimento in vitro de culturas celulares de CCR

Como previamente detalhado em métodos, obteve-se medida indireta do crescimento de culturas celulares das linhagens ACHN, SKRC-17, SKRC-39, KRCY, SKRC-02 e SKRC-45 em condições controle, na presença de diferentes concentrações de UO126 (0, 2,5, 10 e 40 μ M), gefitinibe (0, 0,05, 0,2 e 1 μ g/ml) e rapamicina (0, 0,2, 1 e 5 nM).

Figura 17 – Efeito de diferentes concentrações de UO126 no crescimento de culturas celulares de CCR.

Figura 18 – Efeito de diferentes concentrações de gefitinibe no crescimento de culturas celulares de CCR.

Figura 19 - Efeito de diferentes concentrações de rapamicina no crescimento de culturas celulares de CCR.

Figura 20 – Crescimento relativos de linhagens celulares de CCR em condições controle, na presença de rapamicina (5nM), UO126 (40uM) ou da combinação dos dois agentes. Comparação entre grupos por ANOVA e identificação dos pares que apresentam diferença entre si pelo método de Student-Newman-Keuls. * diferença significativa para o grupo controle, # diferença significativa para a combinação.

Como demonstrado na figura 17, UO126 teve efeito variável no crescimento das diferentes linhagens celulares, sendo máximo e expressivo na linhagem SKRC-17. Observou-se ainda que embora boa parte do efeito esteja presente a 10uM, o efeito máximo na maioria das linhagens celulares se deu a 40uM.

Por sua vez, gefitinibe (figura 18) teve um efeito modesto no crescimento em todas as linhagens celulares, exceto em SKRC-02, onde nenhum efeito foi observado. Este efeito foi observado já a baixas concentrações. Já rapamicina (figura 19) apresentou efeito bastante marcado em todas as linhagens celulares, com exceção de KRCY. Tal efeito foi observado já a 0,2 nM.

Quando UO126 (40uM) foi combinado a rapamicina (5nM), observou-se que, de uma forma geral, a associação dos dois agentes teve efeito superior ao de cada um dos agentes isoladamente (figura 20). Importantes exceções foram as linhagens SKRC-17 e SKRC39, onde o efeito da combinação não foi superior ao já pronunciado efeito de UO126 e rapamicina respectivamente.

Figura 21 – Crescimento relativos de linhagens celulares de CCR em condições controle, na presença de rapamicina (5nM), gefitinibe (1 ug/ml) ou da combinação dos dois agentes. Comparação entre grupos por ANOVA e identificação dos pares que apresentam diferença entre si pelo método de Student-Newman-Keuls. * diferença significativa para o grupo controle, # diferença significativa para a combinação.

Verificamos ainda que a combinação de gefitinibe a rapamicina ampliou o efeito inibitório desta droga em 4 das linhagens celulares (figura 21). Nas linhagens SKRC-39 e SKRC-02 não se demonstrou nenhum efeito inibitório adicional com a adição de gefitinibe à rapamicina.

Discussão

5 Discussão

5.1 – Características do estudo, sua relevância e suas limitações

A maioria dos progressos terapêuticos obtidos em oncologia nas décadas de 70, 80 e 90 se deram com o desenvolvimento de novos agentes citotóxicos, melhores combinações de agentes citotóxicos existentes e melhor suporte clínico ao paciente oncológico, viabilizando a tolerância de protocolos terapêuticos mais intensivos e consequentemente mais tóxicos.

Os últimos 5 anos, contudo, têm sido de grande entusiasmo para a comunidade oncológica. O desenvolvimento do mesilato de imatinibe para o tratamento da leucemia mielóide crônica (LMC)(Kantarjan et al., 2002) em suas diversas fases, das leucemias linfóides agudas Ph⁺ e tumores estromais gastrointestinais criou um novo e revolucionário paradigma em oncologia. Ao invés da experimentação quase aleatória de agentes citotóxicos e imunoterápicos existentes nas diferentes tipos de câncer, tínhamos o conhecimento da natureza molecular do câncer levando ao desenvolvimento de drogas altamente específicas, eficazes e seguras.

No entanto, os exemplos de cânceres que, como a LMC, são sustentados por uma única anormalidade genética são extremamente limitados

e certamente não incluem os tumores mais prevalentes na população. Assim, a compreensão detalhada das características moleculares dos tumores e o reconhecimento da heterogeneidade presente em neoplasias agrupadas morfológicamente sobre a mesma categoria será essencial para o sucesso da assim chamada terapia biológica. Tal argumento encontra amplo respaldo no limitado sucesso de diversos agentes biológicos empregados como monoterapia em tumores epiteliais de alta prevalência como pulmão (Jane et al., 2004), mama (Cobleigh et al., 2003) e cólon (Cunningham et al., 2004).

O câncer renal é notório por sua insensibilidade quase universal a agentes citotóxicos convencionais de forma que, além do escasso benefício atribuível à imunoterapia, pouco avanço foi obtido no tratamento do CCR metastático nos últimos 30 anos.

Dessa forma, o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para o CCR é de extrema prioridade e passa pela compreensão detalhada de sua biologia.

O presente trabalho procurou contribuir para a compreensão da importância do sistema de MAPK, da sinalização por EGF e do complexo de início de tradução na manutenção do câncer renal e das consequências da sua manipulação farmacológica.

Todos os experimentos apresentados basearam-se em culturas celulares de CCR. Culturas celulares são baratas, viabilizando a realização de vários experimentos paralelos, e bastante dinâmicas, permitindo a aferição do

resultado dos experimentos realizados usualmente em poucos dias. Outra importante vantagem é a fácil manipulação de células em cultura, permitindo inserção de material genético (em forma de plasmídeo ou vírus) e a exposição a condições não possíveis *in vivo* como hipóxia extrema e deprivação completa de determinado nutriente ou fator de crescimento.

Porém, a interpretação de dados provenientes de experimentos realizados em culturas exige cautela. Embora tais resultados possam nos fornecer valiosa informação sobre a biologia tumoral, várias limitações podem ser enumeradas.

1 - Representatividade do câncer em estudo. Ainda que tentemos generalizar as conclusões através da inclusão do maior número possível de linhagens celulares, tais linhagens podem não representar toda a diversidade de tumores de determinado tipo histológico presente na população. Mais importante, as condições do meio de cultura podem selecionar entre os diferentes subclones presentes em um tumor aquele mais aptos a proliferar nesta situação não fisiológica. Resultados obtidos de tal subclone podem não ser aplicáveis ao restante do tumor.

2 – Ausência de interação com matrix extra-celular e células estromais.

3 – Ausência de interação com o sistema imune.

4 – Inexistência de variações farmacocinéticas. Exposição de culturas celulares a drogas e inibidores não levam em consideração fatores que

estariam presentes *in vivo* como variação da biodisponibilidade da droga, variações circadianas de concentração e efeito biológico de metabólitos.

Assim, resultados obtidos de experimentos em culturas celulares se prestam a demonstrar mecanismos moleculares de oncogênese e a gerar hipóteses quanto a estratégias de modulação de mecanismos biológicos corrompidos pelo câncer. Hipóteses assim geradas requerem confirmação em modelos *in vitro* mais complexos e em modelos *in vivo* a fim de se comprovar seu real valor terapêutico.

5.2 – Efeitos da inibição de MAPK em CCR

Como previamente discutido, MAPK é um importante sistema de sinalização celular implicado em proliferação, apoptose, angiogênese, migração e metástase (Sebolt-Leopold 2000; Wada et al., 2004). No presente trabalho, o uso de um inibidor conhecido de MEK1, MEK2 e MEK5 (UO126) induziu, como esperado, bloqueio da fosforilação de ERK1/2, em uma condição de equilíbrio com um meio semi-fisiológico por 24 horas e inibiu a ativação de ERK 1/2 e ERK5 estimulada por EGF.

A molécula 4EBP1 é o regulador mais crítico da formação do complexo de início de tradução e a modificação de sua fosforilação (e consequentemente

da sua capacidade de ligar-se a eIF4E) representa uma estratégia interessante quando se objetiva a modulação da formação do CIT. A fosforilação de 4EBP1, contudo, é um processo complexo, compreendido de pelo menos quatro etapas seqüenciais de fosforilação nas quais atuam o complexo mTOR-raptor e ao menos uma quinase controlada por MAPK. Outra potencial maneira como MAPK pode modular a interação entre 4EBP1 e eIF4E é pelo aumento da transcrição de 4EBP1, com conseqüente aumento da disponibilidade de formas não fosforiladas com conseqüente inativação funcional de eIF4E (Rolli-Derkinderen et al., 2003).

No presente estudo, demonstramos importante defosforilação de 4EBP1 em 2 linhagens celulares mediante tratamento com UO126. No entanto, qRT-PCR para 4EBP1 e 4EBP2 não demonstrou nenhuma evidência de aumento de transcrição destas moléculas mediante tratamento com UO126 nas quatro linhagens celulares testadas.

Surpreendente, contudo, foi a observação de que o tratamento com UO126 induziu, na maioria das linhagens celulares, defosforilação de P70S6K e conseqüentemente RPS6. Até muito recentemente, não se conhecia nenhum efeito da modulação de MAPK na atividade enzimática de mTOR ou de seu substrato imediato P70S6K. Duas contribuições recentes (Naegle et al., 2004; Ma et al., 2005), provenientes de sistemas biológicos outros que não CCR, sugerem que a ativação de ERK1/2 leva também a fosforilação de TSC2, com conseqüente cessação de seu efeito inibidor sobre RHEB e conseqüentemente

mTOR. Nossos achados indiretamente confirmam a existência desta via e sugerem que seu efeito na fosforilação de substratos de mTOR pode ser significativa.

Demonstramos ainda que a oferta de nutrientes, hipoteticamente aminoácidos, apresenta estreita correlação com a fosforilação de substratos de mTOR de uma maneira que parece ser independente dos mecanismos de sinalização celular localizados acima de mTOR, achado este concordante com o conhecimento prévio da estrutura e regulação de mTOR (Long et al., 2005). Mais do que apontar condições ideais para a realização dos experimentos subsequentes, tal observação pode ter correlação com o que acontece *in vivo*. A escassez de nutrientes no interior do tumor pode explicar a aparente diferença nos níveis de fosforilação de RPS6 entre amostras de tumor e culturas celulares previamente observada (Gemmill et al., 2005).

Embora ERK1/2 tenha sido previamente apontada como a quinase mediadora da sinalização cruzada entre MAPK e TSC2, observamos que, em uma das linhagens celulares (SKRC-39), ocorreu inibição da fosforilação de RPS6 e de 4EBP1 mediante tratamento com UO126 apesar da completa ausência de fosforilação de ERK1/2 em condições de equilíbrio ou mediante estimulação com fator de crescimento epitelial.

Tal achado original sugere que ERK5, outro dos substratos cuja fosforilação é afetada por UO126, possa ser, senão o único, um dos mediadores desta sinalização cruzada. Ainda como argumento em favor da

importância da sinalização por ERK5 em CCR, podemos citar a inibição pequena, porém significativa, que UO126 exerceu no crescimento de cultura celular nesta mesma linhagem. ERK5 mostrou-se ainda um mediador responsivo a EGF e modulável por inibidores da atividade de tirosina quinase de EGFR, assim como por inibidores diretos de MEK1 e MEK2.

A demonstração da importância da sinalização por MAPK em CCR e das consequências de sua inibição fornecem um modelo em que a inibição eficiente de uma via de sinalização tem consequências biológicas claras e relevantes – aqui demonstradas pelo efeito de UO126 no crescimento de culturas celulares de CCR. Tal inibição pode, hipoteticamente, ser alcançada de diversas formas, seja pela inibição direta de receptores de fatores de crescimento, pela inibição da ligação do fator de crescimento ao receptor, pela inibição da atividade de quinases localizadas acima do sistema em questão (como Raf) ou pela inibição direta do sistema de quinases. Esta última possibilidade encontra respaldo no recente desenvolvimento de inibidores de MEK com atividade anti-tumoral *in vitro* e que se encontram em etapas precoces de desenvolvimento clínico.

Recentemente, reportou-se o resultado de um estudo de fase 1 com CI-1040 (PD 184352), um potente inibidor de MEK1 e MEK2. Neste estudo, determinou-se aceitável perfil de toxicidade e eficácia da droga em produzir seu efeito biológico, medido pela defosforilação de ERK1/2. Embora resposta tumoral não faça parte dos objetivos principais de estudos de fase 1, observou-

se, entre os 60 pacientes avaliados, uma resposta parcial e 19 pacientes com doença estável com duração média de 5,5 meses (Lorusso et al., 2005).

5.3 – Importância de EGFR

Em concordância com o que havíamos previamente reportado (Gemmill et al., 2005), gefitinibe apresenta efeito variável na inibição da fosforilação de ERK1/2 em linhagens de CCR. Como representado no presente trabalho pelas linhagens uniparentais PRC3 e WT8, tal efeito parece ser dependente da função do gene *VHL*, uma vez que gefitinibe inibe a fosforilação de ERK1/2 na linhagem *wt*, mas não na linhagem mutante. Entre as diversas possibilidades para este fenômeno, pode-se destacar a possível maior abundância do ligante TGF- α nas linhagens mutantes, por ser esse um alvo de HIF e consequentemente super expresso na ausência funcional de *VHL*. Outra possibilidade seria a abundância de outros fatores de crescimento em linhagens mutantes, de forma que a sinalização através de EGFR teria uma importância secundária na fosforilação de ERK1/2 em condições normais.

Ao mantermos linhagens celulares em meio livre de soro por 24 horas e então as estimularmos com concentrações relativamente altas de EGF, obtemos o isolamento do efeito de EGF nas diferente vias de sinalização e a

possibilidade de melhor compreender o resultado bioquímico das possíveis intervenções farmacológicas neste sistema.

Observamos uma eficácia quase universal de gefitinibe em inibir a fosforilação de ERK1/2 induzida por EGF, no entanto, tal efeito foi mais pronunciado nas linhagens *wtVHL* (ACHN, KRCY) e apenas parcial nas linhagens mutantes (SKRC-02, SKRC-17, SKRC-45).

Observamos ainda que outros fatores de crescimento, como HGF, podem apresentar um efeito mais importante que EGF na ativação de MAPK, como demonstrado na linhagem SKRC-17, e podem ser os responsáveis pela fosforilação mantida de ERK1/2 a despeito do tratamento com gefitinibe descrita em linhagens mutantes para *VHL*.

Nosso experimento realizado em meio deprivado de soro também revelou marcada fosforilação de AKT induzida por EGF e bloqueada pelo tratamento com gefitinibe, embora o significado de tal observação em situações mais fisiológicas seja desconhecido.

O efeito de gefitinibe no crescimento de culturas celulares nos fornece várias lições, principalmente se comparado ao efeito de UO126 e contrastado com os efeitos bioquímicos da estimulação com EGF na presença ou ausência de gefitinibe.

Em geral, o efeito de gefitinibe foi modesto mas consistente ao longo das linhagens celulares estudadas, comprovando a importância biológica da inibição da sinalização induzida por EGFR. Quando comparado com a UO126,

o efeito de gefitinibe foi em geral menor, sustentando a hipótese de que a inibição mais eficiente da ativação de ERK1/2, e possivelmente de ERK5, por meio de um inibidor direto de MEK1, MEK2 e MEK5 ou da inibição concomitante de outros receptores será necessária para mais eficiente controle do crescimento tumoral. Tal hipótese fica bem ilustrada na linhagem SKRC-17, onde a eficiência de HGF em induzir fosforilação de ERK1/2 e o efeito limitado de gefitinibe no bloqueio da fosforilação induzida por EGF estão em perfeito acordo com a observação de que, enquanto UO126 inibiu intensamente o crescimento da linhagem celular, gefitinibe apresentou um efeito bem menor.

Em contraste, na linhagem KRCY, gefitinibe parece ter tido um efeito superior ao de UO126 na inibição do crescimento. É possível que isso seja resultado da marcada inibição da fosforilação de AKT determinada por gefitinibe e obviamente não por UO126. Devemos notar ainda que nessa linhagem celular, assim como em ACHN e SKRC-17, gefitinibe inibiu não só a fosforilação de AKT induzida pela introdução de EGF no meio como também a fosforilação presente previamente ao estímulo com EGF sugerindo que tal fosforilação se mantém por ativação de EGFR, possivelmente pela secreção pelas células tumorais de EGF e/ou TGF- α .

Quando comparamos o efeito de UO126 e de gefitinibe no crescimento de linhagens de CCR podemos observar que existe uma maior diferença entre o efeito destes dois agentes em linhagens mutantes para *VHL* (SKRC-02, SKRC-17 e SKRC-45) do que existe em linhagens *wt-VHL*. Esta observação

sugere que enquanto a inibição de MAPK parece ser eficiente em inibir crescimento independente da condição do gene *VHL*, a ativação de MAPK é mais dependente de EGFR em linhagens *wtVHL* do que em linhagens mutantes.

5.4 Complexo de início de tradução como alvo promissor no tratamento do câncer renal

Como droga única, rapamicina apresentou efeito significativo na inibição do crescimento de todas as linhagens celulares estudadas sugerindo que a inibição da sinalização através de mTOR é uma estratégia promissora no controle do câncer renal.

Em quase todas as circunstâncias em que rapamicina foi combinada a UO126 ou gefitinibe, o efeito obtido foi superior ao de cada uma das drogas utilizadas individualmente. Tal observação suporta as hipóteses de que alvos do sistema de MAPK e do sistema de quinase IP3 outros que não o CIT são importante para a manutenção destes tumores e que a associação de drogas biológicas será necessária para um controle eficiente do crescimento tumoral.

Dentre as linhagens estudadas, SKRC-39 representa uma importante exceção. Esta linhagem é notória pelos altos níveis de eIF4E e pela ausência de ERK1/2 na sua forma fosforilada. O pequeno efeito observado na inibição

do crescimento por UO126 e gefitinibe foi completamente sobreposto pelo efeito muito maior da rapamicina de forma que o efeito das combinações não foi superior ao da rapamicina isoladamente. Tal resultado sugere que a fosforilação dos substratos de mTOR, em especial 4EBP1, é ainda crítico no processo de início de tradução mesmo na presença de níveis aumentados de eIF4E, reforçando ainda mais o potencial terapêutico de inibidores de mTOR.

Novos inibidores de mTOR se encontram em estudos clínicos de fase 2 em diversas malignidades, incluindo CCR (Atkins et al., 2004). Num futuro próximo, a associação destas drogas a outros agentes biológicos pode se tornar uma estratégia mais eficiente para o controle tumoral.

5.5 Trabalhos futuros

O presente estudo apontou questões relevantes para a compreensão do câncer renal e para o desenvolvimento de novas terapias que precisam ser exploradas e expandidas em trabalhos futuros:

1- Possível comunicação cruzada entre ERK5 e TSC2. Planejamos obter o composto PD-184352, um inibidor específico de MEK1 e 2, mas não de MEK5 junto a Pfizer, Inc. e comparar seu efeito ao efeito in vitro de UO126 na

inibição da fosforilação de substratos de mTOR. Planejamos ainda transfectar linhagens celulares com uma forma constitucionalmente ativa de MEK5 ou com vetor controle e compararmos o efeito na fosforilação de RPS6.

2 – Relevância da inibição de ERK5 para o crescimento de linhagens celulares de CCR. De forma semelhante ao item anterior, planejamos realizar ensaios de crescimento na presença de PD184352 e UO126 e compararmos seus efeitos, uma vez que diferenças observadas nos efeitos destes dois inibidores são possivelmente atribuíveis a ERK5 (inibida por UO126 mas não por PD184352). Etapa seguinte seria a transfecção de uma linhagem celular com uma forma dominante negativa de ERK5 e comparar o seu crescimento com o crescimento da mesma linhagem transfectada com vetor controle.

3 – Potencialização da inibição de EGFR pela inibição da sinalização mediada por outros receptores como VEGFR, MET, FGFR, PDGF. Obtivemos recentemente os inibidores de múltiplas quinases BAY 43-9006 e CHI-258 e pretendemos observar seus efeitos na inibição das vias de sinalização celular isoladamente e em combinação com um inibidor de EGFR.

4 – Efeito biológico da inibição simultânea de mTOR e sinalização através de múltiplos receptores de fatores de crescimento. De forma similar ao item anterior, pretendemos combinar inibidores de múltiplas quinases com inibidores de mTOR e observar efeito biológico in vitro, não só em termos de crescimento como também em termos do efeito na regulação do ciclo celular e na indução de apoptose.

5 – Benefício clínico da associação de um inibidor de EGFR a rapamicina. Em função dos dados previamente por nós publicados (Gemmill et al.) e dos dados obtidos no presente trabalho, formulamos uma proposta para um estudo piloto de fase 2 da combinação do inibidor de EGFR erlotinibe (Tarceva ®) e rapamicina no tratamento do carcinoma de células renais metastático. Tal proposta foi aprovada pelo por Genentech, Inc. e está tramitando pelas comissões regulatórias do *University of Colorado Cancer Center* de forma que esperamos iniciar em breve a inclusão de pacientes junto à clínica multidisciplinar de câncer renal.

6 – Importância da inibição do CIT no controle do câncer renal. Baseado no efeito observado *in vitro* com inibição de crescimento induzida por rapamicina e da verificação da atividade anti-CCR *in vivo* de análogos da rapamicina como CCI-779 (Atkins et al., 2004) assim como da demonstração de sinergismo entre rapamicina e certas drogas citotóxicas em um modelo de carcinoma de mama (Mondesire et al., 2004), iniciamos um estudo de fase 1/2 da combinação entre rapamicina, vinorelbine e bevacizumab no tratamento do CCR avançado.

Conclusões

6 Conclusões

1- Inibição de MAPK representa estratégia eficiente de interferência com o complexo de início de tradução em células de CCR. Esta interferência se dá pela diminuição da fosforilação de RPS6 e 4E-BP1, mas não pela alteração da transcrição de 4E-BP1 ou 4E-BP2.

2- A disponibilidade de nutrientes tem efeito crítico na fosforilação de S6RP fornecendo uma possível explicação aos baixos níveis de fosforilação de S6RP observados em amostras clínicas de CCR.

3- Inibição da fosforilação de RPS6 por UO126 em uma linhagem celular com expressão indetectável de ERK1/2 sugere que ERK5 seja responsável pela conexão entre MAPK e P70S6K e consequente modulação do complexo de início de tradução pelo sistema MAPK.

4- UO126 causa importante inibição de crescimento em linhagens de CCR e seu efeito pode ser potencializado se combinado a rapamicina.

5- Ao inibir a ativação de EGFR e, consequente, ativação dos mediadores ERK1/2, ERK5 e AKT, gefitinibe inibe o crescimento de linhagens

celulares de CCR. Tal efeito pode ser potencializado com a associação de rapamicina a gefitinibe.

Referências

7 Referências

Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*. 2004;6:203-8.

Ahmad T, Eisen T. Kinase inhibition with BAY 43-9006 in renal cell carcinoma. *Clin Can Res*. 2004;10:6388-92.

Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett*. 1997;410:83-6

Atkins MB, Regan M, McDermott D. Update on the Role of Interleukin 2 and Other Cytokines in the Treatment of Patients with Stage IV Renal Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:6342-6.

Atkins MB, Hidalgo M, Stadler WM, Logan TF, Dutcher JP, Hudes GR, Park Y, Liou SH, Marshall B, Boni JP, Dukart G, Sherman ML. Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2004;22:909-18.

Avdulov S, Li S, Michalek V, Burrichter D, Peterson M, Perlman DM, Manivel JC, Sonenberg N, Yee D, Bitterman PB, Polunovsky VA. Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the

malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer Cell*. 2004;5:553-63.

Baselga J, Averbuch SD. ZD1839 ('Iressa') as an anticancer agent. *Drugs*. 2000;60 (Supl 1):33-40

Baselga J, Arteaga CL. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:2445-59.

Benvenuto, G., Li, S., Brown, S. J., Braverman, R., Vass, W. C., Cheadle, J. P., Halley, D. J., Sampson, J. R., Wienecke, R., and DeClue, J. E. The tuberous sclerosis-1 (TSC1) gene product hamartin suppresses cell growth and augments the expression of the TSC2 product tuberlin by inhibiting its ubiquitination. *Oncogene* 2000;19:6306-16.

Bharti AC, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol*. 2002;64:883-8

Birt AR, Hogg GR, Dube WJ. Hereditary multiple fibrofolliculomas with trichodiscomas and acrochordons. *Arch Dermatol* 1977;113:1674-7.

Bjornsti MA, Houghton PJ. Lost in translation: dysregulation of cap-dependent translation and cancer. *Cancer Cell*. 2004;5:519-23.

Brauch H, Weirich G, Brieger J, Glavac D, Rodl H, Eichinger M, Feurer M, Weidt E, Puranakanittha C, Neuhaus C, Pomer S, Brenner W, Schirmacher P, Storkel S, Rotter M, Masera A, Gugeler N, Decker HJ. VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: Association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res* 2000;60:1942-8.

Bui MH, Seligson D, Han KR, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y, Horvath S, Leibovich BC, Chopra S, Liao SY, Stanbridge E, Lerman MI, Palotie A, Figlin RA, Belldegrun AS. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res* 2003;9:802-11.

Carvajal-Vergara X, Tabera S, Montero JC, Esparis-Ogando A, Lopez-Perez R, Mateo G, Gutierrez N, Parmo-Cabanas M, Teixido J, San Miguel JF, Pandiella A. Multifunctional role of Erk5 in multiple myeloma. *Blood*. 2005;105:4492-9

Chan S. Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer. *Br J Cancer*. 2004;91:1420-4.

Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001;410:37-40

Childs R, Chernoff A, Contentin N, Bahceci E, Schrump D, Leitman S, Read EJ, Tisdale J, Dunbar C, Linehan WM, Young NS, Barrett AJ. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2000;343:750-8.

Chiu MI, Katz H, Berlin V. RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:12574-8.

Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: Biological regulation via destruction. *Bioessays* 2000;22:442–51.

Cobleigh MA, Langmuir VK, Sledge GW, Miller KD, Haney L, Novotny WF, Reimann JD, Vassel A. A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 2003;30:117-24.

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:337-45.

Dan HC, Sun M, Yang L, Feldman RI, Sui XM, Ou CC, Nellist M, Yeung RS, Halley DJ, Nicosia SV, Pledger WJ, Cheng JQ. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates tuberous sclerosis tumor suppressor complex by phosphorylation of tuberin. *J Biol Chem*. 2002;277:35364-70

Dawson NA, Guo C, Zak R, Dorsey B, Smoot J, Wong J, Hussain A. A phase II trial of gefitinib (Iressa, ZD1839) in stage IV and recurrent renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:7812-9.

De Benedetti A, Harris AL. eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31:59-72.

Dong F, Gutkind JS, Lerner AC. Granulocyte colony-stimulating factor induces ERK5 activation, which is differentially regulated by protein-tyrosine kinases and protein kinase C. Regulation of cell proliferation and survival. *J Biol Chem*. 2001;276:10811-6

Doublet JD, Peraldi MN, Gattegno B, Thibault P, Sraer JD. Renal cell carcinoma of native kidneys: prospective study of 129 renal transplant patients. *J Urol*. 1997;158:42-4.

Doudna JA, Rath VL. Structure and function of the eukaryotic ribosome: the next frontier. *Cell*. 2002;109:153-6.

English JM, Pearson G, Hockenberry T, Shivakumar L, White MA, Cobb MH. Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control. *J Biol Chem*. 1999;274:31588-92

Escudier B, Szczyluk C, Eisen T, Stadler WM, Schwartz B, Shan M, Bukowski RM. Randomized Phase III trial of the Raf kinase and VEGFR inhibitor sorafenib (BAY 43-9006) in patients with advanced renal cell carcinoma (RCC). *ASCO Annual Meeting Procedures*. 2005;23:A4510. (Presented at 41th annual meeting of the American Society of Clinical Oncology; 2005 May 13-17; Orlando, USA. Abstracts)

Esparis-Ogando A, Diaz-Rodriguez E, Montero JC, Yuste L, Crespo P, Pandiella A. Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Mol Cell Biol*. 2002;22:270-85

Fadden P, Haystead TA, Lawrence JC Jr. Identification of phosphorylation sites in the translational regulator, PHAS-I, that are controlled by insulin and rapamycin in rat adipocytes. *J Biol Chem*. 1997;272:10240-7.

Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*. 1998;273:18623-32.

Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*. 2004;23:3151-71.

Fujita J, Kraus MH, Onouse H. Activated H-ras oncogenes in human kidney tumors. *Cancer Res*. 1998;48:5251-5.

Fyfe G, Fisher RI, Rosenberg SA, Sznol M, Parkinson DR, Louie AC. Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol*. 1995;13:688-96.

Gago-Dominguez M, Yuan JM, Castela JE, Ross RK, Yu MC. Regular use of analgesics is a risk factor for renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 1999;81:542-8.

Gallou C, Joly D, Mejean A, Staroz F, Martin N, Tarlet G, Orfanelli MT, Bouvier R, Droz D, Chretien Y, Marechal JM, Richard S, Junien C, Beroud C. Mutations of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: Definition of a risk factor for VHL patients to develop an RCC. *Hum Mutat* 1999;13:464-75.

Garber, K. Rapamycin's resurrection: a new way to target the cancer cell cycle. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:1517-9.

Gemmill RM, Bemis LT, Lee JP, Sozen MA, Baron A, Zeng C, Erickson PF, Hooper JE, Drabkin HA. The TRC8 hereditary kidney cancer gene suppresses growth and functions with VHL in a common pathway. *Oncogene* 2002;21:3507-16.

Gemmill RM, Zhou M, Costa L, Korch C, Bukowski RM, Drabkin HA. Synergistic growth inhibition by Iressa and Rapamycin is modulated by VHL mutations in renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2005;92:2266-77.

George D, Michaelson D, Oh WK, Reitsma D, Laurent D, Mietlowski W, Wang Y, Dugan M, Kaelin WG, Kantoff P. Phase I study of PTK787/ZK 222584 (PTK/ZK) in metastatic renal cell carcinoma. *ASCO Annual Meeting Proceedings*. 2003;21:A1548. (Presented at 39th annual meeting of the American Society of Clinical Oncology; 2003 May 31 – Jun 3; Chicago, USA, Abstracts)

Gera JF, Mellinghoff IK, Shi Y, Rettig MB, Tran C, Hsu JH, Sawyers CL, Lichtenstein AK. AKT activity determines sensitivity to mTOR inhibitors by regulating cyclin D1 and c-myc expression. *J Biol Chem*. 2004;279:2737-46.

Grignon DJ, Che M. Clear cell renal cell carcinoma. *Clin Lab Med*. 2005;25:305-16

Gomella LG, Sargent ER, Wade TP, Anglard P, Linehan WM, Kasid A. Expression of transforming growth factor alpha in normal human adult kidney and enhanced expression of transforming growth factors alpha and beta 1 in renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 1989;49:6972-5.

Graff JR, Zimmer SG. Translational control and metastatic progression: enhanced activity of the mRNA cap-binding protein eIF-4E selectively enhances translation of metastasis-related mRNAs. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20:265-73.

Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK.

Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med.* 2002;8:128-35.

Guinan P, Sobin LH, Algaba F, Badellino F, Kameyama S, MacLennan G, Novick A. TNM staging of renal cell carcinoma: Workgroup No. 3, Union International Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997;80:992-3.

Gunaratnam L, Morley M, Franovic A, de Paulsen N, Mekhail K, Parolin DA, Nakamura E, Lorimer IA, Lee S. Hypoxia inducible factor activates the transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor receptor growth stimulatory pathway in VHL(-/-) renal cell carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2003;278:44966-74.

Hainsworth JD, Sosman JA, Spigel DR, Schwert RC, Carrell DL, Hubbard F, Greco FA; Cannon S. Phase II trial of bevacizumab and erlotinib in patients with metastatic renal carcinoma (RCC). *ASCO Annual Meeting Proceedings* 2004;22:A4502. (Presented at 40th annual meeting of the American Society of Clinical Oncology; 2004 June 5-8; New Orleans, USA, Abstracts)

Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 2004;18:1926-45.

Heesom KJ, Avison MB, Diggle TA, Denton RM. Insulin-stimulated kinase from rat fat cells that phosphorylates initiation factor 4E-binding protein 1 on the rapamycin-insensitive site (serine-111). *Biochem J.* 1998;336 :39-48.

Hidalgo M, Rowinsky EK. The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene*. 2000;19:6680-6.

Hoffman MA, Ohh M, Yang H, Klco JM, Ivan M, Kaelin WG Jr. Von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF. *Hum Mol Genet*. 2001;10:1019-27.

Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol*. 2002;22:7004-14.

Humes HD, Beals TF, Cieslinski DA, Sanchez IO, Page TP. Effects of transforming growth factor-beta, transforming growth factor-alpha, and other growth factors on renal proximal tubule cells. *Lab Invest*. 1991;64: 538-45.

Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 2003;115:577-90.

Jane PA, Gurubhagavatula S, Yeap BY, Lucca J, Ostler P, Skarin AT, Fidias P, Lynch TJ, Johnson BE. Outcomes of patients with advanced non-small cell lung cancer treated with gefitinib (ZD1839, "Iressa") on an expanded access study. *Lung Cancer*. 2004;44:221-30.

Kamakura S, Moriguchi T, Nishida E. *J Biol Chem*. 1999;274:26563-71.

Kammula US, White DE, Rosenberg SA. Trends in the safety of high dose bolus interleukin-2 administration in patients with metastatic cancer. *Cancer*. 1998;83:797-805.

Kamura T, Koepp DM, Conrad MN, Skowyra D, Moreland RJ, Iliopoulos O, Lane WS, Kaelin WG Jr, Elledge SJ, Conaway RC, Harper JW, Conaway JW. Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* 1999;284:657–61.

Kantarjan H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M, Druker B, Goldman J, O'Brien SG, Russell N, Fischer T, Ottmann O, Cony-Makhoul P, Facon T, Stone R, Miller C, Tallman M, Brown R, Schuster M, Loughran T, Gratwohl A, Mandelli F, Saglio G, Lazzarino M, Russo D, Baccarani M, Morra E. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*. 2002;346:645-52

Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ, Lee JD. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature*. 1998;395:713-6.

Kibel A, Iliopoulos O, DeCaprio JA, Kaelin WG Jr. Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to elongins B and C. *Science* 1995;269:1444–6.

Kishida T, Stackhouse TM, Chen F, Lerman MI, Zbar B: Cellular proteins that bind the von Hippel-Lindau disease gene product. Mapping of binding domains and the effect of missense mutations. *Cancer Res*. 1995;55:4544–8.

Knebelmann B, Ananth S, Cohen HT, Sukhatme VP. Transforming growth factor alpha is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res.* 1998;58:226-31.

Kondo K, Yao M, Yoshida M, Kishida T, Shuin T, Miura T, Moriyama M, Kobayashi K, Sakai N, Kaneko S, Kawakami S, Baba M, Nakaigawa N, Nagashima Y, Nakatani Y, Hosaka M: Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: Relationship to clinicopathological parameters. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34:58-68.

Lazaris-Karatzas A, Sonenberg N. The mRNA 5' cap-binding protein, eIF-4E, cooperates with v-myc or E1A in the transformation of primary rodent fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 1992;12:1234-8.

Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh F, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L, Schmidt L, Zhou F, Li H, Wei MH, Chen F, Glenn G, Choyke P, Walther MM, Weng Y, Duan DR, Dean M, Glava D, Richards FM, Crossey PA, Ferguson-Smith MA, Le Paslier D, Chumakov IC, Daniel CA, Craig M, Eamonn R, Linehan WM, Zbar B, Lerman MI. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993;260:1317-20.

Liu W, Li J, Roth RA. Heregulin regulation of Akt/protein kinase B in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;261:897-903.

Liu L, Cavanaugh JE, Wang Y, Sakagami H, Mao Z, Xia Z. ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-

promoted survival of developing but not mature cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:8532-7.

Lonergan KM, Iliopoulos O, Ohh M, Kamura T, Conaway RC, Conaway JW, Kaelin WG Jr. Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol Cell Biol*. 1998;18:732–741.

Long X, Ortiz-Vega S, Lin Y, Avruch J. Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. *J Biol Chem*. 2005;280:23433-6.

Lonser RR, Glenn GM, Walther M, Chew EY, Libutti SK, Linehan WM, Oldfield EH. Von Hippel-Lindau disease. *Lancet* 2003;361:2059–67.

Lorusso PM, Adjei AA, Varterasian M, Gadgeel S, Reid J, Mitchell DY, Hanson L, DeLuca P, Bruzek L, Piens J, Asbury P, Van Becelaere K, Herrera R, Sebolt-Leopold J, Meyer MB. Phase I and pharmacodynamic study of the oral MEK inhibitor CI-1040 in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol*. 2005;23:5281-93.

Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*. 2005;121:179-93.

Maldazys JD, deKernion JB. Prognostic factors in metastatic renal carcinoma. *J Urol* 1986;136:376-9.

Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene*. 2000;19:6550-65.

Margolin KA, Rayner AA, Hawkins MJ, Atkins MB, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss GR, Doroshow JH, Jaffe HS, Roper M. Interleukin-2 and lymphokine-activated killer cell therapy of solid tumors: analysis of toxicity and management guidelines. *J Clin Oncol*. 1989;7:486-98.

McDermott DF, Regan MM, Clark JI, Flaherty LE, Weiss GR, Logan TF, Kirkwood JM, Gordon MS, Sosman JA, Ernstoff MS, Tretter CPG, Urba WJ, Smith JW, Margolin KA, Mier JW, Gollob JA, Dutcher JP, Atkins MB. Randomized Phase III Trial of High-Dose Interleukin-2 Versus Subcutaneous Interleukin-2 and Interferon in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *J of Clin Oncol*. 2005;23:133-41.

McLaughlin JK, Mandel JS, Blot WJ, Schuman LM, Mehl ES, Fraumeni JF Jr. A population-based case control study of renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1984;72:275-84.

Medical Research Council Renal Cancer Collaborators. Interferon-alpha and survival in metastatic renal carcinoma: early results of a randomized controlled trial. *Lancet*. 1999;353:14-7.

Mellemgaard A, Engholm G, McLaughlin JK, Olsen JH. Risk factors for renal cell carcinoma in Denmark: I. Role of socioeconomic status tobacco use beverages and family history. *Cancer Causes Control*. 1994;5:105-13.

Ministério da Saúde – Instituto Nacional do Câncer. Incidência de câncer no município de São Paulo, Brasil. São Paulo, Brasil, 1999.

Mondesire WH, Jian W, Zhang H, Ensor J, Hung MC, Mills GB, Meric-Bernstam F. Targeting mammalian target of rapamycin synergistically enhances chemotherapy-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2004;10:7031-42.

Motzer RJ, Amato R, Todd M, Hwu WJ, Cohen R, Baselga J, Muss H, Cooper M, Yu R, Ginsberg MS, Needle M. Phase II trial of antiepidermal growth factor receptor antibody C225 in patients with advanced renal cell carcinoma. *Invest New Drugs*. 2003;21:99-101.

Motzer RJ, Rini BI, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Bukowski RM, George DJ, Kim SR, Baum C. Phase 2 trials of SU11248 show antitumor activity in second-line therapy for patients with metastatic renal cell carcinoma (RCC). *ASCO Annual Meeting Proceedings*. 2005;23:A4508. (Presented at 41th annual meeting of the American Society of Clinical Oncology; 2005 May 13-17; Orlando, USA, Abstracts).

Mulloy R, Salinas S, Philips A, Hipkind RA. Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade. *Oncogene* 2003;22:5387–98.

Naegel S, Morley SJ. Molecular cross-talk between MEK1/2 and mTOR signaling during recovery of 293 cells from hypertonic stress. *J Biol Chem*. 2004;279:46023-34.

Neshat MS, Mellinghoff IK, Tran C, Stiles B, Thomas G, Petersen R, Frost P, Gibbons JJ, Wu H, Sawyers CL. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10314-9

Nickerson ML, Warren MB, Toro JR, Matrosova V, Glenn G, Turner ML, Duray P, Merino M, Choyke P, Pavlovich CP, Sharma N, Walther M, Munroe D, Hill R, Maher E, Greenberg C, Lerman MI, Linehan WM, Zbar B, Schmidt LS. Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with the Birt-Hogg-Dube syndrome. *Cancer Cell* 2002;2:157–64.

Oka H, Chatani Y, Hoshino R. Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 1995;55:4182-7.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*. 2000;19:3159-67.

De Paulsen N, Brychzy A, Fournier MC, Klausner RD, Gnarr JR, Pause A, Lee S. Role of transforming growth factor- α in von Hippel-Lindau (VHL)(-/-) clear cell renal carcinoma cell proliferation: a possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:1387-92.

Pause A, Peterson B, Schaffar G, Stearman R, Klausner R. Studying

interactions of four proteins in the yeast two-hybrid system: Structural resemblance of the pVHL/elongin BC/hCUL-2 complex with the ubiquitin ligase complex SKP1/cullin/F-box protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:9533–8.

Pearson G, English JM, White MA, Cobb MH. ERK5 and ERK2 cooperate to regulate NF-kappaB and cell transformation. *J Biol Chem*. 2001 276:7927-31.

Preiss T, W Hentze M. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays*. 2003;25:1201-11.

Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T, Sonenberg N. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J*. 1999;18:270-9.

Quesada JR. Role of interferons in the therapy of metastatic renal cell carcinoma. *Urology*. 1989;34:80-3.

Ramakrishnan V. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*. 2002;108:557-72

Ratain MJ, Flaherty KT, Stadler WM, O'Dwyer P, Kaye S, Xiong H, Patnaik A, Gore M, Lee RJ, Eisen T. Preliminary antitumor activity of BAY 43-9006 in metastatic renal cell carcinoma and other advanced refractory solid tumors in a phase II randomized discontinuation trial (RDT). *ASCO Annual Meeting Proceedings* 2004;22:A4501. (Presented at 40th annual meeting of the American Society of Clinical Oncology; 2004 June 5-8; New Orleans, USA, Abstracts)

Ravaud A, Audhuy B, Gomez F, Escudier B, Lesimple T, Chevreau C, Douillard JY, Caty A, Geoffrois L, Ferrero JM, Linassier C, Drevon M, Negrier S. Subcutaneous interleukin-2, interferon alfa-2a, and continuous infusion of fluorouracil in metastatic renal cell carcinoma: a multicenter phase II trial. Groupe Francais d'Immunotherapie. *J Clin Oncol*. 1998;16:2728-32.

Raymond E, Faivre S, Vera K, Delbaldo C, Robert C, Spatz A, Bello C, Brega N, Scigalla P, Armand JP. Final results of a phase I and pharmacokinetic study of SU11248, a novel multi-target tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced cancers. *ASCO Annual Meeting Proceedings*. 2003;22:A769. (Presented at 39th annual meeting of the American Society of Clinical Oncology; 2003 May 31 – Jun 3; Chicago, USA, Abstracts)

Raymond E, Alexandre J, Faivre S, Vera K, Materman E, Boni J, Leister C, Korth-Bradley J, Hanauske A, Armand JP. Safety and pharmacokinetics of escalated doses of weekly intravenous infusion of CCI-779, a novel mTOR inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22:2336-47.

Richter JD, Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 2005;433:477-80

Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Mariotto A, Feuer EJ, Edwards BK (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2002*, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002/, based on November 2004 SEER data submission, posted to the SEER web site 2005.

Rini BI, Halabi S, Barrier R, Margolin KA, Avigan D, Logan T, McCarthy PL, Small ES, Linker CA. CALGB 90003: Adoptive Immunotherapy by Allogeneic Stem Cell Transplantation for Metastatic Renal Cell Carcinoma: An Intergroup Phase II Study. *Blood*. 2004;104:A810. (Presented at 46th annual meeting of the American Society of Hematology; 2004 Dec 4-7; San Diego, USA, Abstracts)

Rini BI, Rixe O, Bukowski RM, Michaelson MD, Wilding G, Hudes GR, Bolte O, Steinfeldt H, Reich SD, Motzer RJ. AG-013736, a multi-target tyrosine kinase receptor inhibitor, demonstrates anti-tumor activity in a Phase 2 study of cytokine-refractory, metastatic renal cell cancer (RCC). *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2005;23:A4509. (Presented at 41th annual meeting of the American Society of Clinical Oncology; 2005 May 13-17; Orlando, USA, Abstracts).

Rolli-Derkinderen M, Machavoine F, Baraban JM, Grolleau A, Beretta L, Dy M. ERK and p38 inhibit the expression of 4E-BP1 repressor of translation through induction of Egr-1. *J Biol Chem*. 2003;278:18859-67.

Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, Chang AE, Schwartzentruber DJ, Aebersold P, Leitman S, Linehan WM, Seipp CA. Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or with lymphokine activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85:622-32.

Rowinsky EK, Schwartz GH, Gollob JA, Thompson JA, Vogelzang NJ, Figlin R, Bukowski R, Haas N, Lockbaum P, Li YP, Arends R, Foon KA,

Schwab G, Dutcher J. Safety, pharmacokinetics, and activity of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in patients with metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22:3003-15.

Ruggero D, Montanaro L, Ma L, Xu W, Londei P, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. *Nat Med.* 2004;10:484-6.

Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, Williams JM, Dumont FJ, Wiederrecht G, Abraham RT. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem.* 1995;270:815-22.

Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, Li L, Pan D, Edgar BA. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat Cell Biol.* 2003;5:566-71.

Schalm SS, Fingar DC, Sabatini DM, Blenis J. TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Curr Biol.* 2003;13:797-806.

Schmidt L, Duh F-M, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, Scherer SW, Zhuang Z, Lubensky I, Dean M, Allikmets R, Chidambaram A, Bergerheim UR, Feltis JT, Casadevall C, Zamarron A, Bernues M, Richard S, Lips CJ, Walther MM, Tsui LC, Geil L, Orcutt ML, Stackhouse T, Lipan J, Slife L, Brauch H, Decker J, Niehans G, Hughson MD, Moch H, Storkel S, Lerman MI, Linehan WM, Zbar B.. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of

the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 1997;16:68–73.

Schmidt L, Junker K, Nakaigawa N, Kinjerski T, Weirich G, Miller M, Lubensky I, Neumann HP, Brauch H, Decker J, Vocke C, Brown JA, Jenkins R, Richard S, Bergerheim U, Gerrard B, Dean M, Linehan WM, Zbar B.. Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene* 1999;18:2343–50.

Sebolt-Leopold JS: Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway. *Oncogene* 2000;19:6594-9

Seeger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*. 1995;9:726-35

Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ, Lane AH, Farmer GE, Lamiell JM, Haines J, Yuen JWM, Collins D, Majoor-Krakauer MD, Bonner T, Mathew C, Rubenstein A, Halperin J, McConkie-Rosell A, Green JS, Trofatter JA, Ponder BA, Eierman L, Bowmer MI, Schimke R, Oostra B, Aronin N, Smith DI, Drabkin H, Waziri MH, Hobbs WJ, Martuza RL, Conneally PM, Hsia YE, Gusella JF. Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature* 1988;332:268-9.

Smith K, Gunaratnam L, Morley M, Franovic A, Mekhail K, Lee S. Silencing of epidermal growth factor receptor suppresses hypoxia-inducible factor-2-driven VHL-/- renal cancer. *Cancer Res*. 2005;65:5221-30.

Snow RM, Schellhammer PF. Spontaneous regression of metastatic renal cell carcinoma. *Urology*. 1982; 20:177-81.

Spigel DR, Hainsworth JD, Sosman JA, Raefsky EL, Meluch AA, Edwards D, Horowitz P, Thomas K, Yost K, Stagg MP, Greco FA. Bevacizumab and erlotinib in the treatment of patients with metastatic renal carcinoma (RCC): Update of a phase II multicenter trial. *ASCO Annual Meeting Proceedings* 2005;23:A4540. (Presented at 41st annual meeting of the American Society of Clinical Oncology; 2005 May 13-17; Orlando, USA, Abstracts)

Stocker H, Radimerski T, Schindelholtz B, Wittwer F, Belawat P, Daram P, Breuer S, Thomas G, Hafen E. Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in Drosophila. *Nat Cell Biol* 2003;5:559-65

Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol*. 2003;13:1259-68.

Teyssier JR, Henry I, Dozier C. Recurrent deletion of the short arm of chromosome 3 in human renal cell carcinoma: shift of the c-raf 1 locus. *J Natl Cancer Inst*. 1986;77:1187-95.

Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EE, Kelsell D, Leigh I, Gorman P, Lamlum H, Rahman S, Roylance RR, Olpin S, Bevan S, Barker K, Hearle N, Houlston RS, Kiuru M, Lehtonen R, Karhu A, Vilkki S, Laiho P, Eklund C, Vierimaa O, Aittomaki K, Hietala M, Sistonen P, Paetau A,

Salovaara R, Herva R, Launonen V, Aaltonen LA. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet.* 2002;30:406-10.

Tsuchiya N, Sato K, Akao T, Kakinuma H, Sasaki R, Shimoda N, Satoh S, Habuchi T, Ogawa O, Kato T. Quantitative analysis of gene expressions of vascular endothelial growth factor-related factors and their receptors in renal cell carcinoma. *Tohoku J Exp Med.* 2001;195:101-13.

Tsukiyama-Kohara K, Vidal SM, Gingras AC, Glover TW, Hanash SM, Heng H, Sonenberg N. Tissue distribution, genomic structure, and chromosome mapping of mouse and human eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins 1 and 2. *Genomics.* 1996;38:353-63.

Uhlman DL, Nguyen P, Manivel JC, Zhang G, Hagen K, Fraley E, Aeppli D, Niehans GA. Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in papillary and nonpapillary renal cell carcinoma: correlation with metastatic behavior and prognosis. *Clin Cancer Res.* 1995;1:913-20.

Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 2004;23:2838–49.

Waters JS, Moss C, Pyle L, James M, Hackett S, A'hern R, Gore M, Eisen T. Phase II clinical trial of capecitabine and gemcitabine chemotherapy in patients with metastatic renal carcinoma. *Br J Cancer.* 2004; 91:1763-8.

Watson J, Mochizuki D. Interleukin 2: a class of T cell growth factors. *Immunol Rev.* 1980;51:257-78.

Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, Malina A, Ray S, Kogan S, Cordon-Cardo C, Pelletier J, Lowe SW. Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature.* 2004;428:332-7.

Werlen G, Hausmann B, Naeher D, Palmer E. Signaling life and death in the thymus: timing is everything. *Science.* 2003;299:1859-63.

Wood JM, Bold G, Buchdunger E, Cozens R, Ferrari S, Frei J, Hofmann F, Mestan J, Mett H, O'Reilly T, Persohn E, Rosel J, Schnell C, Stover D, Theuer A, Towbin H, Wenger F, Woods-Cook K, Menrad A, Siemeister G, Schirner M, Thierauch KH, Schneider MR, Dreves J, Martiny-Baron G, Totzke F. PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res.* 2000;60:2178-89.

Yagoda A, Abi-Rached B, Petrylak D. Chemotherapy for advanced renal cell carcinoma: 1983-1993. *Semin Oncol.* 1995;22:42-60.

Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Steinberg SM, Chen HX, Rosenberg SA. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med.* 2003;349:427-34.

Yang JC, Sherry RM, Steinberg SM, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, White DE, Liewehr DJ, Merino MJ, Rosenberg SA. Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21:3127-32.

Yao M, Tabuchi H, Nagashima Y, Baba M, Nakaigawa N, Ishiguro H, Hamada K, Inayama Y, Kishida T, Hattori K, Yamada-Okabe H, Kubota Y. Gene expression analysis of renal carcinoma: adipose differentiation-related protein as a potential diagnostic and prognostic biomarker for clear-cell renal carcinoma. *J Pathol*. 2005;205:377-87.

Zbar B, Tory K, Merino M, Schmidt L, Glenn G, Choyke P, Walther MM, Lerman M, Linehan WM.. Hereditary papillary renal cell carcinoma. *J Urol* 1994;151:561–6.

Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*. 1995;270:12665-9

Zhuang Z, Park WS, Pack S, Schmidt L, Vortmeyer AO, Pak E, Pham T, Weil RJ, Candidus S, Lubensky IA, Linehan WM, Zbar B, Weirich G.. Trisomy 7-harboring nonrandom duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 1998;20:66–9.

Zisman A, Pantuck AJ, Wieder J, Chao DH, Dorey F, Said JW, deKernion JB, Figlin RA, Belldegrun AS. Risk group assessment and clinical outcome algorithm to predict the natural history of patients with surgically resected renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2002;20:4559-66.

Apêndice I - Publicações do pós-graduando durante o período (Jan, 2003 – Nov, 2005).

(Em atendimento à resolução CoPGr 5140 , de 20 de setembro de 2004, Artigo 98,Parágrafo único).

Artigos:

1-Gemmill RM, Zhou M, **Costa LJ**, Korch C, Bukowski RM, Drabkin H. Synergistic Growth Inhibition by Iressa and Rapamycin Is Modulated by *VHL* Mutations in Renal Cell Carcinoma. Br J Cancer 2005;92:2266-77, 2005 (**em anexo**)

2-Xavier AC, Siqueira SA, **Costa LJ**, Mauad T, Saldiva PH. Missed diagnosis in hematological patients - an autopsy study. Virchows Arch. 2005;446:225-31

3-**Costa LJ**, Xavier AC, del Giglio A. “Negative” results in cancer clinical trials – equivalence or poor accrual ?. Control Clin Trials 2004;25:525-33 (**em anexo**)

4-Fonseca FL, SantAna AV, Bendit I, Arias V, **Costa LJ**, Pinhal AA, del Gilgio A. Systemic chemotherapy induces microsatellite instability in the peripheral blood mononuclear cells of breast cancer patients. Breast Cancer Res, 2004;7:28-32

5- **Costa LJ**, Soares HP, Gaspar HA, Trujillo LG, Santi PX, Pereira RS, de Santana TL, Pinto FN, del Giglio A. Ratio between positive lymph nodes and total dissected axillaries lymph nodes as an independent prognostic factor for

disease-free survival in patients with breast cancer. Am J Clin Oncol. 2004;27:304-6 (**em anexo**)

6-del Giglio A, **Costa LJ**. The quality of randomised controlled trials may be better than assumed. BMJ. 2004;328:24-5

7-**Costa LJ**, Gallafrio CT, Franca FO, del Giglio A. Simultaneous occurrence of Hodgkin disease and tuberculosis: report of three cases. South Med J. 2004;97:696-8

8-**Costa LJ**, Varella PC, Del Giglio A. White coat effect in breast cancer patients undergoing chemotherapy. Eur J Cancer Care 2003;12:372-3

Capítulos de livro:

1-Gemmil RM, **Costa LJ**, Medeiros B, Drabkin H. Molecular Pathogenesis of Renal Cancer and Related Treatment Aspects. In Diseases of the Kidney and Urinary Tract. Schrier R.W. eds. 8th edition, 2005 (in press)

2-**Costa LJ**, Kane M. Chemotherapy for head and neck cancer. In ENT secrets. Jafek B.W., Murrow B.W. eds. 3rd edition, 2005.

3-**Costa LJM**, Giglio A. Marcadores Moleculares em Oncologia (*Molecular Markers in Oncology*). In Oncologia Clínica. Brentani M eds., 2003.