

Débora Carvalho de Aguiar

Inibidores das HSP90 como agentes antitumorais

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pelo Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Declaração de integridade

Eu, Débora Carvalho de Aguiar, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2007010062, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 12 de Setembro de 2014.

O orientador

(Professor Jorge António Ribeiro Salvador)

A aluna

(Débora Carvalho de Aguiar)

Lista de Abreviaturas

WHO – World Health Organization

HSP – Heat Shock Proteins

MEEVD – Pentapeptido da Hsp90 C-terminal

TPR – Repetição de Domínios Tetratricopeptídeos

HOP – HSP Organizing Protein

PPIase – Prolyl Isomerase

AHA1 – Activator of Hsp90 I

P23 – Prostaglandin E Sintase

CDC37 – Cell Division Cycle Homologue

SHR – Steroid Hormone Receptor

STII – Stress Inducible Protein I

GR – Receptor de Glucocorticóides

PR – Receptor de Progesterona

17-AAG – 17-allylamino-17-desmethoxygeldanamycin

HAT – Histona Acetiltransferases

HDAC – Histona Deacetilase

eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial

NO – Óxido Nítrico

GA – Geldanamicina

17-DMAG – 17-dimethylaminoethylamino-17-Demethoxygeldanamycin

DMSO – Sulfóxido de Dimetilo

IPI – Retaspimycin Hydrochloride

MCP3100 – Methylcyclopropene 3100

EHsp90 – Endothelial Heat Shock Protein

VSMC – Células de Músculo Liso Vascular

HMEC – Células Endoteliais Microvasculares Humanas

Resumo

As proteínas de Choque Térmico (Hsps), representam um grupo diverso de chaperonas que desempenham um papel vital na proteção das células contra inúmeros stresses ambientais. Desde a identificação do primeiro inibidor Hsp90 há quase duas décadas atrás, têm havido um progresso substancial no desenvolvimento de moléculas potentes e seletivas que inibam esta chaperona e que contenham atividade anticancerígena.

Esta monografia irá fornecer uma ideia geral da função e estrutura da Hsp90, as suas co-chaperonas, como modificações pós-translacionais podem interferir com esta maquinaria e ainda sobre a eHsp90 e perspectivas futuras.

Abstract

Heat shock proteins (Hsps) represent a diverse group of chaperones that play a vital role in the protection of cells against numerous environmental stresses. Since the identification of the first Hsp90 inhibitor almost two decades ago, there has been substantial progress in the development of potent and selective molecules that inhibit this chaperone and that have anticancer activity.

This monograph will provide an overview about the function and structure of the Hsp90, it's co-chaperones, how post-translational modifications can interfere with this machinery as well as eHsp90 and future prospects.

Índice

1. Introdução.....	7
2. Estrutura e conformação dinâmica das Hsp90.....	8
3. Co-Chaperonas.....	10
3.1. Receptores de hormonas esteróides (SHR).....	10
3.2. Cinases.....	11
4. Modificações pós-tranlacionais.....	12
4.1. Fosforilação.....	12
4.2. Acetilação.....	13
4.3. Nitrosilação.....	13
5. Mediadores apópticos.....	14
6. Inibidores de Hsp90 e doenças humanas.....	14
7. Hsp90 na clinica.....	15
7.1. Geldanamicina (GA).....	15
7.2. Radicol.....	16
7.3. Tanespimicina (17-AAG).....	17
7.4. Ansamicinas soluveis em água: 17-DMAG alvespimicina e IPI-504.....	17
7.5. Inibidores de Hsp90 de segunda e terceira geração.....	18
7.5.1. AUY922.....	18
7.5.2. Ganetespib (STA-9090).....	18
8. Novas perspectivas terapêuticas.....	18
9. Hsp90 e quimioterapia.....	19
10. eHsp90: Novo Alvo na Terapia do Cancro.....	20
11. Conclusão.....	21
12. Bibliografia.....	23

I. Introdução

O cancro é uma doença transversal e uma das principais causas de morte a nível mundial, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WHO), causando 7,6 milhões de mortes (aproximadamente 13% de todas as mortes mundiais) em 2008 ⁽¹⁾ e 8.2 milhões de mortes em 2012. ⁽²⁾

Até 2030 espera-se 21.4 milhões de novos casos de cancro e que 13.2 milhões de mortes estejam relacionadas com esta. ⁽²⁾

Esforços feitos em prol da investigação do cancro obtiveram avanços significativos nestas últimas décadas e alteraram a nossa percepção em relação á complexidade desta doença. ⁽⁷⁾

Os hallmarks do cancro compreendem uma série de ganhos e perdas de funções genéticas e epigenéticas de oncogenes e genes supressores de tumores, respectivamente, que tornam as células cancerígenas capazes de um elevado potencial de replicação irrestrito, resistência a estímulos pro-apópticos, angiogénese sustentada, auto-suficiência no crescimento, insensibilidade a sinais de supressores de crescimento, reprogramação do metabolismo energético e evasão á vigilância do sistema imune. ^[7,8]

Com a explosão de conhecimento relativo a genes e vias moleculares, que regulam muitos dos hallmarks do cancro, terapias direccionadas a alvos específicos baseados em certos mecanismos têm vindo a ser desenvolvidos. ⁽⁷⁾

O estudo da família *dos Heat Shock Proteins* (HSPs) tem sido considerado por muitos como um alvo promissor na terapia do cancro. ⁽³⁾ Estas proteínas encontram-se aumentadas em muitos tumores sólidos e neoplasias hematológicas, como tal, formulou-se a hipótese da utilização de inibidores químicos das Hsp90 com o resultado de degradação destas proteínas oncogénicas servindo como agentes anticancerígenos extremamente úteis. ⁽⁸⁾

Avaliações clínicas e pré-clínicas de uma variedade de inibidores de Hsp90 têm demonstrado efeitos antitumorais quer em monoterapia quer em combinação com quimioterapia. ⁽³⁾

Hsp90 colabora com a Hsp70 para formar um sistema dinâmico, multifuncional e multicompetente que desempenha um papel pivô na protecção biológica dos organismos em stresses ambientais e genéticos. ⁽⁶⁾ No entanto o foco deste trabalho será nas Hsp90 e nos seus efeitos antitumorais.

Sumariando as Hsps representam um grupo de chaperonas que regulam o *fold*ing de proteínas para garantir a conformação e translocação correta, evitam a agregação de proteínas ^[8,10] e possuem um papel vital na protecção das células contra diversos stresses ambientais, ⁽⁴⁾ incluindo elevação de temperatura, hipoxia e danos oxidativos. Visto que estes afectam numerosos processos fisiológicos, tais como, transdução, transporte intracelular e degradação proteica, tornam-se um alvo interessante para a terapêutica do cancro, ⁽⁵⁾ pois a sua inibição pode afectar simultaneamente várias vias oncogénicas. ⁽⁶⁾

2. Estrutura e conformação dinâmica das Hsp90

As Chaperonas moleculares pertencem a um grupo de proteínas altamente conservadas chamado Hsps, que são classificados em famílias de acordo com o tamanho molecular, estas incluem a Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e Hsp pequeno (15-30 kDa). ⁽⁸⁾

Apesar de ser uma proteína de choque térmico, Hsp90 é ubiquitariamente expressa em condições normais e corresponde a cerca de 1-2% do conteúdo total de proteína celular tornando-os uma das proteínas citoplasmáticas mais abundantemente expressas em diversos organismos. ^[3,6,8,9,10,14]

As Hsp90 são membros de uma classe especial de ATPases, estruturalmente relacionados, as chamadas Girases, Hsp90, Histidina Cinase, que contêm uma dobra vinculativa Bergerat-ATP. ⁽⁵⁾

As Hsp90 em humanos contêm duas isoformas *major*, Hsp90 (alfa) e Hsp90 (beta) codificada por dois genes distintos, partilhando aproximadamente 81% de sequência homóloga. Ambos contem os três domínios altamente conservados. No entanto tornou-se cada vez mais claro que estes desempenham papéis diferentes. ⁽⁵⁾

Enquanto a Hsp90 (beta) é expressa abundantemente na maioria dos tecidos a Hsp90 (alfa) é tipicamente induzida em resposta a diversas situações de *stress* celular. ^[6,12]

As Hsp90 possuem uma estrutura homodimérica e cada monómero contém três regiões flexivelmente ligadas, um domínio de ligação ATP N-terminal (N-domínio), um domínio médio de vinculação de ATP (domínio M), e um domínio de dimerização ou terminal C (domínio C). ^[5,8]

O domínio M contribui para a interacção das proteínas clientes e algumas co-chaperonas. O terminal C é essencial para a dimerização da Hsp90 ⁽⁵⁾, regula a atividade da ATPase e recruta co-chaperonas através de um motivo conservado EEVD. Co-chaperonas, contendo repetição de domínios tetratricopeptídeos (TPR), como HOP e PPIase, e as co-chaperonas

não-TPR, CDC37, p23 e AHAI, desempenham um papel importante na maturação da proteína cliente e modulação da atividade ATPase. ⁽⁸⁾

O domínio N-terminal ATPase tem um bolso regulador que se liga e hidrolisa ATP para mediar uma série de ciclos de associação-dissociação entre Hsp90 e proteínas cliente. Este domínio contém a dobra Bergerat, no qual o nucleótido adopta uma forma curva. ⁽⁶⁾

Co-chaperonas também recrutam proteínas cliente específicos para a Hsp90 e / ou estabilizam a Hsp90 num estado ligado a ATP para prolongar a meia-vida do complexo multichaperona maduro. ⁽⁸⁾

Estudos estruturais revelaram que Hsp90 adopta espontaneamente conformações estruturais distintas, que parecem estar em um equilíbrio dinâmico. No estado apo, Hsp90 adopta uma forma em "V", chamada de conformação aberta. A ligação de ATP desencadeia uma série de alterações conformacionais incluindo reposicionamento da região da tampa do terminal N e uma mudança dramática na orientação domínio N-M. Finalmente, a Hsp90 atinge um estado mais compacto, denominada conformação fechada em que os domínios N são dimerizados. ⁽⁵⁾ [figura 1. Adaptado de 5]

Ou seja, após ligação rápida ao ATP, a Hsp90 atinge lentamente o primeiro estado intermediário, em que a tampa de ATP está fechada, mas os domínios-N ainda estão abertos. A dimerização do terminal N leva á formação do segundo estado intermediário, no qual há reposicionamento do domínio M que interage com o domínio N. Em seguida, a Hsp90 atinge um estado totalmente fechado no qual ocorre a hidrólise de ATP. Após hidrolisação, o domínio N dissocia-se libertando ADP e fosfato inorgânico, voltando a Hsp90 á sua conformação inicial ⁽⁵⁾. Outra característica interessante da região de ligação ao ATP é que vários resíduos de aminoácidos conservados formam uma "tampa" que se fecha sobre o bolso de ligação de nucleótidos no estado de ligação com o ATP, mas está aberto durante o estado de ligação com o ADP. ⁽⁵⁾

As funções das Hsp90 podem igualmente ser reguladas por modificações pós-translacionais, estas incluem a fosforilação, nitrosilação e acetilação. ^[8,9]

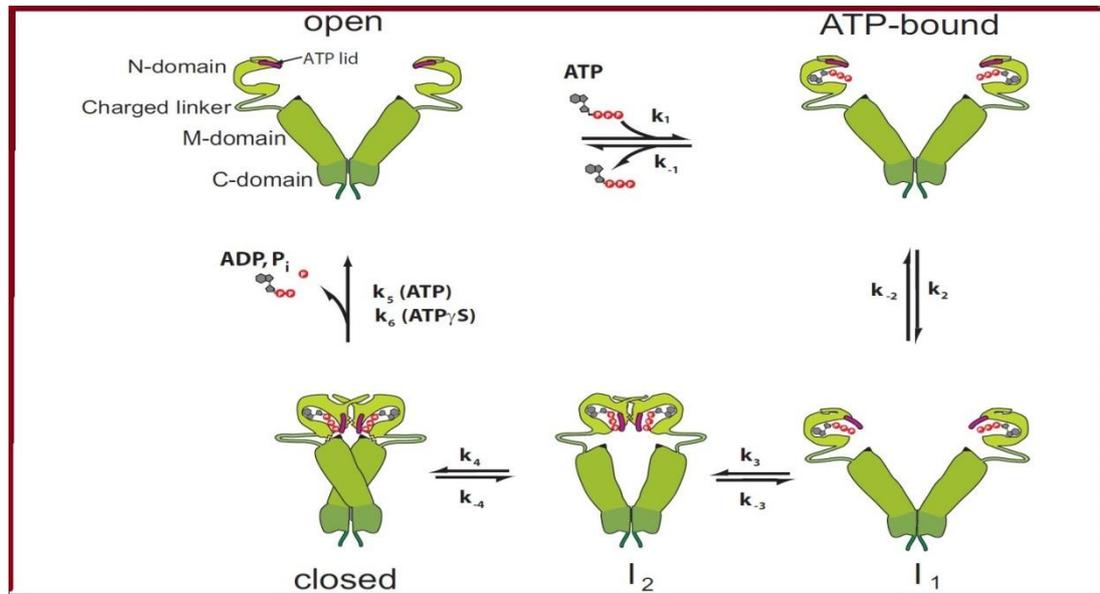


Figura 1

3. Co-chaperonas:

Hsp90 desempenha um papel proeminente nos processos pós-translacionais, impedindo a agregação de proteínas e permitindo a translocação através das membranas. Auxilia também na montagem / desmontagem de complexos multiprotéicos e na maturação conformacional de moléculas de sinalização. Embora geralmente estabiliza os seus substratos, ou chamadas proteínas "cliente", Hsp90 pode também promover a degradação de proteínas. ⁽¹⁰⁾ Para executar essas diversas funções, Hsp90 não funciona de forma independente actua sim como o componente central de maquinarias maior e mais complexa, que contêm outras chaperonas, co-chaperonas e moléculas acessórias. ⁽¹⁰⁾

Até à data, mais de 200 co-chaperonas foram identificadas. Estas regulam a função da Hsp90 de diferentes maneiras, tal como a inibição ou a activação da ATPase da Hsp90, ou pelo recrutamento de proteínas cliente específicas para o ciclo. ⁽⁵⁾

3.1. Receptores de hormonas esteróides (SHR)

Tem sido bem estabelecido que certas células cancerígenas crescem de uma forma dependente de hormonas esteróides. Os receptores de estrogénio são sobre expressas em cerca de 70% dos casos de cancro da mama, e genes receptores de estrogénios têm sido associados com diferentes riscos de desenvolver cancro da mama. ⁽⁹⁾

Mutações nos receptores de androgénio podem contribuir para a progressão do cancro da próstata e para o insucesso na terapia endócrina com antagonistas de androgénio. ⁽⁹⁾

Os receptores estrogénicos e androgénios bem como receptores glucocorticóides, são proteínas cliente-Hsp90, não podendo ligar-se a suas respectivas hormonas nem activar genes-alvo sem função correcta das Hsp90. Portanto, a inibição da maquinaria Hsp90 suprime o crescimento dependente de hormonas de certas células tumorais. ⁽⁹⁾

De acordo com experiências reconstitutivas, SHR deve passar cronologicamente por três complexos com diferentes composições de co-chaperonas para chegar a sua conformação activa. Hsp70 / Hsp40 foram identificados como componentes do "complexo inicial." Após associação com a Hsp90 através da proteína adaptadora Hop o "complexo intermediário" é formado. Além do complexo intermediário, um terceiro complexo que contém PPlase e a co-chaperona p23 tem sido encontrado na última etapa do ciclo. ⁽⁵⁾

Hop / STII (stress inducible protein I) serve como uma proteína adaptadora entre Hsp70 e Hsp90 e facilita a transferência da proteína cliente. Por isso, é indispensável para a manutenção da actividade de ligação da hormona do receptor de glucocorticóides (GR) e receptor de progesterona (PR). ⁽⁵⁾

A p23 foi identificada como um componente em SHR complexos, em conjunto com a Hsp90 e uma PPlase. Facilita a maturação de proteínas cliente através da estabilização da conformação fechada da Hsp90. Como resultado, a hidrólise de ATP, que é indispensável para a libertação da proteína cliente, é parcialmente inibida na presença de p23 / SbaI. ⁽⁵⁾ Além disso, os inibidores de Hsp90 podem ser benéficos em pacientes que desenvolvem resistência a terapias hormonais, tamoxifeno ou inibidores da aromatase. ⁽⁸⁾

3.2. Cinases

Proteínas cinases são a maior classe de clientes de Hsp90, com um ciclo de chaperonas semelhante, havendo contudo pequenas diferenças nas co-chaperonas envolvidas. ⁽⁸⁾

Compostos concebidos para inibir potentemente e selectivamente as cinases que conduzem a oncogenes estão actualmente em desenvolvimento clínico para o tratamento de uma ampla gama de tumores. Alguns desses agentes são altamente activos, e induzem respostas terapêuticas notáveis em cancros portadores de lesões geneticamente relevantes. ⁽¹⁰⁾

Proteínas cinases são recrutadas para Hsp90 através da acção de Hop / STII e a co-chaperona específica cinase Cdc37. Ambos são capazes de estabilizar o complexo cinase / Hsp90. ^[5,9]

Numa fase posterior, o activador ATPase AHA1 pode libertar a Cdc37 da Hsp90, em conjunto com nucleótidos, o que leva à activação final das proteínas cinases. ⁽⁵⁾

Cdc37 interage com cinases através do domínio N-terminal e liga-se ao domínio N da Hsp90 através da sua parte C-terminal. ⁽⁵⁾. A interacção da Cdc37 com Hsp90 leva à estabilização da conformação aberta e a inibição da actividade de ATPase de Hsp90. ⁽⁵⁾

AHA1 é o mais poderoso activador ATPase da Hsp90, ligando-se aos domínios M e N da Hsp90. ^(5,9) A ligação de AHA1 induz uma conformação parcialmente fechada da Hsp90 e acelera dramaticamente a progressão do ciclo da ATPase. ⁽⁵⁾

Interacção sinérgica foi observada entre a depleção de AHA1 e 17-AAG na inibição do crescimento de células cancerígenas, o que sugere que a modulação de Aha1 pode ser outra estratégia terapêutica potencial. ⁽³⁾

4. Modificações pós-translacionais

Modificações pós-translacionais são outro elemento regulador altamente importante da maquinaria Hsp90. ^[5,9,10] Diferentes modificações pós-translacionais, tais como a fosforilação, acetilação, e nitrosilação, controlam rigidamente a função da Hsp90 e, assim, influenciam a maturação das proteínas cliente. ^[5,9,16]

A modificação pós-translacional pode também afectar a eficácia dos inibidores de Hsp90 e medicamentos, e, assim, influenciar a sensibilidade das células (de cancro) para os inibidores. Por outro lado, os inibidores de Hsp90 podem afectar modificações pós-translacionais, que afectam a actividade das chaperonas de Hsp90. ⁽⁹⁾

4.1 Fosforilação

A fosforilação é a modificação pós-translacional mais frequentemente detectada da Hsp90. Um número de diferentes locais de fosforilação de tirosina ou de serina foram identificadas e investigadas quanto ao seu impacto na função da chaperona Hsp90. ⁽⁵⁾

Por exemplo, apenas Hsp90 fosforilada estimula a actividade da proteína cliente da Hsp90 inibidor de cinase heme-regulada (HRI). A desfosforilação elimina a capacidade de Hsp90 para activar esta proteína cliente. Curiosamente, a hiperfosforilação também leva a uma diminuição da actividade da Hsp90. Por conseguinte, o estado de fosforilação da Hsp90 deve ser regulado com precisão, a fim de manter o bom funcionamento desta. ⁽⁵⁾

A fosforilação, além disso, também modula a interacção com co-chaperonas e, assim, exerce mais influência sobre esta maquinaria.

O estado de fosforilação de varias resíduos individuais de serina, treonina e tirosina tem vindo a demonstrar que afectam de modo único a função das Hsp90. ^[12,16]

Uma compreensão mais detalhada e aprofundada da fosforilação de Hsp90 poderia fornecer novas estratégias para aumentar a eficácia dos inibidores de Hsp90 e retardar ou reverter a aquisição de resistência a estes fármacos. ⁽¹²⁾

4.2 Acetilação

A acetilação é uma modificação pós-translacional que adiciona grupos acetilo às proteínas, geralmente em resíduos de lisina. ⁽¹⁶⁾

Esta é uma modificação reversível mediada por acções opostas de acetiltransferases (HAT's) e deacetilases. ⁽⁵⁾

A acetilação dos resíduos de lisina em Hsp90 pode inibir o seu ciclo de ATPase. ⁽¹⁰⁾

Em geral, a acetilação enfraquece interações Hsp90-cliente, e, assim, falha em apoiar a activação da proteína cliente. A acetilação de Hsp90 tem sido observada em células tratadas com inibidores da histona deacetilase (HDAC) ou após o silenciamento do HDAC6, e isto correlaciona-se com a desestabilização de várias proteínas cliente Hsp90. ⁽¹²⁾

Embora o impacto da HDAC6 na acetilação da Hsp90 tem sido extensivamente estudada, outros HDAC's também têm capacidade para deacetilar a chaperona, tais como a HDAC1 e a HDAC10. ⁽¹⁶⁾

Assim, diferentes HDAC podem alterar o *status* de acetilação Hsp90 em locais celulares distintos e como tal provavelmente para fins distintos. ⁽¹⁶⁾

A hiperacetilação que é induzida por inibição de HDAC anula a p23, proteínas clientes e locais de ligação ATP, e aumenta a ligação do domínio N de fármacos inibidoras. ⁽¹²⁾ A acetilação da Hsp90 também foi correlacionada com a diminuição da ligação a ATP. ⁽¹⁶⁾

4.3 Nitrosilação

A S-nitrosilação é uma modificação covalente de tióis de cisteína reativas em proteínas pelo óxido nítrico (NO). As Hsp90 de mamíferos são um alvo da S-nitrosilação mediada por NO

produzido pelas proteínas cliente, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). A S-nitrosilação foi reportada como sendo um regulador negativo que inibe a atividade ATPase da Hsp90. ⁽¹⁶⁾ Estudos mostram que NO causa S-nitrosilação da Hsp90 α humana em células endoteliais, e que esta modificação, que inibe a atividade da chaperona, ocorre no domínio C da Hsp90 α da Cys-597. ⁽¹⁶⁾

Nitrosilação-S de Cys-597 inibe a atividade da Hsp90 ATPase, confirmando que as modificações estruturais induzidas por fatores ambientais podem ser propagadas entre os domínios espacialmente distantes da Hsp90. É intrigante especular que uma parte da atividade anti-tumoral de NO pode reflectir a inibição da Hsp90 mediada pelo NO em células cancerosas. ⁽¹⁶⁾

5. Mediadores apópticos

As células mamíferas normais exercem um programa intrínseco que suprime a proliferação ilimitada ⁽⁹⁾, algo que não se verifica em células tumorais.

Vias de sinalização anti crescimento comprometidas podem ser difundidas na generalidade das células cancerígenas humanas obtendo assim a sua independência proliferativa.

A apoptose é um programa de morte celular altamente regulado desencadeada por uma diversidade de stresses celulares. ⁽⁸⁾ e que tem sido estabelecida como o mecanismo anti-proliferativo *major* que atua como uma barreira natural para o desenvolvimento do cancro. ⁽⁹⁾

O membro fundamental do sistema apóptico é a proteína supressora tumoral p53. ⁽⁹⁾ Como factor de transcrição, o p53 é activado em resposta a stresses indutores de danos no DNA. Uma vez ativo, o p53 induz paragem do ciclo celular até as condições estarem normalizadas ou apoptose se os stresses induzidos forem demasiado grandes ou se os danos forem irreparáveis. ^[8,9]

6. Inibidores de Hsp90 e doenças humanas

Eficácia terapêutica reflectida no benefício clínico é determinada não só pela actividade anticancerígena imediata como também pela rapidez e frequência pelo qual a resistência ocorre. A actividade e resistência estão intrinsecamente interligados. Quanto maior a “morte” de uma população de células tumorais atingidas por um determinado fármaco, menor a população tumoral existente no qual pode desenvolver resistência. Como tal,

mesmo se um composto exercer um efeito anticancerígeno relativamente fraco, se for bem tolerado e a resistência não ocorrer, ainda poderá ser considerado um agente altamente eficaz. ⁽¹²⁾

Cancro enquanto monoclonal na origem, têm elevadas taxas come mutação e são comumente aneuplóides. ⁽¹⁰⁾ A inibição da Hsp90 foi relacionada ao aumento do desenvolvimento de aneuploides que supostamente proporciona uma vantagem adaptativa, aumentando a diversidade genética em populações sob stress. ⁽¹⁰⁾ Estas doenças não são estáticas e os seus condutores genéticos não são limitados a um conjunto de alvos definidos. Ao invés, os tumores são compostos por populações heterogéneas, e abrigam algumas células que são altamente capazes de se adaptar e evitar as defesas do hospedeiro e de resistir a intervenções terapêuticas. As intensas pressões selectivas impostas sobre as células cancerígenas pelo ambiente hospedeiro impulsionam a evolução destas células ao longo de múltiplos caminhos. ⁽¹⁰⁾

Grande parte do entusiasmo em torno do desenvolvimento de inibidores de Hsp90 surge do seu potencial para alcançar o que muitos agentes antineoplásicos moleculares usados em terapias-alvo não conseguem: a interrupção simultânea de múltiplas vias de sinalização celular que são essenciais para a proliferação dos tumores e a sua sobrevivência. ⁽¹⁰⁾ Dadas as evidências, é seguro dizer que a função de Hsp90 está intimamente relacionado com a saúde humana.

Um número considerável de relatórios sugere que desempenha um papel crucial na progressão da doença. ⁽⁵⁾ Por exemplo, a sua expressão é de 2 a 10 vezes superior em células tumorais do que em células normais ^[5,14]. Portanto, emergiu como um alvo importante em várias doenças sendo desenvolvidos numerosos inibidores naturais e sintéticos nos últimos anos. ⁽⁵⁾

No entanto a actividade dos agentes únicos para inibidores de Hsp90, tem sido, infelizmente, modesto em tratamentos de tumores refractários e recorrentes na maioria dos estudos publicados até à data. ⁽¹⁰⁾

7. Hsp90 na clínica

7.1 Geldanamicina (GA)

Geldanamicina (GA), uma benzoquinona ansamicina, foi o primeiro da classe natural de inibidores Hsp90 a ser descoberta e substancialmente estudada. ⁽³⁾ Estudos estruturais e

bioquímicos demonstraram que a GA é um inibidor competitivo para o local de ligação da Hsp90. [3,6] ligando-se ao sítio de ligação do ATP no domínio-N evitando assim a alteração conformacional da Hsp90. [5] Estudos revelam que este demonstra maior actividade citotóxica em células tumorais do que em células normais e ainda que é sequestrado em concentrações mais elevadas para o interior dos tumores como demonstrado em xenoinxertos de modelos animais. [11]

Apesar dos resultados marcantes em culturas de células, tem uma atividade muito baixa em modelos animais pré-clínicos devido á instabilidade metabólica e devido ao limite da dose que causa hepatotoxicidade. [3,10] Para melhorar a tolerabilidade e responder a dificuldades de formulação, vários derivados semi-sintéticos da geldanamicina têm vindo a ser desenvolvidos, entre eles 17-AAG e 17-DMAG. [10]

Geldanamicina interfere com a função de Hsp90 e gera degradação proteossomal de várias proteínas reguladoras chave, incluindo tirosina cinases e recetores de esteróides, muitos dos quais estão envolvidos na promoção da neoplasia. Este ligando natural, também causa diferenciação e apoptose e a sua afinidade para os complexos de Hsp90 a partir de células tumorais é de 100 vezes maior em células tumorais do que em células não tumorais. [6]

7.2. Radicicol

O Radicicol (também conhecido como monorden) é outro produto natural inibidor da Hsp90, trata-se de um macrólido de 14 membros, originalmente isolada de *Monosporium bonorden*. O Radicicol atua como um composto que imita nucleótidos e ocupa a bolsa de ligação do ATP, mas com uma afinidade muito mais elevada do que o ATP. Estudos *in vitro* têm mostrado que radicicol tem efeitos antiproliferativos potentes. No entanto, estudos *in vivo* não revelam atividades anti-tumorais, o que é provavelmente devido á sua baixa estabilidade biológica. [5]

O Radicicol, tal como a geldanamicina, é inativo *in vivo*, devido à sua instabilidade no soro e não têm propriedades farmacológicas aceitáveis para aplicação clínica. Por outro lado, os derivados de oxima de radicicol possuem atividade antitumoral potente *in vivo* através da desestabilização da ligação de Hsp90 com proteínas específicas cliente. Derivados de oxima são mais estáveis do que as do radicicol, não causando toxicidade hepática grave e funcionam tanto *in vivo* e *in vitro*. [6]

Mais compostos com melhor actividade inibitória e baixa toxicidade estão actualmente a ser concebidas e sintetizadas. [5]

Devido aos resultados limitados em tratamento usando somente inibidores Hsp90, há que explorar estratégias pelas quais se visa a função de Hsp90 como alvo em células cancerígenas podendo estas aumentar a actividade de outros fármacos anticancerígenos, ao mesmo tempo bloqueando a capacidade dos tumores de se adaptar e desenvolver resistência aos medicamentos, o resultado global seria uma maior eficiência no controle da doença. ⁽¹⁰⁾

7.3. Tanespimicina (I7-AAG)

A Tanespimicina, (*17-allylamino-17-desmethoxygeldanamycin*) foi o primeiro da classe de inibidores de Hsp90 a entrar em ensaios de fase I, no entanto depararam-se com os seguintes efeitos tóxicos: diarreia, náusea, vômitos, transaminases elevadas e fadiga. Inicialmente este derivado surte efeito mostrando indícios de toxicidade nos candidatos do ensaio no entanto não tem durabilidade e acaba por desaparecer.

Uma limitação proeminente do I7-AAG tem sido a formulação; esta requer um diluente que inclui fosfolípido de ovo e 4% DMSO, que poderá contribuir para toxicidade adicionais. ⁽¹⁰⁾

7.4. Ansamicinas solúveis em água: I7-DMAG alvespimicina e IPI-504

Para ultrapassar problemas relacionados com formulações, o I7-DMAG (*17-dimethylaminoethylamino-17-Demethoxygeldanamycin*) e IPI-504 foram desenvolvidos como análogos aquo-solúveis do I7-AAG. Além de uma maior solubilidade, o I7-DMAG é mais activo que o I7-AAG em modelos pré-clínicos e tem bioviabilidade oral. O I7-DMAG tem vindo a ser testado usando várias doses, horários e métodos de administração (i.e. oral ou I.V.). Embora respostas positivas têm sido observadas em cancro da próstata e melanomas, o desenvolvimento de I7-DMAG tem sido limitado pela apresentação de toxicidades como pneumonite, elevadas transaminases e alterações oculares. ⁽¹⁰⁾

IPI-504 (retaspimicina) é uma dihidroquinona derivada do I7-AAG que é solúvel em água. Em sistemas biológicos este é rapidamente oxidado para estabelecer um equilíbrio entre o composto mãe e o composto I7-AAG. Tem sido testado em ensaios clínicos de fase II e III, no entanto tal como acontece com I7-AAG e o I7-DMAG, a hepatotoxicidade tem sido a maior limitação no uso deste composto. ⁽¹⁰⁾

7.5. Inibidores de Hsp90 de segunda e terceira geração

Ainda existe uma grande dedicação, esforço e estudos a nível industrial e académicos em prol da descoberta de novos inibidores sintéticos de Hsp90. Várias destas novas classes de compostos estão presentemente a ser testados na esperança de evitar maior parte dos problemas decorrentes dos inibidores da primeira geração. Estes compostos ligam-se ao local N-terminal ATPase, mas de modo diferente que a geldanamicina, enquanto ainda previnem a chaperona de deambular entre as conformações ADP-ATP. Destes composto, os que se encontram em fases mais avançadas de desenvolvimento são o AUY922 (Novartis) e o ganetespib (STA-9090, Synta).⁽¹⁰⁾

7.5.1. AUY922

Efeitos adversos comuns deste composto incluem diarreia, fadiga, náusea e vómitos. Toxicidade ocular tem sido o mais problemático, mas felizmente têm sido relativamente leves e reversíveis. Estes incluem visão turva, escurecimento da vista e acomodação retardada entre escuro e claridade. Apesar de alguns resultados positivos em ensaios de fase I – doença estabilizada – a Pfizer levou à descontinuação de mais estudos relacionados com este composto.⁽¹⁰⁾

7.5.2. Ganetespib (STA-9090)

Ganetespib (STA-9090), já se encontra em ensaios clínicos de fase III. Em ensaios de fase I, a toxicidade apresentada foi semelhante á encontrada no AUY922, mas a toxicidade ocular tem sido menos frequente. Tem sido testada em pacientes com cancro da mama, gástrico, do colon e melanomas. O efeito adverso mais frequente tem sido diarreia, que tem sido controlada com agentes redutores da motilidade.⁽¹⁰⁾

8. Novas perspectivas terapêuticas

Muitos outros quimiotipos estão presentemente a serem desenvolvidos, tais como os compostos bio-disponíveis orais MPC3100 (Myriad Pharmaceuticals) e o NVP HSP990 (Novartis). Isto pode apresentar uma grande vantagem em relação a limitações de horários e doses que tem vindo a dificultar o desenvolvimento dos compostos que requerem

administração parenteral. Uma característica particularmente atraente da dosagem oral pode ser o potencial de inibição de Hsp90 mais sustentada. Isto pode ter particular relevância nos casos em que temos que combinar com outros compostos/medicamentos onde doses baixas mas sustentadas de Hsp90 são essenciais. Novos agentes tais como BIIB021 e Debio 0932 (anteriormente conhecido como CUDC-305), demonstram boa penetração no Sistema Nervoso Central (SNC) e tal característica pode expandir a sua gama de aplicações para incluir os tumores cerebrais primários, bem como metástases no SNC. ⁽¹⁰⁾

Derivados do antibiótico cumarínico Novobiocina representam uma estratégia alternativa única pois inibem a Hsp90 tendo como alvo o domínio C-terminal ⁽¹²⁾ e induzem degradação das proteínas clientes da Hsp90. ⁽¹⁷⁾ Embora todos os inibidores de Hsp90 atualmente na clínica reconheçam a bolsa de ligação ATP no domínio N da chaperona, o domínio-C da Hsp90 podem também ser alvo de fármacos, tais como os antibióticos cumarínicos, novobiocina, clorobiocina e coumermicina AI. A inibição da Hsp90 pela Novobiocina induziu respostas celulares semelhantes aos inibidores N-terminal. ⁽³⁾ No entanto, a baixa afinidade destes compostos para Hsp90, juntamente com a sua maior afinidade para as topoisomerasas do tipo II, excluiu a sua avaliação posterior como inibidores de Hsp90 clinicamente úteis. ⁽¹²⁾

9. Hsp90 e Quimioterapia

O conceito de combinação de medicamentos de modo a aumentar a probabilidade de sucesso de cura já se encontra bem estabelecida ao longo da história de tratamento de infeções microbianas e de cancro. ⁽¹⁰⁾

Dada esta longa tradição, a ideia da combinação de inibidores de Hsp90 com outros medicamentos para criar regimes de quimioterapia mais eficazes está longe de ser radical. A novidade reside na possibilidade de que a Hsp90 pode proporcionar não só um novo alvo molecular, mas também e pela primeira vez, proporcionar um meio farmacológico pelo qual pode atacar intrinsecamente a evolução dos cancros. ⁽¹⁰⁾

Estudos pré-clínicos e clínicos recentes exploraram os efeitos de uma combinação de inibidores Hsp90 e outros agentes anti-cancerígenos na terapia do cancro. Com base nos diferentes mecanismos terapêuticos dos medicamentos anti-cancerígenos convencionais, os inibidores de Hsp90 exerceram efeitos diferentes nestes estudos combinatórios. Na maioria dos casos foram observados efeitos aditivos ou sinérgicos na altura de matar células cancerígenas quando combinados com a maioria dos agentes citotóxicos convencionais. ⁽³⁾

A combinação terapêutica de Hsp90 e outros medicamentos estão de momento em ensaios clínicos de fase II. Um estudo recente de fase II, com I7-AAG e trastuzumab, mostra que esta combinação tem actividade anticancerígena significativa em pacientes com cancro da mama metástico HER2-positivo. ⁽³⁾

Os resultados interessantes obtidos com I7-AAG e trastuzumab no tratamento do cancro da mama resistentes a trastuzumab, combinado com os outros ensaios pré-clínicos de Hsp90 em roedores, sugere que muitos mais ensaios clínicos serão tentados num futuro próximo. ⁽³⁾

10. eHsp90: Novo Alvo na Terapia do Cancro

Apesar de milhares de publicações relativos a funções de chaperonas Hsp90 citosólica, descobriu-se recentemente que a Hsp90 também está localizada nas mitocôndrias. Esta nova localização para Hsp90 é predominantemente observado em cancros, onde desempenha um papel crítico na regulação dos clientes que supervisionam a homeostase mitocondrial e sobrevivência. ⁽¹³⁾

A Hsp90 foi reportado por participar em vários processos fisiológicos e fisiopatológicas, tais como a cicatrização de feridas, angiogénese, rearranjo celular no mesênquima craniano durante neurulação, activação de monócitos, macrófagos e células dendríticas, bem como invasão tumoral e metástases. ⁽¹⁴⁾

Ao longo da última década, um lado mais sinistro da eHsp90 surgiu, revelando um papel para a eHsp90 na malignidade. Enquanto estudos anteriores caracterizavam eHsp90 como uma proteína capaz de alertar o sistema imunitário do hospedeiro para o perigo, uma avalanche de resultados subsequentes apoiaram o conceito de que eHsp90 promove a progressão do tumor. ⁽¹³⁾

Em tecidos normais, a função de eHsp90 é o de "reparar", caso contrário eHsp90 não, existiria se a reparação dos tecidos não fosse necessária. Esta propriedade única de eHsp90 difere da chaperona intracelular, que desempenha papéis igualmente importantes em células normais e cancerígenas. Portanto, essa característica concede a eHsp90 o *status* de um alvo ideal para a terapia de alguns tipos de cancro que constitutivamente sobreexpressam Hsp90. ⁽¹⁴⁾

Mais evidências do papel alargado da eHsp90 na tumorigénese são fornecidas pela sua frequente detecção na superfície de diversos tumores, incluindo fibrosarcoma, da mama, melanoma, do ovário e neuroblastoma. ⁽¹³⁾ Como tal o que se verifica são níveis mais altos de eHsp90 em pacientes com cancro. ⁽¹⁴⁾

A expressão disseminada da eHsp90 nos diversos cancros prediz uma função importante. De acordo com esta previsão, eHsp90 emergiu como um regulador fulcral da motilidade celular nos tumores, invasão e metástase. ⁽¹³⁾

Estudos apoiam por unanimidade a conclusão que o bloqueio da função eHsp90 prejudica profundamente a invasão tumoral e metástase, resultados que reforçam o papel fundamental da eHsp90 em cancros. Tendo em conta que as metástases tumorais causam a maioria das mortes relacionadas com cancro, uma compreensão de como eHsp90 pode regular esses processos tem elevada relevância clínica. ⁽¹³⁾

A inibição da eHsp90 em ratinhos para metástases revelou benefício na sobrevivência e metástases reduzidas sugerindo o potencial clínico para inibir as funções da Hsp90 extracelular, sem afetar as suas funções intracelulares. ⁽¹⁵⁾

Dado que a hipoxia em lesões é concebido para desencadear a reparação vascular, não é surpreendente que eHsp90, e em particular eHsp90 α , afecta uma grande variedade de tipos de células associadas com o desenvolvimento vascular. Um relatório inicial indicou que eHsp90 modulava eventos de sinalização celular em células de músculo liso vascular (VSMC), enquanto um relatório subsequente mostrou que eHsp90 promoveu a motilidade das células endoteliais microvasculares humanas (HMECs) e aumentou a formação de túbulos. ⁽¹³⁾

Outros estudos demonstraram que a isoforma alfa (mas não beta) da Hsp90 é encontrada na superfície de células de fibrossarcoma HT1080 e que a sua inibição reduz a capacidade de invasão de células e migração. ⁽¹⁵⁾

Este resultado indica que múltiplos estímulos que coexistem dentro do microambiente da ferida estimulam o reforço de mecanismos para garantir secreção de Hsp90 e subsequente reparação da vasculatura danificada. ⁽¹³⁾

A regulação dependente de eHsp90 da motilidade celular e invasão é de longe o seu papel mais proeminente, com destaque para a sua função fundamental em modelos de migração induzida por lesões e cancro. ⁽¹³⁾

Enquanto eHsp90 pode possuir funções de supressor tumoral intrínsecas, o microambiente do tumor, sem dúvida, sequestra funções pró-inflamatórias do eHsp90, transformando eHsp90 num dos principais motores da progressão do tumor. ⁽¹³⁾

Embora esses estudos tenham ampliado o repertório de clientes eHsp90, a compreensão em torno dos seus novos processos relevantes relativamente ao cancro permanece incompleta. Identificar e validar novos clientes extracelulares para eHsp90 e determinar os seus papéis na progressão do cancro e metástases trará novas informações quanto a um

design ideal de fármacos eHsp90 para reduzir a metástase e estabelecer um biomarcador de soro para a eficácia da droga. ⁽¹⁵⁾

II. Conclusão

É evidente que a Hsp90 desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase da proteína no cancro.

A inibição da Hsp90 revela ser uma grande promessa no tratamento de uma ampla variedade de tumores sólidos e hematológicos.

A vantagem mais atrativa na terapêutica alvo da Hsp90 é o impacto combinado das várias vias oncogénicas envolvidas em múltiplos passos de carcinogénese e progressão do cancro e como a inibição Hsp90, leva eventualmente, à degradação ubiquitina-proteassoma de uma grande população de proteínas cliente oncogénicos.

Até agora, nenhum inibidor Hsp90 passou em testes clínicos e recebeu uma aprovação regulamentar para tratamentos em cancro. Os ensaios, tanto foram encerrados em fases tardias como em fases iniciais.

Uma vez que, é provável que a toxicidade limite da dose seja um problema importante no uso dos inibidores de Hsp90 como agentes isolados, uma abordagem alternativa para a aplicação da inibição Hsp90 é combinar inibidores de Hsp90 com os outros agentes terapêuticos, para melhorar a eficácia reduzindo assim a dose limite de toxicidade. Esta perspectiva, é apoiada por um grande número de avaliações clínicas e pré-clínicas de inibidores Hsp90 que têm demonstrado resultados promissores na combinação de medicamentos quimioterápicos ou outros agentes.

Em resumo, o direcionamento de Hsp90 para uma terapêutica anti tumoral tem um futuro potencialmente brilhante. Os últimos progressos no desenvolvimento de inibidores Hsp90 e uma compreensão mais aprofundada das características das Hsp90 reforçam ainda mais a sua participação benéfica na terapia contra o cancro.

No entanto, mais estudos são necessários para investigar se chegou uma nova era para as proteínas Hsp90.

12. Referências bibliográficas

1. http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/index.html (consultado a 20/05/2014)
2. <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/world/> (consultado a 20/05/2014)
3. Li Y, Zhang T, Schwartz SJ, Sun D. New developments in Hsp90 inhibitors as anti-cancer therapeutics: mechanisms, clinical perspective and more potential. *Drug Resist Updat.* 2009 Feb-Apr;12(1-2):17-27.
4. Hance MW, Nolan KD, Isaacs JS. The double-edged sword: conserved functions of extracellular Hsp90 in wound healing and cancer. *Cancers (Basel).* 2014 May 6;6(2):1065-97.
5. Li J, Buchner J. Structure, function and regulation of the Hsp90 machinery. *Biomed J.* 2013 May-Jun;36(3):106-17.
6. Gava L, Ramos C. Human 90 kDa Heat Shock Protein Hsp90 as a Target for Cancer Therapeutics. *Current Chemical Biology* 12/2008; 3(1):10-21.
7. Wang Y, Giaccone G. Challenges in cancer molecular targets and therapeutics. *Front Oncol.* 2011 May 2;1:4.
8. Mahalingam D, Swords R, Carew JS, Nawrocki ST, Bhalla K, Giles FJ. Targeting Hsp90 for cancer therapy. *Br J Cancer.* 2009 May 19;100(10):1523-9.
9. Miyata Y, Nakamoto H, Neckers L. The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks. *Curr Pharm Des.* 2013;19(3):347-65.
10. Whitesell L, Santagata S, Lin NU. Inhibiting Hsp90 to treat cancer: a strategy in evolution. *Curr Mol Med.* 2012 Nov 1;12(9):1108-24.
11. Woodhead AJ, Angove H, Carr MG, Chessari G, Congreve M, Coyle JE, et al. Discovery of (2,4-dihydroxy-5-isopropylphenyl)-[5-(4-methylpiperazin-1-ylmethyl)-1,3-dihydroisoindol-2-yl]methanone (AT13387), a novel inhibitor of the molecular chaperone Hsp90 by fragment based drug design. *J Med Chem.* 2010 Aug 26;53(16):5956-69.
12. Trepel J, Mollapour M, Giaccone G, Neckers L. Targeting the dynamic Hsp90 complex in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010 Aug;10(8):537-49.
13. Hance MW, Nolan KD, Isaacs JS. The double-edged sword: conserved functions of extracellular Hsp90 in wound healing and cancer. *Cancers (Basel).* 2014 May 6;6(2):1065-97.

14. Li W, Tsen F, Sahu D, Bhatia A, Chen M, Multhoff G, Woodley DT. Extracellular Hsp90 (eHsp90) as the actual target in clinical trials: intentionally or unintentionally. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2013;303:203-35.
15. McCready J, Wong DS, Burlison JA, Ying W, Jay DG. An Impermeant Ganetespib Analog Inhibits Extracellular Hsp90-Mediated Cancer Cell Migration that Involves Lysyl Oxidase 2-like Protein. *Cancers (Basel).* 2014 Apr 30;6(2):1031-46.
16. Mollapour M, Neckers L. Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Mar;1823(3):648-55.
17. Donnelly A, Blagg BS. Novobiocin and additional inhibitors of the Hsp90 C-terminal nucleotide-binding pocket. *Curr Med Chem.* 2008;15(26):2702-17.
18. Lu X, Xiao L, Wang L, Ruden DM. Hsp90 inhibitors and drug resistance in cancer: the potential benefits of combination therapies of Hsp90 inhibitors and other anti-cancer drugs. *Biochem Pharmacol.* 2012 Apr 15;83(8):995-1004.

