



CINTIA ELISABETH GOMEZ

**“Modulação das vias de sinalização de sobrevivência, ciclo celular,
resistência e potencial metastático pela etoxzolamida na linhagem celular de
adenocarcinoma ductal de pâncreas humano (PANC-1)”**

***“Modulation of survival, cell cycle, resistance signaling pathways and
metastatic potential by ethoxzolamide in human pancreatic ductal
adenocarcinoma cell line (PANC-1)”***

CAMPINAS, 2013



CINTIA ELISABETH GOMEZ

**“Modulação das vias de sinalização de sobrevivência,
ciclo celular, resistência e potencial metastático pela
etoxzolamida na linhagem celular de adenocarcinoma
ductal de pâncreas humano (PANC-1)”**

*“Modulation of survival, cell cycle, resistance signaling
pathways and metastatic potential by ethoxzolamide in human
pancreatic ductal adenocarcinoma cell line (PANC-1)”*

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Cintia Elisabeth Gomez</i>
<i>[Signature]</i>
o aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Dissertation presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Functional and Molecular Biology, in the area of Biochemistry.

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Verissima Ferreira Halder

CAMPINAS, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

L629m

Limia, Cintia Elisabeth Gomez, 1983-

Modulação das vias de sinalização de sobrevivência, ciclo celular, resistência e potencial metastático pela etoxzolamida na linhagem celular de adenocarcinoma ductal de pâncreas humano (PANC-1) / Cintia Elisabeth Gomez Limia. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Carmen Veríssima Ferreira Halder.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Neoplasias pancreáticas. 2. Etoxzolamida. 3. Marcadores biológicos de tumor. I. Ferreira, Carmen Veríssima, 1969-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Modulation of survival, cell cycle, resistance signaling pathways and metastatic potential by ethoxzolamide in human pancreatic ductal adenocarcinoma cell line (PANC-1)

Palavras-chave em Inglês:

Pancreatic neoplasms
Ethoxzolamide
Biological tumor markers

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carmen Veríssima Ferreira Halder [Orientador]
Ana Carolina Santos de Souza Galvão
José Andrés Yunes

Data da defesa: 21-03-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 21 de março de 2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira Halder (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Ana Carolina Santos de Souza Galvão


Assinatura

Dr. José Andrés Yunes


Assinatura

Profa. Dra. Cintia Maria Saja Cereda

Assinatura

Prof. Dr. Licio Augusto Velloso

Assinatura

“Si buscamos resultados diferentes no debemos hacer siempre lo mismo”

Albert Einstein

Dedicatoria

A toda mi familia,
por acompañarme en mis logros y dificultades,
por la comprensión de mi ausencia en momentos importantes para poder realizar mis estudios.

Especialmente a mi madre Dany,
por su apoyo y amor incondicional en todos los momentos de mi vida, por enseñarme valores
de vida que hoy guían mis días, por sus esfuerzos y dedicación para mi formación como
profesional y ser humano, por ser la luz de mis ojos.

A mis hermanos Tito y Rodrigo,
por el apoyo y por la confianza que siempre depositaron en mí.

A mi abuelo Miguel Ángel “*in memoriam*”,
por su apoyo incondicional en mis estudios y trayecto como ajedrecista, por todas sus
enseñanzas y valores que hoy acompañan mis días.

A Hugo “*in memoriam*”,
por su apoyo y cariño incondicional en momentos importantes de mi vida, por guiarme e
iluminar mi camino, por enseñarme a no tener miedo de nada y que mi fuerza interior puede
llegar lejos.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer enormemente à professora e orientadora Carmen, por ter me dado a oportunidade de começar uma nova etapa da minha carreira científica. Quando aluna de graduação, sem ter conhecimento na área de oncologia e cultura de células, ela me acolheu e deu a oportunidade de realizar um estágio e posteriormente o mestrado. O que me levou ao começo de uma longa trajetória de aprendizagem que realizei no laboratório. Quero agradecer também por me ensinar os primeiros passos sobre a pesquisa e pela experiência adquirida nestes anos, que contribuiu para minha formação profissional.

Meu especial agradecimento a Karin, pelo empenho em me guiar e ensinar as diferentes técnicas de laboratório através da sua “orientação de bancada”, pelas importantes discussões de resultados e por contribuir no meu crescimento profissional.

Quero agradecer a todos o que fazem parte do Laboratório de Bioensaios “*in vitro*” e Transdução de Sinal. À Denise e a Cláudia por terem me recebido tão bem no laboratório, pelo suporte técnico e as sugestões em todos os momentos da execução do meu projeto. À Josélia, pelas extensas discussões de trabalho e artigos, que foram muito importantes para o desenvolvimento da minha pesquisa. À Thaís, pela viagem ao congresso dos Estados Unidos e pelas discussões a respeito do meu projeto e ideias. Ao Bispo, que em alguns momentos me ajudou com técnicas novas de laboratório e acrescentou em minha formação profissional. À Juli, por muitas das sugestões sobre técnicas de laboratório e discussões científicas. Aos demais, que já estiveram em nosso laboratório: Mile, Rodrigo e Mika pelas valiosas sugestões em diversos momentos do meu trabalho. À Daisy, por me ensinar muitos temas sobre pesquisa, pelas discussões e sugestões pertinentes ao meu trabalho e contribuir na minha formação profissional. À Roberta, por ter contribuído com novas ideias e técnicas de

laboratório deste projeto. Aos novos integrantes do nosso laboratório: Gustavo, Marina e Rodrigo.

Quero agradecer também a todo o pessoal do Laboratório de Enzimologia, do Departamento de Bioquímica da UNICAMP, Darlene, Camila Wielewski e Erika. À Camila Camargo e Guilherme Michelini, pelas discussões a respeito de projetos e ideias. Ao pessoal do Laboratório de Genética Animal, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP, Ana María L. Azeredo-Espin, Renato, Mariana, Norma, Pablo e Palocci, por terem me ajudado nos primeiros passos da pesquisa quando aluna de iniciação científica e acrescentado na minha formação profissional.

A todos os que integram o Departamento de Bioquímica da UNICAMP, especialmente aos funcionários do programa de pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, Viviane, Andréia e Silvia, pelas informações necessárias sobre os trâmites dos documentos para a qualificação. Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Biologia, em especial a Mara Janaina de Oliveira, pela disposição, informação sobre os documentos da qualificação.

Agradeço aos professores que participaram da minha graduação na “Facultad de Ciencias Biológicas y Bioquímica, Universidad Nacional del Litoral”, e na pós-graduação em Biologia Molecular e Funcional (UNICAMP). Em especial, a Jorge Vega que me ajudou na minha adaptação acadêmica, durante o intercâmbio, para cursar novas disciplinas no Instituto de Biologia (UNICAMP). Não menos importante, gostaria agradecer ao Prof. Hiroshi, por todo o seu apoio, ensinamentos, conversas e, acrescentar com seus conhecimentos e experiência na minha formação profissional.

Agradeço aos membros da pré-banca, Prof. Dr. Licio Augusto Velloso, Prof. Dr. Fernando Coelho e a Profa. Dra. Ana Carolina Santos de Souza Galvão, pelas importantes sugestões para a melhoria desta dissertação. Do mesmo modo, agradeço aos membros da

banca Dr. José Andrés Yunes, Profa. Dra. Ana Carolina, Prof. Dr. Licio e Dra. Cíntia Maria Saia Cereda.

Agradeço aos amigos que encontrei aqui tanto no tempo do intercâmbio e estágio quanto nestes anos de mestrado, muitos deles me ajudaram a crescer, me acompanharam e foram parte de momentos importantes na minha vida até o dia de hoje, fazendo da minha estada em Campinas e Barão Geraldo um lugar de lindas lembranças e muitas alegrias.

Quero agradecer especialmente a Robert, Luiz, Tiago, Anselmo, Rocha, Raul e Belleza, Mari e André, Tere e Migue, Cami e Mário, Ine, Gabi, Andreza, Irene, Cíntia, Vivi, Denise, Danilo, Erick, Anísio, Tiago, Yovani, Cheo, Javi, Tania, Meli, Isa, Yamit, Gleidson e Vinicius. Quero agradecer também aos queridos amigos de xadrez, Alexandre, Enzo, Tatiana, Eliana, Jota, Duber, Fernando e em especial a Gerson e Denise que me incentivaram jogar depois de tantos anos trazendo lindos momentos de alegria.

Agradeço aos meus amigos da Argentina que são parte de minha vida em todos os momentos, Andrea, Sofi, Sebastián, Moni, José Luis, Lisi, Fernando, Dario, Hugo, Germán, Sabri, Caro, Tania, Gabriel, Noe, Pauli, Manu e Nico. A minhas amigas uruguaias Vania, Paola e Vico.

Agradeço a toda minha família pelo apoio nas minhas decisões, por me acompanhar nas diferentes etapas, além de confiarem sempre em mim. Agradeço especialmente aos meus tios Ernesto e Vilma, Kiki e Esteban, por todos os conselhos, ajuda e incentivo dado em diferentes momentos. A minhas avós Elita e Irma, por sempre estarem dispostas a me acompanhar em cada decisão da minha vida. A todos os meus primos pela alegria e amizade de sempre.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro durante o mestrado, com a bolsa e reserva para participação em congressos

científicos; além do auxílio a projetos de pesquisa da Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira Halder, que garantiram a execução deste projeto.

Agradecimento Especial às seguintes Instituições:



UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas



Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(FAPESP) - Processo nº 2011/03517-9

RESUMO

O câncer de pâncreas é considerado a quarta causa de morte por doenças malignas nos países ocidentais. Entre os tipos de câncer de pâncreas exócrino cerca de 80-90% dos casos correspondem ao adenocarcinoma ductal, um câncer altamente agressivo, invasivo, potencialmente metastático e altamente resistente às quimio e radioterapias convencionais. Deste modo, novos compostos que diminuam o comportamento agressivo das células de câncer de pâncreas são necessários. Atualmente os inibidores das anidrases carbônicas (IAC), da família das sulfonamidas heterocíclicas/aromáticas (ex. etoxzolamida - EZA), estão sendo estudados como agentes antitumorais, antiepiléticos, entre outros. No entanto, pouco se sabe sobre o mecanismo molecular de ação antitumoral destes compostos. Deste modo, pela primeira vez, foi avaliado o efeito da EZA em câncer de pâncreas e outros tipos de tumores sólidos (melanoma e próstata) com fenótipos altamente agressivos. As linhagens celulares SKMel-103 (melanoma) e PANC-1 (câncer de pâncreas) apresentaram sensibilidade similar frente à EZA nos tempos de tratamentos de 48 e 72 h, PC-3 (câncer de próstata) apresentou maior resistência. Diante destes resultados prévios, e tendo em vista o interesse do nosso grupo de pesquisa em entender melhor a biologia do câncer de pâncreas, foi escolhida a linhagem celular PANC-1. O objetivo principal deste projeto foi estudar o mecanismo molecular de ação pela qual a EZA diminui a proliferação e a agressividade tumoral, analisando a expressão e função de biomarcadores chaves destes processos. EZA diminuiu a viabilidade das células PANC-1 ($IC_{50} = 222 \mu M$) e induziu parada do ciclo celular na fase G_0/G_1 o que foi confirmado pelo decréscimo da expressão das proteínas chaves do ciclo celular, como ciclina D1 e CDK4. Adicionalmente, a expressão da quinase Pim-1, associada com resistência e sobrevivência foi marcadamente diminuída, sendo observada também uma redução da expressão da P-glicoproteína (Pgp), proteína associada com resistência a múltiplas drogas. Adicionalmente foi observado um aumento da atividade da quinase AKT, resultado que foi relacionado com o estresse no retículo endoplasmático (ERE). De forma interessante tanto a expressão quanto a atividade das metaloproteinases (MMPs) foram diminuídas, assim como a expressão da integrina $\alpha v \beta 3$ e FAK, proteínas que estão relacionadas com fenótipos agressivos e invasivos do câncer de pâncreas. Deste modo, nossos resultados mostram, pela primeira vez, detalhes moleculares da ação antitumoral da EZA, os quais reforçam o potencial desta classe de compostos como interessantes agentes quimioterápicos.

ABSTRACT

Pancreatic cancer is considered the fourth-leading cause of disease malignancies-related death in the western world. About 80-90% of exocrine pancreatic cancer correspond to ductal adenocarcinoma and remains highly aggressive, invasive, potentially metastatic and highly resistant to conventional chemotherapy and radiotherapy. In this regard, novel compounds that diminish the aggressiveness behavior of pancreatic cancer cells are urgently called for. Currently the carbonic anhydrase inhibitors (CAI), aromatic and heterocyclic sulfonamides (e.g. ethoxzolamide – EZA), have been investigated as antitumoral, antiepileptic agents, among others. However, little is known about the molecular mechanisms of action of these compounds. Thus, for the first time, it has been evaluated the effect of EZA in pancreatic cancer and other types of solid tumors (melanoma and prostate cancer) that display highly aggressive phenotypes. The cell lines SKMel-103 (melanoma) and PANC-1 (pancreatic cancer) presented similar sensibility towards EZA after treatment for 48 and 72 h, however PC-3 displayed higher resistance. Considering these previous results and in view of the interest of our research group to better understand the biology of pancreatic cancer, we chosen PANC-1 cell line as model. The main goal of this study was to examine the molecular mechanism by which EZA diminished the proliferation rate and the tumoral aggressiveness of PANC-1 cells by checking the expression/function of some key biomarkers of those processes. EZA decreases PANC-1 cells viability ($IC_{50} = 222 \mu M$) and caused cell cycle arrest at phase G_0/G_1 confirmed by decreasing expression of key proteins of cell cycle, such as, cyclin D1 and CDK4. In addition, the expression of pro-survival kinase, Pim-1, associated with cell resistance and survival was markedly diminished, it was also observed reduction in the P-glycoprotein (Pgp) expression level, an important protein associated with multidrug resistance (MDR). In addition, it was observed an augment of AKT kinase activity. This activation of AKT might be related with endoplasmic reticulum (ER) stress. Interestingly, both expression and activity of metalloproteinases (MMPs) were diminished, as well as integrins $\alpha v \beta 3$ expression and FAK activity, all of them are key proteins involved with aggressive and invasive phenotypes in pancreatic cancer cells. Our findings revealed, for the first time, the molecular details of EZA antitumoral action, which reinforce the potential of this class of compounds as interesting chemotherapeutic agents.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

λ : comprimento de onda

AAZ: acetazolamida

ABC: (*ATP-binding cassette transporters*), família dos transportadores ABC

ABCB1: (*ATP-binding cassette, sub-family B member 1*), família de transportadores de membrana ABC, subfamília B1

ABCC1: (*ATP-binding cassette, sub-family C member 1*), família de transportadores de membrana ABC, subfamília C1

ABCG2: (*ATP-binding cassette subfamily G member 2*), família de transportadores de membrana ABC, subfamília G1

ABCP: transportador ABC placenta-específico

ACs: anidrases carbônicas

AIF: (*Apoptosis Inducing Factor*), fator de indução de apoptose

AKT: proteína quinase B

ANOVA: análise de variância

AP-1: (*activating protein-1*), proteína ativadora-1

APAF-1: (*apoptotic protease-activating factor-1*), fator 1 de ativação de proteases pró-apoptóticas

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATF4: (*activating transcription factor 4*), fator de ativação da transcrição 4

ATF6: (*activating transcription factor 6*), fator de ativação da transcrição 6

ATP: trisfofato de adenosina

BAD: (*Bcl-2 antagonist of cell death*), proteína antagonista de Bcl-2 associada à morte celular

BAK: (*Bcl-2 antagonist /killer*), proteína antagonista/exterminadora de Bcl-2

BAX: (*Bcl-2-associated X protein*), proteína X associada a Bcl-2

Bcl-2: (*B-cell lymphoma 2*), proteína 2 de linfoma de células B

Bcl-xL: (*B-cell lymphoma-extra large*), isoforma L da proteína semelhante a Bcl-2

BCRJ: Banco de Células do Rio de Janeiro

BCRP: (*breast cancer resistance protein*), proteína de resistência do câncer de mama

BH: domínio homólogo a Bcl-2

CAM: moléculas de adesão celular

CAMK: quinase dependente de calmodulina

Caspases: (*cysteine aspartate-specific proteases*), enzimas da família cisteína-aspartato de proteases específicas

CD95: *cluster of differentiation 95*

Cdc25: proteína fosfatase 25 reguladora da divisão celular

CDK1: quinase 1 dependente de ciclina

CDK2: quinase 2 dependente de ciclina

CDK4: quinase 4 dependente de ciclina

CDs: ciclodextrinas

CHOP: (*C/EBP homologous protein*), proteína homóloga C/EBP

cIAP: proteína inibidora de apoptose

DMEM: (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), meio Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DP: desvio padrão

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilenodiamino tetracético

EGF: fator de crescimento epidérmico

EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico

eIF2 α : fator 2 alfa de iniciação da síntese proteica em eucariotos

ELAM-1: (*endothelial leukocyte adhesion molecule-1*), molécula de adesão endotelial de leucócitos-1

EndG: endonuclease G

EPM: erro padrão da média

ERE: Estresse do retículo endoplasmático

EZA: (6-ethoxy-1,3-benzothiazole-2-sulfonamide), etoxzolamida

FAK: quinase de adesão focal

FAP-1: *FAS-associated phosphatase 1*

FAS: membro 6 da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral

FASL: proteína ligante do receptor FAS

FOXO: (*Forkhead Box-containing Protein O*), fator de transcrição da família *Forkhead*

GRP: proteínas reguladoras de glicose

GSK-3 α/β : glicogênio sintase quinase-3 α/β

h: hora

HIF-1: fator de indução de hipóxia

HP- β CD: 2-hidroxipropil-3-ciclodextrina

Hsp27: proteína de choque térmico 27

Hsp70: proteína de choque térmico 70

Hsp90: proteína de choque térmico 90

IAC: inibidores das anidrases carbônicas

IC₅₀: concentração do composto que diminui em 50% a viabilidade celular

ICAM: molécula de adesão intercelular 1

IL: interleucina

INCA: Instituto Nacional de Câncer

IP: iodeto de propídeo

IRE1: *inositol-requiring enzyme 1*

JAK: (*Janus Kinase*), Janus quinase

KDa: Kilo Dalton

LMA: leucemia mielóide aguda

LRP : (*lung resistance-related protein*), proteína relacionada à resistência no pulmão

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

MDR: resistência a múltiplas drogas

MEC: matriz extracelular

MMP: metaloproteinase de matriz

MRPs: proteínas MDR relacionadas

mTOR: proteína serina/treonina quinase alvo da rapamicina em mamíferos

MTT: 3-brometo de (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio

MTZ: metazolamida

MXR: proteína associada à resistência a mitoxantrona

NaF: fluoreto de sódio

NIH: *National Institute of Health*

NFκB: fator nuclear kappa B

OMS: Organização Mundial da Saúde

p58^{IPK}: *inhibitor of the eIF2α protein kinases PKR*

PAGE: (*polyacrylamide gel electrophoresis*), eletroforese em gel de poliacrilamida

p-AKT: AKT fosforilada

PANC-1: linhagem celular de adenocarcinoma ductal de câncer de pâncreas humano-1

PAP: *Pancreatitis-associated protein*

PBS: solução tampão fosfato salino

PC-3: linhagem celular de câncer de próstata humano

PEA3: *Ets-related transcription factor family members*

PERK: *PKR-like Endotelium reticulum kinase*

Pgp: P-glicoproteína

PH: domínio homólogo à plecstrina

PHLPP: *pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase*

PPP: *phosphoprotein phosphatase*

PI3K: fosfatidilinositol-3 quinase

Pim: *proviral integration of Moloney vírus*

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

PP2A: proteína serina/treonina fosfatase 2A

PRAS40: substrato de AKT rico em prolina de 40 KDa

PTEN: (*phosphatase and tensin homolog*), proteína fosfatase homóloga de tensina

PTP: proteína tirosina fosfatase

PVDF: (*polyvinylidene difluoride*), Fluoreto de Polivinilideno

Ras: *Rat sarcoma protein*

RE: Retículo Endoplasmático

RNA: ácido ribonucleico

rpm: rotação por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SDS: dodecil sulfato de sódio

Ser: serina

SFB: soro fetal bovino

SKMel-103: *Human Skin Melanoma cell line 103*

Sp-1: *Specificity Protein 1*

Src: proteína tirosina quinase proto-oncogênica Src ou pp60 c-src

STAT: proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição

TAK: (*transforming growth factor- β -activated kinase*), quinase ativada por TGF- β

TAP: proteína transportadora de peptídeos antigênicos

TBS: tampão salino Tris

TBST: tampão salino Tris com *Tween 20*

TGF- β : Fator transformador de crescimento β

Thr: treonina

TIMP: inibidor de metaloproteinase de tecido

TNF: fator de necrose tumoral

Tris: tris (hidroximetil) aminometano

Tyr: tirosina

UPR: *unfolded protein response*

VCAM-1: (*vascular cell adhesion molecule-1*), molécula de adesão celular vascular

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

XBP-1: *X-box binding protein 1*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura da etoxzolamida.....	7
Figura 2.	A. Estrutura da ciclodextrina, α , β e γ -CD são definidas por n: 6, 7 e 8, respectivamente. B. Representação esquemática da estrutura tridimensional das ciclodextrinas (adaptado de Britto et al., 2004).....	9
Figura 3.	Esquema das respostas UPR (<i>unfolded protein response</i>) no estresse do retículo endoplasmático.....	16
Figura 4.	Etapas do processo de metástase.....	17
Figura 5.	Viabilidade das células PANC-1, PC-3 e SKMel-103 expostas a diferentes concentrações de etoxzolamida.....	39
Figura 6.	Curva de proliferação e viabilidade das células PANC-1 expostas a diferentes concentrações de etoxzolamida.....	41
Figura 7.	Análise da expressão de proteínas que controlam a progressão do ciclo celular após do tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h.....	43
Figura 8.	Etoxzolamida induz parada do ciclo celular em células PANC-1.....	45
Figura 9.	Análise da expressão da quinase Pim-1, c-Myc, Pgp e estado de ativação da PP2A nas células PANC-1 tratadas com a etoxzolamida.....	48
Figura 10.	Modelo hipotético da degradação de Pim-1 pela fosfatase PP2A.....	47
Figura 11.	Proteínas substratos de Pim-1 quinase e da fosfatase PP2A.....	50

Figura 12.	Análise da expressão da chaperona GRP78 relacionada ao estresse do retículo endoplasmático após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h.....	51
Figura 13.	Análise da expressão e fosforilação da enzima quinase AKT relacionada ao estresse do retículo endoplasmático após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h.....	53
Figura 14.	Análise da expressão e/ou fosforilação de proteínas substratos de AKT.....	54
Figura 15.	Análise da expressão das metaloproteinases MMP2 e MMP9 após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h.....	57
Figura 16.	Análise da atividade das metaloproteinases MMP2 e MMP9 após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h.....	58
Figura 17.	Análise da expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h.....	59
Figura 18.	Avaliação da capacidade de adesão celular das células PANC-1 expostas a diferentes concentrações de etoxzolamida.....	61
Figura 19.	Análise da expressão das proteínas FAK e integrina $\alpha v \beta 3$ após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h.....	63
Figura 20.	Alterações na morfologia das células PANC-1, induzidas pela etoxzolamida após o tratamento por 48 h.....	66

Figura 21.	Análise da expressão de proteínas chaves que participam nos processos de morte celular após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h.....	70
Figura 22.	Análise da expressão das anidrases carbônicas após do tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h.....	72
Figura 23.	Alvos moleculares da etoxzolamida e efeitos do mecanismo de ação molecular.....	73
Figura 24.	Capacidade de recuperação celular das células PANC-1 expostas a diferentes concentrações de etoxzolamida.....	74
Figura 25.	Viabilidade das células PANC-1 expostas a diferentes concentrações de gencitabina.....	77
Figura 26.	Viabilidade das células PANC-1 expostas a diferentes concentrações de etoxzolamida combinada com 160 μ M de gencitabina.....	79
Figura 27.	Curva de proliferação e viabilidade das células PANC-1 expostas a diferentes concentrações de gencitabina.....	81
Figura 28.	Viabilidade das células PANC-1 expostas a diferentes concentrações do complexo etoxzolamida-ciclodextrina e etoxzolamida sem complexo.....	84

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	1
1.1.	Impacto do câncer e influências no perfil epidemiológico mundial.....	2
1.1.1	Influência do câncer de pâncreas no perfil epidemiológico do Brasil.....	2
1.2.	Resistência a múltiplas drogas (MDR) e agressividade tumoral.....	3
1.3.	Drogas da família das sulfonamidas.....	6
1.3.1.	Etozzolamida e relação com o câncer.....	7
1.4.	Ciclodextrina aumenta a solubilidade da etozzolamida.....	8
1.5.	Principais alvos moleculares modulados pela etozzolamida na linhagem celular de adenocarcinoma ductal de câncer de pâncreas (PANC-1), avaliados neste trabalho.....	10
1.5.1.	Mecanismos de sobrevivência celular.....	10
1.5.1.1.	Proteínas quinases e mecanismos de sobrevivência celular.....	10
1.5.1.2.	Estresse do retículo endoplasmático (ERE).....	14
1.5.2.	Metástase.....	17
1.5.3.	Apoptose em câncer de pâncreas.....	20
2.	Objetivos.....	23
3.	Materiais e Métodos.....	25
3.1.	Materiais.....	26
3.2.	Métodos.....	26
3.2.1.	Linhagens celulares e manutenção.....	26
3.2.2.	Tratamento das células com etozzolamida.....	27

3.2.3.	Análise da viabilidade celular pelo ensaio de redução do MTT.....	27
3.2.4.	Análise da expressão de proteínas por Western Blotting.....	28
3.2.5.	Avaliação da atividade das metaloproteinases 2 e 9 por zimografia.....	30
3.2.6.	Análises do ciclo celular utilizando marcação com iodeto de propídeo (IP).....	30
3.2.7.	Adesão celular em placas de cultura de células.....	31
3.2.8.	Avaliação da capacidade de recuperação das células PANC-1 após tratamento com etoxzolamida.....	32
3.2.9.	Tratamento da linhagem celular PANC-1 com etoxzolamida combinada com gencitabina.....	32
3.2.10.	Preparação do complexo sólido etoxzolamida com 2-hidroxipropil-3-ciclodextrina (HP- β -CD).....	33
3.2.11.	Microscopia Confocal.....	34
3.2.11.1.	Avaliação das alterações celulares e biomarcadores de invasão e migração celular.....	34
3.2.12.	Análise dos resultados.....	35
4.	Resultados e discussão.....	37
4.1	Efeito da etoxzolamida na viabilidade de linhagens de tumores sólidos.....	38
4.2.	Avaliação do ciclo celular, proliferação, sobrevivência e resistência das células PANC-1.....	40
4.2.1.	Etoxzolamida induz parada do ciclo celular em PANC-1.....	40
4.2.2.	Etoxzolamida causa alteração da expressão de mediadores da progressão do ciclo celular.....	41

4.2.3.	Análise da expressão da quinase Pim-1, c-Myc, Pgp e estado de ativação da PP2A nas células PANC-1 tratadas com etoxzolamida.....	46
4.2.4.	Estresse do retículo endoplasmático (ERE) em células PANC-1.....	50
4.2.4.1.	Estresse do retículo endoplasmático poderia regular diferencialmente a fosforilação de AKT nos resíduos Treonina 308 e Serina 473.....	52
4.2.4.2.	Estresse do retículo endoplasmático poderia induzir degradação da ciclina D1.	55
4.3.	Avaliação do potencial de invasão celular.....	56
4.3.1.	Análise da expressão e atividade de metaloproteinases.....	56
4.3.2.	Ensaio de adesão celular e análises de biomarcadores de invasão celular.....	60
4.3.3.	Avaliação das alterações morfológicas das células PANC-1 e relação com proteínas associadas ao citoesqueleto de invasão e migração celular.....	65
4.4.	Efeitos da etoxzolamida nos mecanismos de morte celular.....	68
4.5.	Análise da expressão das anidrases carbônicas.....	71
4.6.	Avaliação de recuperação celular após tratamento de 48 h com etoxzolamida..	72
4.7.	Efeito do tratamento combinado de etoxzolamida com gencitabina na viabilidade celular das células PANC-1.....	76
4.8.	Viabilidade das células PANC-1 utilizando o complexo de etoxzolamida e 2-hidroxipropil-3-ciclodextrina (HP- β -CD).....	82
5.	Conclusões.....	85
6.	Referências bibliográficas.....	87
7.	Anexos.....	101
7.1.	Atividades adicionais: Apresentação de trabalho em congresso.....	102

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Impacto do câncer e influências no perfil epidemiológico mundial

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. As estatísticas estimam que uma de cada três pessoas tenha probabilidade de adquirir câncer em algum momento da vida, dado impactante se levar em conta que o número de incidência no mundo foi estimado em 12,7 milhões de casos em 2008 (Jemal et al., 2011). Segundo os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) 7,6 milhões de pessoas morreram por causa desta doença em 2008. Dados atuais da OMS estimaram para o ano 2030 27 milhões de casos incidentes de câncer e 17 milhões de mortes em decorrência deste (OMS, 2012). O maior impacto será esperado nos países de baixa e média renda, principalmente pela falta de programas nacionais de controles do câncer. Siegel e colaboradores (2012) estimaram um total de 1,6 milhões de novos casos e que 577.190 americanos poderiam morrer de câncer em 2012. Estes números estimados enfatizam a necessidade de estudar o câncer e transformar conhecimentos em novas e eficientes terapias.

1.1.1. Influência do câncer de pâncreas no perfil epidemiológico do Brasil

O câncer de pâncreas caracteriza-se por apresentar elevada resistência a múltiplas drogas (Long et al., 2011) e uma alta agressividade na progressão da doença (Hashimoto et al., 2011). A OMS apontou o câncer de pâncreas como a quarta causa de morte por doenças malignas nos países ocidentais (OMS, 2012). No Brasil, segundo os dados atuais do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de pâncreas é responsável por 2% de todos os tipos de cânceres diagnosticados, sendo que 4% do total de mortes por câncer são devido a esta doença. A estimativa da incidência registrada no ano 2009 foi de 9.320 novos casos. Já no ano

2010 o INCA apontou 7.440 casos de morte sendo 3.671 homens e 3.769 mulheres. A difícil detecção do câncer de pâncreas e a agressividade tumoral são responsáveis pela alta taxa de mortalidade (Estimativa INCA, 2012).

1.2. Resistência a múltiplas drogas (MDR) e agressividade tumoral

A aquisição de resistência a agentes quimioterápicos ainda constitui o principal obstáculo no tratamento de pacientes com câncer. Por esta razão, a elucidação dos mecanismos que conferem resistência a fármacos com diferentes alvos e estruturas químicas, chamada multirresistência ou do inglês, “*multidrug resistance*” (MDR), e o desenvolvimento de terapias mais eficazes para o tratamento do câncer têm sido as principais metas dos pesquisadores da área nos últimos 35 anos.

A resistência às drogas quimioterápicas pode se manifestar clinicamente logo nos estágios iniciais de tratamento, constituindo o fenômeno de resistência “de novo” ou ser induzida durante a quimioterapia quando células mais “sensíveis” são eliminadas. Em consequência, observa-se que a resistência genética pode ser induzida tanto pelo próprio tratamento com agentes antineoplásicos ou emergir como um evento espontâneo (Kappelmayer et al., 2004; Nobili et al., 2006). Como um mecanismo de caráter multifatorial, o fenótipo MDR tem sido associado a uma série de alterações celulares incluindo alterações no ciclo celular, aumento na eficiência de reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA), redução de apoptose e alteração no metabolismo de drogas (Szakács et al., 2006). Entre os vários mecanismos identificados, o mais comumente encontrado envolve o aumento do efluxo de drogas citotóxicas hidrofóbicas através de um sistema dependente de energia, mediado por membros da família de transportadores ABC (*adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette transporters*). Primeiramente descritos na década de 70, vários membros da família de

transportadores ABC têm se mostrado como potentes indutores de MDR, destacando-se o papel da P-glicoproteína (Pgp), proteínas MDR relacionadas (MRPs) e proteína transportadora de peptídeos antigênicos (TAP) (Hirose et al., 2003; Kruh e Belinsky et al., 2003; Al-Shawi et al., 2005).

O modelo de efluxo de drogas mais estudado foca-se na atividade da Pgp, uma proteína de 170 kDa que cliva ATP provendo a energia necessária para a extrusão de xenobióticos. O aumento na expressão de Pgp, produto gênico de MDR1, tem mostrado ser fator suficiente para a aquisição do fenótipo MDR e resistência frente ao tratamento com várias drogas lipossolúveis incluindo antraciclina (doxorubicina), vinca alcalóides (vinblastina, vincristina), antibióticos (dactinomicina) e antimetabólitos (gencitabina, 5-fluorouracil), entre outros. De fato, células com alta expressão de Pgp são capazes de expelir uma grande variedade de drogas estruturalmente não relacionadas, impedindo que níveis intracelulares tóxicos sejam alcançados (Rumjanek et al., 2001).

Adicionalmente às bombas de efluxo, células tumorais apresentam inúmeros outros importantes mecanismos voltados para a modulação da resposta ao quimioterápico. O transportador ABCG2 (*ATP-binding cassette subfamily G member 2*), também conhecido como transportador ABC placenta-específico (ABCP), proteína associada à resistência a mitoxantrona (MXR) ou proteína associada ao câncer de mama (BCPR), foi primeiramente isolado em células de tumores de mama mostrando ser potente inibidor do acúmulo intracelular de drogas mesmo na ausência de Pgp ou MRP1. De forma similar, a proteína relacionada à resistência no câncer de pulmão (*lung resistance-related protein*, LRP) também se mostrou como indutora de resistência a múltiplas drogas. Vale ressaltar que tanto ABCG2 quanto LRP têm sido detectadas em células leucêmicas e câncer de pâncreas, entre outros tipos de cânceres, sendo considerados importantes fatores de resistência no tratamento da

leucemia mieloide aguda (LMA) (Van den Heuvel-Eibrink et al., 2002; Kappelmayer et al., 2004; Chen et al., 2012).

Na tentativa de combater a resistência de células tumorais muitos inibidores de MDR, especialmente de Pgp, foram identificados, porém nenhum deles se mostrou eficiente clinicamente e muitos foram excluídos por apresentar alta toxicidade. Apesar do pouco sucesso das primeiras drogas estudadas ainda é grande o esforço dispensado na busca de inibidores de MDR não tóxicos e menos propensos a interações com as atuais drogas antineoplásicas. Ainda está em desenvolvimento uma terceira geração de drogas capazes de inibir especificamente Pgp sem alterar a farmacocinética das drogas antitumorais (Ozben et al., 2006; Szakács et al., 2006).

Os tumores do pâncreas são multipotentes e originários de células epiteliais (Deer et al., 2010). Estes tumores apresentam uma alta agressividade e proliferam em microambientes que facilitam a interação com os fibroblastos, células endoteliais, células endócrinas e imunológicas de uma forma complexa. Essa interação promove o crescimento das células tumorais que expressam sua malignidade e invadem órgãos adjacentes, gerando metástase em linfonodos regionais ou fígado principalmente (Imamura et al., 2010), podendo chegar a invasões vasculares e nervosas (Kleeff et al., 2007). Além disso, o câncer de pâncreas é altamente resistente às quimioterapias e radioterapias convencionais apresentando uma rápida quimioresistência intrínseca ou adquirida associada com MDR (Jiang et al., 2011). O fenótipo MDR resulta numa superexpressão das proteínas Pgp (MDR-1), dos transportadores ABCB1 (*ATP-binding cassette, sub-family B member 1*, MDR-1) e ABCC1 (*ATP-binding cassette, sub-family C member 1*, MRP-1) em adenocarcinomas de pâncreas (O'Driscoll et al., 2007). Este fenótipo está associado com um profundo impacto sobre a seleção de estratégias bem como na eficiência terapêutica.

1.3. Drogas da família das sulfonamidas

Atualmente, novos compostos que diminuam o comportamento agressivo do câncer de pâncreas são urgentemente necessários. Deste modo, uma alternativa na busca poderia ser o reposicionamento de fármacos, do inglês “*drug repositioning*”, que vem sendo uma estratégia de inovação bem sucedida e explorada por vários grupos de pesquisa e indústrias farmacêuticas (Lee et al., 2012; Padhy et al., 2011). Esta nova estratégia, consiste principalmente na procura de novos usos de fármacos já aprovados e disponíveis no mercado, sendo altamente favorável no cenário atual do câncer (Tobinick et al., 2009; Cheng et al., 2012).

Os inibidores das anidrases carbônicas (IAC) que pertencem à família das sulfonamidas heterocíclicas/aromáticas e seus derivados (bis sulfonamidas) têm sido desenvolvidos como drogas para diferentes doenças (Husain et al., 2012). Uma série de derivados das sulfonamidas utilizados clinicamente como drogas farmacológicas (tais como acetazolamida, metazolamida, diclorofenamida e etoxzolamida) foram avaliados para reposicionamento de fármacos (Scozzafava et al., 2000). No início foram usados no tratamento sistêmico de glaucoma (Sugrue et al., 2000) e posteriormente como anticonvulsivantes, antiobesidade, anticancerígenos, antipáina, além de serem utilizados como fármacos antibacterianos, inibidores de metaloproteinases de matriz (MMPs), em desordens no desequilíbrio ácido-base e doenças neuromusculares (Husain et al., 2012; Pastorekova et al., 2004, Esteves et al., 2010).

Devido à relação que existe entre o potencial antitumoral destes inibidores e vários tumores hipóxicos (Svastová et al., 2004), alguns derivados das sulfonamidas, como o indisulam (*N*-(3-Chloro-7-indolyl)-1,4-benzenedisulfonamide, E7070), estão sendo testados

em estágios clínicos avançados para o tratamento de tumores sólidos (Supuran et al., 2003; Kesteren et al., 2002).

1.3.1. Etozzolamida e relação com o câncer

A etozzolamida (*6-ethoxy-1,3-benzothiazole-2-sulfonamide*, EZA) pertence à classe das sulfonamidas heterocíclicas/aromáticas (Figura 1) que inibe principalmente as enzimas anidrases carbônicas (ACs, E.C. 4.2.1.1) I, II, IV, V, VII e IX (Bertucci et al., 2009, Nishimori et al., 2005, Supuran et al., 2010). Este fármaco é utilizado clinicamente no tratamento de glaucoma, úlceras duodenais, como diurético e ainda em alguns casos em tratamentos de epilepsia (Supuran et al., 2001).

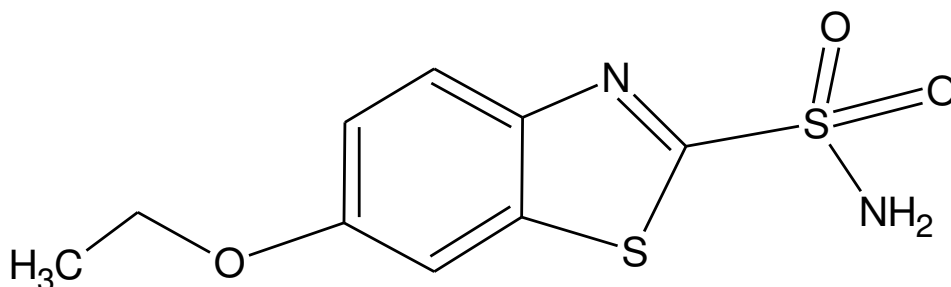


Figura 1 – Estrutura da etozzolamida

Devido à alta expressão encontrada das ACs I e II em células hematopoiéticas, os inibidores destas enzimas são apontados como promissores agentes antileucêmicos (Chen et al., 2006). Chegwiddden e colaboradores (1995) demonstraram que inibidores das ACs clinicamente usados como acetazolamida (AAZ), metazolamida (MTZ) e etozzolamida inibem o crescimento de células de linfoma humano. Em relação aos tumores sólidos, Parkkila e colaboradores (2000) demonstraram que a acetazolamida reduz o potencial agressivo e

invasivo de tumores renais, sugerindo que a redução da capacidade de invasão fosse atribuída à inibição da AC II e/ ou ACXII por prevenir a ativação das enzimas que degradam a matriz celular. Resultados similares foram encontrados para células de melanoma humano (Martínez-Zaguilan et al., 1996). Este inibidor também foi testado em câncer de pâncreas. Deste modo, Juhász e colaboradores (1993) demonstraram que a AAZ inibiu a proliferação “*in vitro*” de várias linhagens propondo que a AAZ poderia atuar como agente antiproliferativo por inibir a AC IX. A EZA foi sintetizada visando melhorar as propriedades físico-químicas de alguns derivados das sulfonamidas e melhorar os efeitos da AAZ (Maren et al., 1992, Maren et al., 1990). Neste contexto, não existem trabalhos que descrevem em detalhes o mecanismo de ação antitumoral da etoxzolamida.

1.4. Ciclodextrina aumenta a solubilidade da etoxzolamida

Entre os derivados das sulfonamidas utilizados clinicamente, a etoxzolamida apresenta vantagens nas propriedades físico-químicas e fisiológicas. Diferentes estudos demonstraram que a etoxzolamida tem estabilidade em plasma e o tempo de vida média é maior que da acetazolamida (Maren et al., 1990; Maren et al., 1992). A etoxzolamida apresenta uma alta velocidade de difusão na membrana plasmática de eritrócitos e diferentes tecidos devido às propriedades lipofílicas (Maren et al., 1990), embora tenha uma baixa solubilidade no meio aquoso ($22,8 \text{ mgL}^{-1}$), sendo este um dos principais problemas a se resolver para melhorar sua atividade biológica.

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, compostos por unidades D-glicopiranosídicas ligadas, que formam uma cavidade hidrofóbica no centro da sua estrutura molecular (Figura 2). Essa cavidade, por sua vez, é capaz de acomodar pequenas moléculas não polares ou lipossolúveis, modificando assim suas características físico-químicas e

biológicas (Miranda et al., 2011). Uma característica chave das formulações com CDs é aumentar a solubilidade das moléculas carregadas no meio aquoso, facilitando a absorção pelas membranas citoplasmáticas das células (Szejtli et al 1988; Loftsson et al., 2007) e aumentando a atividade biológica dos fármacos no interior delas, resultando em uma redução da dose requerida do composto ativo (Valle et al., 2004; Garnero et al., 2010). Neste contexto, numerosos estudos têm sido realizados para melhorar a solubilidade no meio aquoso de várias sulfonamidas incluindo a etoxzolamida (Loftsson et al., 1994; Ribeiro et al., 2012). Loftsson e colaboradores (1994) utilizaram a 2-hidroxipropil-3-ciclodextrina (HP- β -CD) como veículo para aumentar a solubilidade tanto da acetazolamida quanto da etoxzolamida, a fim de melhorar o tratamento de glaucoma. Deste modo, observaram um aumento da solubilidade em meio aquoso e da estabilidade de ambas as drogas.

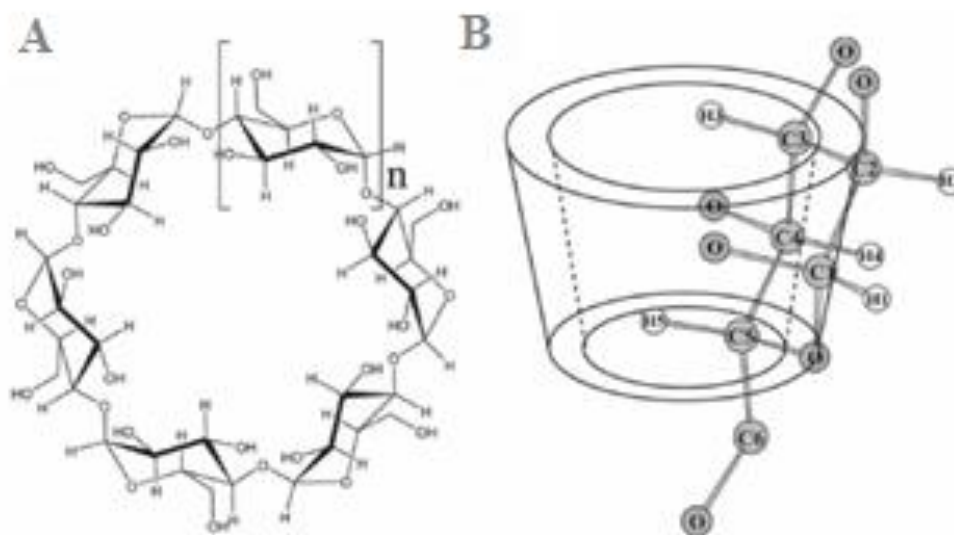


Figura 2. (A). Estrutura da ciclodextrina, α , β e γ -CD são definidas por n: 6,7 e 8, respectivamente (B). Representação esquemática da estrutura tridimensional das ciclodextrinas (adaptado de Britto et al., 2004).

1.5. Principais alvos moleculares modulados pela etoxzolamida na linhagem celular de adenocarcinoma ductal de câncer de pâncreas humano (PANC-1), avaliados neste trabalho

1.5.1. Mecanismos de sobrevivência celular

1.5.1.1. Proteínas quinases e mecanismos de sobrevivência celular

Numerosas enzimas quinases participam ativamente nas vias de sinalização envolvidas nos processos de proliferação, sobrevivência e resistência em diferentes tipos de cânceres (Amaravadi e Craig et al., 2005). Enzimas serina/treonina quinases que pertencem à subfamília das proteínas AGC, como AKT/PKB e Pim (*proviral integration of Moloney virus*), que compreende a família da quinase dependente de calmodulina (CAMK), regulam uma variedade de eventos celulares (Manning et al., 2007; Bullok et al., 2005).

Três estruturas da família das quinases Pim foram definidas para Pim-1, Pim-2 e Pim-3. Vários estudos de cristalografia revelaram que estas enzimas não possuem domínios reguladores, portanto expressam-se na célula constitutivamente ativas (Qian et al., 2004). Porém, a desregulação da expressão protéica parece estar envolvida com a ação de membros da subfamília das proteínas serina/treonina fosfatases PP2A (*protein phosphatase 2A*) que pertencem à família das PPP (*phosphoprotein phosphatase*) (Ma et al., 2007).

Adicionalmente, dados na literatura indicam que a expressão gênica destas enzimas poderia ser induzida e regulada por um amplo número de citocinas (interleucinas (IL) -2, 3 e 7), mitógenos e hormônios que participam das vias de sinalização Janus quinase/ proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição (JAK/STAT), proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) e fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K). A expressão da quinase Pim-1 é induzida principalmente pela via de sinalização de STAT3 que participa na sobrevivência

celular e na ativação do fator de transcrição, fator nuclear kappa B (NFκB), entre outros (Shirogane et al., 1999). Estudos recentes têm mostrado que a via de sinalização de K-Ras (*Rat sarcoma protein*) modula a expressão das Pim quinases na linhagem celular PANC-1 (Xu et al., 2011).

Importantes proteínas chaves de diferentes processos celulares são substratos das Pim quinases. Deste modo, foi identificado o fator de transcrição c-Myc que tem um efeito sinérgico nos processos de proliferação de vários tumores sólidos e leucemias (Kim et al., 2010), além dos reguladores do ciclo celular como o inibidor de quinase dependente de ciclina 1, p12 (p21WAF1/CIP1), e a proteína fosfatase 25 reguladora da divisão celular (Cdc25) (Bachmann et al., 2006). A fosforilação destas fosfatases estimula a progressão do ciclo celular das fases G₁-S e G₂-M por aumento da atividade dos complexos ciclina A/ ciclina dependente de quinase 1 (CDK1) e ciclina A/CDK2. A inibição destas fosfatases é regulada pela quinase associada à Cdc25C, C-TAK (*transforming growth factor-b-activated kinase 1*) / MARK3, também substrato de Pim, e quando fosforilada é inativada e consequentemente perde a capacidade de inibir as fosfatases Cdc25 (Tang et al., 2011).

De forma interessante, Pim-1 e Pim-2 quinases fosforilam e inativam as proteínas pró-apoptóticas FOXO3a (*Forkhead Box-containing Protein O*), SOCS 1/3 (*suppressors of cytokine signaling*) e os membros da família de domínio homólogo a Bcl-2 (BH), como a proteína antagonista de Bcl-2 associada à morte celular (BAD), induzindo resistência à apoptose (Aho et al., 2004; Brault et al., 2010). Além de induzir a repressão da transcrição, do inibidor de quinases dependentes de ciclina, p27^{KIP1}, por inativação das proteínas FOXO1a e FOXO3a como foi demonstrado em vários tumores sólidos e leucemias (Morishita et al., 2008). As quinases Pim promovem a degradação dependente de proteossomo do inibidor p27^{KIP1}, interferindo na progressão da fase G₁-S do ciclo celular (Brault et al., 2010).

Por outro lado, a enzima quinase Pim-1 regula a proteína inibidora da quinase mTOR (proteína alvo de rapamicina de mamíferos), substrato de AKT rico em prolina de 40 KDa (PRAS40), e quando fosforilada dissocia-se do complexo mTORC1 incrementando a atividade quinase de mTOR, o que sugere que Pim-1 também é uma reguladora dessa enzima e participa no controle do crescimento celular (Zhang et al., 2009).

Entre as quinases altamente expressas com um importante papel nas vias de sinalização tanto em células normais, quanto tumorais, encontra-se a serina/treonina quinase AKT/PKB. Esta enzima participa na regulação de vias de sinalização envolvidas com várias funções biológicas que incluem proliferação, sobrevivência, migração e metástase celular (Yang et al., 2010).

AKT/PKB uma vez traduzida e processada no retículo endoplasmático (RE) é reconhecida pelas chaperonas da família das proteínas de choque térmico, Hsp90, Hsp70 e Hsp27, cuja função é proteger AKT inativa da ubiquitinação e degradação proteossomal no citosol (Yang et al., 2010). Após ser translocada ao citosol, pode ligar-se, através do seu domínio homólogo à plestrina (PH), ao grupo inositol do 3,4,5-fosfatidilinositol trisfosfato (PIP₃), presente na membrana plasmática e previamente ativado pela PI3K. Uma vez associada à membrana, AKT poderá ser ativada por fosforilação nos resíduos de treonina 308, 51 e 50 pela proteína quinase 1 dependente de 3-fosfoinositol (PDK-1) e pelo complexo protéico mTORC2 na serina 473 e 52, sendo que a máxima atividade da AKT é dependente da fosforilação dos resíduos serina 473 e treonina 308 (Zhang et al., 2009).

Além disso, AKT é regulada negativamente indireta ou diretamente por diferentes fosfatases. A PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) remove o grupo fosfato 3' do PIP₃ formando PIP₂, portanto deprime AKT do sítio de ancoragem à membrana plasmática e, deste modo, participa na inibição da via de sinalização de PI3K/AKT (Maehama et al., 1998). Outra

forma de modulação da AKT é através da desfosforilação de resíduos específicos. As PHLPP (*pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase*) (Gao et al., 2005) são as principais enzimas identificadas que têm afinidade pelo resíduo serina 473. Do mesmo modo, a PP2A (Andjelkovic et al., 1996) além de atuar sobre o resíduo serina 473, atua sobre o resíduo treonina 308 com alta afinidade. Estas desfosforilações da AKT estão relacionadas à diminuição da proliferação e crescimento celular (Kuo et al., 2008).

A via de sinalização PI3K/AKT participa nos processos de inibição da apoptose e estimulação da sobrevivência celular, por induzir indiretamente a expressão da Bcl-2, Bcl-x_L, do mesmo modo que foi indicado para a quinase Pim (Hu et al., 2009). Estudos recentes demonstraram que a enzima quinase Pim-1 quando altamente expressa, poderia fosforilar o resíduo serina 473 de AKT e regular a ativação desta enzima (Li et al., 2010). Além disso, outros estudos mostraram que a via de sinalização PI3K/AKT está envolvida na regulação da expressão de quinase Pim-1 mediante estímulo hormonal (Krishnan et al., 2003). Estes resultados indicam que pode existir um mecanismo de *feedback* entre estas duas enzimas (Hu et al., 2009).

A quinase AKT, uma vez ativa, pode fosforilar e inativar a enzima glicogênio sintase quinase-3 α/β (GSK-3 α/β) (Yang et al., 2010), que resulta de um aumento principalmente da expressão das ciclinas D (Shiota et al., 2006). AKT, assim como Pim, fosforila e suprime os inibidores de quinases dependentes de ciclina, p21^{CIP} e p27^{KIP}, portanto está envolvida na regulação do ciclo celular na fase G₁-S, além de participar na ativação do complexo mTORC1, induzindo a ativação da síntese proteica e, portanto, regulando o crescimento celular (Amaravadi e Craig et al., 2005).

Deste modo, numerosos trabalhos na literatura têm indicado como alvos chaves tanto à família das quinases Pim quanto a AKT, por apresentar um alto potencial no controle do ciclo

celular, crescimento celular, sobrevivência, proliferação e aquisição de resistência a apoptose na progressão tumoral de vários tipos de cânceres, incluindo o câncer de pâncreas (Xu et al., 2011; Mortenson et al., 2004; Parsons et al., 2010).

1.5.1.2. Estresse no retículo endoplasmático (ERE)

O retículo endoplasmático é a organela responsável pela biossíntese protéica, enovelamento por assistência de proteínas chamadas chaperonas, processamentos pós-traducionais e degradação das proteínas mal enoveladas. O RE tem um papel fundamental na biossíntese de lipídeos e esteróides, sendo a membrana desta organela o sítio de produção da maioria dos lipídeos para as membranas citoplasmáticas, mitocondriais, peroxissomais, entre outras (Rutkowski e Kaufman et al., 2004). O RE também tem um papel principal no armazenamento intracelular e sinalização de cálcio, envolvido com muitos processos celulares tais como divisão celular, diferenciação, apoptose, autofagia e migração (Di Sano et al., 2012; Harr et al., 2011).

Os distúrbios nas funções normais do RE, como consequência de alterações nos níveis de energia celular, do estado redox, homeostase da concentração de cálcio, condições de hipóxia, excesso ou falta de glicose ou nutrientes, acúmulo e agregação de proteínas mal enoveladas induzem nesta organela um estado nomeado Estresse do Retículo Endoplasmático (Xu et al., 2005). Este estado produz numerosas alterações fisiopatológicas que consequentemente, induzem doenças neurodegenerativas, isquemia e diabetes (Forman et al., 2003; Yoshida et al., 2007).

Na tentativa de combater as alterações do ERE as células desenvolveram várias estratégias de proteção celular. As respostas celulares nesta condição, do inglês “*unfolded protein response*” (UPR), são respostas adaptativas que utilizam mecanismos de proteção para

recuperar a homeostase celular e função normal do RE, reduzir a acumulação e agregação das proteínas e manter a sobrevivência celular. Estes mecanismos induzem a expressão de chaperonas do RE, membros da família das proteínas reguladoras de glicose (GRP) tais como GRP78, GRP94 e calreticulina, inibição da síntese proteica e indução da via de degradação de proteínas relacionadas (Schoroder e Kaufman et al., 2005). Entretanto, se a agregação proteica e o estresse persistirem, a UPR ativa vias de sinalização apoptótica (Szegezdi et al., 2006).

Entre as proteínas reguladas pela UPR está a GRP78, uma chaperona (considerada uma das proteínas mais abundantes do RE) que desempenha várias funções celulares, tais como enovelamento das proteínas, controle de qualidade dos processos relacionados com a estabilidade das estruturas protéicas, ligação ao cálcio. Estudos recentes sugerem uma função como proteína anti-apoptótica em situações de estresse avançado (Szegezdi et al., 2006; Ridder et al., 2011). Vários estudos, têm demonstrado que a GRP78 poderia também estar localizada na superfície citoplasmática celular em condições patológicas incluindo as células de câncer, competindo com vários receptores envolvidos na indução tanto da proliferação quanto da apoptose (Ridder et al., 2011; Zhang et al., 2010; Kim et al., 2006).

Em condições celulares normais três proteínas localizadas na membrana do RE relacionadas com a UPR são mantidas em um estado inativo através da associação com GRP78, estas são: *inositol-requiring enzyme 1* (IRE1), *PKR-like Endoplasmatic Reticulum kinase* (PERK) e *activating transcription factor 6* (ATF6) (Xu et al., 2005). Em uma situação de estresse, GRP78, com o fim de estabilizar as proteínas mal enoveladas acumuladas no RE, dissocia-se das proteínas de membrana IRE1, PERK e ATF6 ativando as vias de sinalização relacionadas com cada receptor e, deste modo, dando início às respostas UPR (Figura 3).

O adenocarcinoma de câncer de pâncreas caracteriza-se por manter um microambiente tumoral em condições de hipóxia, deficiente de importantes metabólitos como glicose e

aminoácidos, relacionado principalmente com a alta taxa de proliferação destas células (Koong et al., 2000). Vários estudos têm indicado à resposta UPR como um mecanismo celular adaptativo para combater os estados de estresse metabólico e hipóxicos em diferentes tipos de cânceres, incluindo o câncer de pâncreas (Bi et al., 2005; Rouschop et al., 2010). Embora a UPR tenha um papel dual na mediação da ativação das vias de sobrevivência ou morte celular por apoptose ou autofagia (Suh et al., 2012), estudos mostram que o ERE persistente poderia causar indução de apoptose por ativação das caspases 4 e 12 em células de câncer de pâncreas (Nawrocki et al., 2005).

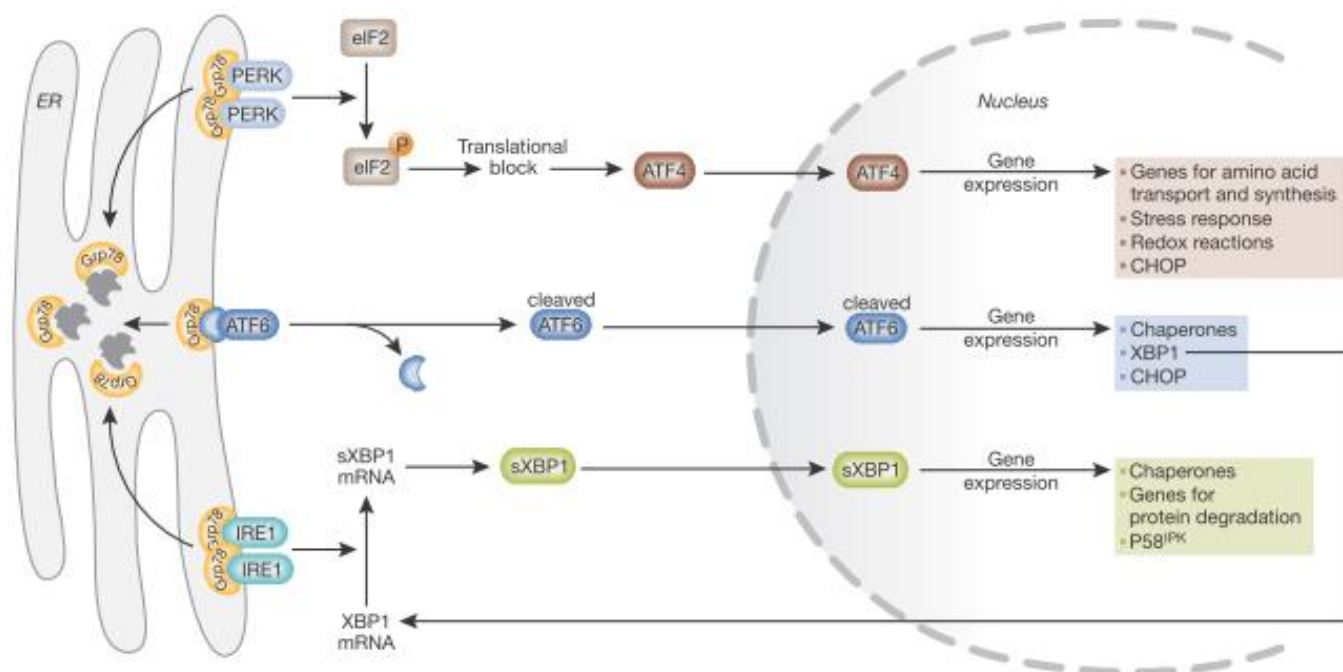


Figura 3. Esquema da resposta UPR (*unfolded protein response*) no ERE: Em uma situação de ERE, aumenta a quantidade de proteínas mal enoveladas. GRP78 dissocia-se dos três principais receptores do RE, PERK, ATF6 e IRE1, seguido da ativação dos mesmos. Estes mecanismos ocorrem sequencialmente, sendo PERK o primeiro a ser ativado, seguido do ATF6 e, por último, IRE1. PERK uma vez ativo bloqueia a síntese proteica em geral por fosforilação do fator de iniciação eIF2 α e promove a translocação ao núcleo do fator de transcrição ATF4, e induz a transcrição de genes relacionados com o equilíbrio homeostático do RE. ATF6 é ativado por proteólise depois da translocação do RE ao complexo de Golgi. Uma vez ativo ATF6 atua como um fator de transcrição que regula a expressão das chaperonas e XBP-1 (*X-box binding protein 1*), fator de transcrição que participa na via de sinalização do receptor IRE1. XBP-1 uma vez translocado ao núcleo participa no controle de fatores de transcrição de chaperonas e inibidores de PERK, p58^{IPK} (*inhibitor of the eIF2 α protein kinases PKR*), assim como genes envolvidos na degradação de proteínas. O ATF6 induz a expressão de CHOP (*C/EBP homologous protein*) que participa em vias de sinalização apoptóticas se o ERE persiste (adaptado de Szegezdi et al., 2006).

1.5.2. Metástases

A metástase é um processo que envolve a propagação das células tumorais de um tumor primário para uma região secundária do organismo. Este evento é responsável por 90% das mortes relacionadas com diferentes tipos de cânceres (Weigelt et al., 2005; Yilmaz e Christofori et al., 2009). O potencial metastático de uma célula tumoral depende das interações das moléculas da superfície celular com o microambiente extracelular que envolve tanto as células vizinhas quanto a matriz extracelular (MEC). O processo de metástase é dividido nas seguintes etapas: invasão, intravasão, transporte, extravasão, colonização metastática e angiogênese (Chaffer et al., 2011) (Figura 4).

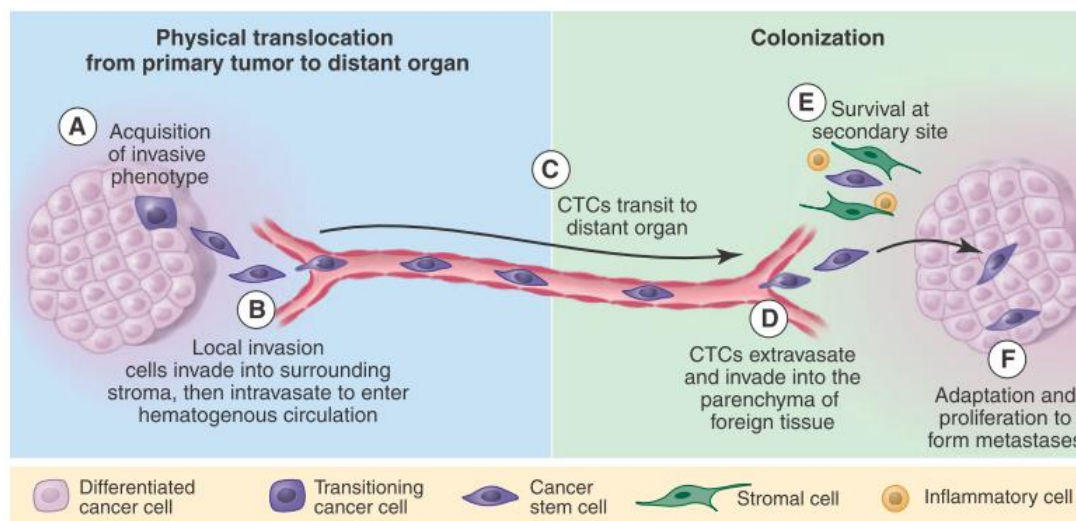


Figura 4. Etapas do processo de metástase. (A) No começo da metástase, as células do tumor primário adquirem um fenótipo invasivo. (B) As células tumorais invadem a matriz extracelular e são intravasadas nos vasos sanguíneos (C) As células tumorais são transportadas na circulação sanguínea para outros órgãos mais distantes e deverão sobreviver sem interação célula-célula e célula-matriz. (D) Extravasão das células tumorais e invasão em microambientes teciduais distantes. (E) As células tumorais devem sobreviver frente às respostas imunes inatas. (F) Na colonização metastática, as células tumorais devem se adaptar ao novo microambiente e iniciar a proliferação (Chaffer et al., 2011).

A invasão das células tumorais requer a participação de moléculas de adesão, integrinas, proteases específicas como as MMPs. As características adquiridas de invasividade e mobilidade celular são coordenadas por um mecanismo nomeado transição epitelial-mesenquimal (EMT). Este evento envolve a conversão das características morfológicas

principais das células epiteliais e padrão de expressão gênica em uma forma de programa transcricional característico das células mesenquimais que permite as células invadir localmente, intravasas e posteriormente extravasar em outros tecidos (Nguyen et al., 2009).

Neste processo as moléculas de adesão celular (CAM) e as caderinas mediam o reconhecimento entre célula-célula e ativação da expressão de vários genes envolvidos na interação celular. Assim, quando as células do tumor primário invadem uma região local e proliferam, a interação célula-célula será dissociada e posteriormente as células livres poderão migrar e se aderir por meio da expressão das CAM às células da nova região (Langley et al., 2007).

Vários estudos têm demonstrado que o câncer de pâncreas apresenta uma elevada expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) e ELAM-1 (*endothelial leukocyte adhesion molecule-1*) (Schwaeble et al., 1993; Shimoyama et al., 1997) e sugerem um destacado papel na progressão tumoral por estarem envolvidas na migração e invasão celular (Tempia-Caliera et al., 2002; Stetler- Stevenson et al., 1993).

Além destas proteínas, foram identificadas as integrinas, que pertencem à família de receptores reguladores da adesão celular, que contêm mais de 24 heterodímeros compostos por subunidades α e β . Dependendo da combinação destas subunidades, variará a afinidade pelos diferentes componentes da MEC (colágenos, fibronectinas, lamininas), portanto, a função principal das integrinas é mediar à interação das células-MEC e a transdução de sinais intracelulares, que regulam sobrevivência, proliferação, migração, invasão celular e morte celular (Desgrosellier e Cheresch et al., 2010).

Por outro lado, a ativação das integrinas induz uma mudança na estrutura do citoesqueleto das células através da interação com proteínas unidas à actina, como paxilina,

vinculina, talina e ativação de quinases específicas tais como a quinase de adesão focal (FAK). Vários estudos demonstraram que a FAK media a mobilidade celular através da formação de um complexo com a enzima quinase Src e consequente ativação da via de sinalização RAS- MAPKs (Schaller et al., 2001, Yilmaz e Christofori et al., 2009).

A expressão alterada dos receptores de integrinas em células tumorais poderia aumentar a mobilidade e invasão das células metastáticas por modificação da estrutura das membranas celulares e por modular a aderência nas diferentes MECs, além de modular a expressão das metaloproteinases (Desgrosellier e Cheresch et al., 2010; Hosotani et al., 2002). Entretanto, vários estudos indicaram um importante papel das integrinas na indução de um tipo de apoptose nomeado *anoikis* (Frisch et al., 1994). Este processo é ativado em resposta à diminuição da expressão das moléculas de adesão celular e consequente redução tanto da interação célula-MEC quanto célula-célula. A redução da expressão de integrinas está relacionada com a ativação da procaspase-8 e apoptose (Desgrosellier e Cheresch et al., 2010).

A invasão das células tumorais nos tecidos requer a ação de proteases específicas capazes de degradar a MEC. Serinas proteases e metaloproteinases participam desse processo. As MMPs pertencem à família das enzimas endopeptidase zinco-dependentes que estão envolvidas em vários processos fisiológicos, responsáveis principalmente pela degradação da MEC (Murphy et al., 2003).

Estas enzimas são expressas nas células na forma de zimogênios e precisam ser clivadas para se tornarem ativas. Inibidores endógenos (TIMPs) regulam a função destas metaloproteinases, portanto um balanço entre MMPs e TIMPs pode disparar a sinalização para a invasão celular (Roy et al., 2009). A regulação da expressão gênica das MMPs depende de vários elementos- *cis* e ativadores- *trans*, tais como a proteína ativadora-1 (AP-1), PEA3 (*Ets-related transcription factors*), Sp-1 (*Specificity Protein 1*), β -catenin/Tcf-4 e NF- κ B (Yan e

Boyd et al., 2007). Este fato está relacionado com uma ampla variedade de fatores de crescimento e citocinas, que incluem interleucinas e interferons, que disparam diferentes vias de sinalização envolvidas com os ativadores-*trans* dos promotores das MMPs (Fini et al., 1988; Yan e Boyd et al., 2007).

Entre os tipos de cânceres de pâncreas exócrino cerca de 80-90% são classificados como adenocarcinoma ductal, um câncer altamente agressivo, invasivo e potencialmente metastático (Li et al., 2004). Neste contexto, o câncer de pâncreas é caracterizado por apresentar uma invasão local rápida nas estruturas adjacentes. Foi observado que a MEC contém vários tipos de componentes (proteoglicanos, colágenos e fibronectina), sendo o colágeno tipo IV o mais predominante (Leblond et al., 1989). Dois tipos de collagenase IV têm sido reconhecidos, gelatinase A (MMP-2) e gelatinase B (MMP-9) (Stetler-Stevenson et al., 1993) as quais apresentam uma potente atividade para degradar colágeno tipo IV, V, VII, IX, X, fibronectina e elastina (Senior et al., 1991). Estudos mostraram que a expressão das metaloproteinases está aumentada em vários tipos de cânceres, incluindo o câncer de pâncreas (Hosotani et al., 2007), fato que indica o grau de progressão tumoral. Portanto, as MMPs têm um papel importante na metástase, invasão e angiogênese celular (Yilmaz et al., 2007).

1.5.3. Apoptose em câncer de pâncreas

Vários tipos de cânceres desenvolvem diversos mecanismos de resistência para evadir os processos de morte celular (Hager et al., 1999; Deirdre et al., 2004). A combinação de diferentes fatores, tais como, crescimento acelerado e resistência adquirida durante a terapia, são responsáveis pela resistência e agressividade no câncer de pâncreas (Korsmeyer et al., 1992; Miyashita e Reed et al., 1993).

A apoptose é definida como um fenômeno programado de morte celular controlado por uma série de genes capazes de definir o destino das células frente a diferentes estímulos intra e extracelulares. Como característica principal as modificações na morfologia celular ocorrem de uma maneira coordenada com o núcleo, citoplasma e a membrana citoplasmática até completa eliminação das células sem gerar reações inflamatórias locais (Ferreira et al., 2002). Estudos relacionados ao câncer de pâncreas indicaram que a desregulação da apoptose frequentemente é uma das principais causas relacionadas com resistência intrínseca e adquirida nas terapias convencionais (Fulda et al., 2006).

Os mecanismos moleculares que induzem e regulam a apoptose estão envolvidos principalmente com duas vias de sinalização dependentes de caspases (*cysteine aspartate-specific proteases*), que inclui a via dos receptores de morte celular (via extrínseca) e a via mitocondrial (via intrínseca). Por outro lado a apoptose pode ser induzida pela via independente de caspases que envolve a participação da flavoproteína AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) e o citocromo c (Ow et al., 2008; Indran et al., 2011).

As caspases são cisteínas-proteases que clivam os seus substratos após resíduos de ácido aspártico. Estas enzimas constituem uma ampla família de proteínas homólogas entre si, com atividade enzimática, sendo atualmente identificados 14 membros e relacionadas com as vias de sinalização apoptóticas (Nicholson et al., 1999; Fulda et al., 2006). A ativação da apoptose via receptores de morte celular (TNFR e Fas) presentes na membrana por ligantes específicos (TNF alfa e FasL) induz uma série de ativações de pró-caspases tais como as pró-caspase-8, pró-caspase -1,-3,-6,-7 e -9 sendo estas últimas quem executam a morte celular (Indran et al., 2011).

Diferentes fatores ambientais podem atuar como estímulos para ativar a apoptose por meio da via intrínseca induzindo a permeabilização mitocondrial e liberação de moléculas

pró-apoptótica para o citoplasma, tais como citocromo c e AIF. O citocromo c, uma vez liberado, se liga ao fator de ativação de proteases pró-apoptóticas-1 (APAF-1) que por sua vez, tem a capacidade de se ligar à pró-caspase-9 e formar um complexo nomeado “apoptosoma”. Consequentemente, ocorrerá a ativação da caspase-9, na presença de ATP. A caspase-9 é um iniciador da ativação de uma cascata de caspases efetoras, que cliva as pró-caspases -2, -3, -6 e 7 (Kroemer et al., 2000). Este evento pode ser regulado pela participação das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl- xL (*B- cell lymphoma*), ambas localizadas na membrana mitocondrial externa, cuja função principal é a inibição da liberação do citocromo-c ou impedindo que APAF-1 ative a pró-caspase-9 (Adrian et al., 2006). Entretanto, uma série de proteínas da mesma família tais com a proteína X associada a Bcl-2 (BAX) e a proteína antagonista/exterminadora de Bcl-2 (BAK) tem atividade pró-apoptótica (Walensky et al., 2011). Estudos demonstraram que as células de câncer de pâncreas apresentam altos níveis de pró-caspase-3, Bcl-xL e FAP-1 (*FAS-associated phosphatase 1*). Fato atribuído às características invasivas e resistentes à morte celular por apoptose dependente de caspases do câncer de pâncreas (Roy et al., 2001; McConkey et al., 2010; Hu et al., 1998; Fulda et al., 2006).

Os eventos relacionados com a apoptose independente de caspase não foram ainda elucidados completamente, porém se sabe que o AIF é liberado da mitocôndria, e translocado ao núcleo em condições de apoptose e induz condensação de cromatina e ativação de processos de degradação do DNA em fragmentos de 50 Kb. De fato, este é um papel crítico da AIF envolvida nos mecanismos de morte celular que ocorre em diferentes tipos de tumores (Norberg et al., 2010). Muitas drogas demonstraram ativação das vias de apoptose independente de caspase em câncer de pâncreas através das proteínas AIF e EndG (Anderson et al., 2003; Ma et al., 2011).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os mecanismos moleculares de ação da etoxzolamida sobre a resistência, agressividade e potencial metastático da linhagem celular de adenocarcinoma ductal de pâncreas humano (PANC-1) utilizada como modelo biológico.

Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da etoxzolamida na viabilidade das linhagens celulares de PC-3 (câncer de próstata), PANC-1 (câncer de pâncreas) e SKMel-103 (melanoma);
- Estudar o mecanismo molecular de ação da etoxzolamida através da análise da expressão/atividade de proteínas chaves envolvidas com sobrevivência, proliferação, invasão, migração, resistência e morte das células PANC-1;
- Estudar os efeitos da etoxzolamida relacionados com ciclo celular das células PANC-1;
- Estudar os efeitos da etoxzolamida na indução do estresse do retículo endoplasmático das células PANC-1;
- Avaliar a capacidade de adesão das células PANC-1;
- Avaliar o efeito da etoxzolamida combinada com gencitabina na viabilidade das células PANC-1.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os anticorpos utilizados foram obtidos da Cell Signaling e Abcam. Tris-base, Tween 20 e acrilamida foram obtidos da USB; SDS e orto-vanadato da Calbiochem; Triton-X 100, inibidores de proteases, etoxzolamida (EZA) e o MTT (3-brometo de (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Os demais reagentes foram obtidos da Merck. A linhagem celular PANC-1 foi adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células de melanoma SKMel-103 foram cedidas pela Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler (Universidade de São Paulo). As células de câncer de próstata PC-3 foram obtidas de *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD).

3.2. Métodos

3.2.1. Linhagens celulares e manutenção

O cultivo das linhagens celulares de melanoma SkMel-103 e câncer de pâncreas PANC-1 foi realizado em meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) e para o cultivo celular da linhagem celular de câncer de próstata PC-3 foi realizado em meio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640) ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina (100 U/mL), 1% sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) e 10 µL de fungizona (1 mg/mL). Nas três linhagem celulares, todos os experimentos foram realizados entre as passagem 4 e 16. Para a manutenção, as células foram cultivadas em frascos de cultura celular com repiques periódicos (2-3 vezes na semana) em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂.

3.2.2. Tratamento das células com etoxzolamida

A etoxzolamida foi dissolvida em dimetildisulfoxido (DMSO) e diluída em meio RPMI 1640 ou em DMEM de forma que a concentração final do DMSO se mantivesse sempre em 0,15% (concentração não tóxica para as células). A solução da etoxzolamida foi sonicada por 12 minutos para sua total solubilização.

As células PC-3, PANC-1 e SKMel-103 foram plaqueadas independentemente em microplacas de 96 poços (100 µL/ poço) na densidade 8×10^4 células/mL e cultivadas por 24 h para atingirem a semi-confluência. Em seguida o meio de cultura foi removido e as células foram tratadas com as diferentes concentrações de etoxzolamida variando de 0-300 µM (100 µL/ poço) e incubadas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂, durante 24, 48 e 72 h. Após o tratamento o meio foi removido e os poços foram lavados com solução tampão fosfato salino (PBS) e, em seguida, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Três experimentos foram realizados em quadruplicata. Os resultados foram representados relativos ao controle (atribuído o valor de 100 %) como média $\pm$ erro padrão.

3.2.3. Análise da viabilidade celular pelo ensaio de redução do MTT

Após o período de tratamento, o meio dos poços foi removido, e cada poço foi lavado com PBS. Em seguida foi adicionado o MTT (0,5 mg/mL) dissolvido em meio DMEM sem soro. Após da incubação por 3 h, em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂, o meio foi retirado cuidadosamente e adicionado etanol absoluto (100 µL/ poço) para solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 10 min e a absorbância correspondente a cada poço foi lida em leitor de placas (ELx 800 BIO-TEK) no comprimento de onda (λ) de 570 nm. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao controle onde as células não foram expostas ao agente teste (Mosmann et al., 1983).

3.2.4. Análise da expressão de proteínas por Western Blotting

Para a preparação das amostras, as células PANC-1 foram plaqueadas em placas de 100 mm (10 mL/placa) na densidade de $1,8 \times 10^5$ células/mL e mantidas em cultura por 24 h na estufa a 37°C contendo 5% de CO₂, para atingirem a semi-confluência. Em seguida foi realizado o tratamento com 100 µM, 150 µM e 200 µM de etoxzolamida durante 48 h. Posteriormente as células foram coletadas das placas com auxílio de um raspador de células, transferidas para tubos de tipo eppendorf, centrifugadas a 1500 rpm (centrífuga Eppendorf 5810R, rotor FA-45-30-11) por 3 min e lavadas com PBS três vezes a 4°C. O pellet foi coletado e ressuspensionado em tampão de lise 50 mM Tris- HCl (pH 7,4), 1% Tween 20, 0,25% deoxicolato de sódio, 150 mM de cloreto de sódio (NaCl), 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 1 mM orto-vanadato, 1 mM de fluoreto de sódio (NaF), e inibidores de proteases 1 µg/mL de aprotinina, 1 µg/mL de leupeptina e 1 mM de 4-cloridrato de fluoreto aminoetil benzosulfonila (PMSF). As amostras foram homogeneizadas com sonicador e mantidas em banho de gelo por 2 h, com agitações a cada 15 min. Os extratos proteicos foram centrifugados a 14000 rpm por 10 min a 4°C, o precipitado foi descartado e o conteúdo de proteínas do extrato foi determinado por espectrofotometria através do método de Bradford, utilizando um kit comercial (*Sigma*) com albumina como padrão. Nos extratos foi adicionado tampão de amostra (100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 200 mM de ditioneitol (DTT), 4 % de SDS, 0,1 % de azul de bromofenol e 20% de glicerol) na proporção 1:1. No passo seguinte, as amostras foram levadas até ponto de ebulição por 5 min e os extratos celulares foram resolvidos por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) (8-12%). As proteínas foram transferidas para membranas de *polyvinylidene difluoride* (PVDF) as quais foram posteriormente bloqueadas com leite desnatado 2,5%, preparado em tampão salino Tris (TBS) contendo 0,05% de *Tween 20* (TBST), por 2 h. As membranas foram lavadas três vezes por

5 min com TBST e incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários para: ciclina D1 (ICat. N°: #2978S- Cell signaling), ciclina B (ICat. N°: #4138S Cell signaling), CDK4 (ICat. N°: #2906- Cell signaling), Pim-1 (ICat. N°: #2907- Cell signaling), PP2A não metilada subunidade C (ICat. N°: #4957- Cell signaling), c-Myc (ICat. N°: #9402- Cell signaling), Pgp (ICat. N°: ab3364-250- Abcam), Akt (ICat. N°: #2938S- Cell signaling), GRP78 (ICat. N°: ab21685 - Abcam), p-Akt (Ser 473) (ICat. N°: ab28821- Abcam), p-Akt (Thr 308) (ICat. # 05-802R - Upstate), p-mTor (Ser 2448) (ICat. N°: #2971S- Cell signaling), mTor (ICat. N°: #2972S- Cell signaling), GSK-3 β (Ser 9) (ICat. # 05-643 - Upstate), LC3B (ICat. N°: #2775- Cell signaling), caspase 3 (ICat. N°: #9665- Cell signaling), AIF (ICat. N°: #4642- Cell signaling), Bcl-2 (ICat. N°: #2870- Cell signaling), ACI (ICat. N°: ab108367- Abcam), ACII (ICat. N°: ab124687- Abcam), VEGF (ICat. N°: ab21278- Abcam), p- FAK (Tyr 925) (ICat. N°: #3281- Cell signaling), integrina β 3 (ICat. N°: ab7167-Abcam), MMP2 (ICat. N°: sc-6838-Santa Cruz), MMP9 (ICat. N°: #3852S- Cell signaling), GAPDH (ICat. N°: #2128- Cell signaling) diluídos em 1:1000. Após lavagem em TBST, três vezes por 5 min, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase-HRP (diluição 1:5000) por uma hora e 30 min, e posteriormente lavadas em TBS três vezes por 5 min. As bandas foram detectadas por quimioluminescência. A intensidade da banda foi quantificada por densitometria pelo programa ImageJ (*National Insitute of Health*, NIH). Finalmente, os valores resultantes foram normalizados com a proteína GAPDH, utilizada como controle interno. Três experimentos foram realizados em quadruplicata. Os resultados foram representados relativos ao controle (atribuído o valor de 100%) como média $\pm$ desvio padrão.

3.2.5. Avaliação da atividade das metaloproteinases 2 e 9 por zimografia

Para a preparação das amostras, as células PANC-1 foram plaqueadas em placas de 100 mm (10 mL/placa) na densidade de $1,8 \times 10^5$ células/mL e mantidas em cultura por 24 h na estufa a 37°C contendo 5% de CO₂, para atingirem a semi-confluência. Em seguida foi realizado o tratamento com 100 µM, 150 µM e 200 µM de etoxzolamida durante 48 h. Posteriormente, o meio de cultura foi coletado e centrifugado a 14000 rpm por 5 min (centrífuga Eppendorf 5810R, rotor FA-45-30-11) e, em seguida, o sobrenadante foi coletado para a quantificação proteica a qual foi determinada por espectrofotometria através do método de Bradford, utilizando um kit comercial (Sigma) com albumina como padrão. Imediatamente as amostras foram congeladas a -80 °C até o momento da análise da zimografia. Posteriormente, as amostras foram fracionadas em gel de poliacrilamida a 12% contendo gelatina a 4%. Após o fracionamento, os géis foram lavados em uma solução aquosa de Triton X-100 (2% m/v) e incubados 18 h em tampão de proteólise (Tris-CaCl₂) a 37°C. O gel foi corado com solução contendo corante *Coomassie Blue G-250* durante 3 h e, em seguida, o gel foi descorado e fixado com solução contendo metanol 50% e glicerol 5% (Barboza et al., 2000). A análise das bandas foi realizada por densitometria pelo programa ImageJ (NIH). Três experimentos foram realizados em quadruplicata. Os resultados foram representados relativos ao controle (atribuído o valor de 100%) como média ± desvio padrão.

3.2.6. Análises do ciclo celular utilizando marcação com iodeto de propídeo (IP)

A avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo foi realizada através da quantificação do conteúdo de DNA celular que interage diretamente de forma estequiométrica com corantes fluorescentes, como o IP. As quatro diferentes fases do ciclo foram observadas numa população de células em proliferação de acordo com a intensidade de fluorescência.

Para a preparação das amostras, as células PANC-1 foram plaqueadas em placas de 6 poços (2 mL/poço) na densidade de 3×10^5 células/mL e mantidas em cultura por 24 h na estufa a 37°C contendo 5% de CO₂. Em seguida foi realizado o tratamento com 100 µM, 150 µM e 200 µM de etoxzolamida durante 48 h. Após do tratamento, as células PANC-1 foram tripsinizadas e coletadas pela adição de 5 mM de EDTA, e cuidadosamente retiradas da placa. Em seguida, foram ressuspensas em *work solution* (1 g/mL de citrato de sódio, 1 mg/mL de Ribonuclease A, 0,02 mg/mL de iodeto de propídio, 0,01 % de Triton X-100). Após a incubação na ausência de luz por 60 min, as células foram analisadas em citômetro de fluxo, *Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter, Inc)* utilizando o programa *Flow Jo (Tree Star, Inc.)*. Os resultados representam média $\pm$ erro padrão de 1 experimento realizado em quadruplicata.

3.2.7. Adesão celular em placas de cultura de células

Neste ensaio as células PANC-1 foram resuspensas, em placas de 24 poços (1mL/poço) na densidade de $6,25 \times 10^4$ células/mL, nas soluções de tratamento contendo etoxzolamida (0, 150 e 250 µM) e incubadas durante 12, 18 e 22 h em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Posteriormente, o tratamento foi descartado e os poços foram lavados com PBS. Para verificar a quantidade de células aderidas foi utilizado o teste de viabilidade pela redução do MTT. Dois experimentos foram realizados em quadruplicata. Os resultados foram representados relativos ao controle (atribuído o valor de 100%) como média $\pm$ erro padrão.

3.2.8. Avaliação da capacidade de recuperação das células PANC-1 após tratamento de 48 h com etoxzolamida

As células PANC-1 foram plaqueadas em placas de 100 mm (10 mL/poço) numa densidade de $1,8 \times 10^5$ células/mL e mantidas em cultura por 24 h, incubadas na estufa a 37°C contendo 5% de CO₂, para atingir a semi-confluência. Posteriormente, foi realizado o tratamento com 150 e 250 µM de etoxzolamida durante 48 h. Após do tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e replaqueadas em placas de 24 poços na densidade celular de $6,25 \times 10^4$ células/mL. Posteriormente, as células foram incubadas com meio sem tratamento durante 12, 18, 24 e 48 h em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Para verificar a viabilidade celular foi utilizado o teste de viabilidade determinada pela redução do MTT. Dois experimentos foram realizados em quadruplicata. Os resultados foram representados relativos ao controle (atribuído o valor de 100%) como média $\pm$ erro padrão.

3.2.9. Tratamento da linhagem celular PANC-1 com etoxzolamida combinada com gencitabina

As células PANC-1 foram plaqueadas independentemente em microplacas de 96 poços (100 µL/ poço) na densidade 8×10^4 células/mL e cultivadas a 37°C, 5% de CO₂ em estufa úmida por 24 h até atingirem semi-confluência. Posteriormente, o meio de cultura foi removido e colocado meio novo no controle. Para o tratamento com gencitabina foram colocadas soluções de gencitabina (previamente diluída em médio DMEM) com a concentração variando de 0-250 µM. Para o tratamento com a combinação etoxzolamida-gencitabina foram colocadas soluções de etoxzolamida com concentrações variando de 0-300 µM combinadas com uma solução de 160 µM de gencitabina.

As células foram mantidas em cultura durante 24, 48 e 72 h em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Logo do tratamento o meio foi removido e os poços foram lavados com solução tampão fosfato (PBS), em seguida a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Dois experimentos foram realizados em quadruplicata. Os resultados foram representados relativos ao controle (atribuído o valor de 100%) como média ± erro padrão.

3.2.10. Preparação do complexo sólido etoxzolamida com 2-hidroxipropil-3-ciclodextrina (HP-β-CD)

O complexo sólido foi obtido através da mistura da etoxzolamida 1 mM (0,0258 g) com 2-hidroxipropil-3-ciclodextrina 1 mM (0,14%) em água deionizada. Em seguida, essa solução foi autoclavada por 120°C por 20 min e liofilizada (Liofilizador LABCONCO Freezone 4.5), para obtenção do complexo sólido. O complexo foi estocado nas mesmas condições da etoxzolamida, temperatura ambiente e em ausência de luz. Foram preparados complexos sólidos em estequiometrias (1:1) de etoxzolamida-HP-β-CD (Loftsson et al., 1994). Posteriormente, as células PANC-1 foram plaqueadas independentemente em microplacas de 96 poços (100 µL/ poço) na densidade 8×10^4 células/mL e cultivadas por 24 h até atingirem a semi-confluência. Em seguida o meio de cultura foi removido e as células foram tratadas com as diferentes concentrações de etoxzolamida-HP-β-CD (dissolvido em meio DMEM), variando de 0-300 µM (100 µL/ poço) e incubadas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂, durante 24, 48 e 72 h. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Dois experimentos foram realizados em quadruplicata. Os resultados foram representados relativos ao controle (atribuído o valor de 100%) como média ± erro padrão.

3.2.11. Microscopia Confocal

3.2.11.1. Avaliação das alterações celulares e biomarcadores de invasão e migração celular

Neste ensaio as células PANC-1 foram plaqueadas em placas de 24 poços (1 mL/ poço) na densidade de $6,25 \times 10^4$ células/mL e cultivadas sobre lamínulas durante 24 h até atingirem a semi-confluência. Posteriormente, o meio de cultura foi removido e as células foram tratadas com etoxzolamida nas concentrações de 150 e 250 μ M durante 48 h em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% em PBS por 20 min. As células foram então incubadas por 20 min com PBS glicina (0,1 M), e permeabilizadas com 0,2% de *Tween* 20 em PBS por 2 min. Como passo seguinte, as células foram incubadas com tampão de bloqueio (10% de solução de soro) por 5 min. As células foram, então, incubadas com 25 μ L dos anticorpos primários, anti-integrina β 3 (1:300) ou anti-FAK (Tyr 925) (1:300), diluídos em tampão de bloqueio por 1 h, lavadas com PBS e incubadas com tampão de bloqueio por 1 min a temperatura ambiente. Finalmente, as células foram incubadas com os anticorpos secundários específicos conjugados com Alexa Fluor-488 (FAK) e Alexa Fluor-546 (integrina β 3) diluídos ambos a 1:500 e colocado o marcador de núcleo TOPRO3 (1:1000) por 30 min a temperatura ambiente, em ausência da luz. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS, e as lamínulas montadas com Fluoromount G. A análise das células foram realizadas com microscópio confocal invertido de varredura a laser LSM 510 META, utilizando-se as seguintes condições: FAK (tyr 925): laser Ar 488 nm e emissão em 500-550 nm; integrina β 3: HeNe 546 nm e emissão 560-590 nm e o TROPO3 635-700 nm. As imagens foram preparadas utilizando-se o programa ImageJ (NIH).

3.2.12. Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram apresentados na forma de gráficos, expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ou desvio padrão (DP). A análise estatística foi realizada com o programa *one way* ANOVA (não paramétrico), para as amostras comparadas entre si utilizou-se o test Tukey. Foram considerados significativamente diferentes os valores com $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito da etoxzolamida na viabilidade de linhagens celulares de tumores sólidos

A identificação de compostos que possam diminuir a viabilidade de células tumorais é de grande importância no desenvolvimento de quimioterápicos. Portanto, baseando-se na literatura sobre o efeito antitumoral das sulfonamidas (Scozzafava et al., 2000; Pastorekova et al., 2004; Supuram et al., 2003) e nos dados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa sobre o potencial da etoxzolamida como antileucêmico (dados não publicados), procurou-se avaliar a sensibilidade das linhagens celulares tumorais altamente agressivas, PANC-1 (câncer de pâncreas), SKMel-103 (melanoma) e PC-3 (câncer de próstata), frente a este composto. A Figura 5 mostra que os efeitos citotóxicos da etoxzolamida na linhagem celular PANC-1 só puderam ser detectados a partir de 48 h de tratamento. Além disto, as linhagens celulares PANC-1 e SKMel-103 responderam de forma similar a este composto após 48 e 72 h de tratamento (Figura 5 B e C). Por outro lado, o efeito citotóxico da etoxzolamida na linhagem celular PC-3, apesar de já evidenciado no tratamento de 48 h, foi menos intenso após 72 h de tratamento (Figura 5 B e C). Diante destes resultados e tendo em vista o interesse do nosso grupo de pesquisa em entender melhor a biologia do câncer de pâncreas, os estudos referentes à elucidação do mecanismo molecular de ação antitumoral da etoxzolamida foram conduzidos com as células PANC-1.

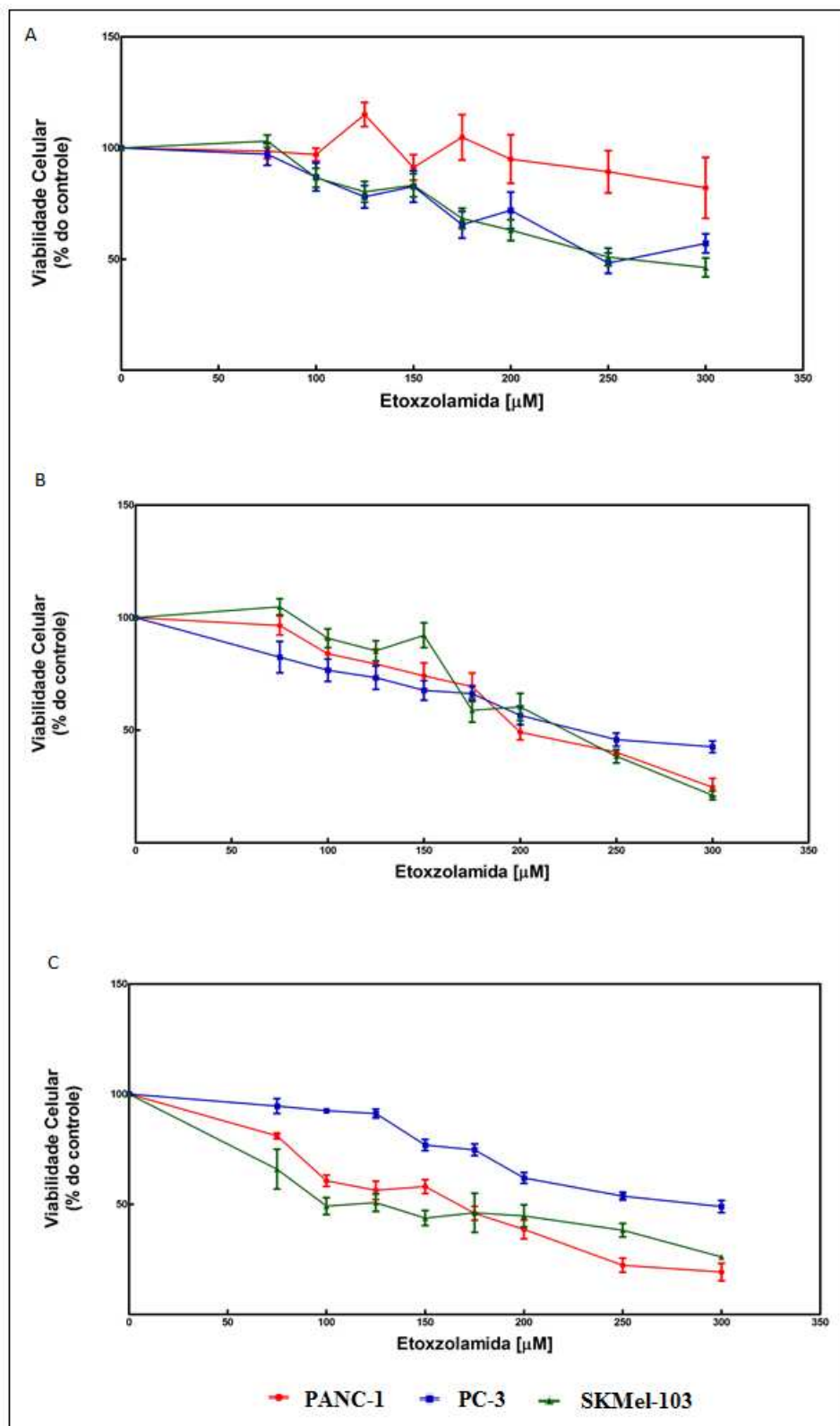


Figura 5. Viabilidade das células PANC-1, PC-3 e SkMel-103 expostas a diferentes concentrações de etozzolamida. As células (8×10^4 células/mL) foram plaqueadas independentemente em microplacas de 96 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. As células foram tratadas com diferentes concentrações do composto e incubadas nas mesmas condições por 24 (A), 48 (B) e 72 h (C). A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT. Resultados representam média $\pm$ erro padrão de 3 experimentos independentes realizados em quadruplicata (ANOVA).

4.2. Avaliação do ciclo celular, proliferação, sobrevivência e resistência das células PANC-1

4.2.1. Etozzolamida induz parada do ciclo celular em PANC-1

Uma vez demonstrado que a etozzolamida reduz a viabilidade celular em PANC-1, de modo concentração-tempo dependente (Figura 5), decidimos investigar se a redução está relacionada com a parada do ciclo celular ou com o incremento da morte celular ou ambos os processos. Deste modo, as células foram incubadas por 24, 48 e 72 h em um intervalo de concentrações de 0-300 μ M, como descrito anteriormente, posteriormente foi medida a redução da viabilidade através da técnica do MTT a partir do tempo zero (definido como o tempo do início do experimento, quando as células atingiram a semi-confluência e ainda não haviam sido tratadas).

Os resultados observados no tratamento de 48 h mostraram uma viabilidade de 146 % $\pm$ 10 em 100 μ M, 140 % $\pm$ 7 em 150 μ M, 120 % $\pm$ 1,2 em 200 μ M, 87 % $\pm$ 3,3 em 250 μ M e 75 % $\pm$ 4 em 300 μ M, ao passo que a viabilidade das células não tratadas foi de 161 % em comparação com o controle do tempo zero (Figura 6). Uma redução similar foi observada no tratamento de 72 h, na concentração de 200 μ M a diminuição da viabilidade celular foi de 114 % $\pm$ 4,7, em 250 μ M foi de 93 % $\pm$ 8,5 e a concentração de 300 μ M apresentou uma diminuição de 69 % $\pm$ 5,7, ao passo que as células não tratadas apresentaram 227% de viabilidade celular (Figura 6). Estes resultados demonstraram que o bloqueio da proliferação nas células PANC-1 poderia estar relacionado com a parada do ciclo celular em concentrações inferiores a 200 μ M e nas concentrações maiores que 250 μ M a etozzolamida poderia estar induzindo morte celular, uma vez que nestas últimas concentrações a porcentagem de células viáveis foi menor que a porcentagem do controle em tempo zero (Figura 6).

Juhász e colegas (2003) demonstraram que a acetazolamida em 100 μM levou à diminuição da proliferação e resultados similares foram obtidos recentemente com um derivado das sulfonamidas, mostrando que o composto poderia inibir o ciclo celular na fase G1, ambos foram testados em várias linhagens celulares de câncer de pâncreas (Wei et al., 2012).

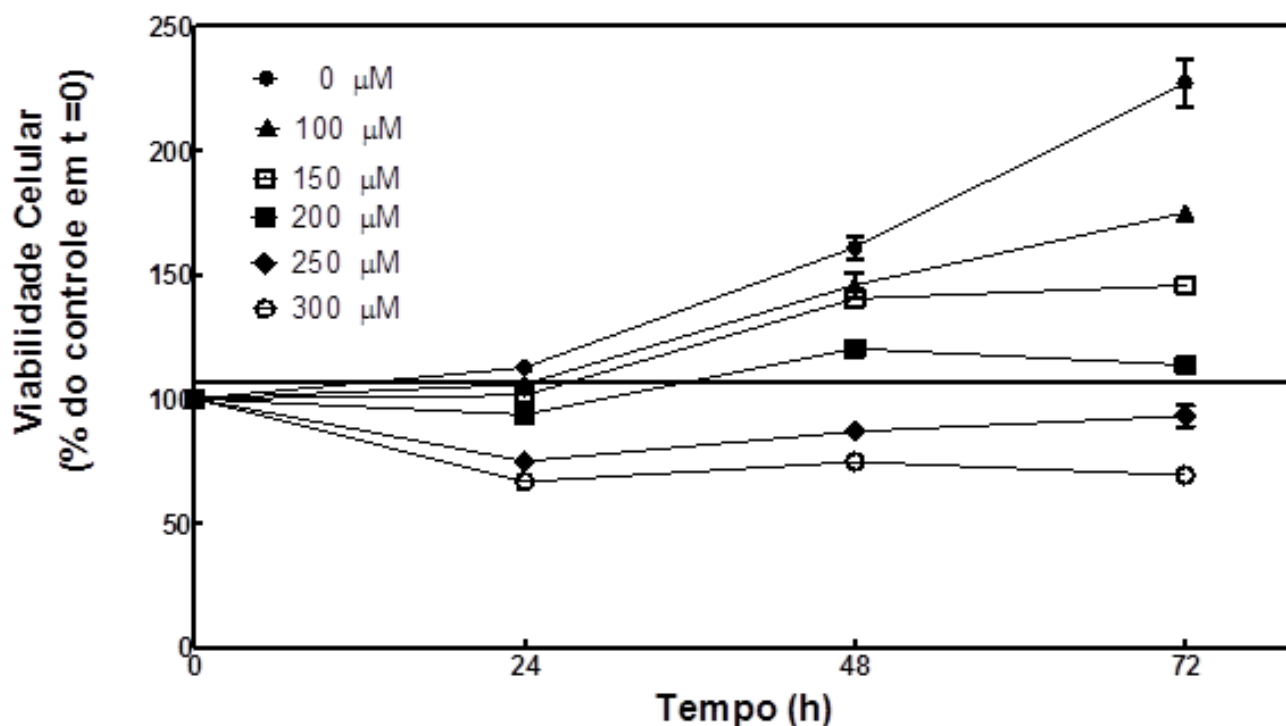


Figura 6. Curva de proliferação e viabilidade das células PANC-1, expostas a diferentes concentrações de etoxzolamida. As células (8×10^4 células/mL) foram plaqueadas independentemente em microplacas de 96 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO_2 . As células foram tratadas com diferentes concentrações de etoxzolamida e incubadas nas mesmas condições por 24, 48 e 72 h. A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT. t = 0, tempo zero. Resultados representam média $\pm$ erro padrão da média de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata (ANOVA).

4.2.2. Etoxazolamida causa alteração da expressão de mediadores da progressão do ciclo celular

Em virtude da ação citotóxica da etoxzolamida sobre as células PANC-1, a influência deste composto sobre a expressão de alguns mediadores da progressão do ciclo celular foi

avaliada no tratamento de 48 h com concentrações variadas de etoxzolamida de 100, 150 e 200 μM . De forma interessante observamos que o nível da ciclina D1 foi marcadamente diminuído, assim como da quinase 4 dependente de ciclina (CDK4). Além disto, um aumento da ciclina B foi detectado nas concentrações de 150 e 200 μM de etoxzolamida (Figura 7).

A ciclina D1 é importante para que as células possam ultrapassar o ponto de restrição entre a fase G_1 e S do ciclo celular. Portanto, quando a concentração desta ciclina D1 é baixa, no estágio tardio da G_1 , não há formação do complexo CDK4/Ciclina D1 e conseqüente não ocorre fosforilação dos substratos necessários para progressão das células da fase G_1 para S, culminando com a parada do ciclo na fase G_1 (Ekholm et al., 2000). Como nossos resultados mostram uma marcante diminuição da ciclina D1 e os níveis de expressão de CDK4 diminuíram levemente, supõe-se que a etoxzolamida causou a parada do ciclo na fase G_1 .

Além disto, nossos resultados revelaram um aumento da expressão da ciclina B nas duas últimas concentrações da etoxzolamida. A ciclina B começa a ser sintetizada no final da fase S e sua concentração aumenta à medida que as células avançam na fase G_2 , atingindo a máxima concentração durante a pró-metáfase. No começo da fase G_2 , a ciclina B forma um complexo protéico com a CDK1 (Cdc2) e, portanto, participa nos eventos necessários para a entrada da célula na mitose (fase M). Porém, antes da entrada na anáfase a ciclina B deve ser totalmente degradada para a progressão do ciclo celular (Harper et al., 2002). Alguns trabalhos têm indicado que um acúmulo da ciclina B1/Cdc2 poderia interromper o ciclo celular na prometáfase da mitose (Choi et al., 2010).

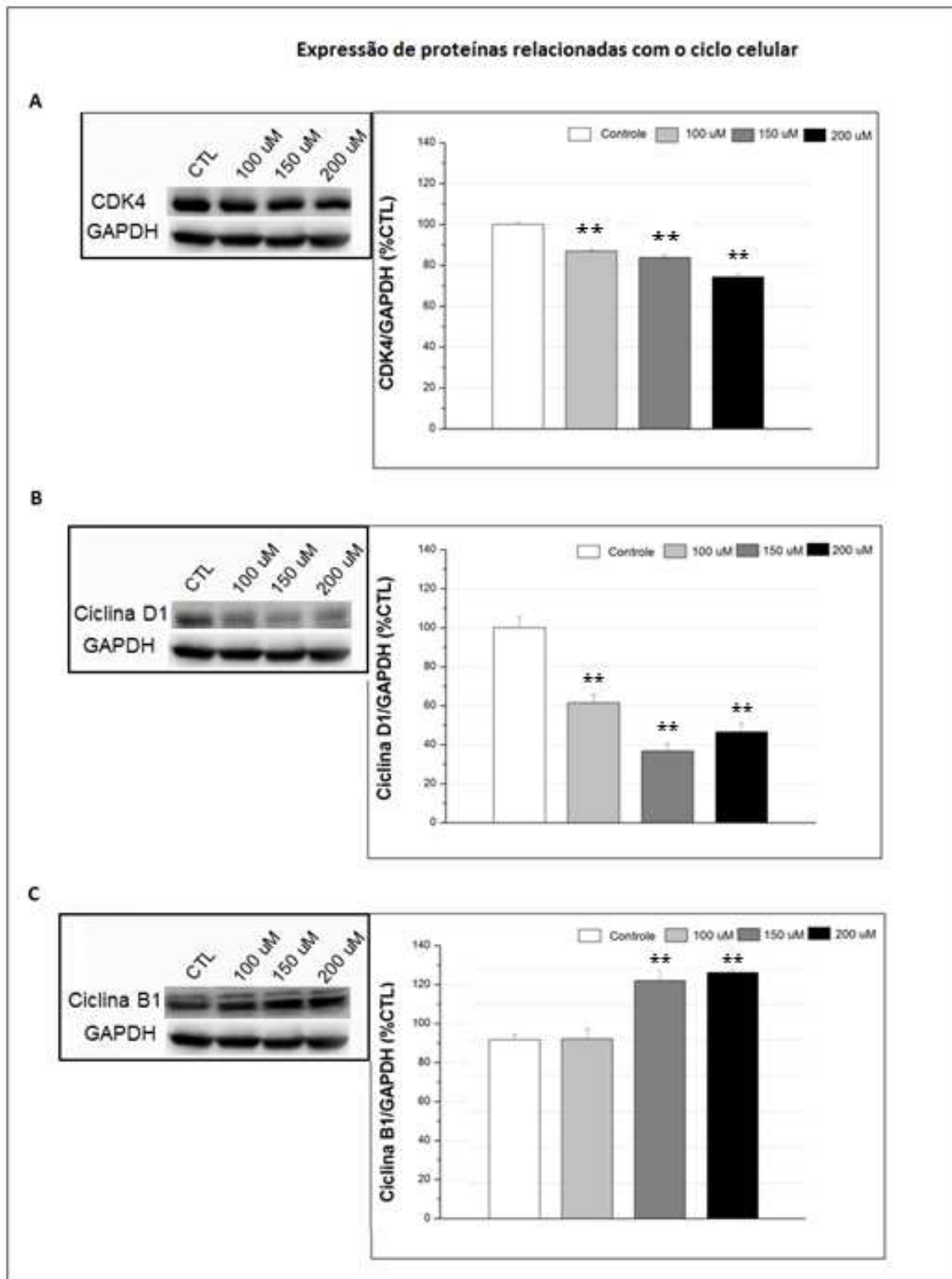


Figura 7. Análise da expressão de proteínas que controlam a progressão do ciclo celular após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como porcentagem. Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes (n=3). ANOVA seguido de post test Tukey. ** diferença significativa ($P < 0,05$) do tratado em relação ao controle.

Além disso, estudamos a distribuição das células PANC-1 nas diferentes fases do ciclo celular. Para isto, avaliamos o ciclo celular por citometria de fluxo, através da quantificação do conteúdo de DNA celular por marcação com IP. As células PANC-1 foram tratadas com concentrações de 150 e 200 μ M de etoxzolamida durante 48 h.

Os resultados apresentados na figura 8 mostraram uma leve diferença em cada fase do ciclo celular, nas porcentagens das células tratadas com 150 e 200 μ M de etoxzolamida e as células controles. O número das células na fase G_0/G_1 foi aumentado 1,12 vezes comparadas com as células não tratadas. Por outro lado foi observada uma diminuição das porcentagens de células na fase G_2/M e um aumento na fase S na concentração de 200 μ M. Estes resultados indicam que a etoxzolamida poderia estar induzindo parada do ciclo das células PANC-1 na fase G_0/G_1 , nas concentrações propostas.

Uma das principais características das células PANC-1 é o acelerado crescimento, tumorigenicidade e quimioresistência adquirida por acumulação de múltiplas alterações genéticas (Deer et al., 2010; Lieber et al., 1975). Vários genes que codificam reguladores do ciclo celular apresentam-se frequentemente mutados em diferentes tipos de cânceres e, conseqüentemente, causam alterações da regulação da proliferação celular. Entre esses reguladores as quinases dependentes de ciclina CDK4 e CDK6 estão indicadas como proteínas chaves no ciclo celular, incluindo o câncer de pâncreas (Collins et al., 2005; Malumbres et al., 2009; Retzer-Lidl et al., 2007). Ambas CDKs formam um complexo com as ciclinas D e juntas participam na progressão do ciclo celular através do ponto de restrição G_1/S , fosforilando diferentes proteínas alvos. A inativação do supressor de tumor p16 e a alta expressão das ciclinas D1 e D3 têm sido identificadas no adenocarcinoma ductal de pâncreas (Al-Aynati et al., 2004).

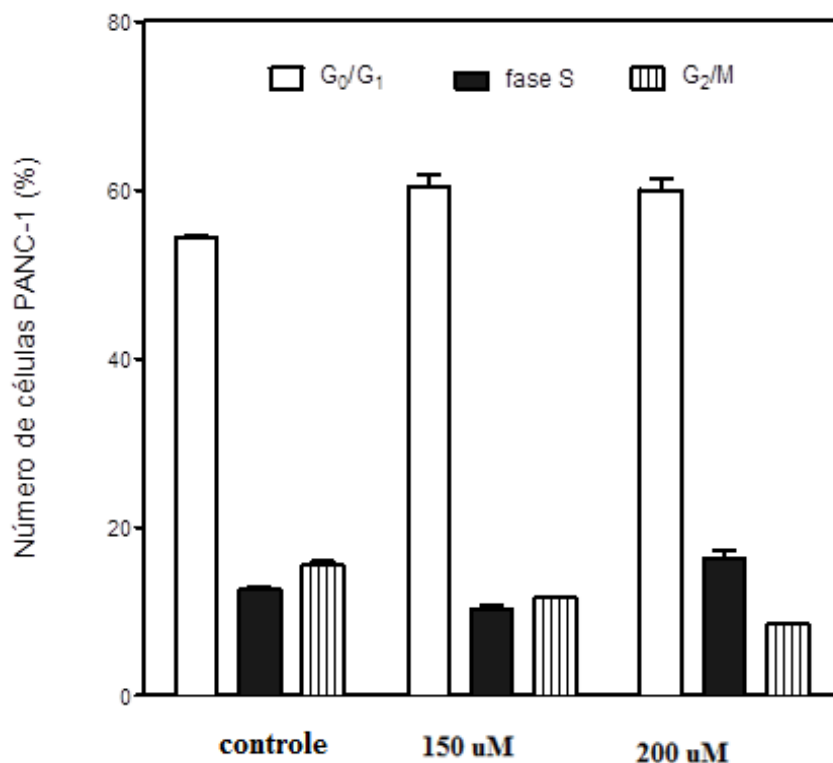


Figura 8. Etozzolamida induz parada do ciclo celular em células PANC-1. As células (3×10^5 células/mL) foram plaqueadas independentemente em placas de 6 poços e incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. As células foram tratadas com 150 e 200 μM de etoxzolamida e incubadas por 48 h. O número de células PANC-1 foi determinado nas diferentes fases do ciclo celular (fase G₀/G₁, fase S e fase G₂/M) por quantificação do DNA marcado com iodeto de propídio (IP) e analisado com citômetro de fluxo. Resultados representam média $\pm$ erro padrão de 1 experimento realizado em quadruplicata. ANOVA seguido de post test Tukey ($P < 0,05$).

De maneira interessante, a etoxzolamida reduziu significativamente a expressão da ciclina D1 e da CDK4. Os dados também mostraram que este composto apresentou propriedades citostáticas, que explicam a parada do ciclo celular na fase G₀/G₁. Este resultado é consistente com vários trabalhos que têm associado à desregulação das proteínas chaves do ciclo celular com a inibição da proliferação e migração celular em adenocarcinoma ductal de pâncreas (Radulovich et al., 2010). Além disso, foi mostrado que diferentes derivados de sulfonamidas podem parar o ciclo celular em diferentes fases, em várias linhagens celulares de tumores sólidos (Kesteren et al., 2002; Wei et al., 2012; Huan et al., 2012).

4.2.3. Análise da expressão da quinase Pim-1, c-Myc, Pgp e estado de ativação da PP2A nas células PANC-1 tratadas com etoxzolamida

As proteínas Pim, pertencentes à família das serina/treonina quinases dependentes de calmodulina, são constitutivamente ativas em células tumorais e estão relacionadas com proliferação, sobrevivência e resistência (Amaravadi e Craig et al., 2005). Fazem parte da família das proteínas Pim, as enzimas Pim-1, Pim-2 e Pim-3, cuja expressão depende do tipo de tecido e do estado metabólico das células. A expressão de Pim-1 é induzida principalmente por STAT3 que participa na sobrevivência celular, e na ativação do fator de transcrição NFkB, entre outros (Shirogane et al., 1999). Um fato interessante é que Pim-1 quinase participa na ativação das fosfatases Cdc25, a qual regula a ativação dos complexos Ciclina/CDKs envolvidos na progressão dos pontos de restrição do ciclo celular nas fases G1/S e G2/M (Tang et al., 2011).

A PP2A é uma serina/treonina fosfatase, holoenzima heterotrimérica formada pelas subunidades A, B e C. A subunidade A (65 kDa) tem função estrutural para a associação da subunidade catalítica C (36 kDa) constituída pelas isoformas α e β . A subunidade B tem uma função de regulação uma vez formado o heterotrímero (Kurimchak et al., 2012). A subunidade C é reversivelmente metilada em um resíduo conservado de Leu-309 no C-terminal culminando na ativação da PP2A (Tolstykh et al., 2000). Dentre os processos nos quais a PP2A participa, encontra-se a regulação do ciclo celular através da desativação do complexo ciclina/CDKs em diferentes fases do ciclo celular (Perry et al., 2007). Além disto, Perry e colaboradores (2007) reportaram que a PP2A uma vez ativa mantém a fosfatase Cdc25 inativa, o que leva à parada do ciclo celular nas fases G1/S e G₂/M.

Etozolamida causou diminuição da expressão da proteína quinase Pim-1 a partir da concentração de 150 μ M e da PP2A C não metilada na concentração de 200 μ M, indicando

um aumento da atividade desta fosfatase (Figura 9 A e B). Desta forma, tanto a diminuição da expressão da Pim-1 quanto o aumento da atividade da PP2A, induzida pela etoxzolamida, pode ser um dos fatores responsáveis pela parada do ciclo celular nas células PANC-1. Este fato poderia estar relacionado com o papel destas proteínas na regulação dos pontos de restrição nas fases G1/S e G2/M, como discutido anteriormente.

Um modelo hipotético da degradação de Pim-1 pela fosfatase PP2A foi proposto por Ma e colaboradores (2007). Estes autores mostraram que uma alta expressão da PP2A causa diminuição tanto do nível de expressão quanto da atividade de Pim-1. Foi sugerido que Pin-1, uma prolil-isomerase, pode formar um complexo com Pim-1 fosforilada, o qual interagirá com a subunidade B da PP2A. A Pim-1 quando desfosforilada pela PP2A será ubiquitinada e degradada pelo sistema proteossomo (Figura 10).

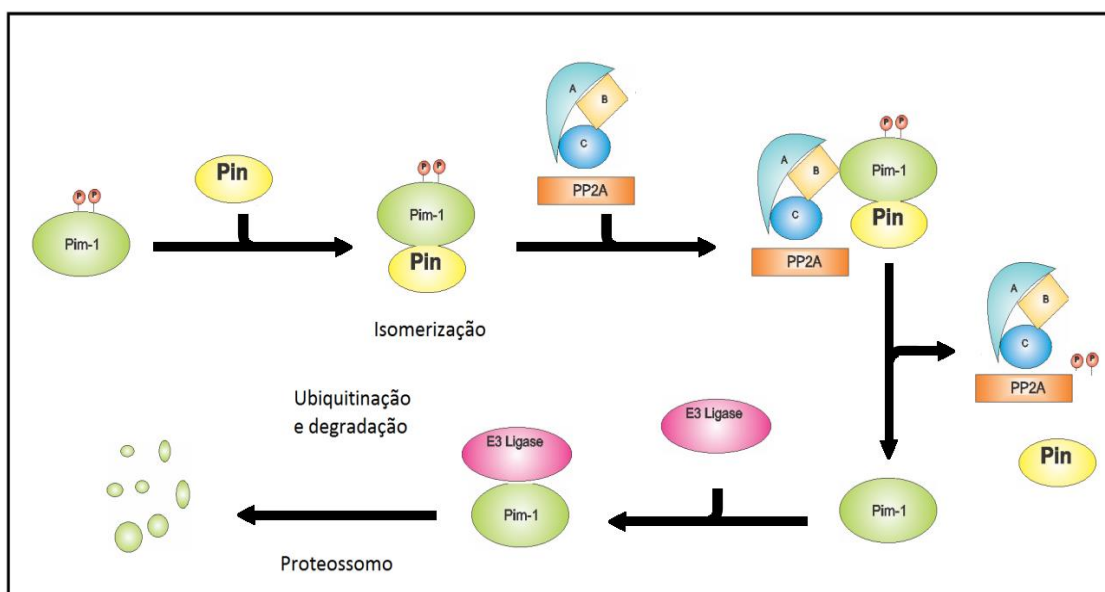


Figura 10. Modelo hipotético da degradação de Pim-1 pela fosfatase PP2A. (modificado de Ma *et al.*, 2007).

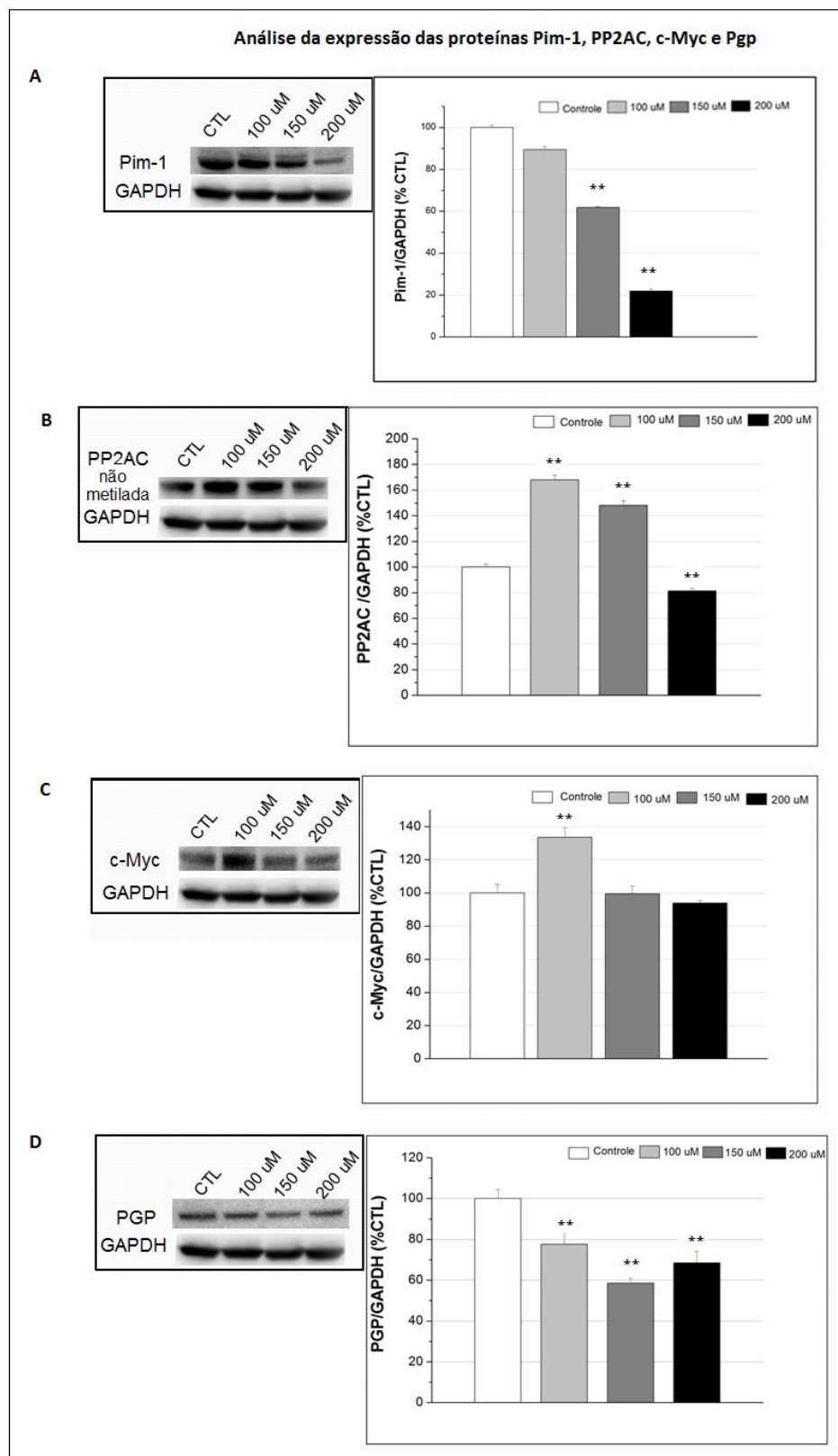


Figura 9. Análise da expressão de quinase Pim-1, c-Myc, Pgp e estado de ativação da PP2A após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como porcentagem. Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes (n=3). ANOVA seguido de post test Tukey. ** diferença significativa ($P < 0,05$) do tratado em relação ao controle.

Neste trabalho também avaliamos a expressão da proteína c-Myc após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida (Figura 9 C). Somente na concentração de 100 μ M observou-se um aumento da expressão desta proteína, no entanto, nas concentrações maiores o nível de expressão foi similar ao das células controle.

O fator de transcrição c-Myc, é indicado como um regulador crítico em diversos processos celulares que incluem o crescimento celular, proliferação, apoptose, angiogênese e diferenciação (O'Connell et al., 2003; Robson et al., 2011). Esta proteína participa ativamente na regulação do ciclo celular e está envolvida na transição da fase G1 à fase S, através da ativação dos complexos ciclina/CDK (Amati et al., 1998; Dauphinot et al., 2001).

De forma interessante, em relação à P-glicoproteína (Pgp) observamos uma diminuição da expressão após o tratamento com a etoxzolamida (Figura 9 D). A proteína Pgp, após ser sintetizada, é exportada pelo retículo endoplasmático como uma proteína de 150 kDa a qual será glicosilada no complexo de Golgi resultando na proteína madura de 170 KDa. Em seguida, a proteína funcional é translocada para a membrana citoplasmática e finalmente poderá mediar o efluxo de drogas, sendo, portanto, um importante mediador da resistência de células tumorais a quimioterápicos (Xie et al., 2010).

O fato da etoxzolamida diminuir a expressão da Pgp pode ser um indicativo que este composto diminua a resistência das células de câncer pancreático. Porém, somente com a análise da atividade desta proteína poderemos ter uma conclusão. Interessante notar que a diminuição da expressão da Pgp induzida pela etoxzolamida pode ter relação com a redução dos níveis da proteína Pim-1. Xie e colaboradores (2010) demonstraram que a Pim-1 fosforila e regula a expressão/níveis da Pgp por proteger a proteína Pgp imatura (150 kDa) da clivagem pelas proteases do RE e da degradação proteossomal, deste modo permite a glicosilação e estabiliza a proteína madura (170 kDa).

A figura 11 resume as proteínas que Pim-1 e PP2A têm como substratos e deste modo poderiam participar na regulação da expressão ou atividade das mesmas. Neste esquema foram indicadas as fases do ciclo celular que as proteínas Pim-1 e PP2A participam segundo os dados da literatura descritos em nossa discussão.

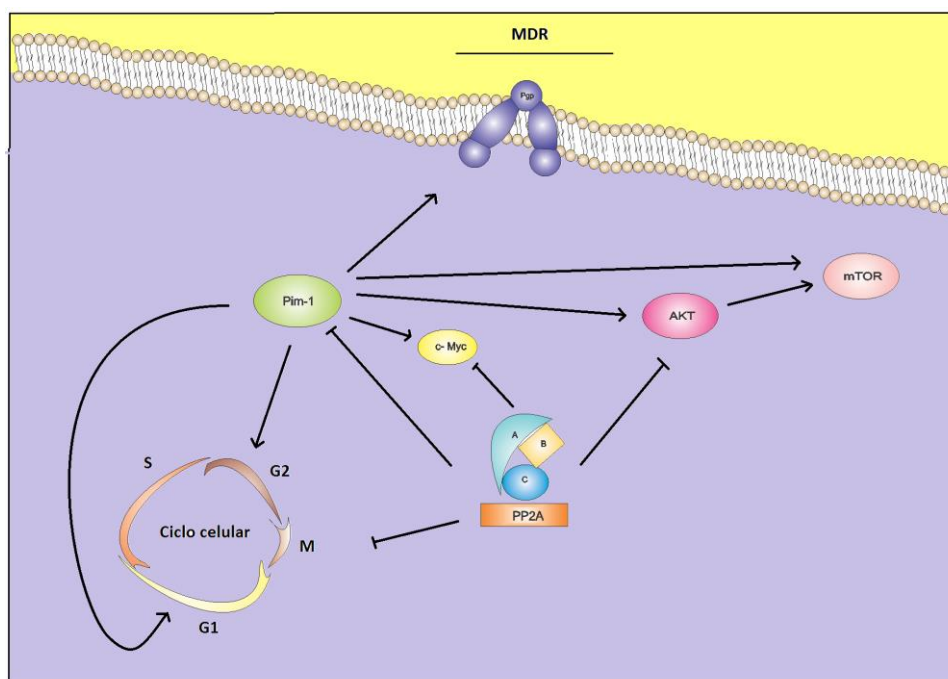


Figura 11. Proteínas substratos de Pim-1 quinase e da fosfatase PP2A. Pim-1 quinase participa na ativação das fosfatases Cdc25, envolvidos na progressão do ciclo celular nas fases G1/S e G2/M. Além disso, esta quinase tem um papel importante na síntese dos transportadores Pgp, relacionados com MDR. Do mesmo modo, está envolvida com os processos de sobrevivência e proliferação celular por participar da ativação da quinase AKT, mTor e na expressão do fator de transcrição c-Myc. Entretanto, PP2A uma vez ativa mantém a fosfatase Cdc25 inativa, o que leva à parada do ciclo celular nas fases G1/S e G2/M. Além de participar na degradação da Pim-1 quinase.

4.2.4. Estresse do retículo endoplasmático (ERE) em células PANC-1

O acúmulo de proteínas mal enoveladas, alterações na homeostase do cálcio e outros fatores no lúmen do retículo endoplasmático (RE) causam estresse do RE. Estes distúrbios ativam a resposta UPR (*unfolded protein response*) que leva à indução da expressão de chaperonas do RE e inibição da síntese proteica até conseguir condições de equilíbrio,

prevalecendo numa primeira fase à sobrevivência celular. Entretanto, se o estresse persiste a resposta UPR ativa vias de sinalização que levam à morte celular (Szegezdi et al., 2006).

Neste contexto decidimos analisar os níveis de expressão da chaperona GRP78, depois do tratamento com etoxzolamida durante 48 h. Nossos resultados mostraram que o aumento das concentrações de etoxzolamida culminou com um incremento da expressão da GRP78 (Figura 12).

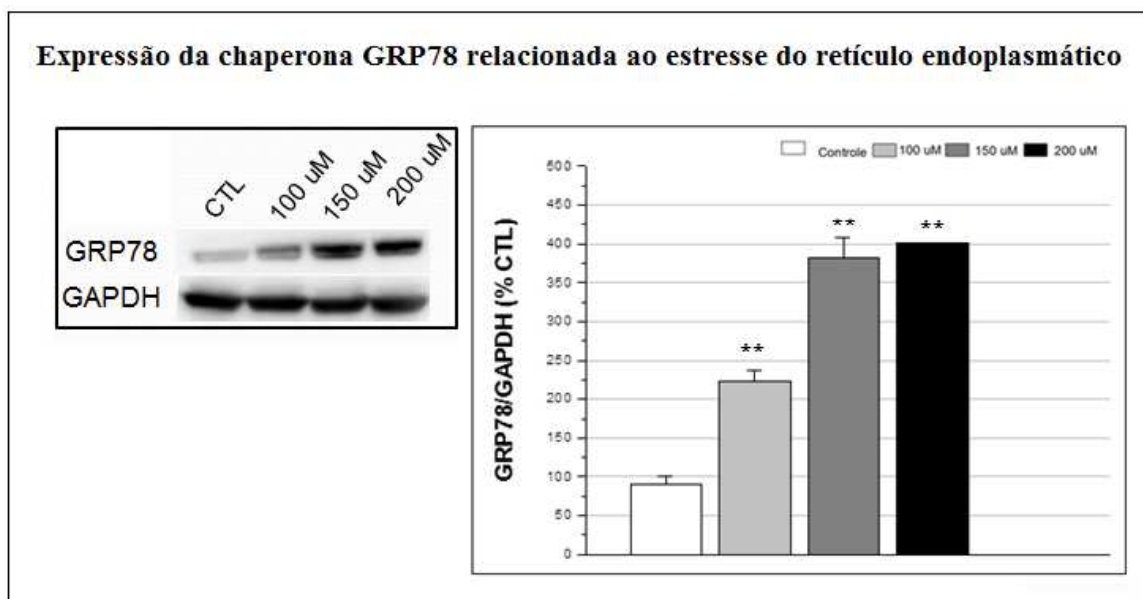


Figura 12. Análise da expressão da chaperona GRP78 relacionada ao estresse do retículo endoplasmático após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como porcentagem. Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes ($n=3$). ANOVA seguido de post test Tukey. ** diferença significativa ($P < 0,05$) do tratado em relação ao controle.

A GRP78 é uma das proteínas utilizada como sensor e modulador da resposta UPR em condições de ERE (Ma et al., 2004). A indução da expressão da GRP78 e outras chaperonas estão relacionadas com a ativação da via de sinalização do fator de transcrição ATF6 e os receptores PERK e IER1 (Szegezdi et al., 2006). Vários estudos têm demonstrado que uma vez induzido gradualmente o ERE, a chaperona GRP78 apresenta-se altamente expressa e uma

indução persistente leva as células à morte de maneira concentração-dependente em relação ao indutor (Lee et al., 2001, Misra e Pizzo et al., 2005). Diante destes resultados sugerimos que a etoxzolamida poderia estar induzindo ERE pela alta indução de GRP78 nas diferentes concentrações da droga.

4.2.4.1. Estresse no retículo endoplasmático poderia regular diferencialmente a fosforilação de AKT nos resíduos Treonina 308 e Serina 473

A serina/treonina quinase AKT/PKB, uma vez traduzida, é processada no RE é reconhecida pelas chaperonas Hsp90, Hsp70 e Hsp27 cuja função é proteger AKT inativa da degradação proteossomal. Após ser translocada ao citosol, a AKT pode ligar-se ao grupo inositol do PIP₃, o qual se encontra ligado à membrana plasmática. Uma vez associada à membrana, AKT poderá ser ativada por fosforilação nos resíduos de treonina 308, 51 e 50 pela PDK-1 e pelo complexo protéico mTORC2 na serina 473 e 52, sendo que a máxima atividade da AKT é dependente da fosforilação dos resíduos serina 473 e treonina 308 (Zhang et al., 2009). Muitas doenças relacionadas com o ERE apresentam uma alteração na atividade da AKT incluindo vários tipos de cânceres (Ni et al., 2007).

Deste modo, analisamos o *status* de fosfoforilação da AKT em ambos resíduos, depois do tratamento com etoxzolamida durante 48 h. Observamos que p-AKT (Ser 473) apresentou um aumento destacado nas concentrações de 100, 150 e 200 µM de etoxzolamida e p-AKT (Thr 308) diminuiu a fosfoforilação, uma vez normalizadas com a AKT total (Figura 13).

Estes resultados mostraram que houve um aumento relativo da fosforilação da quinase AKT (razão Ser 473/ Thr 308) entre ambos os resíduos nas diferentes concentrações de etoxzolamida. Tendo em conta que a atividade da AKT depende dos níveis de fosforilação

tanto do resíduo Ser 473 quanto Thr 308 (Zhang et al., 2009), decidimos analisar a expressão de alguns substratos da quinase AKT, tais como mTOR e GSK-3 β .

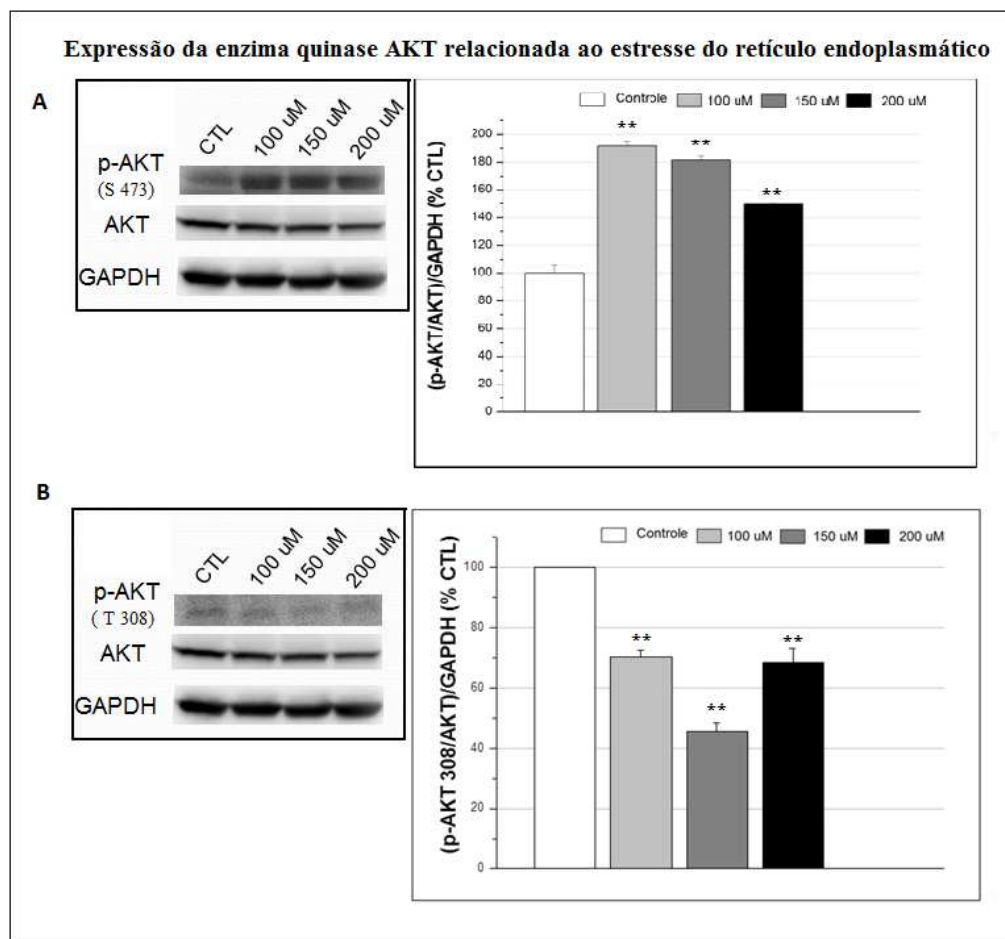


Figura 13. Análise da expressão e fosforilação da enzima quinase AKT, relacionada ao estresse do retículo endoplasmático, após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como porcentagem. Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes (n=3). ANOVA seguido de post test Tukey. ** diferença significativa ($P < 0,05$) do tratado em relação ao controle. S= serina, T= treonina.

A figura 14 mostra que a atividade da mTOR (razão p-mTOR (Thr 2448)/mTOR) apresentou uma leve diminuição e que a fosforilação de p-GSK-3 β (Ser 9) está aumentada.

A razão que existe entre as fosforilações Ser 473/ Thr 308 poderia influenciar tanto na atividade de AKT como na variação da especificidade pelo substrato em condições de ERE. Yung e colaboradores (2011) mostraram recentemente que em uma situação de estresse do

retículo, a fosforilação da AKT no resíduo Ser 473 está aumentada e a fosforilação na Thr 308 foi gradualmente diminuída. Deste modo, observaram que diferentes níveis de estresse regulam diferencialmente ambas as fosforilações e seus substratos. Estudos recentes mostraram que a enzima quinase Pim-1 altamente expressa poderia fosforilar o resíduo Ser 473 de AKT e regular a ativação desta enzima (Li et al., 2010).

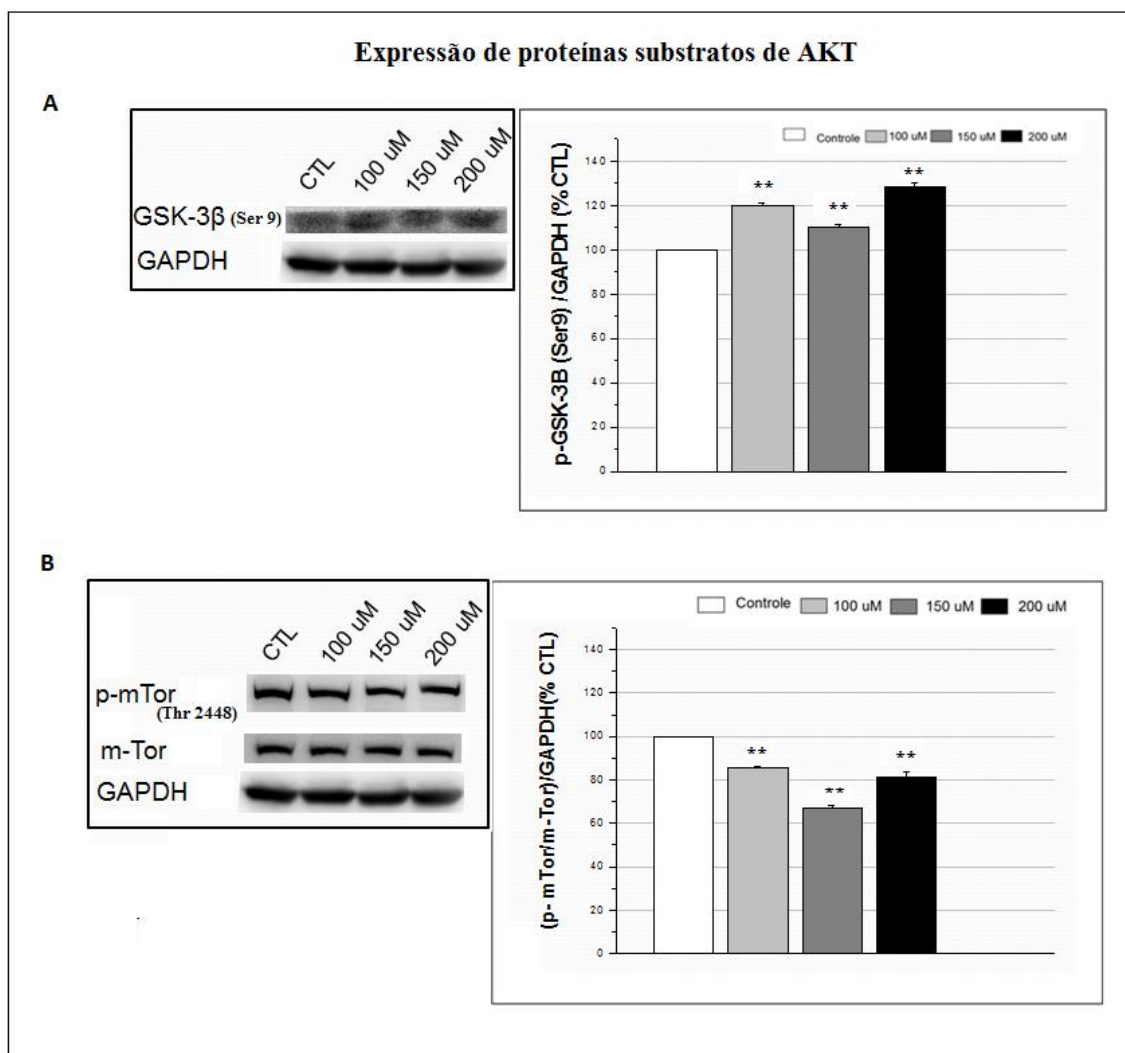


Figura 14. Análise da expressão e/ou fosforilação de proteínas substratos de AKT após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como porcentagem. Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes (n=3). ANOVA seguido de post test Tukey. ** diferença significativa ($P < 0,05$) do tratado em relação ao controle.

4.2.4.2. Estresse do retículo endoplasmático poderia induzir degradação da ciclina D1

Tanto em células normais quanto tumorais, a resposta UPR aumenta a expressão de genes que codificam as chaperonas do RE, tais como GRP78 ou GRP74, entre outras. A indução da expressão destas chaperonas foi relacionada com o decréscimo da síntese protéica e parada do ciclo celular na fase G_1 (Dricu et al., 1993; Brostrom et al., 1998). Vários estudos indicaram que a parada do ciclo na fase G_1 , em condições de estresse do RE, resulta de uma inibição da tradução da ciclina D1 (Brewer et al., 1999; Chiang et al., 2008). Estudos demonstraram que a ativação da via de sinalização dependente de PERK, relacionada à resposta UPR, é suficiente para mediar a diminuição dos níveis de ciclina D1 e promover a parada do ciclo celular na fase G_0/G_1 . Uma vez ativado PERK, ocorre uma inativação da proteína eIF2 α e inibição da tradução da ciclina D1, entre outras proteínas (Brewer et al., 2000; Raven et al., 2008). Portanto, PERK foi indicada como um efetor proximal da resposta UPR, ligada às condições de estresse do RE para regular a progressão do ciclo celular.

Numerosos estudos demonstraram que a ciclina D1 tem sido identificada como superexpressa em vários tipos de cânceres, incluindo o câncer de pâncreas (Elsheikh et al., 2008; Bartkova et al., 1995). Deste modo, em câncer de pâncreas a superexpressão da ciclina D1 é utilizada como biomarcador de prognóstico, e usualmente correlacionada com uma menor sobrevida pós-operatória (Gansauge et al., 1997; Kornmann et al., 1998). Além disso, estudos mostram que a ciclina D1 está implicada com mecanismos de quimioressistência (Kornmann et al., 1999).

Baseados nos dados da literatura, nossos resultados são consistentes com a diminuição da expressão da ciclina D1 e as condições de estresse (Figura 7 e 12). Portanto, sugerimos que a regulação dos níveis de ciclina D1 e a consequente parada do ciclo celular na fase G_0/G_1

poderiam estar relacionados com a modulação da resposta UPR ativada nas condições de ERE, induzido pelos efeitos da etoxzolamida.

4.3. Avaliação do potencial de invasão celular

4.3.1. Análise da expressão e atividade de metaloproteinases

O câncer de pâncreas é caracterizado por apresentar uma invasão local rápida nas estruturas adjacentes. A matriz extracelular contém vários tipos de componentes, sendo o colágeno tipo IV o predominante (Leblond et al., 1989). Dois tipos de collagenases IV têm sido identificados, a MMP-2 e a MMP-9, as quais apresentam uma potente atividade para degradar colágeno tipo V, VII, IX, X, fibronectina e elastina (Senior et al., 1991). Vários estudos indicaram que a expressão das MMP-2 e MMP-9 está aumentada em diferentes tipos de cânceres, incluindo o câncer de pâncreas (Hosotani et al., 2007).

Em relação às metaloproteinases expressas nas células PANC-1, analisamos tanto a expressão quanto atividade das MMP-2 e MMP-9 (Figuras 15 e 16, respectivamente). A expressão de ambas as metaloproteinases foi diminuída somente nas concentrações de 150 e 200 μ M da etoxzolamida. De forma interessante a atividade das MMP-2 e MMP-9, analisada por zimografia, foi reduzida em todas as concentrações da etoxzolamida utilizadas.

Esteves e colaboradores (2010) reportaram que inibidores de anidrases carbônicas derivados das sulfonamidas também atuam como inibidores das MMPs. Portanto, podemos sugerir que a etoxzolamida esteja afetando diretamente a atividade das MMPs. Além disto, este resultado é interessante, pois é um indicativo que o potencial metastático das células PANC-1 tenha diminuído.

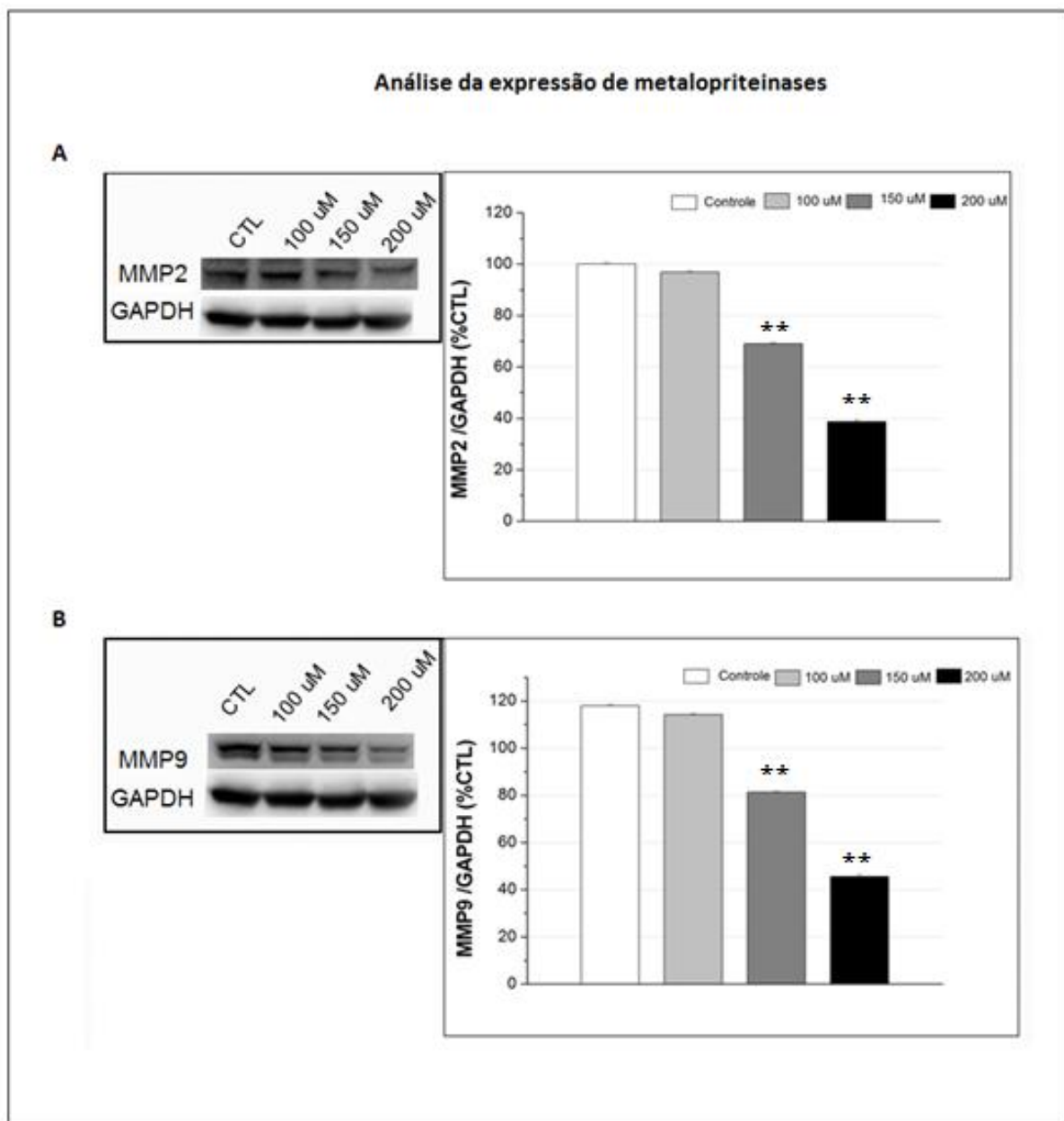


Figura 15. Análise da expressão das metaloproteínas MMP2 e MMP9 após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como porcentagem. Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes (n=3). ANOVA seguido de post test Tukey. ** diferença significativa ($P < 0,05$) do tratado em relação ao controle.

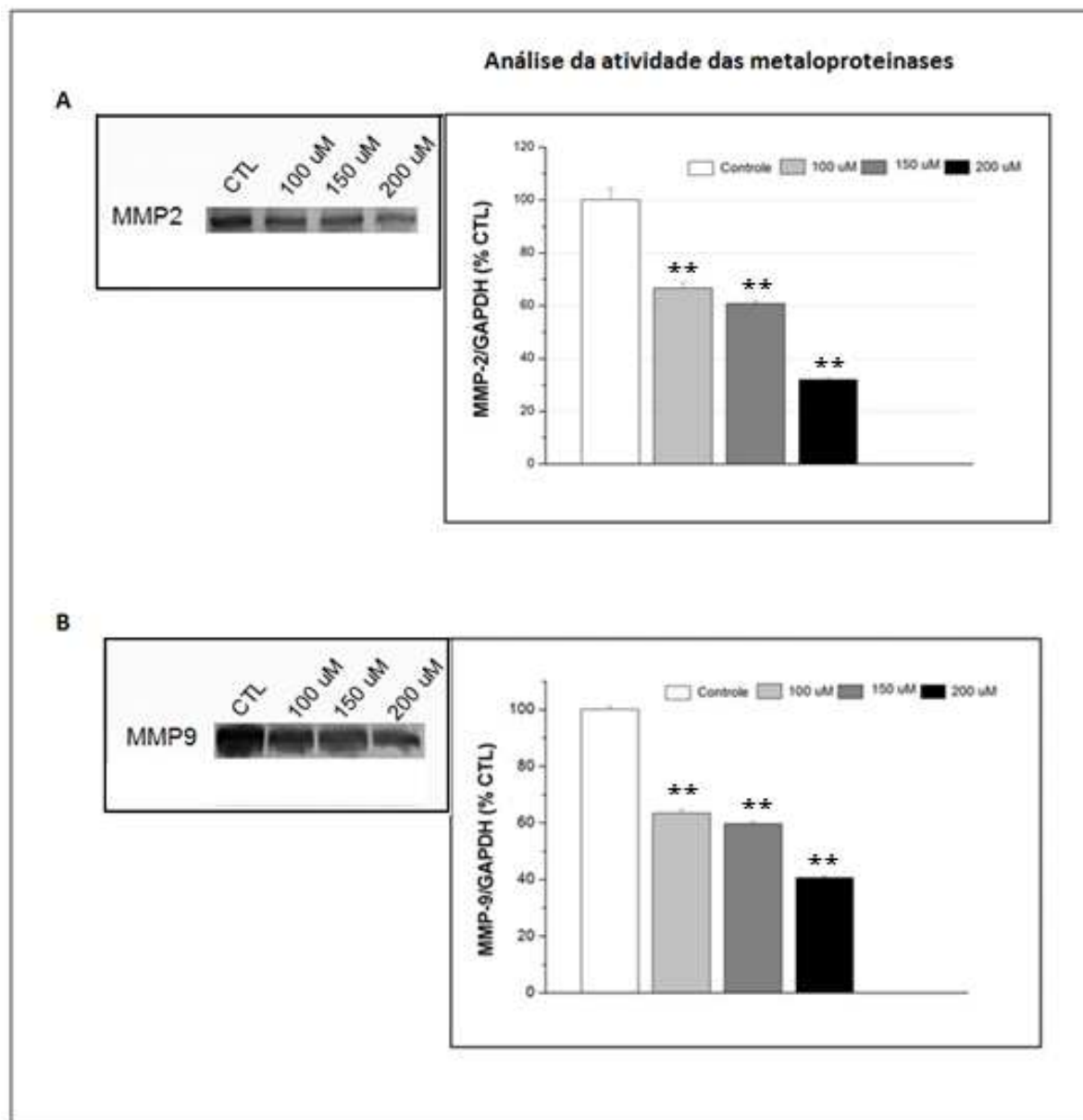


Figura 16. Análise da atividade das metaloproteínases MMP2 e MMP9 após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como porcentagem. Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes (n=3). ANOVA seguido de post test Tukey. ** diferença significativa ($P < 0,05$) do tratado em relação ao controle.

Como o processo de invasão celular está associado com a ativação da angiogênese, decidimos analisar a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) para verificar se a expressão deste biomarcador de angiogênese (Baeriswyl et al., 2009) estaria diminuída após o tratamento das células PANC-1 com a etoxzolamida. Nas condições

experimentais utilizadas, foi observada uma leve diminuição significativa da expressão do VEGF (Figura 17).

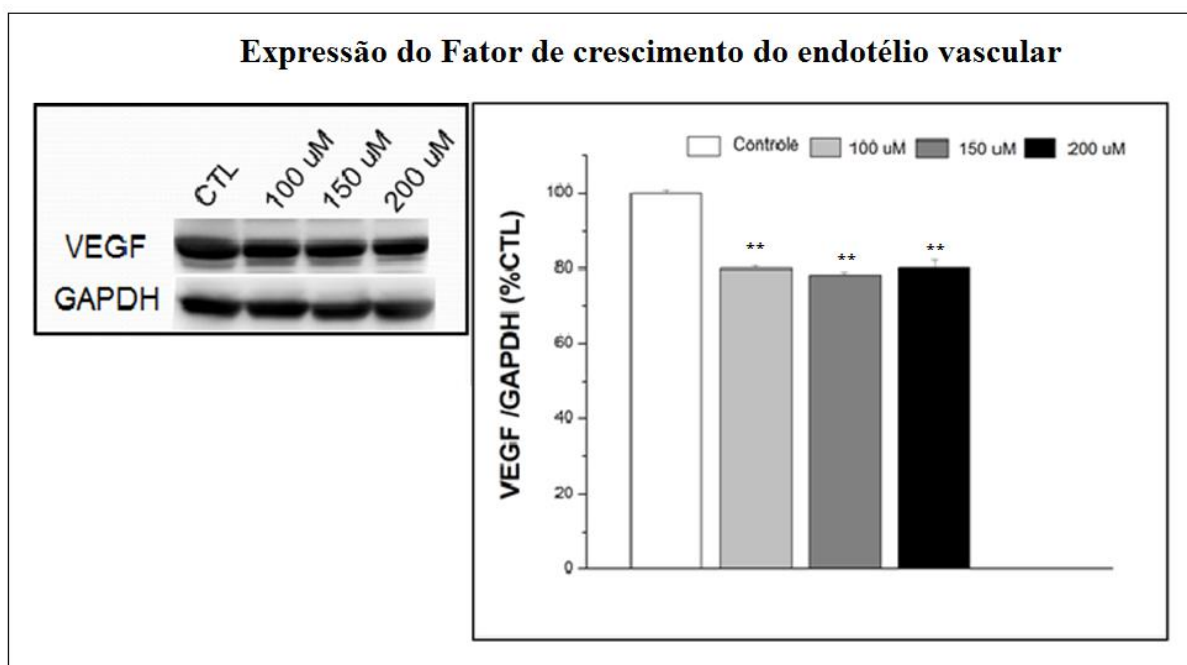


Figura 17. Análise da expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como porcentagem. Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes (n=3). ANOVA seguido de post test Tukey. ** diferença significativa ($P < 0,05$) do tratado em relação ao controle.

Muitos tumores sólidos apresentam um elevado crescimento e proliferação celular gerando um microambiente deficiente de oxigênio. A adaptação destas células às condições de hipóxia leva à indução da expressão e ativação de vários genes envolvidos tanto com o metabolismo oncogênico quanto com a resistência as terapias convencionais (Pastoreková et al., 2008). Deste modo, foi observado que em uma resposta primária às condições de hipóxia, as células tumorais superexpressam e ativam o fator de indução de hipóxia (HIF-1). Este fator de transcrição tem como papel principal regular a expressão de vários genes envolvidos no processo de hipóxia, tais como o VEGF, os transportadores de glucose GLUT-1 e GLUT-3,

transportadores de Na^+/H^+ como NHE1 ou de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, como AE2, proteínas de adesão, MMP-2, entre outros (Thiry et al., 2006).

Em relação aos nossos resultados, como foi observada uma leve diminuição da expressão do VEGF, será necessário analisar outros biomarcadores de angiogênese e deste modo, poder confirmar se o tratamento das células com a etoxzolamida interfere no processo da angiogênese.

4.3.2. Ensaio de adesão celular e análises de biomarcadores do potencial de invasão celular

O potencial metastático de uma célula tumoral depende das interações das moléculas da superfície celular com o microambiente extracelular que envolve tanto as células vizinhas quanto a MEC (Chaffer et al., 2011). Neste contexto, a invasão das células tumorais requer a participação de moléculas de adesão, integrinas e proteases específicas (Langley et al., 2007). Entre estas proteínas, as integrinas mediam a interação das células-MEC seguidas da transdução de sinais intracelulares, que regulam sobrevivência, proliferação, migração e invasão celular (Desgrosellier e Cheresch et al., 2010). A sinalização por integrinas leva à ativação da quinase FAK e, deste modo, pode mediar a motilidade celular através da formação de um complexo com a enzima quinase Src e consequente ativação das vias de sinalização RAS-MAPKs (Schaller et al., 2001, Yilmaz e Christofori et al., 2009).

Para avaliar a capacidade de adesão das células PANC-1, incubamos as células com diferentes concentrações de etoxzolamida 150 e 250 μM durante 12, 18 e 22 h. A figura 18 mostra que os efeitos da etoxzolamida induziram diminuição da adesão celular na concentração de 250 μM . No entanto, não foi observada variação na concentração de 150 μM

durante os três tempos de incubação em relação ao controle. Tais resultados indicam que a presença de etoxzolamida poderia interferir no processo de adesão das células PANC-1.

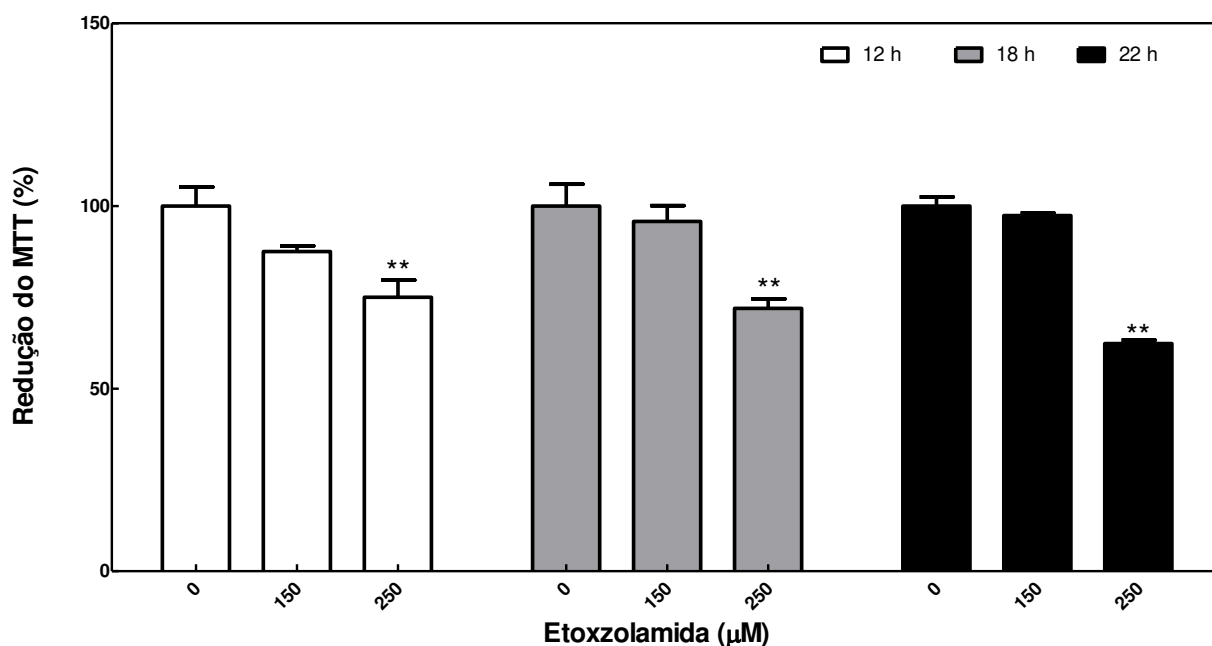


Figura 18. Avaliação da capacidade de adesão celular das células PANC-1 expostas a concentrações de 150 µM e 250 µM de etoxzolamida. As células ($6,25 \times 10^4$ células/mL) foram plaqueadas independentemente em placas de 24 poços e incubadas por 12, 18 e 22 h a 37°C e 5% de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT. Os resultados representam média $\pm$ erro padrão da média de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata. ANOVA seguido de post test Tukey. ** diferença significativa ($P < 0,05$) do tratado em relação ao controle.

Vários estudos têm demonstrado que o câncer de pâncreas apresenta uma elevada expressão de moléculas de adesão (Schwaeble et al., 1993; Shimoyama et al., 1997). Deste modo, sugerimos que a diminuição da adesão das células PANC-1 poderia estar relacionada com a redução dessas interações célula-célula e célula-MEC principalmente nas etapas de intravasão, migração e extravasão (Tempia-Caliera et al., 2002; Stetler- Stevenson et al., 1993). Portanto, a inibição destas interações pode representar um interessante alvo terapêutico na atenuação do potencial metastático das células tumorais (Bendas and Borsig et al., 2012).

Baseados nos resultados apresentados acima, para analisar se a perda de adesão está relacionada com um aumento da invasão e migração na progressão da metástase, foram

avaliados por western blotting a expressão da integrina $\alpha\beta3$ e a quinase p-FAK (Tyr 925), fosforilada por Src. Os dados obtidos na figura 19 (A) mostram que a expressão da integrina $\alpha\beta3$ apresentou um aumento na concentração de 150 μM de etoxzolamida, ao passo que na concentração de 200 μM a expressão foi destacadamente diminuída. Do mesmo modo, também observamos que a expressão da quinase FAK fosforilada foi destacadamente diminuída na concentração de 200 μM de etoxzolamida (Figura 19 B).

Estes resultados sugerem que a etoxzolamida, em concentrações mais elevadas, poderia ser um modulador negativo da metástase das células PANC-1 por estar relacionada tanto com a diminuição da adesão, diminuição da expressão e atividade de MMPs e redução da migração devido ao decrescimento da expressão da integrina $\alpha\beta3$ e fosforilação FAK (Tyr 925), já que ambas as proteínas indicam o fenótipo invasivo e encontram-se envolvidas na indução da migração das células tumorais (Yilmaz e Christofori et al., 2009; Desgrosellier e Cheresch et al., 2010).

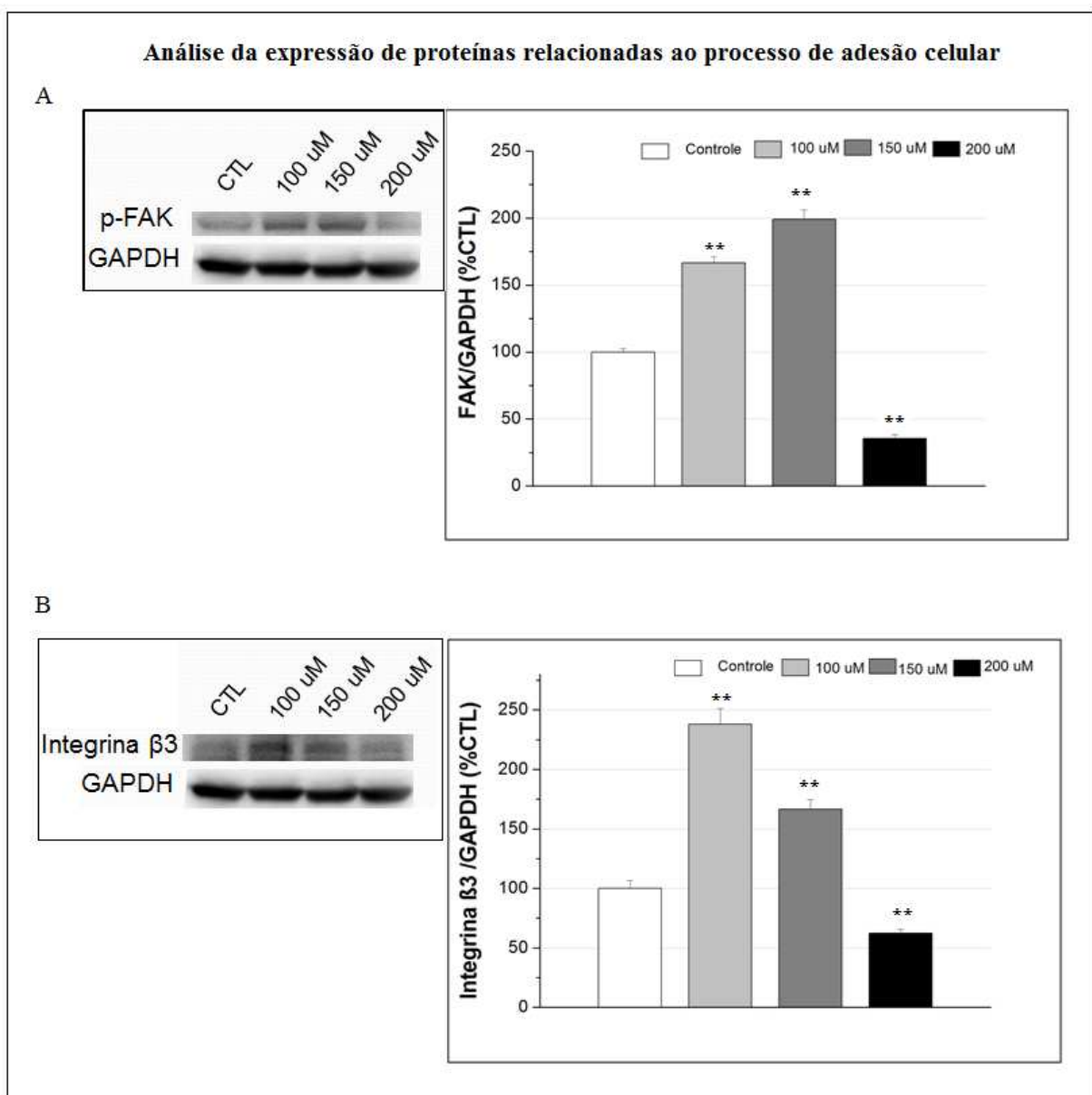


Figura 19. Análise da expressão das proteínas FAK e Integrina $\alpha\beta 3$ após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como porcentagem. Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes (n=3). ANOVA seguido de post test Tukey. ** diferença significativa ($P < 0,05$) do tratado em relação ao controle.

Em adenocarcinoma ductal de pâncreas a expressão da integrina $\alpha\beta 3$ tem sido observada em 58% dos casos e está associada com o aumento da metástase nos nodos linfáticos e fígado (Hosotani et al., 2002). Desgrosellier e colaboradores (2009) suprimiram a expressão da subunidade $\beta 3$, da integrina $\alpha\beta 3$, em células PANC-1 e observaram que a

metástase nos linfonodos hepáticos foi significativamente inibida, além de diminuir a massa do tumor primário.

As integrinas tais como $\alpha 6\beta 4$ ou $\alpha v\beta 3$, são integrinas de união a laminina, fibronectina ou vitronectina, respectivamente e apresentam-se altamente expressas principalmente em células de melanoma, câncer de próstata, câncer de pâncreas, câncer de ovários entre outros (Desgrosellier e Cheresch et al., 2010). Estudos têm demonstrado que a alta expressão promove a invasão celular através da degradação da membrana basal, participam na regulação da expressão e aumento da ativação das MMP-2 e MMP-9, e na ativação das vias de sinalização relacionadas com sobrevivência, proliferação e migração celular (Desgrosellier e Cheresch et al., 2010; Hosotani et al., 2002).

Estudos prévios têm relacionado à expressão da integrina $\alpha v\beta 3$ e ativação da quinase Src com aumento da invasão e migração celular em matrizes de fibrinogênio ou vitronectina, em várias linhagens celulares incluindo câncer de pâncreas (Leavesley et al., 1992; Summy et al., 2003). As integrinas mediam a adesão e migração celular pela ativação do complexo quinase Src-FAK, ambas ativam vias de sinalização que incluem as proteínas Rac1 e Cdc42 e inativam Rho, sendo todas moléculas semelhantes às Ras da família das GTPases (Desgrosellier et al., 2009). Estas vias resultam na formação de numerosos filopódios ou formação de lamelipódios, uma região de protrusão, que participam no movimento das células, deste modo, Src-FAK juntas, ativam a migração celular (Desgrosellier et al., 2009; Huveneers and Danen et al., 2009).

4.3.3. Avaliação das alterações morfológicas das células PANC-1 e relação com proteínas associadas ao citoesqueleto, invasão e migração celular

Os processos de migração celular apresentam-se como um ciclo de quatro etapas principais, extensão da membrana, adesão das células-substrato, translocação da célula e quebra das adesões celulares. Muitos complexos proteicos, incluindo as quinases FAK e Src, as proteínas da família Rho e as integrinas, são essenciais no processo de migração celular (Hood e Cheresch et al., 2003; Yilmaz e Christofori et al., 2009). Juntas, além de contribuir nas mudanças da morfologia celular, participam na coordenação dos movimentos gerados nas células no processo de migração celular (Lauffenburger e Horwitz et al., 1996).

Dados prévios na literatura evidenciaram as diferentes localizações das integrinas nos processos de invasão e migração celular. Deste modo, observaram que as subunidades das integrinas são sintetizadas e dimerizadas no retículo endoplasmático e, posteriormente, são transportadas por vesículas até a membrana citoplasmática na superfície celular. Estudos indicaram que as células em movimento apresentam acúmulo das integrinas na margem frontal celular, contribuindo para a formação e estabilização de protrusões celulares e consequentemente, início da migração (Lufman et al., 2009). Além disto, estas proteínas tendem a permanecer nos pontos de adesão focais até um novo ciclo de translocação celular (Schmidt et al., 1993).

Em virtude dos efeitos avaliados da etoxzolamida sobre as células PANC-1, decidimos estudar a influência deste composto sobre a alteração da morfologia celular e relação com proteínas relacionadas com o citoesqueleto, as quais desempenham um papel importante no processo de invasão e migração celular, a integrina $\alpha v \beta 3$ e a quinase FAK (Tyr 925), cujas expressões foram avaliadas anteriormente por western blotting. Deste modo, as células

PANC-1 após o tratamento de 48 h com concentrações de etoxzolamida de 150 e 250 μM , foram incubadas com anticorpos específicos de anti-integrina $\beta 3$ e anti-FAK (Tyr 925).

As figuras 20 A e B mostram a morfologia característica das células PANC-1 antes do tratamento (controle) (Lee et al., 2011), com adesões intercelulares e ressalta-se que tanto a integrina $\beta 3$ quanto a FAK (Tyr 925) encontram-se principalmente nas regiões perinuclear das células. Entretanto, os resultados revelam uma leve presença da FAK (Tyr 925) localizada em pontos de adesão focal na membrana citoplasmática junto à integrina $\alpha \nu \beta 3$.

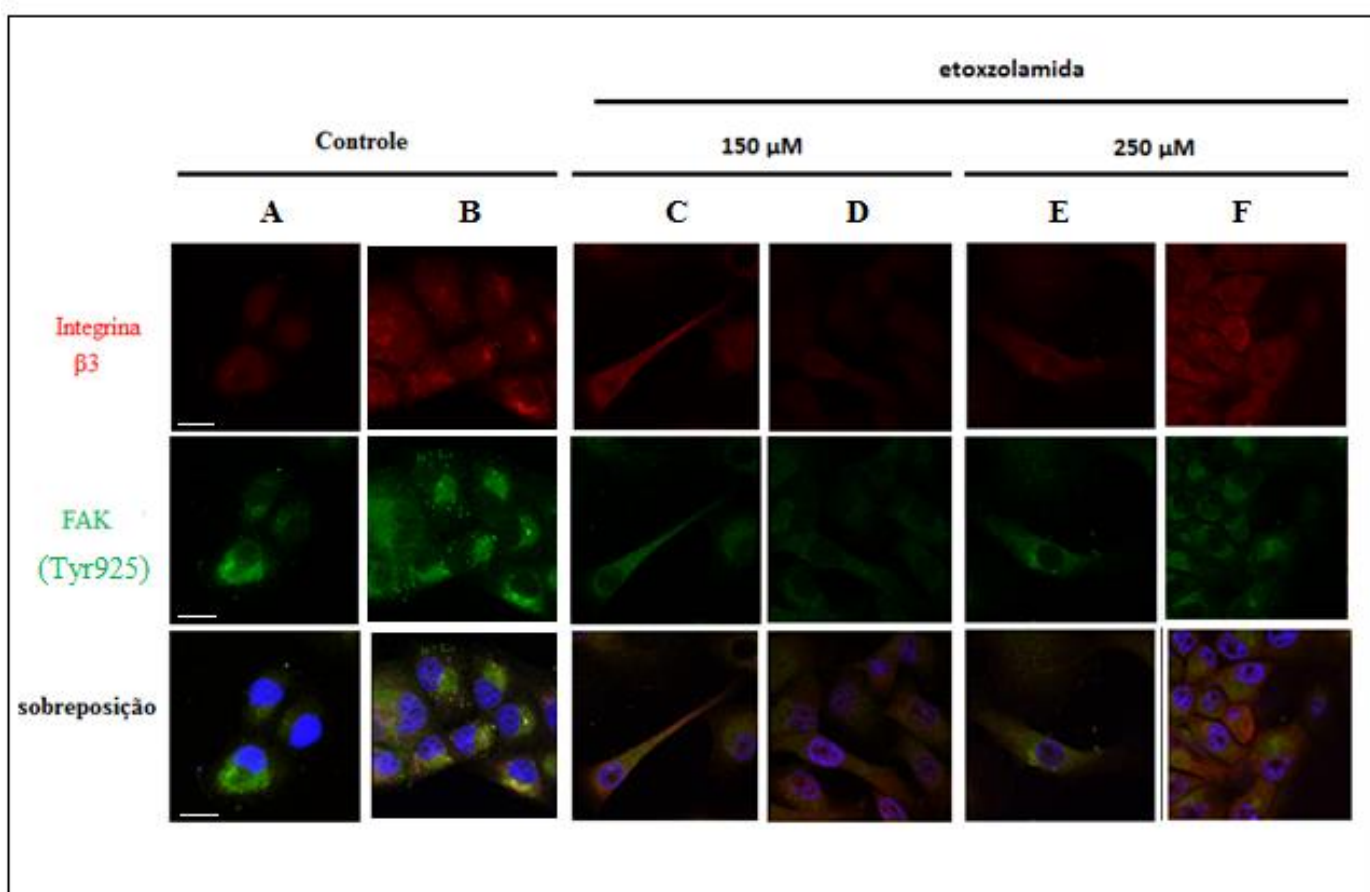


Figura 20. Alterações na morfologia das células PANC-1 induzidas pela etoxzolamida após o tratamento por 48 h. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços (1 mL/ poço) na densidade de $6,25 \times 10^4$ células/mL, incubadas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO_2 . **A e B** são imagens do controle de 24 e 48 h respectivamente. As células foram tratadas com etoxzolamida nas concentrações de 150 (**C e D**) e 250 μM (**E e F**) durante 48 h. Foram colocadas duas imagens (réplicas) por cada condição. As alterações na morfologia foram analisadas por microscopia confocal como descrito em detalhes em “Materiais e Métodos”. Para marcação da integrina $\beta 3$, foi utilizado anticorpo Alexa Fluor-546 (vermelho) e para marcação da FAK (Tyr 925) foi utilizado anticorpo Alexa Fluor-488 (verde), o núcleo foi marcado utilizando TROPO3 (azul). Barra = 20 μM . O resultado foi representativo de 1 experimento.

Porém, as células expostas tanto a 150 μ M quanto a 250 μ M de etoxzolamida, apresentaram uma alteração significativa na morfologia (Figura C e E). Além disso, foram observadas protuberâncias extensas e anormais na periferia da maioria das células. Do mesmo modo, a microscopia confocal revelou a superposição dessas protuberâncias entre as células (Figura D e F). Em relação à integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ e à FAK (Tyr 925), foi observado que ambas as proteínas se apresentaram distribuídas no citosol, enquanto não foram observados pontos de adesão confocal na membrana citoplasmática. Nestas imagens algumas células poderiam estar mantendo adesões célula-célula ao passo que outras se apresentaram totalmente isoladas (Figura C, D, E e F). Estes resultados juntos sugerem que as alterações produzidas pela etoxzolamida poderiam não estar relacionadas com o aumento do fenótipo invasivo e migratório das células PANC-1. Entretanto, os dados obtidos apontam que a alteração da morfologia destas células poderia estar indicando uma reorganização do citoesqueleto, que tem como principal papel estabilizar a estrutura celular, desfavorecendo o fenótipo migratório. Diante destes resultados, para aprofundar melhor neste processo, seria interessante complementar com ensaios de invasividade e migração celular.

Em relação à FAK, Kim e colegas (2003) mostraram que a inibição da FAK em células de neuroblastomas induziu a perda de adesões focais e desorganização do citoesqueleto, este resultado foi associado com a diminuição da FAK (Tyr 397). Além disso, um recente estudo demonstrou que o status da fosforilação Tyr 925 contribui para a regulação coordenada da montagem/desmontagem das adesões focais ou formação das protrusões nas extremidades celulares. Portanto, usando uma forma mutada da FAK (Tyr 925) foi observado decréscimo na velocidade de desmontagem das adesões focais e uma marcada redução da migração, ao passo que uma expressão constitutiva da FAK (Tyr 925) incrementava a dinâmica das adesões focais

e a formação de protuberâncias nas extremidades da margem frontal das células (Deramaudt et al., 2011).

Portanto, sugerimos que o fenótipo invasivo das células PANC-1 poderia estar diminuído devido à ausência tanto de integrina $\alpha\beta3$ quanto FAK (Tyr 925) na membrana celular, levando também em consideração os resultados anteriores, tais como redução da expressão e atividade das principais MMPs, 9 e 2, envolvidas em invasão celular e perda de adesão. Do mesmo modo, sugerimos que parte dos efeitos apresentados pela etoxzolamida, poderia estar relacionado com uma alteração do mecanismo de regulação associados com a extensão da membrana citoplasmática envolvida no processo de migração.

4.4. Efeitos da etoxzolamida nos mecanismos de morte celular

Vários tipos de cânceres desenvolvem diferentes mecanismos de resistência para evadir os processos de morte celular (Hager et al., 1999; Deirdre et al., 2004). A combinação de diferentes fatores, tais como, crescimento acelerado, resistência adquirida durante a terapia, são responsáveis pela resistência e agressividade no câncer de pâncreas (Korsmeyer et al., 1992; Miyashita e Reed et al., 1993). Portanto, decidimos investigar se o tratamento das células PANC-1, por 48 h com a etoxzolamida, induzia alteração da expressão de proteínas chaves envolvidas com morte celular, que participam em vias de sinalização relacionadas com apoptose ou autofagia.

Como primeiro passo, investigamos duas proteínas chaves que participam na via de sinalização de apoptose dependente de caspase, a Bcl-2 e caspase-3. Ambas as proteínas não sofreram alteração significativa da expressão (Figura 21 A). Estes resultados poderiam estar relacionados com a resistência a apoptose das células PANC-1. Vários estudos demonstraram que as células de câncer de pâncreas apresentam altos níveis de procaspase-3, Bcl- xL e

FAP-1, fato relacionado com as características invasivas e da resistência à morte celular por apoptose dependente de caspase (Roy et al., 2001; McConkey et al., 2010; Hu et al., 1998).

Consequentemente decidimos investigar a expressão do fator de indução de apoptose (AIF), uma proteína mitocondrial associada à via de apoptose independente de caspase. Os dados mostraram que os níveis de expressão desta proteína aumentaram em concentrações crescentes da droga (Figura 21 B). Os eventos relacionados com apoptose independente de caspase não foram ainda elucidados completamente, entretanto, se sabe que o AIF é liberado da mitocôndria e translocado ao núcleo e induz ativação dos processos de degradação do DNA. De fato este é um papel crítico desta proteína envolvida nos mecanismos de morte celular que ocorre em diferentes tipos de tumores (Norberg et al., 2010). Além disso, para verificar se a etoxzolamida está ativando a via de morte das células PANC-1 através da apoptose independente de caspase, é necessário analisar outras proteínas que participam nessa via. Muitas drogas são capazes de ativar a via de apoptose independente de caspase em câncer de pâncreas através de proteínas como AIF e EndG (Anderson et al., 2003; Tremblay et al., 2011). Em relação às proteínas associadas com autofagia, decidimos analisar a expressão das proteínas LC3BI e LC3BII, mas não observamos variação significativa durante o tratamento de 48 h (Figura 21 C).

Estes resultados sugerem que, nas condições experimentais utilizadas, não foi observado alteração da expressão/ativação de proteínas que participam em vias de morte por apoptose dependente de caspase ou de autofagia.

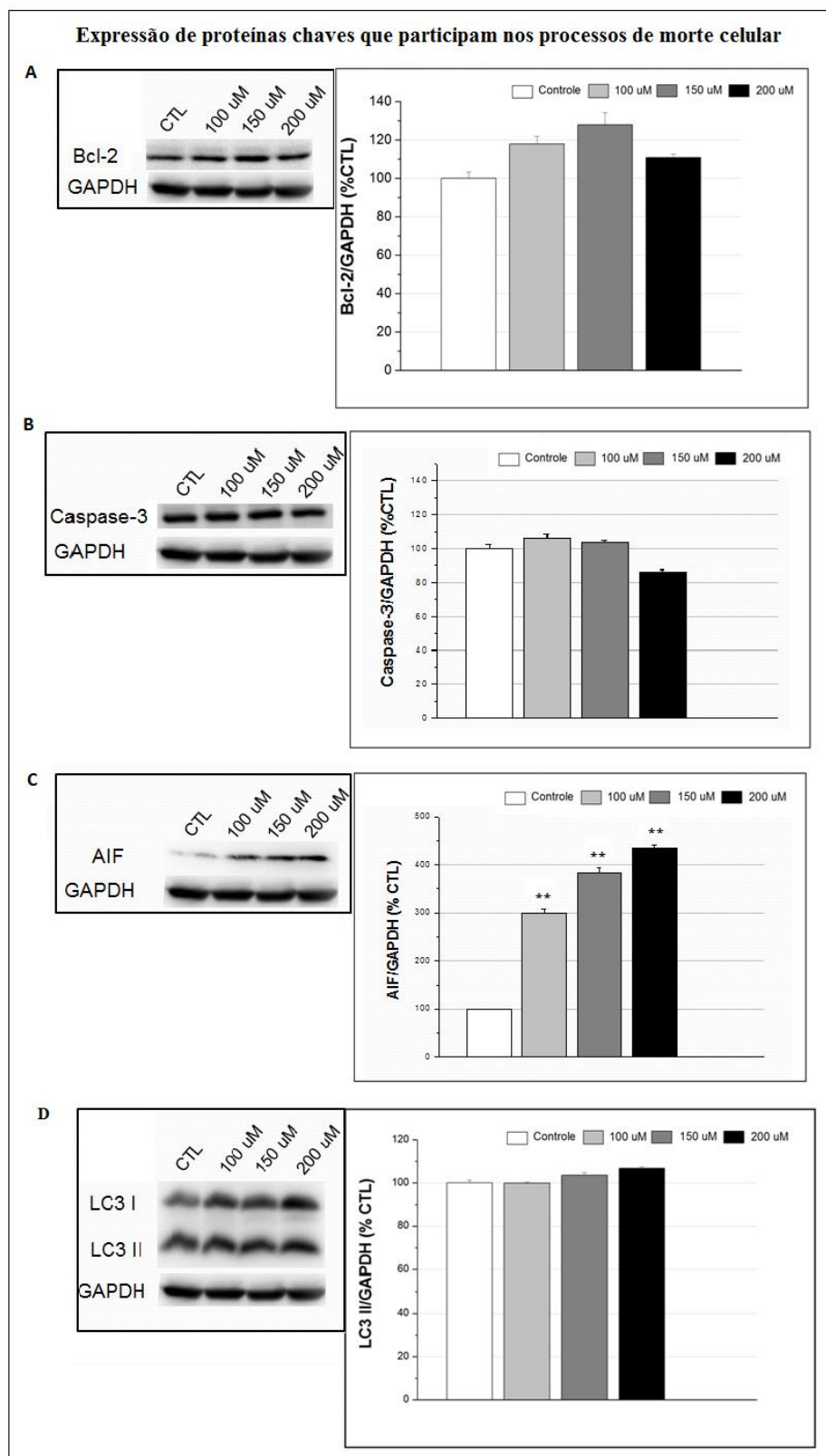


Figura 21. Análise da expressão de proteínas chaves que participam nos processos de morte celular após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como porcentagem. Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes (n=3). ANOVA seguido de post test Tukey. ** diferença significativa ($P < 0,05$) do tratado em relação ao controle.

4.5. Análise da expressão das anidrases carbônicas

As anidrases carbônicas (ACs, E.C. 4.2.1.1) são metaloenzimas presentes em vários organismos, incluindo vertebrados superiores, que catalisam a reação reversível de hidratação do dióxido de carbono. As ACs participam nos principais processos fisiológicos, tais como regulação da homeostase ácido-base, respiração, acidificação renal, vias de gliconeogênese e liponeogênese, entre outros (Henry et al., 1996; Supuram et al., 2004). No contexto tumoral, as ACs tem um importante papel na acidificação do meio extracelular dos tumores sólidos, levando à aquisição de um fenótipo altamente agressivo e metastático (Pastoreková et al., 2008).

Devido ao fato da etoxzolamida ser um inibidor de várias anidrases carbônicas (ACs I, II, IV, V, VII e IX), decidimos analisar se este inibidor também teria influência na expressão das anidrases carbônicas citosólicas, AC I e AC II, das células de câncer de pâncreas. Vários estudos mostraram que diferentes tumores sólidos apresentam uma alta expressão de AC I, ao passo que a expressão da AC II está diminuída. Entretanto, quando as células tumorais iniciam o processo de diferenciação foi observado que a expressão de AC I está diminuída enquanto a expressão da AC II apresenta-se aumentada (Chen et al., 2006).

Nossos resultados mostraram que a expressão da AC I foi constante e não apresentou variação nas concentrações de etoxzolamida utilizadas no tratamento de 48 h. No entanto, a expressão da AC II se manteve constante nas diferentes concentrações do inibidor, porém a expressão aumentou levemente na concentração de 200 μ M (Figura 22). Deste modo, não houve alteração significativa da expressão de ambas as enzimas.

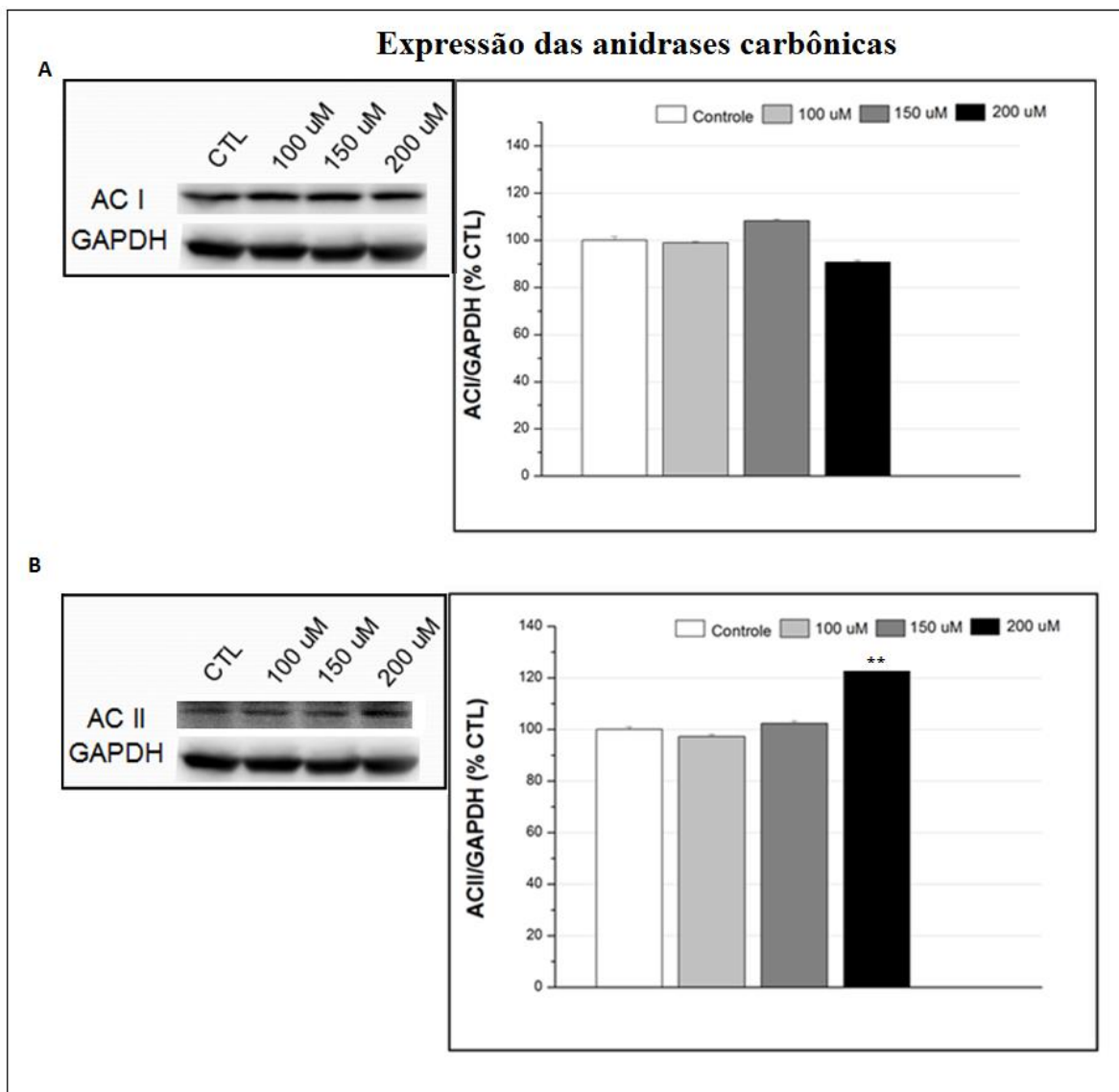


Figura 22. Análise da expressão das anidrases carbônicas após o tratamento das células PANC-1 com etoxzolamida durante 48 h. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como porcentagem. Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes (n=3). ANOVA seguido de post test Tukey. ** diferença significativa ($P < 0,05$) do tratado em relação ao controle.

4.6. Avaliação da recuperação celular após tratamento de 48 h com etoxzolamida

Tendo em vista os resultados observados e analisados neste trabalho, apresentou-se na figura 23 um esquema sobre os efeitos da etoxzolamida nos diferentes processos, relacionados com o potencial agressivo, invasivo e resistente, das células PANC-1, e avaliou-se a capacidade de recuperação das células PANC-1 após o tratamento de 48 h.

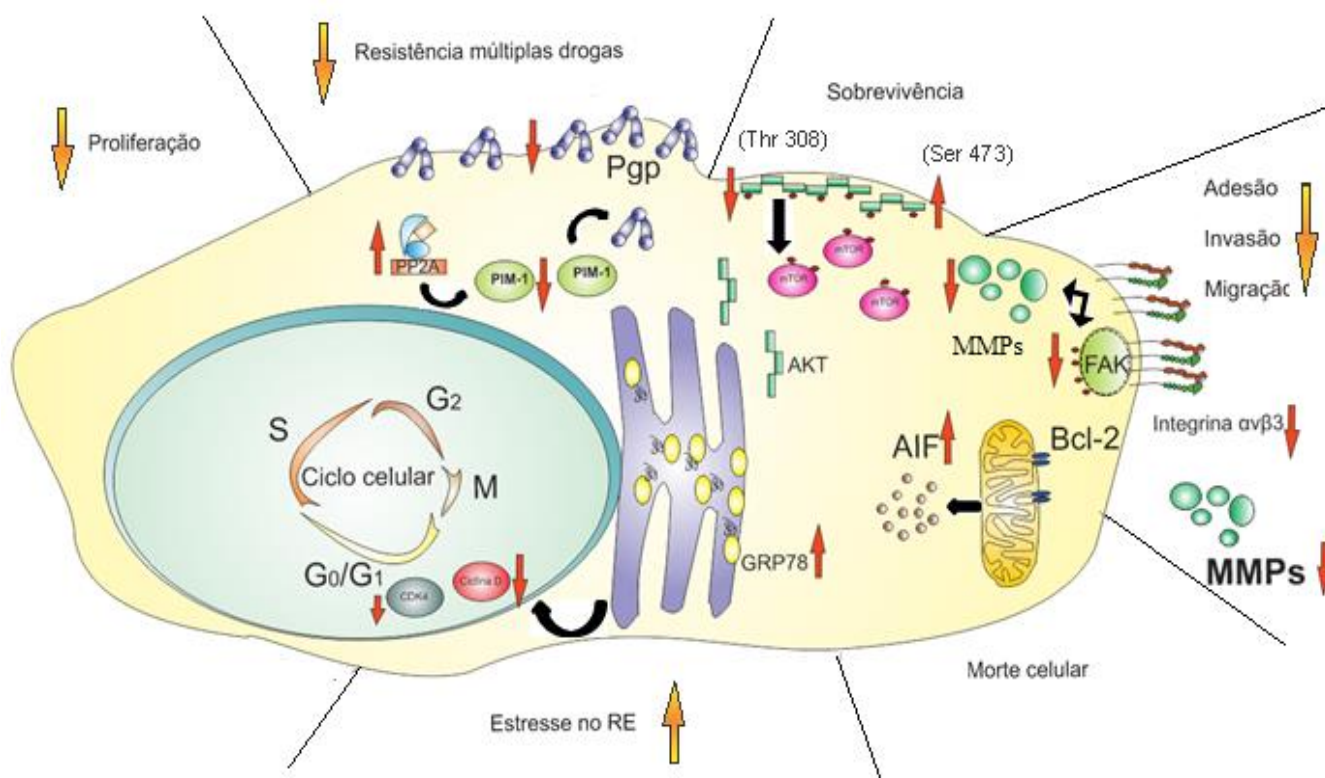


Figura 23. Mecanismo molecular de ação antitumoral da EZA. O esquema indica a relação que existe entre as proteínas chaves que participam em diversos processos das células PANC-1 e os efeitos da EZA. Observou-se uma redução da expressão da CDK4 e ciclina D1 relacionadas com proliferação, ERE e parada do ciclo celular. A redução da expressão da Pgp e a quinase Pim-1, esta última regulada pela ativação da PP2A, foram relacionadas com a atenuação do fenótipo MDR. Uma redução tanto das MMPs, integrina $\alpha v \beta 3$ quanto p-FAK (Tyr925) foi associada com a diminuição da adesão, invasão e migração celular. Além disso, foi observado um aumento da expressão do AIF, envolvida com a via de apoptose independente de caspase. Finalmente, uma alta expressão da chaperona GRP78 e alteração dos resíduos fosforilados da quinase p-AKT (Ser473/Thr308) foram relacionadas com ERE. As setas amarelas indicam os processos celulares modulados pela ação da EZA. Setas vermelhas indicam proteínas cuja expressão/atividade foram moduladas com EZA.

As células PANC-1 foram tratadas com concentrações de 150 e 250 μM de etoxzolamida durante 48 h. Posteriormente as células foram replaqueadas e incubadas durante 12, 18, 24 e 48 h, sem tratamento. Finalmente, foi medida a viabilidade celular pela técnica de redução de MTT, sendo os resultados correlacionados com o nível de recuperação das células tratadas.

Como os resultados não apresentaram diferença significativa, comparadas com os dados obtidos da viabilidade celular após tratamento de 48 h, a figura 24 mostra uma

destacada e similar tendência na diminuição da viabilidade das células PANC-1 que foram replaqueadas nos quatro tempos estabelecidos. Estes resultados sugerem que as células PANC-1, não atingiram altos níveis de recuperação celular, níveis que poderiam estar relacionados com a alteração dos mecanismos de sobrevivência, proliferação, adesão e resistência das células tumorais incluindo o câncer de pâncreas (O'Driscoll et al., 2007; Amaravadi e Craig et al., 2005; Xu et al., 2011; Hosotani et al., 2002).

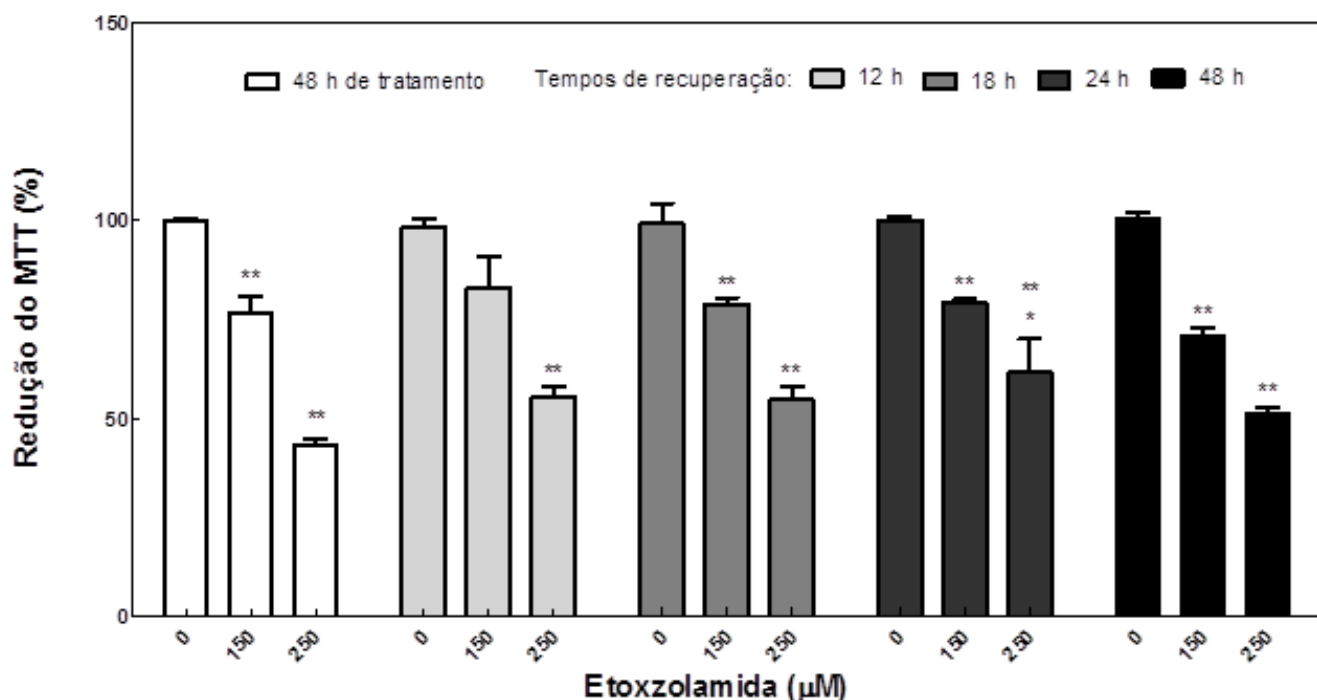


Figura 24. Capacidade de recuperação das células PANC-1 expostas a diferentes concentrações de etoxzolamida. As células ($6,25 \times 10^4$ células/mL) foram plaqueadas independentemente em placas de 24 poços e tratadas com concentrações de 150 e 250 µM de etoxzolamida durante 48 h. Posteriormente foram replaqueadas e incubadas por 12, 18, 24 e 48 h a 37°C e 5% de CO₂, sem tratamento. A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT. Os resultados representam média $\pm$ erro padrão da média de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata. ANOVA seguido de post test Tukey. ** diferença significativa ($P < 0,05$) de cada condição em relação ao controle. * diferença significativa ($P < 0,05$) de cada condição em relação ao tratamento de 48 h.

Com base no exposto, sugerimos que a baixa capacidade de recuperação das células PANC-1 poderia estar relacionada à ação citostática da etoxzolamida (como discutido anteriormente - Figura 6). Resultados que também foram reforçados com a diminuição da

expressão dos biomarcadores do ciclo celular como ciclina D1 e CDK4 (Figura 7), proteínas chaves na regulação do ciclo celular em câncer de pâncreas (Ekholm et al., 2000; Collins et al., 2005; Malumbres et al., 2009; Retzer-Lidl et al., 2007).

Por outro lado, a redução da viabilidade das células replaqueadas, poderia estar relacionada com a atenuação dos diferentes mecanismos de resistência pela etoxzolamida. Diante disto, a quinase Pim-1, biomarcador chave de resistência, sobrevivência e ciclo celular em células tumorais (Shirogane et al., 1999; Brault et al., 2010), apresentou uma expressão destacadamente diminuída depois do tratamento por 48 h com etoxzolamida, assim como a bomba de efluxo de fármacos, P-glicoproteína (Figura 10). Portanto, por apresentar as células PANC-1 uma alta expressão de ambas as proteínas (O'Driscoll et al., 2007; Xu et al., 2011), sugerimos que a falta de recuperação celular frente ao tratamento com a etoxzolamida, poderia estar relacionada com a redução da expressão destas proteínas (Xie et al., 2010). Esta redução poderia provocar uma difícil readaptação das células tumorais e, portanto, poderiam estar relacionadas com a diminuição da sobrevivência e crescimento celular (Zhang ET al., 2009).

A baixa capacidade de recuperação das células PANC-1 também poderia estar associada com a perda da adesão destas células, como foi discutido anteriormente (Figura 18), devido à redução da expressão/atividade das MMP-2, MMP-9, integrinas $\alpha\beta3$ e da FAK. A diminuição destas proteínas está relacionada com a redução do potencial metastático e sobrevivência (Desgrosellier et al., 2009).

Portanto, estes resultados sugerem que a etoxzolamida poderia estar reduzindo a sobrevivência celular, o fenótipo agressivo e altamente metastático das células PANC-1 no tratamento de 48 h e uma vez replaqueadas o efeito poderia estar resultando numa difícil recuperação celular.

4.7. Efeito do tratamento combinado de etoxzolamida com gencitabina na viabilidade das células PANC-1

O câncer de pâncreas apresenta alta agressividade, malignidade e geralmente é diagnosticado em estágios avançados com piores prognósticos. Aproximadamente entre 15-20% dos casos o tumor identificado é tratado, e somente 20% destes pacientes têm uma sobrevida de 5 anos (Li et al., 2004). A quimioterapia e radioterapia são os métodos terapêuticos mais utilizados como tratamentos para a erradicação do tumor. Os agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de câncer de pâncreas em pacientes que apresentam tumores avançados ou potencialmente metastático são principalmente o 5- fluorouracil (5-FU) e a gencitabina (Gemzar®) (Burris et al., 1997). Ambos quimioterápicos foram utilizados sozinhos ou em combinação, como proposta de novas estratégias de terapia (Cascinu et al., 1999). Além disso, foram utilizados em combinação com outras drogas, tais como, cisplatina ou erlotinib (Novario et al., 2004). Entretanto, a eficácia do 5-FU está limitada em produzir benefícios clínicos em apenas 10% de pacientes (Saif et al., 2008).

A ineficácia das quimioterapias convencionais no câncer de pâncreas esta relacionada com a falta de especificidade dos quimioterápicos com relação às células normais e tumorais, consequentemente o tratamento apresenta muitos efeitos colaterais e uma alta resistência a múltiplas drogas intrínseca ou adquirida, entre outros fatores associados com a agressividade deste câncer (Jiang et al., 2011; Rocha et al., 2004). Neste contexto, a identificação de novas drogas ou combinações será necessária para melhorar os tratamentos convencionais do câncer de pâncreas. Portanto, avaliou-se a viabilidade celular e proliferação das células PANC-1 frente à etoxzolamida combinada com a gencitabina.

A figura 25 mostra a curva de viabilidade das células PANC-1 uma vez tratadas, durante 48 h, com gencitabina nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100 e 250 μ M. Nesta

condição foi determinado um valor de IC_{50} de 160 μ M. Entretanto, as células PANC-1 tratadas com gencitabina durante 24 h, apresentaram uma alta resistência ao tratamento nas concentrações de 50, 80 e 160 μ M (dado não mostrado). Vários estudos na literatura têm indicado valores menores de IC_{50} em diferentes tempos de tratamento de 24, 48 e 72 h (Jiang et al., 2006; Matthews et al., 2007). Trabalhos recentes sugerem que as células PANC-1 apresentam resistência intrínseca à gencitabina por alteração de diferentes proteínas associadas à resistência como MRP5 e ABCC5 (Wu et al., 2009; Hagmann et al., 2010). Diante deste resultado, e levando em conta os mecanismos moleculares de ação antitumoral da etoxzolamida, avaliamos se ambos os fármacos combinados poderiam induzir efeitos citotóxicos nas células PANC-1.

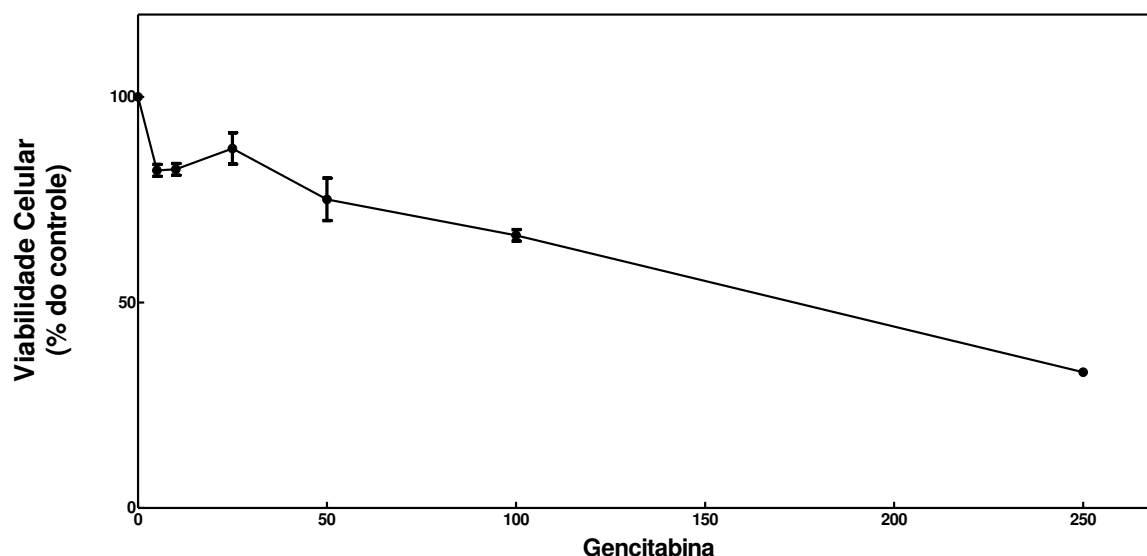


Figura 25. Viabilidade das células PANC-1 expostas a várias concentrações de gencitabina. As células (8×10^4 células/mL) foram plaqueadas independentemente em microplacas de 96 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO_2 . As células foram tratadas com diferentes concentrações do composto e incubadas nas mesmas condições por 48 h. A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT. Resultados representam média $\pm$ erro padrão da média de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata (ANOVA).

Com base no exposto, na figura 26 apresentam-se as curvas de viabilidade da etoxzolamida em três tempos de tratamento 24, 48 e 72 h nas concentrações de 0-300 μ M e as

curvas correspondentes à combinação da etoxzolamida (0-300 μM) com a gencitabina na concentração igual ao IC_{50} (160 μM).

Os dados mostram que a combinação de etoxzolamida-gencitabina apresentou maior efeito citotóxico nas concentrações inferiores a 250 μM comparada com a etoxzolamida sozinha (Figura 26 A) e com gencitabina sozinha no tratamento de 24 h.

Embora não apresentaram diferença nos IC_{50} do tratamento a partir de 48 e 72 h (IC_{50} , 222 μM e 164 μM , respectivamente), os resultados no tratamento de 48 h indicam que o efeito de ambas as drogas, nas concentrações menores, apresentou um efeito aditivo, diminuindo a viabilidade das células PANC-1 comparadas com o tratamento da etoxzolamida sozinha (Figura 26 B e C). Porém, o IC_{50} da gencitabina sozinha, no tratamento de 48 h, apresentou um valor menor que a combinação da etoxzolamida-gencitabina (Figura 25). No tratamento de 72 h a combinação da etoxzolamida-gencitabina não apresentou diferença com o tratamento da etoxzolamida sozinha (Figura 25 C). Estes resultados poderiam estar relacionados com a resistência intrínseca das células PANC-1 à gencitabina Chang et al., 2011).

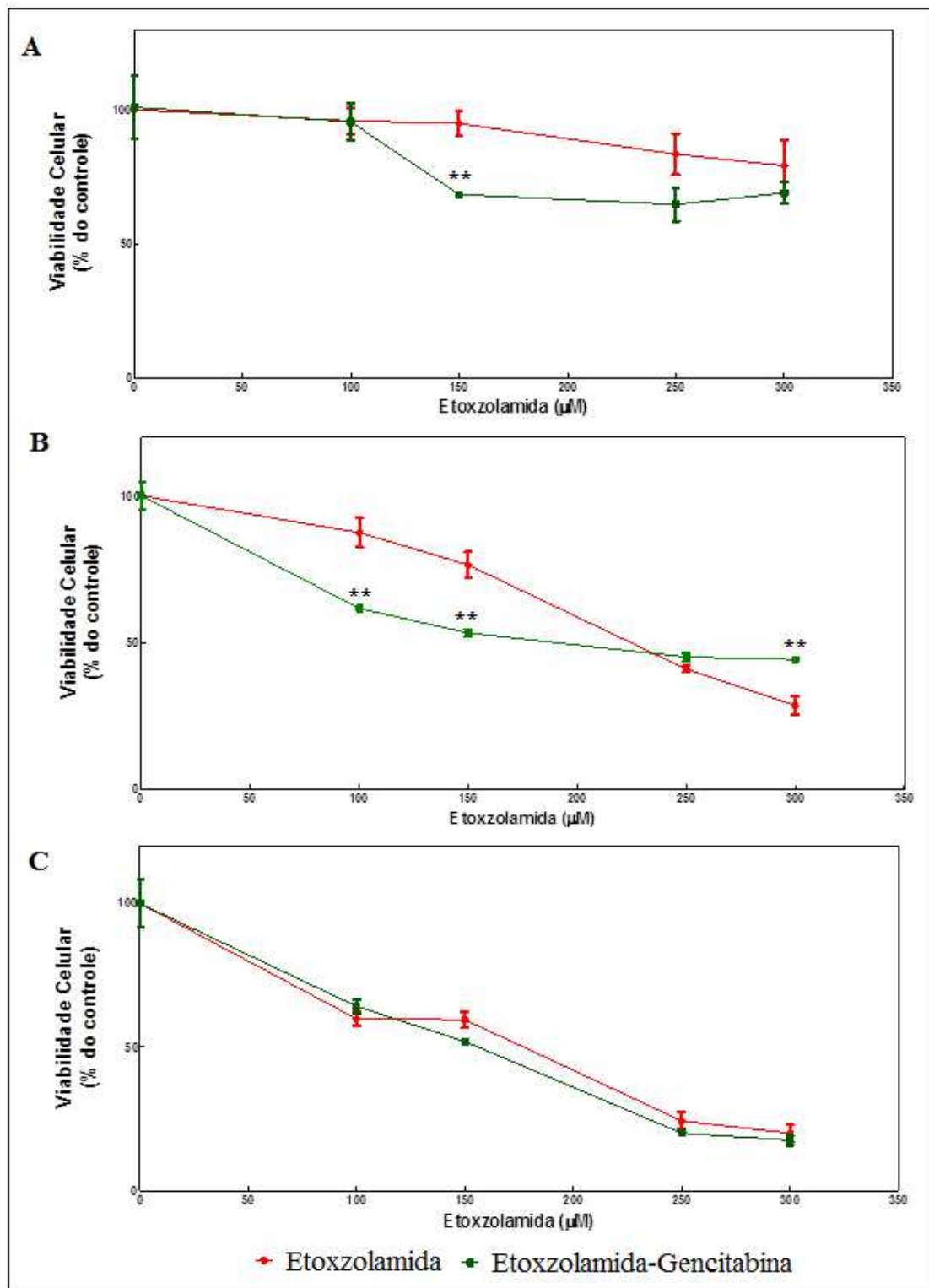


Figura 26. Viabilidade das células PANC-1 expostas a diferentes concentrações de etozzolamida combinada com 160 µM de gencitabina. As células (8×10^4 células/mL) foram plaqueadas independentemente em microplacas de 96 poços e incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. As células foram tratadas com diferentes concentrações do composto e incubadas nas mesmas condições por 24 (A), 48 (B) e 72 h (C). A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT. Resultados representam média ± erro padrão da média de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata. ANOVA seguido de post test Tukey. ** diferença significativa ($P < 0,05$) de cada condição em relação ao controle.

Dados na literatura indicam à gencitabina (2',2'- difluorodesoxicitidina) como um quimioterápico citostático capaz de inibir a progressão do ciclo celular das fases G₀/G₁ e S (Hertel et al., 1990), inibir as enzimas DNA polimerase, ribonucleotídeo redutase e as enzimas que participam no reparo do DNA, além de ser incorporado ao DNA por ser um análogo de nucleosídeos, inibindo a replicação do mesmo (Heinemann et al., 1988). A inibição dos mecanismos de reparo do DNA pode propiciar um incremento da citotoxicidade quando combinada com outros agentes quimioterápicos tais como os compostos de platina (Van Moorsel et al., 2000).

Uma vez mostrado que o tratamento da etoxzolamida-gencitabina reduz a viabilidade celular em PANC-1, de um modo concentração-tempo dependente, estudamos se a redução da viabilidade está relacionada com a parada do ciclo celular, ou com o incremento da morte celular, ou ambos os processos como foi analisado no tratamento da etoxzolamida sozinha.

As células foram incubadas por 24, 48 e 72 h em um intervalo de concentrações de 0-300 µM como descrito anteriormente e foi medida a viabilidade celular através da técnica do MTT a partir do tempo zero (Figura 27). Os resultados observados no tratamento de 24 h mostraram uma diminuição da viabilidade a partir da concentração de 150 µM que atingiram 100% (tempo zero). Uma redução similar foi observada no tratamento de 48 h, na concentração de 250 µM. Entretanto, nenhum dos dois tempos de tratamento indicou morte celular. Um interessante resultado foi observado no tratamento de 72 h, devido aos dados indicarem que poderia estar sendo induzido algum tipo de morte celular em concentrações superiores que 150 µM.

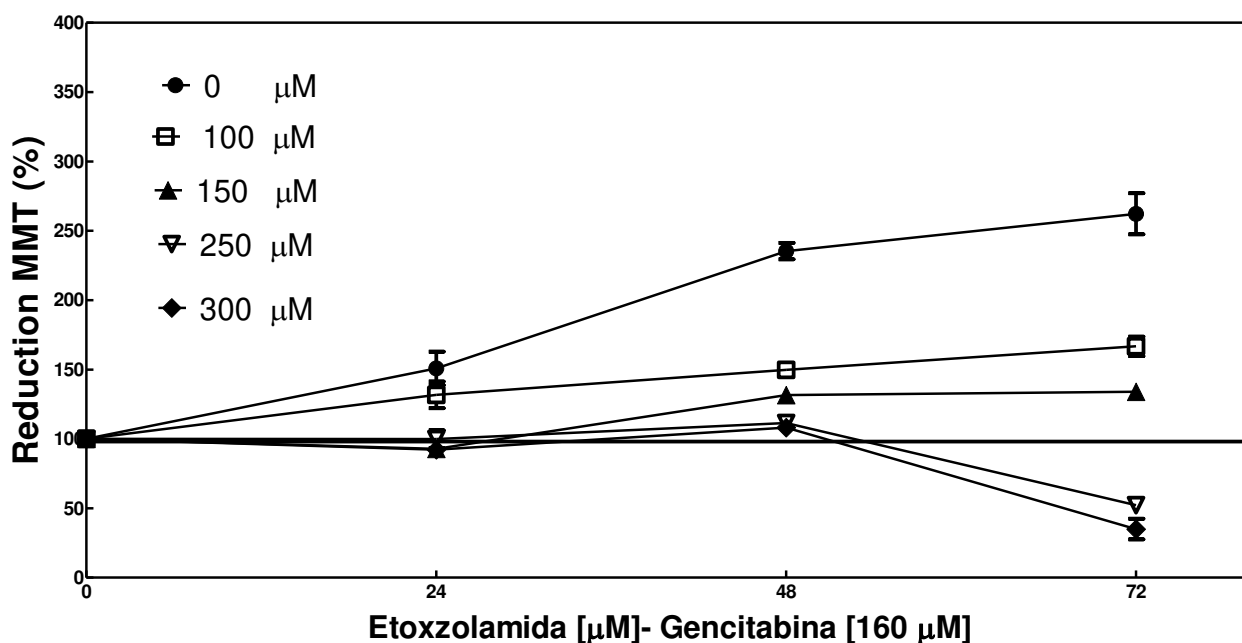


Figura 27. Curva de proliferação e viabilidade das células PANC-1 expostas a diferentes concentrações de gencitabina. As células (8×10^4 células/mL) foram plaqueadas independentemente em microplacas de 96 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. As células foram tratadas com diferentes concentrações do composto e incubadas nas mesmas condições por 24, 48 e 72 h. A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT. Resultados representam média $\pm$ erro padrão da média de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata (ANOVA).

Estes resultados sugerem que a combinação etoxzolamida-gencitabina induz parada do ciclo celular a partir do tratamento de 24 h, dado de interesse comparado com os resultados obtidos na curva de proliferação da etoxzolamida sozinha (Figura 6). A diferença do IC₅₀ entre os tempos de tratamento de 24 h para a etoxzolamida sozinha e a combinação etoxzolamida-gencitabina poderia estar relacionado com os alvos moleculares associados principalmente com o ciclo celular atingidos em um menor tempo. Por ter sido as células PANC-1 sensibilizadas pelos mecanismos de ação e efeitos da gencitabina, a combinação melhorou efeito da etoxzolamida sozinha (Van Moorsel et al., 2000).

Os mecanismos de morte celular têm sido ativados no tratamento de 72 h em concentrações menores. Jiang e colaboradores (2006) sugeriram que a gencitabina poderia

suprimir a proliferação das células PANC-1 e induzir apoptose por inibição da PAP (*Pancreatitis-associated protein*) e indução da expressão de GSK-3 β .

Vários mecanismos de resistência a quimioterápicos foram indicados na literatura em diferentes estudos “*in vitro*” com o uso de gencitabina, fluorouracil e cisplatina numa ampla gama de linhagens de câncer de pâncreas, e propuseram a participação de diferentes proteínas tais como as Pgp, FAK, TAK1 entre outras (Wu et al., 2009; Hagmann et al., 2010; Melisi et al., 2011). Coincidentemente, a etoxzolamida diminuiu a expressão de várias dessas proteínas e enzimas como foi descrito neste trabalho, indicadas na literatura, como interessantes alvos. Contudo, não foi observado variação do IC₅₀ nos tempos de tratamento de 48 e 72 h. Portanto, sugerimos que a combinação poderia atingir alvos relacionados principalmente ao ciclo celular. Estes resultados poderiam indicar que as células PANC-1 possuem mecanismos de resistência à combinação de gencitabina e etoxzolamida (Wu et al., 2009; Clarke et al., 2002; Goan et al., 1999; Chang et al., 2011).

4.8. Viabilidade das células PANC-1 utilizando o complexo de etoxzolamida e 2-hidroxipropil-3-ciclodextrina (HP- β -CD)

Numerosos estudos têm indicado os derivados das sulfonamidas como agentes anticancerígenos mostrando que estes derivados podem atuar de diferentes formas em cada linhagem tumoral (Pastorekova et al., 2004; Liu et al., 2012; Wang et al., 2012). Além disso, nossos resultados mostraram, pela primeira vez, o potencial da etoxzolamida como agente antitumoral no tratamento do câncer de pâncreas. Em células PANC-1 foi observada uma diminuição da viabilidade celular (IC₅₀, 222 μ M) e um efeito dose dependente nos tempos de 24, 48 e 72 h de tratamento com etoxzolamida.

Tendo em conta que uns dos principais problemas da etoxzolamida é a baixa solubilidade (22,8 g/L) que apresenta em meio aquoso e baseados nos estudos já realizados pelo grupo de pesquisa de Loftsson e colaboradores (1994), decidimos encapsular a etoxzolamida com o composto 2-hidroxipropil-3-ciclodextrina (HP- β -CD) (1:1). Diante disto, decidimos avaliar a viabilidade das células PANC-1 frente a esta formulação.

Além de melhorar a solubilidade da etoxzolamida, quando encapsulada na HP- β -CD, nossos resultados mostraram que a viabilidade celular foi diminuída notavelmente em 24 horas de tratamento com o complexo (Figura 28 A). O IC₅₀ decresceu em torno de 2 vezes comparado com o tratamento sem complexo. Em relação ao tratamento de 48 h com o complexo etoxzolamida-ciclodextrina, o valor do IC₅₀ não apresentou diferença significativa com o tratamento sem complexo. Entretanto, foi observada uma diminuição significativa nas concentrações mais baixas do tratamento entre 50-150 μ M (Figura 28 B). Além disso, foi observado que o tratamento com etoxzolamida-ciclodextrina apresentou variação concentração-tempo dependente só nos tempos de 24 e 48 h, devido a que o valor do IC₅₀ obtido em 72 h de tratamento com o complexo foi similar comparado com o tratamento de 48 h (Figura 28). Estes dados indicam que a formulação etoxzolamida- HP- β -CD aumentou a biodisponibilidade da etoxzolamida, principalmente através do aumento da solubilidade da mesma em meio aquoso. Deste modo, a diminuição da viabilidade celular poderia estar relacionada com um aumento da concentração da etoxzolamida no interior destas células, por apresentar a etoxzolamida um destacado caracter hidrofóbico e ser capaz de atravessar as membranas celulares por difusão simples (Maren et al., 1990; Loftsson et al., 1994).

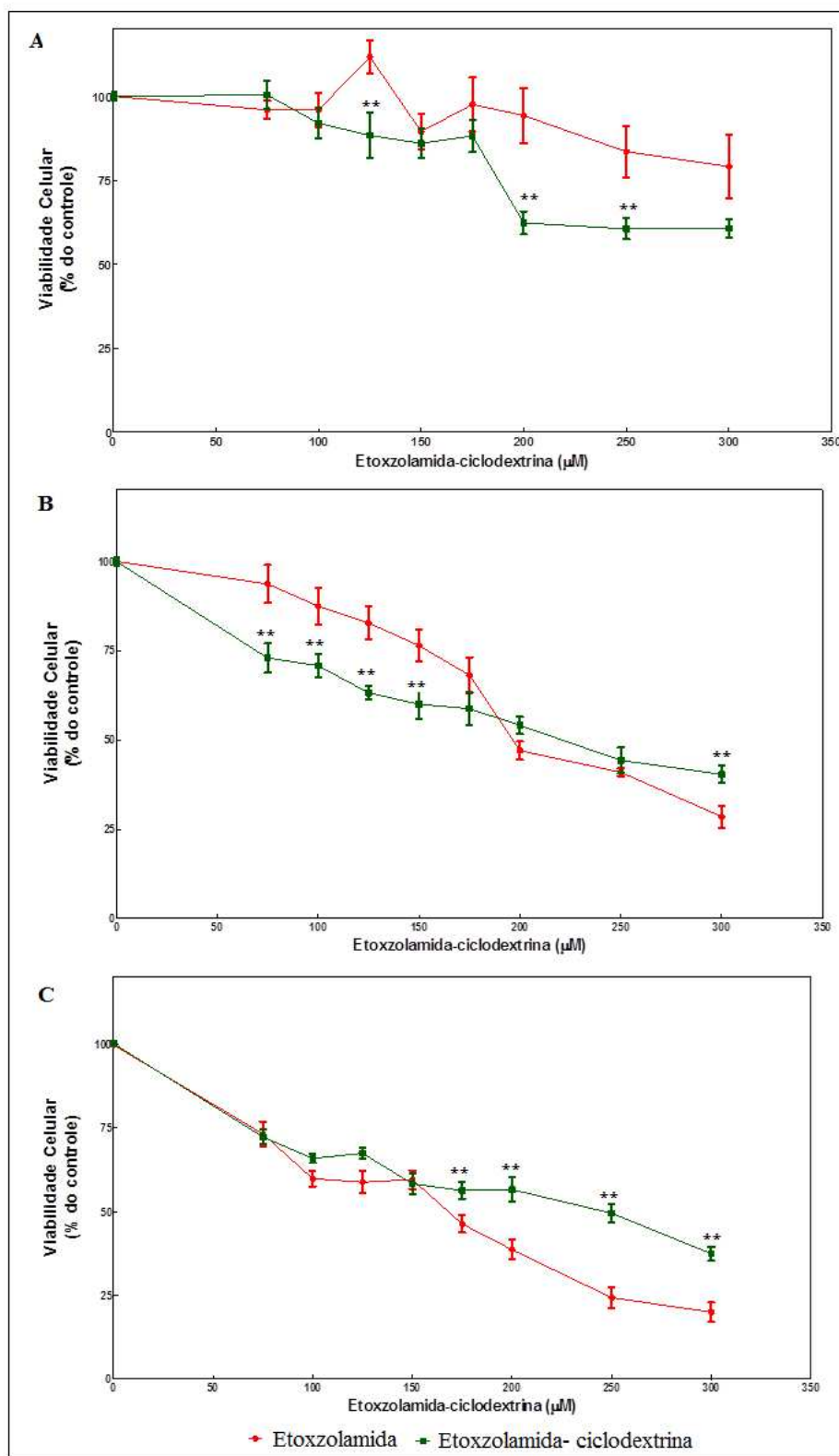


Figura 28. Viabilidade das células PANC-1, expostas a várias concentrações do complexo etoxzolamida-ciclodextrina e etoxzolamida sem complexo. As células (8×10^4 células/mL) foram plaqueadas independentemente em microplacas de 96 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. As células foram tratadas com diferentes concentrações do complexo e incubadas nas mesmas condições por 24 (A), 48 (B) e 72 h (C). A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT. Resultados representam média $\pm$ erro padrão da média de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata. ANOVA seguido de post test Tukey. ** diferença significativa ($P < 0,05$) de cada condição em relação ao controle.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou pela primeira vez o potencial da etoxzolamida como droga antitumoral em tumores sólidos, devido à modulação negativa de biomarcadores de resistência, agressividade e invasividade tais como a oncoproteína Pim-1, a ciclina D1 e a proteína Pgp associada a MDR. Um dos objetivos principais das quimioterapias do câncer é inibir a proliferação celular, desta maneira nossos resultados experimentais mostraram que a etoxzolamida possui propriedades citostáticas, devido à desregulação das principais proteínas que participam no ponto de transição da fase G₁-S do ciclo celular, seguido da parada do ciclo celular na fase G₁. Além disso, o incremento da citotoxicidade foi relacionado com a diminuição das principais proteínas associadas com resistência, Pim-1 e Pgp, o que levou a uma falta de recuperação das células PANC-1 depois do tratamento. Por outro lado, estudamos os possíveis mecanismos de ação da etoxzolamida e mostramos como esta droga poderia estar relacionada com a regulação e indução do estresse no retículo endoplasmático pelo aumento da expressão da chaperona GRP78 e a modulação da fosforilação da quinase AKT e seus substratos. De forma interessante, etoxzolamida poderia atuar como um potente agente anti-metastático. Deste modo, observamos que o fármaco apresentou efeitos na diminuição da expressão de múltiplos alvos moleculares como as MMPs, FAK e integrina $\alpha\beta 3$ e nos mecanismos de ação que resultaram na redução da capacidade de adesão e do fenótipo invasivo observados nas células PANC-1. Estas características mostram que a etoxzolamida poderia apresentar melhores vantagens frente aos quimioterápicos utilizados convencionalmente no câncer de pâncreas. Portanto, os resultados sugerem uma nova proposta para melhorar as quimioterapias atuais do câncer de pâncreas que permitirão explorar novas estratégias que levem em consideração o conjunto de alvos chaves de agressividade, invasão e resistência celular identificados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adrian, C., Brumatti, G., and Martin, S.J. (2006). Apoptosomes: protease activation platforms to die from. *Trends Biochem. Sci.* 31: 243-247.
- Aho T.L., Sandholm J., Peltola K.J., Mankonen H.P., Lilly M., Koskinen P.J. (2004) Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. *FEBS Lett.*, 571, 43–49.
- Al-Aynati M.M., Radulovich N., Ho J., Tsao M.S. (2004). Overexpression of G1-S cyclins and cyclin- dependent kinases during multistage human pancreatic duct cell carcinogenesis. *Clin. Cancer Res* 10: 6598-6605.
- Al-Shawi M.K. and Omote H. (2005). The remarkable transport mechanism of P- glycoprotein: a multidrug transporter. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37: 489-496.
- Amaravadi R. and Craig B. T. (2005). The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J. Clin. Invest.* 115(10):2618–2624.
- Amati B., Alevizopoulos K., Vlach J. (1998). Myc and the cell cycle. *Front Biosci.* 3:d250-68.
- Anderson K. M., Waddah A., Bonomi P., Seed T. M., Dudeja P., Hu Y., and Harris J. E.. (2003). Caspase- Dependent and –Independent Panc-1 Cell Death Due to Actinomycin D and MK 886 Are Additive but Increase Clonogenic Survival. *Exp Biol Med* (Maywood). 228: 915-925.
- Andjelković M, Jakubowicz T, Cron P, Ming XF, Han JW, Hemmings BA. (1996). Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(12):5699-704.
- Bachmann M, Kosan C, Xing PX, Montenarh M, Hoffmann I, Mörry T. (2006). The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 directly phosphorylates and activates the G2/M specific phosphatase Cdc25C. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(3):430-43.
- Baeriswyl, V. and Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 19: 329-337.
- Barboza L.P., Souza J.M., Simões F.V., Bragança I.C., Abdelhay E. (2000). Análise dos transcritos da translocação t(9;22) em Leucemia Mielóide Crônica. *Rev. Bras hematol. hemoter.* 22 (2): 89-98.
- Bartkova, J., Lukas, H. Muller, M. Strauss, B. Gusterson, and J. Bartek. (1995). Abnormal patterns of D-type cyclin expression and G1 regulation in human head and neck cancer. *Cancer Res.* 55: 949-956.
- Bedard K., Szabo E., Michalak M., Opas M. (2005). Cellular Functions of Endoplasmic Reticulum Chaperones Calreticulin, Calnexin, and ERp57. *Int Rev Cytol.*, 245: 91-121.
- Bendas G. and Borsig L. (2012). Cancer Cell Adhesion and Metastasis: Selectins, Integrins, and the Inhibitory Potential of Heparins. *Int J Cell Biol.* Article ID 676731, 10 pages doi:10.1155/2012/676731.
- Bertucci A., Innocenti A., Zoccola D., Scozzafava A., Tambutté S., Supuran C. T. (2009). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition studies of a coral secretory isoform by sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 5054–5058.
- Bi M, Naczki C, Koritzinsky M, Fels D, Blais J, Hu N, Harding H, Novoa I, Varia M, Raleigh J, Scheuner D, Kaufman RJ, Bell J, Ron D, Wouters BG, Koumenis C. (2005). ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J.* 24(19):3470-81.
- Bullock AN, Debreczeni J, Amos AL, Knapp S, Turk BE. (2005). Structure and substrate specificity of the Pim-1 kinase. *J Biol Chem.* 280(50): 41675-82.

- Brault L., Gasser C., Bracher F., Huber K., Knapp S., and Schwaller J.. (2010). PIM serine/threonine kinases in the pathogenesis and therapy of hematologic malignancies and solid cancers. *Haematologica*, 95(6) 1004-1015.
- Brewer J.W., Diehl J.A. (2000). PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *PNAS* 7; 97(23): 12625-30.
- Brewer, J. W., L. M. Hendershot, C. J. Sherr, and J. A. Diehl. 1999. Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 8505-8510.
- Brindeiro PA. (1999). Caracterização de aspectos bioquímicos e moleculares de linhagem eritroleucêmica Lucena 1-K562 envolvidos com o fenótipo MDR. MSc. Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.
- Britto M. A. F. O., Nascimento J.R. C. S., Dos Santos E.H.F. (2004). Análise estrutural de ciclodextrinas: Um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. *Quím. Nova* 27(6) 882-888.
- Brostrom C.O., Brostrom M.A. (1998). Regulation of translational initiation during cellular responses to stress. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 58: 79-125.
- Burris H.A, Moore M.J., Andersen J. Green M.R., Rothenberg M.L. (1997). Improvements in survival and clinical benefit with Gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: A randomized trial. *J Clin. Oncol*. 15: 2403-2413.
- Cascinu S, RR Silva, S Barni, R Labianca, L Frontini, E Piazza, G Pancera, P Giordani, L Giuliodori, MA Pessi, V Fusco, G Luporini, R Cellerino and G Catalano. (1999). A combination of gemcitabine and 5-fluorouracil in advanced pancreatic cancer, a report from the Italian Group for the Study of Digestive Tract Cancer (GISCAD). *Cell Cycle* 6:1,104-110.
- Chaffer, C.L. and Weinberg, R.A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331: 1559-1564.
- Chang Alex. (2011). Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer* 71 3–10.
- Chegwidden W. R., Spencer I. M. (1995). Sulphonamide inhibitors of carbonic anhydrase inhibit the growth of human lymphoma cells in culture. *Inflammopharmacology* 3 (3): 231-239.
- Chen J, Kremer CS, Bender TP. (2006). The carbonic anhydrase locus contains a c-Myb target promoter and modulates differentiation of murine erythroleukemia cells. *Oncogene* 25: 2758-2772.
- Chen M., Xiaofeng X., Feitong W., Yong A., Dong T., Yue X., Hui W., Zhongxu Y., Wentao G., Jishu W., Jingjing Z., Yi M. (2012). Expression and promoter methylation analysis of ATP-binding cassette genes in pancreatic cancer. *Oncol Rep.*;27(1): 265-9.
- Cheng F, Liu C, Jiang J, Lu W, Li W, Liu G, Zhou W, Huang J, Tang Y. (2012). Prediction of drug-target interactions and drug repositioning via network-based inference. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(5):e1002503.
- Chiang PC, Hsu JL, Yeh TC, Pan SL, Guh JH. (2008). Elucidation of susceptible factors to endoplasmic reticulum stress-mediated anticancer activity in human hepatocellular carcinoma. *Naunyn Schmiedeberts Arch Pharmacol*. 377(2): 167-77.
- Choi Joung Hey, Fukui Masayuki, Bao Ting Zhu. (2011). Role of Cyclin B1/Cdc2 Up-Regulation in the development of Mitotic Prometaphase Arrest in Human Breast Cancer Cells Treated with Nocodazole. *Plos One* 6(8): e24312.

- Clarke M.L., J.R. Mackey, S.A. Baldwin, J.D. Young, C.E. Cass. (2002). The role of membrane transporters in cellular resistance to anticancer nucleoside drugs. *Cancer Treat. Res.* 112 : 27–47.
- Collins, I. and Garrett, M.D. (2005). Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. *Curr.Opin.Pharmacol.* 5: 366-373.
- Cook, L. M., Hurst, D.R., and Welch, D.R. (2001). Metastasis suppressors and the tumor microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* 21: 113-122.
- Daniel P.T., Wide T., Sturm I., Schulze- Osthoff K. (2001). The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* 15: 1022-32.
- Dauphinot L., De Oliveira C., Melot T., Sevenet N., Thomas V., Weissman B.E., Delattre O. (2001). Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene* 20(25):3258-65.
- Deer EL., Gonzales- Hernandez J., Coursen J.D., Shea J.E., Ngatia J. (2010). Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* 39: 425- 435.
- Deirdre A. N., Eileen White. (2004). Exploiting different ways to die. *Genes Dev.* 18: 1223-1226.
- Deramaut TB, Dujardin D, Hamadi A, Noulet F, Kolli K, De Mey J, Takeda K, Rondé P. (2011). FAK phosphorylation at Tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion. *Mol Biol Cell.* 22(7):964-75
- Desgrosellier J.S., Barnes L.A., Shields D.J., Huang M., Lau S.K., Prévost N., Tarin D., Shattil S.J., Cheresh D.A. (2009). An integrin alpha(v)beta(3)-c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nat Med.* 15(10):1163-9.
- Desgrosellier, J. S. and Cheresh, D. A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 10: 9-22.
- Di Sano F., Bernardoni P., Piacentini M. (2012). The reticulons: guardians of the structure and function of the endoplasmic reticulum, *Exp. Cell. Res.* 318 (11): 1201-7.
- Dricu A., Carlberg M., Wang M., Larsson O. (1997). Inhibition of N-linked glycosylation using tunicamycin causes cell death in malignant cells: role of down-regulation of the insulin-like growth factor 1 receptor in induction of apoptosis. *Cancer Res.* 1; 57(3): 543-8.
- Eklholm, S. V., and S. I. Reed. (2000). Regulation of G 1 cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 676-684.
- Elsheikh S., Green A.R., Aleskandarany M.A., Grainge M., Paish C.E., Lambros M.B., Reis-Filho J.S., Ellis I.O. (2008). CCND1 amplification and cyclin D1 expression in breast cancer and their relation with proteomic subgroups and patient outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 109 (2): 325-35.
- Esteves M. A., Ortet O., Capelo A., Supuran C. T., Marques S. M., Santos M. A. (2010). Newhydroxypyrimidinone-containing sulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors also acting as MMP inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (12): 3623–3627.
- Estimativa INCA 2012: www.cancer.org.br acesso em 12 de dez de 2012.
- Ferreira C.G., Epping M., Krzyt F.A., Giaccone G. (2002). Apoptosis: target of cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 8 (7): 2024-34.
- Fini M.E., Cook J.R., Mohan R., Brinckerhoff C.E. (1988). Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. In: Parks WC, Mecham RP (eds). *Matrix metalloproteinases*. NewYork: Academic. pp 299–359.
- Forman M. S., Lee V. M-Y., Trojanowski. Q J. (2003). ‘Unfolding’ pathways in neurodegenerative disease. *TRENDS in Neurosciences.* 26 (8): 407–410.
- Frisch S.M., Francis H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol.* 124 (4): 619-626.

- Fulda S.; Debatin K.M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25: 4798-4811.
- Gansauge S, Gansauge F, Ramadani M, Stobbe H, Rau B, Harada N, Beger HG. (1997). Overexpression of Cyclin D1 in Human Pancreatic Carcinoma Is Associated with Poor Prognosis. *Cancer Res.* 1;57(9):1634-7.
- Garnero, C.; ZoppiI, A.; Genovese, D.; Longi, M. (2010). Studies on trimethoprim: hydroxypropyl- β -cyclodextrin: aggregate and complex formulation. *Carbohyd. Res.*, 345 : 2550-2556.
- Gao T, Furnari F, Newton AC.(2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell.*18(1):13-24.
- Goan Y.G., B. Zhou, E. Hu, S. Mi, Y. Yen. (1999). Overexpression of ribonucleotide reductase as a mechanism of resistance to 2,2-difluorodeoxycytidine in the human KB cancer cell line. *Cancer Res.* 59: 4204–4207.
- Gruber G., Hess J., Stiefel C., Aebersold D.M., Zimmer Y., Greiner R.H., Studer U., Altermatt H.J., Hlushchuk R., Djonov V. Correlation between the tumoral expression of β 3-integrin and outcome in cervical cancer patients who had undergone radiotherapy. *Br. J. Cancer.* 92: 41–46.
- Hager J.H., Hanahan D. (1999). Tumor cells utilize multiple pathways to down-modulate apoptosis. Lessons from a mouse model of islet cell carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 887:150–163.
- HagmannW., Jesnowskiand R., Löhr J. M.. (2010). Interdependence of Gemcitabine Treatment, Transporter Expression, and Resistance in Human Pancreatic Carcinoma Cells. *Neoplasia* 12: 740 – 747.
- Harper, J. W., Burton L., and Solomon M. J. (2002). The anaphase promoting complex: it's not just mitosis any more. *Genes Devel.* 16:2179-2206.
- Harr M. W., Distelhorst W. C. (2011). Apoptosis and autophagy: Decoding calcium Signals that Mediate life or Death. *Cold Spring Harb Prespect Biol* 2 (10): a005579.
- Hashimoto O., Shimizu K., Semba S., Chiba S., Ku Y., Yokozaki H., Hori Y. (2011). Hypoxia induces tumor aggressiveness and the expansion of CD133-positive cells in a hypoxia-inducible factor-1 α -dependent manner in pancreatic cancer cells. *Pathobiology.* 78(4):181-192.
- Heineman, V., Hertel, L. W., Grindey, G. B., and Plunkett, W. (1988). Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'- difluoro- 2'deoxyctidine and 1- β -D-arabinofuranosylectosine. *Cancer Res.*, 48: 4024- 4031.
- Henry R. P. (2006). Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annu Rev Physiol.* 1996;58:523-38.
- Hertel, L. W., Boder, G.; B., Korin, J. S. (1990). Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'- difluoro- 2'deoxyctidine). *Cancer Res.* 50: 4417- 4422.
- Hirose M., Hosoi E., Hamano S. and Jalili A. (2003). Multidrug resistance in hematological malignancy. *J. Med. Invest.* 50: 126-135.
- Hosotani R., Kawaguchi M., Masui T., Koshiba T., Ida J., Fujimoto K., Wada M., Doi R., Imamura M. (2002). Expression of integrin α V β 3 in pancreatic carcinoma: relation to MMP-2 activation and lymph node metastasis. *Pancreas.* 25:e30–35.
- Hood JD, Cheresch DA. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer.* (2): 91-100.
- Hu X.F., Jie L., Scott V., Zeping W., Magnuson N. S. and Xing P.X..(2009). PIM-1-specific mAb suppresses human and mouse tumor growth by decreasing PIM-1 levels, reducing Akt phosphorylation, and activating apoptosis. *J. Clin. Invest.* 119(2):362-75.

- Hu Y., Benedict M.A., Wu D., Inohara N., Nunez G. (1998). Bcl- xL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1- dependent caspase-9 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 95: 4386-4391.
- Huan Dou, Wei Zhong, Liu Yang, Tingting Wang, Hong Yan, Yayi Hou. (2012). Synthesis, cytotoxic activities and cell cycle arrest profiles of half-sandwich N-sulfonamide based dithio-o- carborane metal complexes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20 (15): 4693- 4700.
- Husain A., Madhesia D. (2012). Heterocyclic compounds as carbonic anhydrase inhibitor. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 27(6):773-83.
- Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 1807(6):735-45.
- Imamura M. (2010). Recent standardization of treatment strategy for pancreatic neuroendocrine tumors. *World J. Gastroenterol*. 16(36): 4519-25.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Farley, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global Cancer Statistics, 2011. *CA. Cancer J. Clin*. 61: 69-90.
- Jiang Long, Yuqing Zhang, Xianjun Yu, Jingxuan Yang, Drake LeBrun, Changyi Chen, Qizhi Yao, and Min Li. (2011). Overcoming Drug Resistance in Pancreatic Cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 15(7): 817–828.
- Jiang P.H., Motoo Y., Sawabu N., Minamoto T. (2006). Effect of gemcitabine on the expression of apoptosis-related genes in human pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol*. 14;12 (10): 1597-1602.
- Juhász M., J. Chen, U. Lendeckel, U. Kellner, H. -U. Kasper, Z. Tulassay, S. Pastorekova, P. Malfertheiner & M. P. A. Ebert.(2003). Expression of carbonic anhydrase IX in human pancreatic cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther*.18(8):837-46.
- Juhász M., J. Chen, U. Lendeckel, U. Kellner, H. -U. Kasper, Z. Tulassay, S. Pastorekova, P. Malfertheiner & M. P. A. Ebert. (2003). Expression of carbonic anhydrase IX in human pancreatic cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther*.18(8): 837-46.
- Kappelmayer J., Simon A., Kiss F. and Hevessy Z. (2004). Progress in defining multidrug resistance in leukemia. *Expert. Rev. Mol. Diagn*. (4): 209-217.
- Kesteren C.H. V., Mathôt R. A. A., Raymond E., Armand J. P., Ditttrich C.H., Dumez H., Roché H., Droz J. P., Punt C., Ravic M., Wanders J., Beijnen J. H., Fumoleau P. and Schellens J. H. (2002). Population pharmacokinetics and pharmacokinetic- pharmacodynamics relationships of the novel anticancer agent E7070 in four phase I studies. *Br. J. Clin Pharmacol*. 53(5): 553.
- Kim J, Roh M, Abdulkadir SA. (2010). Pim1 promotes human prostate cancer cell tumorigenicity and c-MYC transcriptional activity. *BMC Cancer*. 10: 248.
- Kim B, van Golen CM, Feldman EL. (2003). Degradation and dephosphorylation of focal adhesion kinase during okadaic acid-induced apoptosis in human neuroblastoma cells. *Neoplasia*. (5):405-16.
- Kleeff J., Beckhove P., Esposito I., Herzig S., Huber P.E., Löhr J.M., Friess H. (2007). Pancreatic cancer microenvironment. *Int J Cancer*. 121(4): 699-705.
- Koong AC, Mehta VK, Le QT, Fisher GA, Terris DJ, Brown JM, Bastidas AJ, Vierra M. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 48(4):919-22.
- Kornmann M., Danenberg K.D., Arber N., Beger H.G., Danenberg P.V., Korc M. (1999). Inhibition of cyclin D1 expression in human pancreatic cancer cells is associated with increased chemosensitivity and decreased expression of multiple chemoresistance genes. *Cancer Res*. 59(14):3505-11.
- Kornmann M., Ishiwata T., Itakura J., Tangvoranuntakul P., Beger H.G., Korc M. (1998). Increased cyclin D1 in human pancreatic cancer is associated with decreased postoperative survival. *Oncology*. 55(4):363-9.

- Korsmeyer S.J. (1992). Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 80:879–886.
- Krishnan, N., Pan, H., Buckley, D.J., and Buckley, A. (2003). Prolactin-regulated pim-1 transcription: A. 2003. Prolactin-regulated pim-1 transcription: identification of critical promoter elements and Akt signaling. *Endocrine*. 20:123–130.
- Kroemer G, Reed J.C. Mitochondrial control of cell death. (2000). *Nature Medicine* 6: 513-9
- Kuo Y.C., Huang K.Y., Yang C.H., Yang Y.S., Lee W.Y., Chiang C.W. (2008). Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J Biol Chem*. 283(4):1882-92.
- Kruh G.D. and Belinsky M.G. (2003). The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 22: 7537-7532.
- Kurimchak A., Graña X.. (2012). PP2A holoenzymes negatively and positively regulate cell cycle progression by dephosphorylating pocket proteins and multiple CDK substrates. *Gene* 499: 1-7.
- Langley, R. R. and Filder, J (2007). Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr. Rev.* 28: 297-321.
- Lauffenburger D. A. and Horwitz A. F. (1996). Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. *Cell*. 84 (3):359-69.
- Leavesley D.I., Ferguson G.D., Wayner E.A., Cheres D.A. (1992). Requirement of the integrin beta 3 subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen. *J Cell Biol*. 117:1101–1107.
- Leblond C.P. & S. Inoue. (1989). Structure, composition and assembly of basement membrane. *Am. J. Anat.* 185: 367–390.
- Lee A. S. (2001). The glucose- regulated proteins: stress induction and clinical applications. *TRENDS in Biochemical Sciences* 6 (8) 504- 510.
- Lee HS, Bae T, Lee JH, Kim DG, Oh YS, Jang Y, Kim JT, Lee JJ, Innocenti A, Supuran CT, Chen L, Rho K, Kim S. (2012). Rational drug repositioning guided by an integrated pharmacological network of protein, disease and drug. *BMC Syst Biol*. 6:80.
- Lee YS, Kim SJ, Min HJ, Jo JY, Park EH, Koh SS. (2011). PAUF promotes adhesiveness of pancreatic cancer cells by modulating focal adhesion kinase. *Exp Mol Med*. 43(5):291-7.
- Li D., Xie K., Wolff R., Abbruzzese J.L. (2004). Pancreatic cancer. *The Lancet* 363: 1049–1057.
- Li S., Xi Y., Zhang H., Wang Y., Wang X., Liu H., Chen K. (2010). A pivotal role for Pim-1 kinase in esophageal squamous cell carcinoma involving cell apoptosis induced by reducing Akt phosphorylation. *Oncol Rep*. 24(4):997-1004.
- Lieber M. Mazzetta J., Nelson-Rees W., Kaplan M. and Todard G. (1975). Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *J. Cancer*: 15 (5): 741-747.
- Liu Z.L., Tian W., Wang Y., Kuang S., Luo X.M., Yu Q. (2012). A novel sulfonamide agent, MPSP-001, exhibits potent activity against human cancer cells in vitro through disruption of microtubule. *Acta Pharmacol Sin*. 33(2):261-70.
- Loftsson, T., Fridriksdóttir, H., Thórisdóttir, S., Stefánsson, E., Sigurdardóttir, A. M., Gudmundsson, Ö. & Sigthórsson, T. (1994). 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin in topical carbonic anhydrase inhibitor formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 1: 175-180.
- Loftsson T, Vogensen SB, Brewster ME, Konrádsdóttir F. (2007). Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. *J Pharm Sci*. 96(10):2532-46.

- Long J., Zhang Y., Yu X., Yang J., LeBrun D.G., Chen C., Yao Q., Li M. (2011). Overcoming drug resistance in pancreatic cancer. *Expert Opin.Ther.Targets*. 15(7):817-28.
- Luftman K, Hasan N, Day P, Hardee D, Hu C. (2009). Silencing of VAMP3 inhibits cell migration and integrin-mediated adhesion. *Biochem Biophys Res Commun*.380(1):65-70.
- Ma D., Tremblay P., Kevinjeet M., Akbari- Asl P., Collins J., T. Hudlicky and Pandey S. (2011). Induction of Apoptosis and Autophagy in Human Pancreatic Cancer Cells by Novel Synthetic C-1 Analogue of 7- deoxypancratistatin. *Americans Journal of Biomedical Sciences* 3(4), 278-291.
- Ma J., H.K. Arnold, M.B. L., Sears R.C. and Kraft A.S.. (2007) Negative regulation of Pim-1 protein kinase levels by the B56b subunit of PP2A. *Oncogene* 26: 5145–5153.
- Ma Y, Hendesrshot LM. (2004). ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat*. 28 (1-2): 51-65.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Rev. Cancer* 9:153-166.
- Manning B.D., Cantley L.C. (2007). Akt/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129: 1261-1274.
- Maren T. H., Bar- Irlan, A., Conroy C.W. and Brechue W. F. (1990).Chemical and pharmacological properties of MK-927, a sulfonamide carbonic anhydrase inhibitor that lowers intraocular pressure by the topical route. *Exp. Eye Res*. 50, 27-36.
- Maren T. H., Breache W. F. and Bar- Ilan A. (1992). Relations Among IOP reduction, Ocular Disposition and Pharmacology of the Carbonic Anhydrase Inhibitor Ethoxzolamide. *Exp. Eye Res*. (1992) 55, 73- 79.
- Martínez-Zaguilán R., Seftor E.A., Seftor R.E., Chu Y.W., Gillies R.J., Hendrix M.J.(1996). Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 14 :176-186.
- Matthews D.J., Yakes F.M., Chen J., Tadano M., Bornheim L., Clary D.O., Tai A., Wagner J.M., Miller N., Kim Y.D., Robertson S., Murray L., Karnitz L.M. (2007). Pharmacological Abrogation of S-Phase Checkpoint Enhances the Anti-Tumor Activity of Gemcitabine In Vivo. *Cell Cycle*. 6(1):104-10.
- McConkey D. J. (2010). Apoptosis Signaling Pathways in Pancreatic Cancer Pathogenesis. J.P. Neoptolemos, R. Urrutia, J. L. Abbruzzese, M. W. Brüchler (eds) *Pancreatic Cancer* (vol. 1) pp 369-386.
- Melisi D., Xia Q., Paradiso G., Ling J., Moccia T, Carbone C., Budillon A., Abbruzzese J. L., Chiao P. J.. (2011). Modulation of Pancreatic Cancer Chemoresistance by Inhibition of TAK1. *J Natl Cancer Inst*103:1–15.
- Miranda J. C., T. E. A. Martins, F. Veiga, H. G. Ferraz. (2011). Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. *Braz. J. Pharm. Sci*. 47 (4). 665-681.
- Misra U. K. and Pizzo V. S. (2005). Up-regulation of GRP78 and antiapoptotic signaling in murine peritoneal macrophages exposed to insulin. *Leukoc. Biol*. 78:187-194.
- Miyashita T., Reed J.C. (1993). Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 81:151–157.
- Morishita D., Katayama R., Sekimizu K., Tsuruo T., Fujita N. (2008). Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27Kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cancer Res.*; 68 (13): 5076-85.
- Mortenson Melinda M., Joseph M. Galante, Michael G. Schlieman, Richard J.Bold. (2004). AKT: A novel target in pancreatic cancer therapy. *Cancer Therapy* (2), 227-238.

- Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods*. 65: 55-63.
- Murphy, G. & J.J. Reynolds. (1993). Extracellular matrix degradation. In *Connective Tissue and Its Inheritable Disorders*. P.M. Royse & B. Steinmann, (eds). Wiley-Liss & Sons, Inc. New York. pp 287–316.
- Nawrocki ST, Carew JS, Dunner K Jr, Boise LH, Chiao PJ, Huang P, Abbruzzese JL, McConkey DJ. (2005). Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 65(24):11510-9.
- Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 9(4):274-84.
- Ni M., Lee A.S. (2007). ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett* 581: 3461-3651.
- Nicholson D.W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation* 6: 1028-42.
- Nishimori I., Vulho D., Innocenti A., Scozzafava A., Mastrolorenzo A. and Supuran. C. (2005). Carbonic Anhydrase Inhibitors. The Mitochondrial Isozyme VB as a New Target for Sulfonamide and Sulfamate Inhibitors. *J Med Chem*.48(24):7860-6.
- Nobili S., Landini I., Giglione B. and Mini E. (2006). Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Curr. Drug Targets* 7: 861-879.
- Norberg E., Orrenius S., Zhivotovsky B. (2010). Mitochondrial regulation of cell death: Processing of apoptosis- inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Commun*. 396 (1): 95- 100.
- Novario A., I. Chiappino, G. F. Bertelli, A. Heouaine, G. Ritorto, A. Addeo, G. Bellone, M. Merlano & O. Bertetto. (2004). Phase II study of cisplatin, gemcitabine and 5-fluorouracil in advanced pancreatic cancer. *Annals of Oncology* 15: 474- 477.
- O'Driscoll L., Walsh N., Larkin A., Ballot J., Ooi W.S., Gullo G., O'Connor R., Clynes M., Crown J., Kennedy S. (2007). MDR1/ P-glycoprotein and MRP-1 drug efflux pumps in pancreatic carcinoma. *Anticancer Res* 27: 1325-1330.
- O'Connell B.C., Cheung A.F., Simkevich C.P., Tam W., Ren X., Mateyak M.K., Sedivy J.M.(2003). A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns.
- OMS. Disponível em <<http://www.who.int.cancer/en/>>, Acesso em: 12 de dez. 2012.
- Ow YP, Green DR, Hao Z, Mak TW. (2012). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9(7):532-42.
- Ozben T. (2006). Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Lett*. 580: 2903-2909.
- Padhy BM, Gupta YK. (2011). Drug repositioning: re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. *J Postgrad Med*. 57(2):153-60.
- Parkkila Sppo, Hannu Rajaniemi, Anna- Kaisa Parkkila, Jyrki Kivelä, Abdul Waheed, Silvia Pastoreková. (2000). Carbonic anhydrase inhibitor suppresses invasion of renal cancer cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97 (5): 2220-2224.
- Parsons C. M., Muilenburg D., Tawnya L. B., Virudachlam S. and Bold J. R. (2010). The Role of Akt Activation in the Response to Chemotherapy in Pancreatic Cancer. *Anticancer Res* (30): 3279-3290.
- Pastorekova S, Ratcliffe PJ, Pastorek J. (2008). Molecular mechanisms of carbonic anhydrase IX-mediated pH regulation under hypoxia. *BJU Int*.101 Suppl 4:8-15.
- Pastorekova S., Parkkila S., Pastorek J., Supuran C.T. Review article. (2004). Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J. Enz. Inhib. Med. Chem*. 19:199-229.

- Perry J. A. and Kornbluth S. (2007). Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell Division*, 2: 1-12.
- Prévost N., Tarin D., Shattil S. J., and Cheresch D. A. (2009). Integrin $\alpha v \beta 3$ /c-src “Oncogenic Unit” Promotes Anchorage-independence and Tumor Progression. *Nat Med.* 15 (10): 1163–1169.
- Qian, K. C. (2004). Structural basis of constitutive activity and a unique nucleotide binding mode of human Pim-1 kinase. *J. Biol. Chem.* 280:6130- 6137.
- Radulovich N., Nhu- An Pham, Strumpf D., Leung L., Xie W., Jurisica I., Ming- Sound Tsao. (2010). Differential roles of cyclin D1 and D3 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular Cancer* 9: 1-24.
- Raven JF, Baltzis D, Wang S, Mounir Z, Papadakis AI, Gao HQ, Koromilas AE. (2008). PKR and PKR-like endoplasmic reticulum kinase induce the proteasome-dependent degradation of cyclin D1 via a mechanism requiring eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *J Biol Chem.* 283(6):3097-108.
- Retzer-Lidl Michaela, Roland M. Schmid and Günter Schneider. (2007). Inhibition of CDK4 impairs proliferation of pancreatic cancer cells and sensitizes towards TRAIL- induced apoptosis via down regulation of surviving. *Int. J. Cancer*: 121, 66-75.
- Ribeiro A., Sosnik A., Chiappetta A. D., Veiga F., Concheiro A. and Alvarez- Lorenzo C.(2012). Single and mixed poloxamine micelles as nanocarriers for solubilization and sustained release of ethoxzolamide for topical glaucoma therapy. *J. R. Soc. Interface.* Doi: 10.1098/rsif.2012.0102
- Ridder G, Ray R, Misra UK, Pizzo SV. (2011). Modulation of the unfolded protein response by GRP78 in prostate cancer. *Methods Enzymol* 489: 245-57.
- Rim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S. (2006). Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis* 11: 5-13.
- Robson Samuel C, Lesley Ward, Helen Brown, Heather Turner, Ewan Hunter, Stella Pelengaris and Michael Khan. (2011). Deciphering c-MYC-regulated genes in two distinct tissues. *BMC Genomics*, 12: 476.
- Rocha Lima C.M., Green M.R., Rotche R. (2004). Irinotecan plus gemcitabine results in no survival advantage compared with gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer despite increased tumor response rate. *J Clin Oncol.* 22(18): 3776-83.
- Rouschop KM, van den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkoul K, Keulers T, Mujcic H, Landuyt W, Voncken JW, Lambin P, van der Kogel AJ, Koritzinsky M, Wouters BG. (2010). The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest.* 120(1): 127–141.
- Roy S., Bayly C.I., Gareau Y., Houtzger V.M., Kargman S., Keen S.L., Rowland K., Seiden I.M., Thorneberry N.A., Nicholson D.W. (2001). Maintenance of caspase-3 proenzyme dormancy by an intrinsic “safety catch” regulatory tripeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* 98: 6132- 6137.
- Roy, R., Yang, J., and Moses, M.A. (2009). Matrix metalloproteinase as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 27: 5287-5297.
- Rumjanek VM, Lucena M, Campos M. M, Marques-Silva V. M, Maia R.C. (1994). Multidrug resistance in leukemias: the problem and some approaches to its circumvention. *Ciencia Cult.* 46: 63-69.
- Rumjanek, VM, Trindade GS, Wagner-Souza K, de Oliveira MC, Marques-Santos LF, Maia RC and Capella MA. (2001). *An. Acad. Ci.* 73(1): 57-69.

- Rutkowski DT, Kaufman RJ. (2004). A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* 14: 20-28.
- Saif M. (2008). Is there a Standard of Care for the Management of Advanced Pancreatic Cancer? Highlights from the Gastrointestinal Cancer Symposium. Orlando, FL, USA. pp 25-27.
- Schaller M.D. (2001). Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta* 1540:1–21.
- Schmidt CE, Horwitz AF, Lauffenburger DA, Sheetz MP. (1993). Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric, and regulated. *J Cell Biol.* 123(4):977-91.
- Schoroder M and Kaufman R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 739-789.
- Schwaeble W, Kerlin M, Meyer zum Buschenfelde KH. (1993). De novo expression of intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, CD54) in pancreas cancer. *Int J cancer* 53: 328-333.
- Shiota C., Woo J.T., Lindner J., Shelton K.D., Magnuson M.A.(2006). Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability. *Dev Cell.* 11(4): 583-9.
- Scozzafava A, Briganti F., Ilies M. A, Supuran CT. (2000). Carbonic Anhydrase Inhibitors: Syntesis of Membrane- Impermeant Low Molecular Weight Sulfonamides Possessing in Vivo Selectiyity for the Membrane- Bound versus Cytosolic Isozymes. *J. Med. Chem.* 43(2): 292-300.
- Senior, R. M., G.L. Griffin, C.J. Fliszar, S.D. Shapiro, G.I. Goldberg & H.G. Welgus. (1991). Human 92- and 72-kilo dalton type IV collagenases are elastases. *J. Biol. Chem.* 266: 7870–7875.
- Shimoyama S, Gansauge F, Gansauge S. (1997). Overexpression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in pancreatic adenocarcinoma in comparison with normal pancreas. *Pancreas* 181-186.
- Shirogane T, Fukada T, Muller JM, Shima DT, Hibi M, Hirano T. (1999). Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity.* 11(6): 709-19.
- Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2012). Cancer Statistics, 2012.CA. *Cancer J. Clin.* 62:10-29.
- Szejtli, J. (1988). Cyclodextrin Technology, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht (Nertherlands), pp. 39-43 and 188-192.
- Huveneers Stephan and Erik H. J. Danen. (2009). Adhesion signaling – crosstalk between integrins, Src and Rho. *Journal of Cell Science* 122, 1059-1069.
- Stetler- Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta L. (1993). Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9: 541-473.
- Stetler- Stevenson, W. G., L. A. Liotta & D. E. Kleiner. (1993). Extracellular matrix 6-role of matrix metalloproteinase in tumor invasion and metastasis. *FASEB J.* 7: 1434–1441.
- Suh DH, Kim MK, Kim HS, Chung HH, Song YS. (2012). Unfolded protein response to autophagy as a promising druggable target for anticancer therapy. *Ann N Y Acad Sci.*1271:20-32.
- Sugrue M.F. (2000). Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Prog Retin Eye Res.* (1): 87-112.
- Summy JM, Gallick GE. (2003). Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer metastasis reviews.* 22:337–358.
- Supuran Claudiu T. (2010). Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20: 3467-3474.

- Supuran C. T. (2004). Carbonic Anhydrase: Catalytic and Inhibition Mechanisms, Distribution and Physiological Roles. Supuran C. T., Scozzafava A., Conway J. (eds). Carbonic Anhydrase: Its Inhibitors and Activators. Copyright 2004 CRC Press, LLC. pp 1-23.
- Supuran CT, Briganti F, Tilli S, Chegwiddden WR, Scozzafava A. (2001). Carbonic Anhydrase Inhibitors: Sulfonamides as Antitumor Agents. *Bioorg Med. Chem.* 9: 703-714.
- Supuran C.T. (2003). Indisulam: an anticancer sulfonamide in clinical development. *Expert Opin. Investig. Drug* 12: 283-287.
- Svastová E, Hulíková A, Rafajová M, Zat'ovicová M, Gibadulinová A, Casini A, Cecchi A, Scozzafava A, Supuran CT, Pastorek J, Pastoreková S. (2004). Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett.* 577(3): 439-45.
- Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C and Gottesman MM. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5: 219-234.
- Szegezdi E., Logue S. E., Gorman M. A., Smali A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports* 7 (9): 880-885.
- Tang Hoi MA and Randy Y.C. POON. (2011). Review article. How protein kinase co-ordinate mitosis in animal cells. *Biochem. J.* 435, 17-31.
- Tempia-Caliera Adrien A., Laszlo Z. Horvath, Arthur Zimmermann, Tibor T. Tihanyi, Murray Korc, Helmut Friess, Markus W. Büchler. (2002). Adhesion Molecules in Human Pancreatic Cancer. *J. Surg. Uncool.* 79: 93-100.
- Thirty A, Done JM, Maser eel B, Superman CT. (2006). Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends Pharmacology Sci.* 27(11):566-73.
- Tobinick EL. (2009). The value of drug repositioning in the current pharmaceutical market. *Drug News Perspect.* (2):119-25.
- Tolstykh Tatiana, Jookyung Lee, Scott Vafai and Jeffry B. Stock. (2000). Carboxyl methylation regulates phosphoprotein phosphatase 2A by controlling the association of regulatory B subunits. *EMBO J.* 19 (21): 5682-5691.
- Valle, E.M.M.D. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.*, 39: 1033-1046.
- Van den Heuvel-Eibrink MM, Wiemer EA, Prins A, Meijerink JP, Vossebeld PJ, van der Holt B, Pieters R and Sonneveld P. (2002). Increased expression of the breast cancer resistance protein (BCRP) in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Leukemia* 16: 833-839.
- Van den Steen P.E., Dubois B., Nelissen I., Rudd P.M., Dwek R.A., Opdenakker G. (2002). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 37: 375-536.
- Van Moorsel, C. J., Pinedo, H. M., Blaauwgeers, J. L. (2000). Mechanisms of synergism between cisplatin and gemcitabine in ovarian and non-small-cell lung cancer cell lines. *Br. J. Cancer*, 80: 981-990.
- Wei Wang, Lin Ao, Elizabeth R. Rayburn, Hongxia Xu, Xu Zhang, Subhasree Ashok Nag, Xuming Wu, Ming- Hai Wang, Hui Wang, Erwin G. Van Mier, Ruiwen Zhang. (2012). KCN1, a Novel Synthetic Sulfonamide Anticancer Agent: In Vitro and In Vivo Anti- Pancreatic Cancer Activities and Preclinical Pharmacology. *Plus one* 7 (9): e44883.
- Weigelt B, Peterse JL, Van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* 5:591-602.
- Walensky LD, Gavathiotis E. (2011). BAX unleashed: the biochemical transformation of an inactive cytosolic monomer into a toxic mitochondrial pore. *Trends Biochem Sci.* 36(12):642-52.

- Wu Huanwen, Liang Zhiyong, Shi Xiaohua, Ren Xinyu, Wang Kai and Liu Tonghua. (2009). Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with constitutive and laminin-induced phosphorylation of FAK in pancreatic cancer cell lines. *Molecular Cancer* 8:125.
- Xie Yingqiu, Burcu Mehmet, Linn Douglas E., Qiu Yun, and Baer Maria R. (2010). Pim-1 Kinase Protects P-Glycoprotein from Degradation and Enables Its Glycosylation and Cell Surface Expression. *Mol. Pharmacol.* 78(2):310-8.
- Xu C., Bailly-Maitre B., and Reed J. C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.* 115:2656–2664.
- Xu D., Allsop S.A., Witherspoon S.M., Snider J.L., Yeh J.J., Fiordalisi J.J., White C.D., Williams D., Cox A.D., Baines A.T. (2011). The oncogenic kinase Pim-1 is modulated by K-Ras signaling and mediates transformed growth and radioresistance in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis*. 32(4):488-95.
- Yan C. and Boyd D. (2007). Regulation of Matrix Metalloproteinase. *Gene Expression. J. Cell. Physiol.* 211: 19–26.
- Yang Wie-Lei, Wu Ching-Yuan, Wu Juan, LinHui-Kan. (2010). Regulation of AKT signaling activation by ubiquitination. *Cell Cycle*. 1; 9(3): 487-497.
- Yilmaz M, Christofori G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 28:15–33.
- Yilmaz M., Christofori G. and Lehenbre F. (2007). Distinct mechanisms of tumor invasion metastasis. *Trends Mol Med.* 13(12):535-41.
- Yoshida Hiderou. (2007). ER stress and diseases. *FEBS Journal* 274 630–658.
- Yung HW, Charnock-Jones DS, Burton GJ. (2011). Regulation of AKT phosphorylation at Ser473 and Thr308 by endoplasmic reticulum stress modulates substrate specificity in a severity dependent manner. *Plos One*. 21; 6(3):e17894.
- Zhang F, Beharry ZM, Harris TE, Lilly MB, Smith CD, Mahajan S, Kraft AS. (2009). PIM1 protein kinase regulates PRAS40 phosphorylation and mTOR activity in FDCP1 cells. *Cancer Biol. Ther.* 8(9):846-53.
- Zhang Y, Liu R, Ni M, Gill P, Lee AS. (2010). Cell surface relocation of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BIP. *J Biol Chem.* 285(20): 15065-75.

ANEXOS

7. Atividades adicionais: Apresentação de trabalho em congresso

Limia et al., J Cancer Sci Ther 2012, 4:10
<http://dx.doi.org/10.4172/1948-5956.S1.025>



2nd World Congress on Cancer Science & Therapy

September 10-12, 2012 Hilton San Antonio Airport, USA

Ethoxzolamide reduces the expression of aggressiveness and invasiveness biomarkers in pancreatic cancer cells

C.G. Limia, K.J. Pelizzaro-Rocha, T.F. Tornatore, Ferreira and C.V.
University of Campinas - UNICAMP, Brazil

Pancreatic cancer is one of the most lethal of human malignancies ranking 4th among cancer-related deaths in the western world. Moreover, the drugs presented on the market fail on treatment of pancreatic cancer. In this regard, novel compounds that diminish the aggressiveness behavior of pancreatic cancer cells are urgently called for. Currently the carbonic anhydrase (CA) inhibitors, aromatic and heterocyclic sulfonamides (e.g. ethoxzolamide - ETZ), have been investigated as chemotherapies, since the acidification of the tumor microenvironment contributes to the metastatic behavior of cancer cells. The main goal of this study was to examine the molecular action by which ETZ diminished the proliferation rate of pancreatic cells (PANC-1) by checking the expression/function of some aggressiveness biomarkers by western blot and zymography. ETZ decreases PANC-1 cells viability with an IC_{50} value at 200 μ M after 48h of treatment, as assessed through MTT reduction. In agreement, pro-survival kinases, AKT and Pim-1, were down regulated. It was also observed that the level of protein serine/threonine phosphatase PP2A (non-methylated C subunit) was also decreased by ETZ, which indicates an activation of this enzyme, and consequently inhibition of AKT and Pim-1. Accordingly, it was observed that ETZ caused cell cycle arrest at G1 phase by decreasing CDK4 and cyclin D expression. Importantly, both MMP-2 and MMP-9 expressions and activities were diminished after PANC-1 treatment with ETZ. The present study shows for the first time the potential of ETZ as anti-pancreatic cancer, mainly due to negative modulation of the aggressiveness and invasiveness biomarkers.

Biography

Cintia completed the Bachelor in Biotechnology in 2011 in Faculty of Biochemistry and Biological Sciences at the National University of the Littoral, Argentina. She worked at Department of Genetic and Evolution, University of Campinas (UNICAMP), SP, Brazil. Currently, she is enrolled as master degree student in Post graduation Program in Functional and Molecular Biology. Since 2011 she has been working under supervision of Prof. Carmen Verissima Ferreira at Laboratory of Bioassays and Signal Transduction, Department of Biochemistry, UNICAMP. The main topic of the project is to define the molecular mechanism by which ethoxzolamide diminishes pancreatic cancer cells aggressiveness.

cintia.gomezlimia@gmail.com