

Ricardo Chaves Quintino

INIBIÇÃO DO SISTEMA ENZIMÁTICO UBIQUITINA PROTEOSSOMA NO TRATAMENTO DO CANCRO

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Maria Luísa Vaz Sá Melo e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ricardo Chaves Quintino, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009010655, 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, 18 de julho de 2014.

(Ricardo Chaves Quintino)

Aos meus pais e irmãs,

Agradecimentos

Aos amigos de sempre, com quem sempre pude contar.

À Professora Doutora Maria Luísa Vaz Sá Melo, por todo o suporte e dedicação.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela formação de excelência que dela recebi.

Índice

Resumo	1
Abstract	2
Lista de abreviaturas	3
1. Sistema enzimático ubiquitina proteossoma	4
2. Inibidores das 20S CP peptidases	7
2.1. Inibidores covalentes reversíveis.....	8
2.1.1. Aldeídos peptídicos.....	8
2.1.2. Boronatos peptídicos	8
2.1.3. β -lactonas	12
2.2. Inibidores covalentes irreversíveis.....	12
2.2.1. β -lactonas	12
2.2.2. α,β -epoxicetonas peptídicas.....	13
2.3. Inibidores específicos do imunoproteossoma	16
2.4. Vantagens e desvantagens dos inibidores do proteossoma	18
2.5. Mecanismos de resistência	19
3. Inibidores da conjugação da ubiquitina.....	20
3.1. Inibidores da enzima de ativação da ubiquitina.....	20
3.2. Inibidores da enzima de conjugação da ubiquitina.....	21
4. Sumoilação	22
5. Outros alvos moleculares	23
6. Avanços futuros.....	24
7. Bibliografia.....	25

Índice de figuras

Figura 1 – Representação esquemática do sistema ubiquitina proteossoma	4
Figura 2 – Estrutura do proteossoma 26S	5
Figura 3 – Estrutura do MG-132	8
Figura 4 – Mecanismo de inibição do proteossoma pelos boronatos	9
Figura 5 – Estrutura do bortezomib	10
Figura 6 – Estrutura do ixazomib e do MLN-2238	11
Figura 7 – Estrutura do delanzomib	12
Figura 8 – Estrutura do PS-519	12
Figura 9 – Estrutura do omuralide e do marizomib	13
Figura 10 – Mecanismo de inibição do proteossoma pelas epoxicetonas	14
Figura 11 – Estrutura da epoximicina, carfilzomib e oprozomib	15
Figura 12 – Estrutura do PR-924 e do IPSI-001	17
Figura 13 – Estrutura do PYR-41, PYZD-4409 e CC0651	21

Resumo

O cancro é um flagelo a nível mundial, sendo uma das doenças que apresenta maior taxa de mortalidade.

A nível celular a apoptose é regulada pelas atividades opostas entre as moléculas anti-apoptóticas e pro-apoptóticas. As células cancerosas frequentemente desregulam estas vias de sinalização, com aumento de proteínas anti-apoptóticas que lhes concedem uma vantagem na sobrevivência e na resistência aos agentes antitumorais.

O sistema ubiquitina proteossoma é uma das peças fundamentais na homeostasia proteica contribuindo para a regulação do desenvolvimento e da diferenciação celular. Portanto alterações nas funções desta via resultam em paragem no crescimento e morte celular devido à indução da cascata da apoptose, como resultado da rápida acumulação de proteínas no interior da célula.

Os inibidores do proteossoma são agentes terapêuticos muito promissores no tratamento de alguns tipos de cancro, tais como, mieloma múltiplo, linfomas, tumores sólidos mas não só, também doenças neurodegenerativas, doenças imunológicas e infeções microbianas. O conhecimento das vias de sinalização associadas ao sistema ubiquitina proteossoma permite, desta forma, um *design* racional de novos fármacos. Com base na sua especificidade de ligação é possível direcionar a terapêutica para o proteossoma diminuindo assim os efeitos secundários, tantas vezes associados aos fármacos citotóxicos.

Palavras-chave: cancro, mieloma múltiplo, bortezomib, proteossoma, ubiquitina, apoptose, inibidores do proteossoma.

Abstract

Cancer is a worldwide flagellum, being one of the diseases that has the highest mortality rate.

In cells, apoptosis is regulated by the opposing activities between anti-apoptotic and pro-apoptotic molecules. Often cancer cells disrupt signaling pathways increasing the anti-apoptotic proteins that give them an advantage in survival and resistance to antitumor agents.

The ubiquitin-proteasome system a vital key in protein homeostasis contributes to the regulation of cellular development and differentiation. Therefore changes in the functions of this pathway results in growth arrest and cell death due to the induction of apoptosis cascade as a result of rapid accumulation of proteins within the cell.

Proteasome's inhibitors are very promising therapeutic agents in the treatment of some type of cancers such as multiple myeloma, lymphoma, solid tumours, but also neurodegenerative diseases, immunological disorders and microbial infections. The knowledge of the signaling pathways associated with the ubiquitin proteasome system allows a rational design of new drugs. Based on their binding specificity it is possible to direct the therapeutic to proteasome reducing the side effects associated with cytotoxic drugs.

Keywords: cancer, multiple myeloma, bortezomib, proteasome, ubiquitin, apoptosis, proteasome's inhibitors.

Lista de abreviaturas

ATP	Adenosina trifosfato
CP	<i>Core particle</i>
E1	Enzima ativadora de ubiquitina
E2	Enzima conjugadora de ubiquitina
E3	Enzima ubiquitina ligase
EC	Ensaio clínico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FNT- α	Fator de Necrose Tumoral α
HDAC	Histona desacetilases
IPs	Inibidores do proteossoma
IPSI	<i>Immunoproteasome specific inhibitors</i>
I κ B α	Inibidor do fator nuclear kappa B
MHC	Complexo <i>major</i> de histocompatibilidade
MM	Mieloma múltiplo
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
PCT90	Proteína de choque térmico 90
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
SUP	Sistema ubiquitina proteossoma
ULP	<i>Ubiquitin-like preotein</i>

I. Sistema enzimático ubiquitina proteossoma

A nível celular existem dois grandes sistemas de degradação proteica, o proteossoma e o lisossoma. O proteossoma controla a degradação de proteínas intracelulares enquanto o sistema de autofagia lisossomal degrada as proteínas extracelulares incorporadas pela célula por endocitose ou pinocitose [1, 2].

O sistema ubiquitina proteossoma (SUP) representa a maior via de degradação proteica, estando implicado na degradação de 80% das proteínas celulares nomeadamente proteínas deformadas, mutadas, bem como, as implicadas na regulação do ciclo celular, desenvolvimento, diferenciação, proliferação, apoptose, sinalização celular, transcrição e transdução de sinais celulares, resposta imune e apresentação de antígenos [2-4].

As proteínas são degradadas pela via ubiquitina proteossoma por dois passos sucessivos e distintos: a ligação covalente de múltiplos monómeros de ubiquitina à proteína em causa e a degradação da proteína pré-sinalizada pela subunidade 20S do proteossoma [3].

Inicialmente, uma molécula de ubiquitina, pequena proteína constituída por 76 aminoácidos, é ativada formando uma ligação tioéster entre a cisteína da cadeia lateral da enzima ativadora de ubiquitina (E1) e a parte C-terminal de uma molécula de ubiquitina, passo este que é dependente de adenosina trifosfato (ATP). A ubiquitina ativada pela E1 é então transferida para um outro resíduo de cisteína de uma enzima conjugadora de ubiquitina (E2). As E2, por sua vez, associam-se a um grupo de enzimas ubiquitina ligase (E3) formando um complexo E2-E3 denominado de ubiquitina ligase. Este complexo liga-se a sinais específicos de degradação em proteínas, tais como, aminoácidos oxidados ou anormais, e auxilia a E2 a formar uma cadeia de poliubiquitina ligada a uma lisina no substrato proteico a sinalizar. Esta cadeia de poliubiquitina atua como um marcador que sinaliza e direciona a proteína para degradação no proteossoma [3-5].

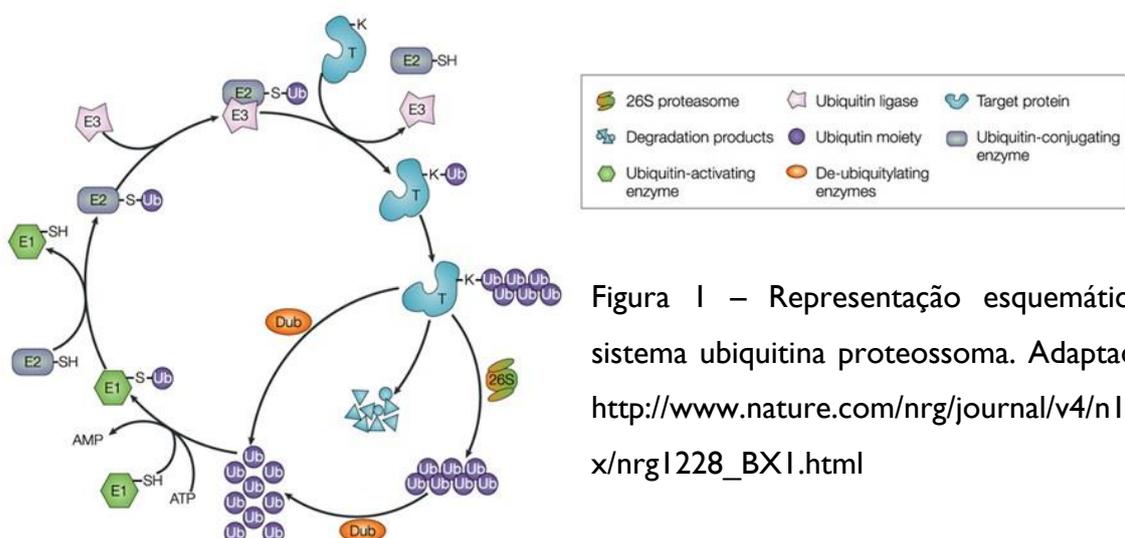


Figura I – Representação esquemática do sistema ubiquitina proteossoma. Adaptado de http://www.nature.com/nrg/journal/v4/n12/box/nrg1228_BX1.html

Este mecanismo tem como função reconhecer e degradar proteínas estruturalmente mal dobradas, ou com outros tipos de anormalidades, tais como, resíduos hidrofóbicos à superfície. Além destas, tem ainda como função controlar o tempo de semivida de algumas proteínas específicas, cuja concentração varia repentinamente durante determinados processos celulares, como por exemplo com as ciclinas, proteínas que controlam a mitose do ciclo celular [4].

O proteossoma constitutivo, também denominado 26S, é um complexo multiproteico com 2,5 MDa constituído por um conjunto de proteínas com mais de 450 Å, que degrada proteínas ubiquitinadas e é encontrado no núcleo e no citoplasma de todas as células eucarióticas. Este é composto por um núcleo catalítico, a subunidade 20S, limitado por duas partículas reguladoras, as subunidades 19S, uma em cada extremidade. A subunidade 20S é o núcleo catalítico ou *core particle* (CP) do proteossoma e é formado por 28 subunidades agrupadas em quatro anéis empilhados, criando uma cavidade central onde ocorre a proteólise. Os dois anéis exteriores são compostos por sete subunidades α diferentes, as quais são predominantemente estruturais, e os dois anéis interiores são compostos por sete subunidades β diferentes, as quais, pelo menos três delas contêm locais catalíticos. Os substratos têm acesso à cavidade proteolítica através da ligação à partícula reguladora 19S e esta, por sua vez, reconhece os substratos marcados com ubiquitina e encaminha-os para a proteólise que ocorre no interior da subunidade 20S do proteossoma [2, 3, 6].

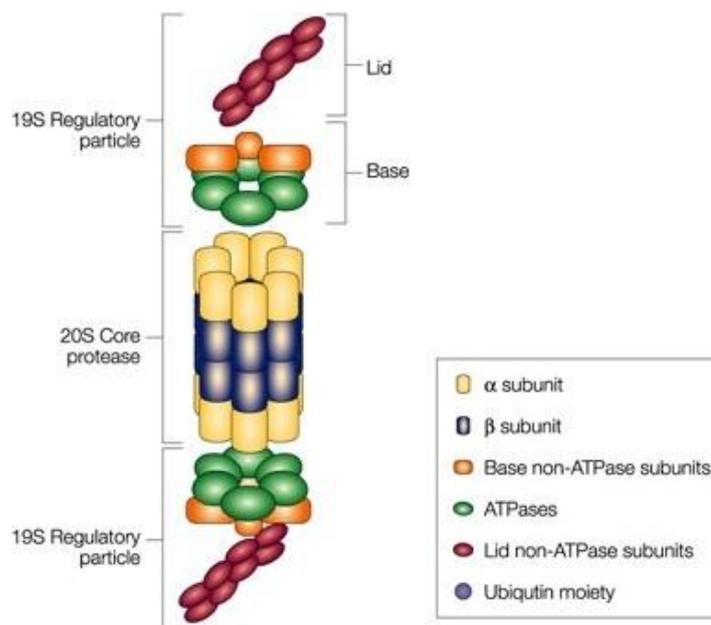


Figura 2 – Estrutura do proteossoma 26S.

Adaptado de http://www.nature.com/nrg/journal/v4/n12/box/nrg1228_BX2.html

As atividades catalíticas do proteossoma são classificadas em três grandes categorias, baseadas na preferência de clivagem da ligação peptídica após um determinado resíduo de um aminoácido. Estas atividades são referidas como *chymotrypsin-like*, cliva resíduos hidrofóbicos, *trypsin-like*, cliva resíduos alcalinos e *caspase-like*, cliva resíduos ácidos, e estão associadas às subunidades $\beta 5$, $\beta 2$ e $\beta 1$, respetivamente [7, 8].

Está descrita uma isoforma alternativa do proteossoma, conhecido como o imunoproteossoma que pode ser formado em resposta à sinalização por citocinas. O interferão γ e o fator de necrose tumoral α (FNT- α) induzem a expressão de um conjunto diferente de subunidades β catalíticas e de subunidades 19S para formarem o imunoproteossoma. As subunidades $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL1) e $\beta 5i$ (LMP7) substituem as subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ do proteossoma constitutivo e a partícula reguladora 19S é substituída por uma estrutura semelhante, a 11S. Estas modificações permitem ao imunoproteossoma gerar peptídeos antigénicos para apresentação pelo complexo *major* de histocompatibilidade (MHC) classe I mediando a resposta imunológica. A expressão deste tipo de proteossoma parece ser específico de alguns tecidos e é particularmente abundante nas células do sistema imunológico. Assim, o imunoproteossoma é altamente expresso nos tumores hematopoiéticos como no mieloma múltiplo (MM) [3, 8].

As células do epitélio cortical do timo expressam o timoproteossoma, uma estrutura muito relacionada com o imunoproteossoma, no qual a subunidade $\beta 5i$ é substituída por uma subunidade, a $\beta 5t$ [7, 9].

A homeostasia proteica desempenha um papel crucial no normal funcionamento celular e, como tal, alterações nesta via metabólica contribuem para vários distúrbios patológicos incluindo a inflamação, e têm vindo a ser associados a patologias como o cancro, a síndrome da imunodeficiência humana, doenças neurodegenerativas e autoimunes, mas também o envelhecimento. Desta forma, como o SUP desempenha um papel crucial na regulação de muitos processos celulares, a inibição da função do proteossoma mostra-se uma estratégia viável no tratamento do cancro [2, 3].

Está descrito que as células neoplásicas apresentam elevados níveis de atividade do proteossoma e são mais suscetíveis aos inibidores do proteossoma (IPs) do que as células normais. Adicionalmente, tem vindo a ser sugerido que a atividade do proteossoma é essencial para a proliferação tumoral e para o desenvolvimento de resistência aos fármacos antitumorais [3].

2. Inibidores das 20S CP peptidases

Os IPs foram, inicialmente, sintetizados como sondas para investigar a função da atividade catalítica do proteossoma, contudo, assim que o papel essencial do proteossoma nas funções celulares foi estabelecido, o proteossoma surgiu como um alvo atrativo para o tratamento do cancro [3].

Estudos preliminares mostraram que os IPs induziam a apoptose em linhas celulares de leucemia e investigações adicionais demonstraram que estes inibidores exibiam um amplo espectro de atividades antiproliferativas e pro-apoptóticas contra tumores sólidos e hematológicos [3].

Muitos compostos disponíveis foram limitados a estudos laboratoriais devido à sua insuficiente potência, especificidade ou estabilidade. Isto conduziu ao desenvolvimento das séries dos boronatos peptídicos, dos quais, entre os muitos que foram testados, surgiu o bortezomib. Com base na sua citotoxicidade, foi submetido a testes adicionais e posteriormente, a ensaios clínicos (EC) [3].

O mecanismo geral dos inibidores das 20S CP peptidases tem por base o facto de todos os locais ativos do proteossoma clivarem ligações peptídicas por um mecanismo no qual o grupo hidroxilo da treonina N-terminal do local catalítico funciona como o nucleófilo catalítico. Deste modo, a inativação dos locais ativos da subunidade $\beta 5$ através de uma modificação na sua treonina catalítica retarda significativamente o crescimento, aumenta a suscetibilidade para o aumento na produção de proteínas anormais e causa acumulação de todos os substratos degradados pelo proteossoma. Porém, modificações similares na treonina catalítica da subunidade $\beta 1$ não causam defeitos fenotípicos, nem levam à acumulação de substratos proteicos. A inativação da subunidade $\beta 2$ reduz levemente a taxa de crescimento e reduz a taxa de degradação proteica, em modelos laboratoriais. Assim, as subunidades $\beta 5$ são os locais mais importantes de clivagem proteica, consequentemente os mais relevantes para o desenvolvimento de inibidores, já os locais catalíticos das subunidades $\beta 1$, aparentemente são funcionalmente redundantes [9].

2.1. Inibidores covalentes reversíveis

2.1.1. Aldeídos peptídicos

Os aldeídos peptídicos foram os primeiros IPs a ser desenvolvidos e, devido ao seu baixo custo, são ainda largamente utilizados. Estes potentes inibidores reversíveis bloqueiam o proteossoma através da formação de um hemiacetal com o grupo hidroxilo da treonina dos locais ativos. Contudo os aldeídos apresentam uma desvantagem pois são simultaneamente inibidores das serina e cisteína proteases [9].

O composto MG-132 é um potente aldeído peptídico sintético com capacidade de atravessar a membrana citoplasmática das células. Este composto representa o primeiro aldeído peptídico que permeia células vivas e inibe seletiva e reversivelmente a atividade proteolítica do proteossoma [2].

Os aldeídos são oxidados rapidamente *in vivo* e não tem atividade sistêmica quando usados em modelos animais. Um avanço interessante para contornar este problema consistiu em sintetizar profarmacos, na forma de semicarbazonas, contudo ainda são necessárias melhorias substanciais na especificidade e na potência destes profarmacos antes de os poder usar como ferramentas para pesquisa de novos agentes terapêuticos [9].

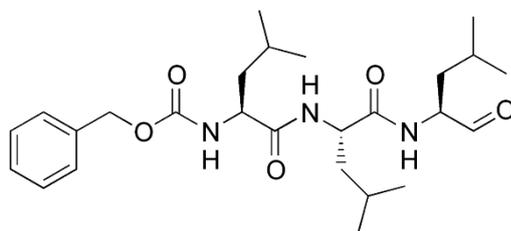


Figura 3 – Estrutura do MG-132. Retirado de <http://www.lifesensors.com/img.php?f=SI9710.jpg&w=242&h=117>

2.1.2. Boronatos peptídicos

Os boronatos peptídicos formam adutos tetraédricos com a treonina do local ativo, os quais são estabilizados através da ligação hidrogênio entre o grupo amina N-terminal da treonina e um dos grupos hidroxilo do ácido borônico [9].

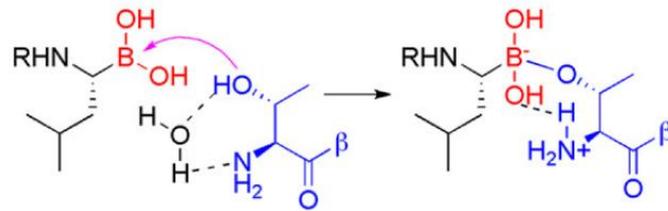


Figura 4 – Mecanismo de inibição do proteossoma pelos boronatos. Adaptado de [9].

O bortezomib (VELCADE[®], Millennium Pharmaceuticals, Inc.) foi o primeiro medicamento inibidor do proteossoma que entrou na prática clínica aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), em 2003, em monoterapia para tratar doentes refratários com MM. Em 2008 obteve a sua aprovação definitiva e foi alargada a sua utilização à terapêutica de primeira linha em combinação com o melfalano e a prednisolona. Atualmente é usado como terapêutica de rotina em doentes com MM e para o tratamento do linfoma das células do manto e teve um grande impacto no alargamento das opções terapêuticas nos últimos anos [10]. Embora demonstre atividade contra o MM quando usado em monoterapia, tem mostrado ainda mais benefícios quando usado em associação, quer com as terapias convencionais, quer com novas terapias [2, 3, 11]. O bortezomib apresenta a limitação de não ser ativo em tumores sólidos [9].

Encontram-se a decorrer vários EC que testam o bortezomib em monoterapia e em associação em vários estádios de doenças e tratamentos. Adicionalmente investigam-se novas aplicações em outros tipos de cancros [12].

Este fármaco é um boronato peptídico que se liga à treonina do local ativo na subunidade $\beta 5$ do 20S CP do proteossoma constitutivo e na subunidade $\beta 5i$ do imunoproteossoma. A avaliação inicial *in vitro* demonstrou que induzia uma acumulação intracelular de proteínas, levando à paragem entre a fase G2 e o início da mitose do ciclo celular e posteriormente levava à apoptose através da ativação de duas caspases, a caspase 8 e caspase 9 [3].

O fator nuclear kappa B (NF- κ B) é intrinsecamente ativado no MM e desempenha um papel importante na sobrevivência celular, proliferação e resistência a agentes citotóxicos. O NF- κ B está ligado ao seu inibidor, o inibidor do fator nuclear kappa B ($I\kappa B\alpha$), no citoplasma e é ativado quando ocorre degradação proteossômica do $I\kappa B\alpha$. Quando ativado, este fator induz a expressão de moléculas de adesão e proteínas anti-apoptóticas e aumenta a produção de interleucina-6 nas células do estroma da medula óssea. A inibição da atividade do proteossoma demonstrou prevenir a degradação do $I\kappa B\alpha$ e subsequente inibição da ativação e translocação do NF- κ B para o núcleo para ativação das vias subordinadas [3, 11].

A nível celular, a inibição do proteossoma resulta na acumulação de várias proteínas importantes supressoras tumorais, incluindo p21, p27, p53, e I κ B α . O I κ B α é um inibidor do NF- κ B, o fator de transcrição mais importante na regulação da proliferação celular. A via de sinalização I κ B α /NF- κ B desempenha um papel crítico na indução da apoptose mediada pelo bortezomib. Também mostrou ser significativamente mais tóxico para as células do MM em relação às células normais [13].

Outro aspeto inovador do bortezomib é o facto de este fármaco não só atuar nas células do MM mas também na proteção do microambiente da medula óssea, através da inibição do crescimento parácrino das células mieloides humanas, pela diminuição da aderência destas células às células do estroma da medula óssea [3, 13].

As lesões osteolíticas caracterizadas pela ativação da atividade osteoclástica acompanhada da redução na atividade osteoblástica são a característica *major* do MM. O bortezomib exibe efeitos importantes no desenvolvimento e progressão da doença óssea associada ao MM, por redução da atividade osteoclástica e aumento da função osteoblástica. Estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que o bortezomib aumenta os níveis de fosfatase alcalina e osteocalcina. Porém, recentemente descobriu-se que a combinação de um glucocorticoide como a dexametasona com o bortezomib poderia inibir os efeitos positivos do bortezomib na proliferação e diferenciação dos osteoblastos, sugerindo que o bortezomib poderia resultar numa melhor cura das lesões osteolíticas quando usado sem o glucocorticoide [3].

Estudos de expressão genética têm sido empregues para aumentar o conhecimento da ação citotóxica deste composto no MM. O perfil de expressão génica demonstrou que o bortezomib resulta em sub-regulação das vias de sinalização de crescimento e sobrevivência, sobre-regulação de moléculas implicadas nas cascatas pro-apoptóticas, bem como, na sobre-regulação das proteínas de choque térmico e nos intervenientes da via ubiquitina proteossoma [3]. O sucesso clínico do bortezomib incitou o desenvolvimento de um grande número de inibidores de segunda geração do proteossoma, com melhoramentos nas propriedades farmacológicas e com menos efeitos secundários.

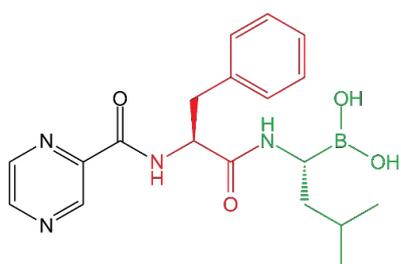


Figura 5 – Estrutura do bortezomib, um dipéptido constituído por uma fenilalanina (vermelho) e uma leucina (verde) cujo grupo carboxílico (-CO₂H) foi substituído por um grupo ácido borónico (-B(OH)₂). Adaptado de [13].

O ixazomib (MLN-9708, Millennium Pharmaceuticals, Inc) é um boronato dipeptídico de segunda geração formulado como um profarmaco na forma de estér borónico. Apresenta biodisponibilidade oral e quando atinge o plasma hidrolisa-se imediatamente em MLN-2238, a sua forma bioativa [9, 14].

O MLN-2238 revela potência e seletividade similares para a subunidade $\beta 5$ do proteossoma responsável pela atividade *chymotrypsin-like*, contudo, tem um tempo de semivida mais curto em relação ao bortezomib [14].

Uma das limitações clínicas do bortezomib é que uma vez ligado ao proteossoma dos eritrócitos, não pode ser libertado, já o MLN-2238 apresenta potência inferior, no que toca à inibição, mas tem uma taxa de libertação maior. Como resultado o MLN-2238 tem um volume de distribuição maior, presumivelmente porque o fármaco inicialmente ligado aos eritrócitos é capaz de se dissociar e penetrar nos tecidos [9, 14].

Este composto tem demonstrado induzir a apoptose em células resistentes quer às terapêuticas convencionais quer ao bortezomib e está atualmente a ser avaliado em estudos de fase I para tratamento de tumores sólidos e doenças hematológicas, em doentes com linfoma e em EC de fase I e 2 para o MM [14-16].

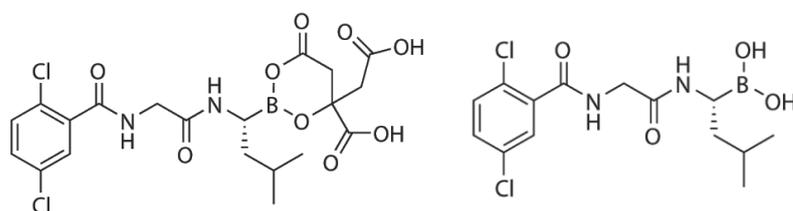


Figura 6 – Estrutura do ixazomib e do seu metabolito bioativo, o MLN-2238. Adaptado de <http://www.apexbt.com/mln9708.html>

O delanzomib, também chamado de CEP-18770, é um boronato peptídico de segunda geração e, tal como o bortezomib, é um inibidor reversível, principalmente da atividade *chymotrypsin-like*. Demonstrou induzir apoptose nas linhas celulares mieloides e em células primárias do mieloma, enquanto exibe um perfil de citotoxicidade favorável contra as células normais. A sua atividade antitumoral foi demonstrada em vários modelos tumorais de animais e foram demonstrados marcados efeitos contra o mieloma em combinação com o melfalano e com o bortezomib [3]. Os resultados dos EC indicaram que, ao contrário do bortezomib, a neuropatia periférica não é uma limitação no que respeita à toxicidade deste composto [9].

O delanzomib concluiu mais cedo a fase I dos EC para tumores sólidos e linfomas não-Hodgkin e está atualmente a ser avaliado em fase I e 2 dos EC para o MM [3].

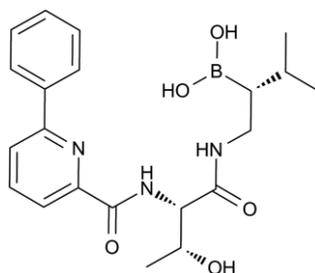


Figura 7 – Estrutura do delanzomib.

2.1.3. β -lactonas

O PS-519 é uma β -lactona com que se liga reversivelmente ao proteossoma. Foi o primeiro inibidor do proteossoma a ser testado em EC para o tratamento de lesões de reperfusão, inflamação e isquemia.

Em modelos animais, o PS-519 reduz a ativação do NF- κ B, atenua a produção de citocinas e moléculas de adesão celular e reduz a infiltração de macrófagos e neutrófilos no cérebro. Este composto concluiu com sucesso a fase I dos EC em humanos, contudo os elevados custos de investimento em EC adicionais aliado à taxa de falha dos ensaios concluídos no enfarte impediram o desenvolvimento deste composto [9] [17].

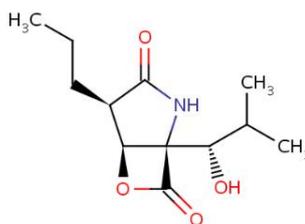


Figura 8 – Estrutura do PS-519.

2.2. Inibidores covalentes irreversíveis

2.2.1. β -lactonas

O omuralide foi o primeiro composto natural descrito, isolado do *Streptomyces* sp., que se liga predominantemente à subunidade β 5 do proteossoma [18].

O marizomib (NPI-0052, Nereus Pharmaceuticals), também conhecido como salinosporoamide A, é uma β -lactona derivado da bactéria marinha *Salinospora tropica* e estruturalmente relacionado com o omuralide [3]. Estas moléculas reagem covalentemente com a treonina do local ativo através da abertura do anel β -lactona e formação de uma ligação éster [18].

Em contraste com o bortezomib que é um inibidor lento e reversível da atividade *chymotrypsin-like*, o marizomib liga-se irreversivelmente, modificando covalentemente os resíduos de treonina no local ativo das três subunidades β do proteossoma [2, 3].

Enquanto o bortezomib é administrado intravenosamente este têm a vantagem de ser bioativo oralmente. Estudos iniciais *in vitro* estabeleceram a eficácia deste composto nas linhas celulares mieloides, incluindo aquelas que eram resistentes ao bortezomib. Estudos em animais com tumores demonstraram redução no crescimento tumoral sem significativa toxicidade. Estudos pré-clínicos demonstraram resultados sinérgicos quando o marizomib foi combinado com bortezomib, lenalidomida e vários inibidores das histonas desacetilases (HDAC). Os EC de fase I e 2 em doentes com MM refratários a tratamentos anteriores estão a decorrer e os EC em linfomas, tumores sólidos e cancro do pulmão de não pequenas células já estão concluídos [3, 19].

Este fármaco pode superar a resistência e induzir apoptose em células mieloides resistentes ao bortezomib. Quando comparado com o bortezomib, o marizomib apresenta uma potência superior, um início de ação mais rápido, uma duração de ação maior e o tratamento não apresenta toxicidade significativa nem induz neuropatia periférica ou mielossupressão [2, 3].

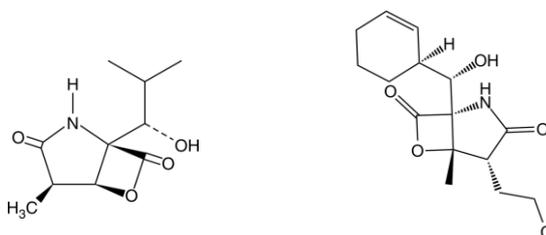


Figura 9 – Estrutura do omuralide e do marizomib.

2.2.2. α,β -epoxicetonas peptídicas

As α,β -epoxicetonas peptídicas são os IPs mais específicos e mais potentes conhecidos até à data. Desde que o proteossoma foi descoberto como sendo um alvo de

peptídeos naturais como a epoximicina, não foram encontrados efeitos *off-target* para estes inibidores [9].

A estrutura cristalina do proteossoma complexada com a epoximicina explica esta excelente especificidade, revelando um anel morfolina formado pela treonina N-terminal e o grupo epoxicetona do inibidor. Esta estrutura sugere que o hidroxilo catalítico ataca primeiro o grupo carbonilo do farmacóforo e, em seguida, o grupo amina da treonina abre o epóxido e completa a formação do aduto morfolina. Os resíduos catalíticos das serina e cisteína proteases não têm um grupo α -amino, logo não podem formar um aduto deste género. Portanto, as epoxicetonas apresentam a vantagem de um mecanismo catalítico fora do comum empregue pelo proteossoma [20].

A potência, elevada especificidade e relativa facilidade de síntese tornaram a epoximicina uma escolha popular para modificações sintéticas [20].

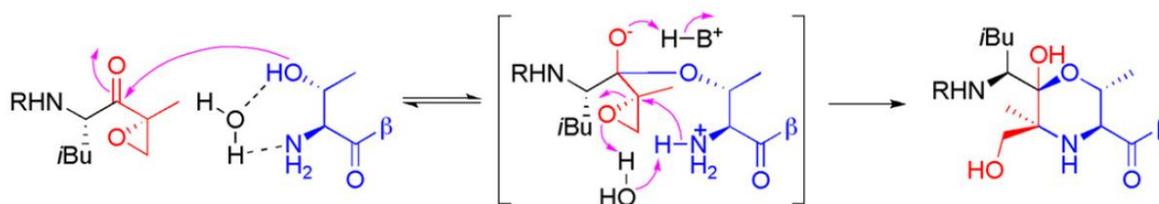


Figura 10 – Mecanismo de inibição do proteossoma pelas epoxicetonas. Adaptado de [9].

O carfilzomib (Kyprolis[®], Onyx Pharmaceuticals, Inc.) é um inibidor baseado na epoximicina, uma epoxicetona tetrapetídica, com propriedades farmacêuticas melhoradas. O carfilzomib liga-se irreversivelmente à subunidade responsável pela atividade *chymotrypsin-like*, quer do proteossoma (β 5), quer do imunoproteossoma (β 5i), levando a uma inibição mais sustentada [3, 15].

Nos ensaios pré-clínicos o carfilzomib mostrou exibir igual potência mas maior seletividade que o bortezomib para a subunidade β 5. Também mostrou atuar *in vitro* sinergicamente com inibidores da HDAC no linfoma e na leucemia [3].

Os resultados provenientes da fase I dos EC, em doentes com doenças hematológicas, mostraram ser bem tolerado e induzir menos vezes neuropatia periférica do que o bortezomib. Os resultados da fase 2 usando o carfilzomib em monoterapia, em doentes refratários ao MM, demonstraram uma resposta de 35,5%, incluindo doentes refratários ao bortezomib. Os principais efeitos secundários são náuseas, com neuropatia periférica limitada, observada em menos de 10% dos doentes. Encontra-se atualmente em vários EC em doentes com MM, recentemente diagnosticados e refratários a tratamentos anteriores, em monoterapia ou em associação com outros agentes antitumorais [3].

Em 2008 obteve a designação de medicamento órfão pela EMA para o tratamento do MM em doentes refratários a tratamentos anteriores e também para aqueles que já foram sujeitos a imunoterapia. Atualmente encontram-se a decorrer três EC, após o resultado destes seguir-se-á a sua aprovação pela FDA [21].

O ONX0912 (anteriormente PR-047, Onyx Pharmaceuticals, Inc.) também designado oprozomib é um análogo inovador do carfilzomib biodisponível por via oral. O carfilzomib, tal como o bortezomib, é administrado por via intravenosa, no entanto, a terapêutica com um inibidor do proteossoma, requer uma administração duas vezes por semana e, portanto, um inibidor biodisponível oralmente é mais vantajoso. O ONX0912 demonstrou atividade antitumoral, *in vitro*, semelhante ao carfilzomib em linhas celulares e células primárias, além disso, potencia a atividade do bortezomib, lenalidomida e inibidores das HDAC. Em modelos animais de MM, linfoma não-Hodgkin e cancro colorretal demonstrou redução na progressão do tumor e prolongou a sobrevivência [3]. Um estudo de fase I em que o oprozomib foi administrado oralmente em doentes refratários e com tumores sólidos recorrentes já está concluído [22].

Os estudos que testam o oprozomib em associação com a dexametasona, lenalidomida e ciclofosfamida em vários estádios de doenças, bem como, estudos de eficácia e de segurança e um estudo multicêntrico de fase Ib/2 estão em fase de recrutamento [3, 22].

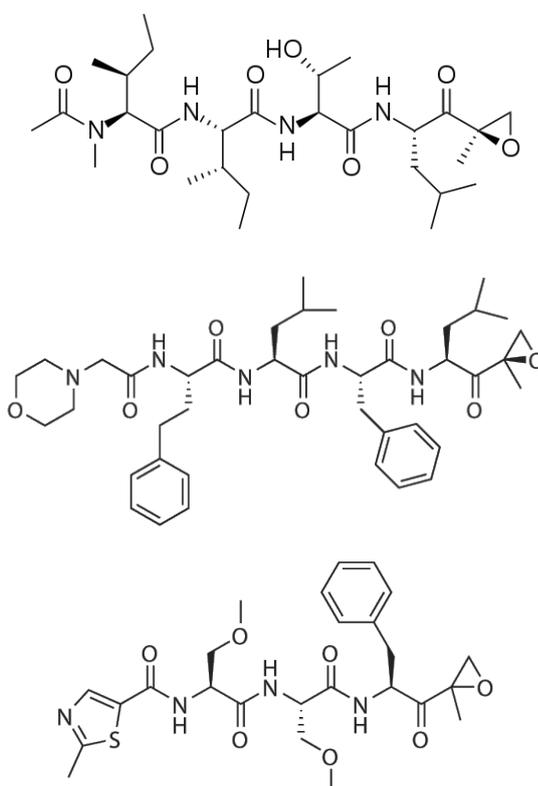


Figura 11 – Estrutura da epoximicina, carfilzomib e oprozomib. Adaptado de [9].

2.3. Inibidores específicos do imunoproteossoma

O SUP mostra estar envolvido não apenas na apoptose mas também no processamento de antígenos, co-estimulação, adesão e quimiotaxia. Também participa no processamento de proteínas intracelulares e virais que geram pequenos fragmentos peptídicos que depois servem como antígenos peptídicos no complexo MHC de classe I.

Certas subunidades incluídas no imunoproteossoma são substituídas por outras subunidades induzidas pelo interferon- γ para gerar um complexo estrutural e funcionalmente distinto do proteossoma constitutivo. O imunoproteossoma é, por isso, um componente essencial do sistema imunitário que fornece antígenos peptídicos de classe I para apresentação às células T citotóxicas. Os componentes MHC classe I posteriormente ligam-se ao péptido gerado pelo proteossoma, e o complexo péptido-MHC é escoltado e apresentado na superfície celular para reconhecimento por receptores específicos existentes nas células T [15].

Uma nova abordagem promissora consiste na utilização de inibidores que inibam especificamente atividades catalíticas do imunoproteossoma. Os imunoproteossomas são expressos constitutivamente nos tecidos imunológicos e são expressos num nível muito mais baixo nos outros tipos de células. Assim, direcionar a terapêutica para o imunoproteossoma confere uma certa especificidade e proporciona uma oportunidade para ultrapassar as toxicidades associadas à inibição do proteossoma constitutivo, tais como, a neuropatia periférica e os efeitos secundários gastrointestinais [3].

Um interesse considerável tem sido focado no desenvolvimento de inibidores específicos do imunoproteossoma para aplicações em imunologia, uma vez que, estes podem combater doenças como o lúpus eritematoso sistémico, a doença inflamatória intestinal e a artrite reumatoide [21].

O PR-924 (Onyx Pharmaceuticals, Inc.) é uma epoxicetona tripeptídica relacionada com o carfilzomib, que exhibe 100 vezes maior seletividade para a subunidade LMP7 do imunoproteossoma quando comparado com o carfilzomib [3, 23].

Estudos mostram que o PR-924 inibe o crescimento e desencadeia a apoptose em linhas celulares mieloides e em células primárias tumorais obtidas de doentes, sem afetar significativamente as células mononucleares do sangue periférico. Este composto induz a apoptose nas células mieloides através da ativação das caspases – 3, 8 e 9 – e libertação do citocromo c. A administração *in vivo* inibe o crescimento tumoral em plasmocitomas humanos. Os estudos relacionados com este composto validam assim a subunidade LMP7 do imunoproteossoma como um alvo terapêutico inovador no tratamento do MM [24].

O IPSI-001, também denominado de calpeptin, é um aldeído peptídico que inibe preferencialmente a subunidade LMP2 do imunoproteossoma e revela uma potência de inibição 100 vezes maior para a subunidade 20Si quando comparado com a 20S do proteossoma constitutivo. Exibe também uma potência 165 vezes maior para a atividade da subunidade Bli do imunoproteossoma [25, 26].

Este fármaco induz a acumulação de conjugados ubiquitina-proteína, proteínas pró-apoptóticas e ativa a apoptose mediada por caspases. Além disto, inibe potentemente a proliferação nas células mieloides obtidas de doentes e noutras doenças hematológicas [25, 26].

Esta evidência fornece uma base lógica para a transposição dos inibidores específicos do imunoproteossoma para a prática clínica, onde podem fornecer aplicações com grande especificidade e menos toxicidade que os inibidores acuais [25, 26].

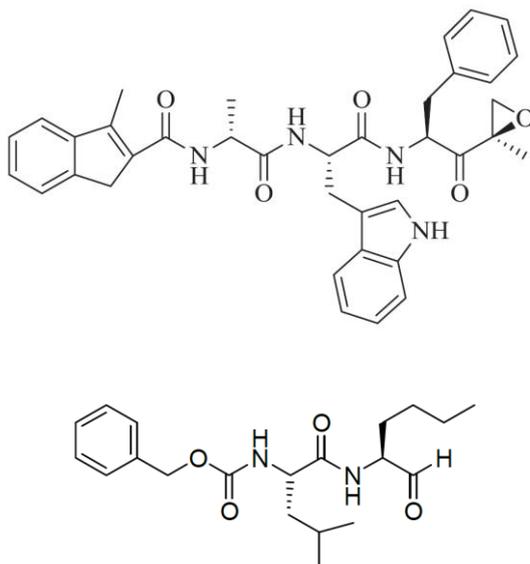


Figura 12 – Estrutura do PR-924 e do IPSI-001.

2.4. Vantagens e desvantagens dos inibidores do proteossoma

O proteossoma é um novo alvo bioquímico e os IPs, tal como o bortezomib, representam uma classe única de agentes antitumorais.

O bortezomib é muito eficaz no tratamento de doentes com MM. A maioria dos doentes responde inicialmente à quimioterapia mas muitos deles, tornam-se refratários devido à resistência das células cancerosas aos agentes antitumorais. Os EC mostram que a taxa de resposta ao bortezomib é surpreendente, 35% em doentes que já haviam sido tratados com três ou mais fármacos e eram refratários a estes tratamentos [27].

Os IPs apresentam alta seletividade. Na generalidade, as linhas celulares mieloides são mais sensíveis ao tratamento com estes fármacos do que as células da medula óssea ou células mononucleares periféricas do sangue de indivíduos saudáveis. No caso do bortezomib, as células mieloides dos doentes são, pelo menos, 170 vezes mais sensíveis ao fármaco do que as células do estroma da medula óssea [3].

O bortezomib interage com vários compostos naturais. Assim os polifenóis do chá verde, flavonóides e ácido ascórbico inibem o efeito anticanceroso do bortezomib através de um mecanismo de interação fármaco-fármaco [28, 29].

Estudos recentes têm demonstrado que os IPs são citotóxicos para diversos tipos de células cancerígenas e que estas são mais sensíveis aos efeitos pró-apoptóticos da inibição do proteossoma do que as células normais [3].

Uma das limitações destes fármacos é serem pouco eficazes em tumores sólidos, mas esta desvantagem pode ser solucionada pela combinação com outros antitumorais, tais como, mefalano, dexametasona, ciclofosfamida, talidomida, entre outros [3].

No caso do bortezomib, este aumenta a sensibilidade das células cancerosas aos agentes tumorais convencionais e o seu desenvolvimento teve por base a tentativa de superar a resistência a outros fármacos [3]. Alguns destes compostos produzem quimiossensibilização para outros fármacos anticancerosos.

Os IPs apresentam efeitos secundários intrínsecos ao seu mecanismo de ação como a inibição de algumas proteases endógenas. Em lisados celulares, onde se avaliou a inibição de serinas proteases pelo bortezomib e pelo carfilzomib, o bortezomib inibiu significativamente estas enzimas numa potência próxima ou equivalente à do proteossoma, contrariamente ao carfilzomib. Os níveis de HtrA2/Omi estão envolvidos na sobrevivência neuronal e aumentaram nos neurónios expostos a ambos os IPs, mas apenas foram inibidos pelo bortezomib. Estes resultados mostram que a neurodegeneração induzida pelo bortezomib, *in vitro*, ocorre por um mecanismo independente do proteossoma e que este fármaco inibe

outros alvos, quer *in vitro* quer *in vivo*, que contribuem para o seu perfil de reações adversas [8, 26, 30].

Os principais efeitos secundários destes compostos são fadiga, mal-estar e fraqueza, pneumonia, desidratação, náusea, vômitos, diarreia, dores nos membros, dor nas costas e artralgias. Estes efeitos secundários limitam a sua utilização em alguns doentes, bem como limitam as doses em alguns deles devido aos efeitos secundários dose dependentes [21].

Os IPs possibilitaram o desenvolvimento de uma nova classe de fármacos contra algumas doenças oncológicas mas não só, vieram também oferecer a possibilidade de compreensão dos mecanismos celulares e bioquímicos de algumas doenças. O seu conhecimento e os dados da sua utilização na prática clínica sustentam novas investigações e o desenvolvimento de novos fármacos com propriedades farmacêuticas melhoradas.

2.5. Mecanismos de resistência

A resistência aos IPs pode ocorrer a nível da estrutura do proteossoma ou nas vias de sinalização dependentes deste. Foram descobertas mutações num único local, a subunidade $\beta 5$ do proteossoma constitutivo (PSMB5) em linhas celulares mieloides resistentes ao bortezomib. Usando testes de sobre-expressão genética, estes mostraram que a mutação pode ocorrer pela interferência com a via de resposta a proteínas mal dobradas [31].

As resistências ao bortezomib estão associadas a mutações no gene que codifica a subunidade $\beta 5$, assim, as células resistentes apresentam uma mutação na subunidade $\beta 5$, na qual a treonina é substituída por uma alanina, logo isto confere resistência pois a treonina é o alvo do bortezomib [13].

Foi também identificado que a PSMD4, uma das subunidades não dependentes de ATP da partícula reguladora do proteossoma, a subunidade 19S, está associada a reações adversas ao bortezomib [32].

Os efeitos antitumorais do bortezomib têm sido principalmente atribuídos à sua ação no NF- κ B e nas vias da proteína reguladora Bcl-2. Logo, não é surpreendente que diferentes polimorfismos da família de genes do NF- κ B afetem a resposta ao tratamento [33].

Nos casos de resistência associada ao sistema ubiquitina proteossoma é possível superar as resistências através do uso de inibidores de segunda geração ou de compostos estruturalmente diferentes que atuem por um mecanismo diferente do bortezomib. O conhecimento dos mecanismos de resistência pode permitir um *design* racional de novos fármacos, bem como, a escolha das terapias combinadas.

3. Inibidores da conjugação da ubiquitina

A ubiquitina funciona com um marcador de proteínas que as sinaliza através de uma ligação covalente. Estão envolvidas três enzimas neste processo, a enzima ativadora de ubiquitina (E1), a enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e a enzima ubiquitina ligase (E3). Nas células apenas existe uma única enzima E1, no entanto, existem dezenas de E2 e centenas de E3. A especificidade das enzimas E3 na célula fornece seletividade às proteínas marcadas para degradação no proteossoma [2].

A conjugação de proteínas com a ubiquitina desempenha numerosos papéis reguladores através de funções dependentes e não dependentes do proteossoma. Alterações no processo de ubiquitinação são observadas num vasto número de patologias, por esta razão, existe grande interesse em atingir farmacologicamente o SUP para tratamento do cancro. Várias classes de inibidores que bloqueiam a degradação de proteínas marcadas com ubiquitina estão sob investigação [34].

3.1. Inibidores da enzima de ativação da ubiquitina

A E1 é responsável pelo primeiro passo do processo de ubiquitinação, através da ativação da ubiquitina e esta enzima é sobre-expressa em todas as leucemias e nas linhas de células mieloides primárias de doentes. Quando a E1 é bloqueada, estas células entram em apoptose [13]. Apesar do papel bem definido da E1, nenhum inibidor desta enzima que apresente permeabilidade celular foi desenvolvido até à data. Como os inibidores da E1 atuam numa fase precoce do processo de ubiquitinação, na qual inibem a ativação da ubiquitina estes inibidores devem, em princípio, bloquear todas as vias dependentes deste passo [34].

O PYR-41 o primeiro inibidor irreversível da E1 além de bloquear a cascata da ubiquitinação, inesperadamente aumenta a sumoilação nas células. A base molecular deste aumento não é conhecida contudo o aumento da sumoilação é também observado nas células cujas E1 são dependentes da temperatura [34].

Funcionalmente o PYR-41 atenua a ativação do NF- κ B mediado por ciclinas, inibe também as vias de ubiquitinação dependentes e a degradação proteossômica do I κ B α . Adicionalmente, o PYR-41 inibe a degradação da p53 e ativa a atividade transcricional deste supressor tumoral. De acordo com este raciocínio, este composto atinge preferencialmente células transformadas que expressam a p53, por isso, o PYR-41 e as pirazonas relacionadas fornecem evidência da capacidade destes compostos diferencialmente atingir células

transformadas, sugerindo o potencial dos inibidores da E1 como agentes terapêuticos no cancro. Estes inibidores também podem ser valiosas ferramentas para o estudo do processo de ubiquitinação [34].

O PYZD-4409 uma molécula inibidora da E1 derivada da 3,5-dioxopirazolidina induz a morte em células malignas e inibe preferencialmente o crescimento das células mieloides primárias comparado com células normais hematopoiéticas. A inibição da E1 aumenta o stress ao nível do retículo endoplasmático e leva as células à apoptose. *In vivo* a administração de PYZD-4409 diminuiu o peso e o volume do tumor quando comparado com o controlo, sem toxicidade significativa. O estudo deste composto também realça a E1 como um novo alvo terapêutico para o tratamento de doenças oncológicas pois podemos atingir efeitos similares aos IPs com um alvo terapêutico alternativo, pois nos humanos apenas existe uma E1 [13, 35].

3.2. Inibidores da enzima de conjugação da ubiquitina

No SUP as enzimas E2 medeiam a conjugação da ubiquitina com os substratos e dessa forma controlam a estabilidade e interações proteicas. A hCdc34 é uma E2 que catalisa a ubiquitinação de centenas de proteínas em conjugação com as centenas de E3. Foi identificado um composto denominado CC0651 que seletivamente inibe a hCdc34. A determinação da estrutura revelou que o CC0651 se liga num local da hCdc34 diferente do local catalítico, causando uma alteração subtil mas que provoca o deslocamento de elementos estruturais desta enzima [36].

Os análogos do CC0651 inibem a proliferação de linhas celulares humanas cancerosas. O CC0651 não afeta as interações da hCdc34 com as enzimas E1 e E3 ou a formação da ligação tioéster mas, em vez disso, interfere com a ligação da ubiquitina aos resíduos de lisina das proteínas a sinalizar. As enzimas E2 são assim suscetíveis à inibição em locais não catalíticos e podem representar uma classe de alvos terapêuticos viáveis no SUP [36].

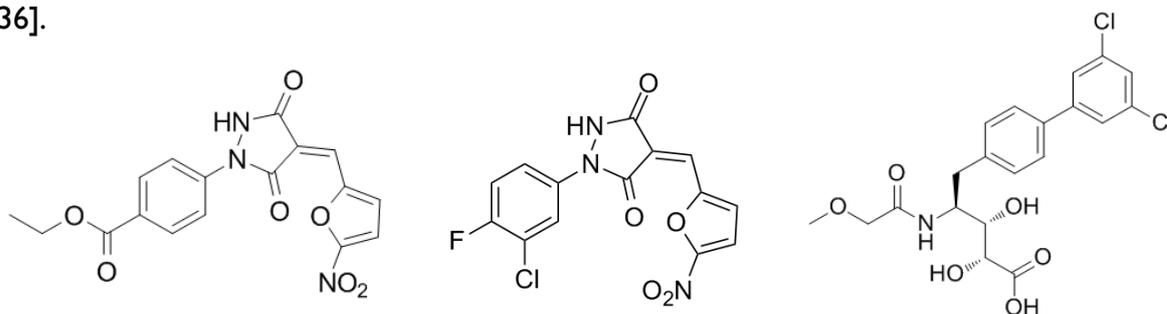


Figura 13 – Estrutura do PYR-41, PYZD-4409 e CC0651.

4. Sumoilação

Recentemente foram descobertas vias enzimaticamente paralelas à via da ubiquitina e estão atualmente a ser investigadas. Estas vias ligam covalentemente *ubiquitin-like preoteins* (ULPs) nos substratos proteicos e cada uma destas ULP tem uma função celular distinta. Algumas vias, como a sumoilação, têm sido identificadas em todos os seres eucarióticos testados [15].

A sumoilação é uma modificação pós-tradução que liga uma proteína denominada *small ubiquitin-like modifier* (SUMO) à proteína alvo e, tal como a ubiquitina, pode sinalizar proteínas para degradação no proteossoma. A proteína SUMO é uma pequena proteína de 12 kDa que foi isolada e mostrou ser 18% homóloga à ubiquitina [15].

A sumoilação é altamente regulada em todos os seres eucarióticos e participa em diversos processos, tais como, transporte proteico do citoplasma para o núcleo, regulação pós-transcricional, segregação cromossômica e controlo do ciclo celular [15].

O papel da proteína SUMO no SUP foi estabelecido desde que a ligação desta proteína a outras proteínas-alvo sinaliza o recrutamento de E3 para ubiquitinação e degradação no proteossoma [15, 16].

Recentemente foi demonstrado que a sumoilação e os seus efetores estão aumentados nos doentes com MM antes do tratamento e nos doentes que não respondem ao bortezomib [15, 16].

Os agregossomas são corpos de inclusão proteicos que são formados quando os organelos celulares de degradação proteica estão comprometidos ou sobrecarregados, o que leva à acumulação de proteínas que não são eliminadas. A formação dos agregossomas é vista como uma resposta celular protetora à presença de proteínas anormais, mal dobradas ou danificadas no citoplasma que não podem ser eliminadas pela via do SUP, mas também funciona como uma plataforma para eventual eliminação autofágica destes agregados [16].

A formação de agregossomas é induzida por um número de fatores celulares stressantes e genotóxicos, incluindo a inibição do proteossoma. Estas estruturas podem representar um potencial mecanismo compensatório para as células eliminarem os conjugados ubiquitina-proteína que se acumulam devido à inibição do proteossoma. Como resultado, ocorre resistência aos IPs e promoção da sobrevivência tumoral [16].

Há evidência recente sobre a proteína SUMO e efetores da sumoilação que estão relacionados com a formação de agregossomas e resistência aos IPs. Desta forma, a inibição da sumoilação previne a formação de agregossomas, impede a eliminação autofágica de

conjugados ubiquitina-proteína e supera a resistência aos IPs, pois resultante da acumulação de conjugados ubiquitina-proteína, ocorre ativação dos mecanismos de morte celular [16].

O proteossoma é limitado na sua capacidade para degradar certas proteínas, tais como, as associadas a membranas, oligoméricas e agregadas. Portanto, atingindo farmacologicamente os efetores da sumoilação é possível afetar a formação e a função dos agregossomas, superar a resistência aos IPs e aumentar a sua citotoxicidade [16].

O papel da sumoilação nas doenças oncológicas só agora começa a ser compreendido e surge como um novo alvo terapêutico que pode ser usado, não apenas, para o tratamento destas doenças, mas também, para superar a resistência aos fármacos antitumorais. São necessários estudos adicionais para compreender melhor o papel desta via nos processos de carcinogênese celular.

5. Outros alvos moleculares

O aumento do conhecimento das vias intracelulares que estão envolvidas na proliferação e na sobrevivência das células tumorais levou à identificação de novos alvos passíveis de intervenção terapêutica. Recentemente, numerosas moléculas inibidoras foram desenvolvidas, atuando contra proteínas celulares chave ou vias de sinalização que possam aumentar o efeito antitumoral dos IPs ou superar a resistência a estes fármacos.

Estas moléculas inovadoras incluem inibidores da proteína de choque térmico 90, inibidores das HDAC, inibidores da farnesiltransferase, inibidores da Bcl-2, anticorpos monoclonais e diferentes inibidores das multikinases. Muitos destes agentes inovadores têm demonstrado atividade sinérgica com os IPs em estudos pré-clínicos e estão a ser testados em EC recentes em combinação com estes [3].

A proteína de choque térmico 90 (PCT90) é uma chaperona que estabiliza numerosas proteínas e que contribui para a sobrevivência e proliferação das células tumorais. Os estudos pré-clínicos com tanespimicina, um inibidor da PCT90, em combinação com o bortezomib demonstraram um efeito sinérgico o que resultou num aumento da acumulação de proteínas marcadas com ubiquitina [37]. Num EC de fase I em que foi testado o bortezomib em associação com a tanespimicina estes demonstraram respostas significativas e duráveis no tempo [38].

6. Avanços futuros

Os IPs fornecem uma estratégia terapêutica inovadora para o tratamento do MM, linfomas mas não só, estes fármacos tem potencial para alargamento das suas utilizações terapêuticas. O bortezomib, o *first-in-class* destes inibidores, mostrou um sucesso notável desde a sua introdução no mercado há 11 anos, pois veio aumentar o tempo de sobrevida global, a sobrevida livre de doença e diminuiu os sintomas reportados pelos doentes.

Os compostos de segunda geração, atualmente em desenvolvimento, já demonstram aumento na seletividade e uma janela terapêutica mais aceitável. No caso de α,β -epoxicetonas peptídicas, os seus efeitos *off-target* são muito limitados, devido ao seu mecanismo de ação único com o local catalítico do proteossoma. Estratégias similares permitem ultrapassar as limitações dos IPs associadas aos seus efeitos secundários.

No sentido de melhorar a segurança e aumentar a eficácia destes fármacos torna-se necessário um aumento no conhecimento de todos os processos envolvidos na homeostasia proteica para permitir um *design* mais racional de novos fármacos, onde o ideal será desenvolver compostos com grupos reativos que reajam só com o alvo terapêutico pretendido.

Atualmente, as pesquisas direcionam-se para outros componentes do SUP a fim de procurar potenciais alvos passíveis de serem atingidos farmacologicamente que confirmem uma maior especificidade. O desenvolvimento de inibidores das E1 e E2 que atingem os passos iniciais do SUP são uma abordagem bastante promissora.

As E3 desempenham um papel fundamental na seleção do substrato logo mostram-se como promissores alvos candidatos para modulação do SUP. Outra abordagem possível é o desenvolvimento de inibidores específicos para a partícula reguladora 19S do proteossoma.

Componentes individuais da via de sumoilação funcionam como biomarcadores para prever a resposta clínica aos IPs e fornecem evidência que atingindo esta via é possível melhorar a resposta terapêutica aos IPs e atuar sinergicamente com estes.

Os IPs apresentam aplicações terapêuticas para além do cancro, encontrando-se algumas em estudo, como sendo, tratamento de doentes transplantados, o tratamento de doenças autoimunes e atividade anti-inflamatória e anti-infecciosa.

Futuramente, são necessárias investigações adicionais a fim de melhorar a compreensão acerca de todas as vias que interagem com o SUP. A completa compreensão deste sistema permitirá ultrapassar as resistências a estes fármacos, além de, permitir o desenvolvimento de novos compostos mais eficazes e que possam levar à cura destas doenças.

7. Bibliografia

1. EDELMANN, M.J., NICHOLSON, B., E KESSLER, B.M., **Pharmacological targets in the ubiquitin system offer new ways of treating cancer, neurodegenerative disorders and infectious diseases.** Expert Rev Mol Med, 13 (2011) e35.
2. CHEN, D. E DOU, Q.P., **The ubiquitin-proteasome system as a prospective molecular target for cancer treatment and prevention.** Curr Protein Pept Sci, 11 (2010) 459-70.
3. GUPTA, A., Multiple Myeloma - An Overview, Chapter 1, Proteasome Inhibitors in the Treatment of Multiple Myeloma, 2012.
4. ALBERTS, B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. E WALTER P., Molecular Biology of the Cell, 5th, 2007.
5. KAISER, P. E HUANG, L., **Global approaches to understanding ubiquitination.** Genome Biol, 6 (2005) 233.
6. SLEDZ, P., FORSTER, F., E BAUMEISTER, W., **Allosteric effects in the regulation of 26S proteasome activities.** J Mol Biol, 425 (2013) 1415-23.
7. BECK, P., DUBIELLA, C., E GROLL, M., **Covalent and non-covalent reversible proteasome inhibition.** Biol Chem, 393 (2012) 1101-20.
8. KAWAMURA, S., UNNO, Y., ASAI, A., ARISAWA, M., E SHUTO, S., **Structurally novel highly potent proteasome inhibitors created by the structure-based hybridization of nonpeptidic belactosin derivatives and peptide boronates.** J Med Chem, 57 (2014) 2726-35.
9. KISSELEV, A.F., VAN DER LINDEN, W.A., E OVERKLEEF, H.S., **Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target.** Chem Biol, 19 (2012) 99-115.
10. Velcade (bortezomib) is Approved for Initial Treatment of Patients with Multiple Myeloma. [Acedido a: 04 de julho de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.fda.gov/aboutfda/centersoffices/officeofmedicalproductsandtobacco/cder/ucm094633.htm>
11. RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO VELCADE. [Acedido a: 23 de abril de 2014]. Disponível na Internet: http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000539/WC500048471.pdf
12. Estudos e ensaios clínicos, bortezomib. [Acedido a: 06 de julho de 2014]. Disponível na Internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=bortezomib&Search=Search>

13. LAWRIE, C.H., Hematology - Science and Practice, Chapter 20, The Ubiquitin-Proteasomal System and Blood Cancer Therapy, 2012.
14. KUPPERMAN, E., LEE, E.C., CAO, Y., BANNERMAN, B., FITZGERALD, M., BERGER, A., YU, J., YANG, Y., HALES, P., BRUZZESE, F., LIU, J., BLANK, J., GARCIA, K., TSU, C., DICK, L., FLEMING, P., YU, L., MANFREDI, M., ROLFE, M., E BOLEN, J., **Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer.** Cancer Res, 70 (2010) 1970-80.
15. DRISCOLL, J.J. E DECHOWDHURY, R., **Therapeutically targeting the SUMOylation, Ubiquitination and Proteasome pathways as a novel anticancer strategy.** Target Oncol, 5 (2010) 281-9.
16. GUPTA, A., Multiple Myeloma - An Overview, Chapter 6, The SUMOylation Pathway as a Potential Therapeutic Target in Multiple Myeloma, 2012.
17. SHAH, I.M., LEES, K.R., PIEN, C.P., E ELLIOTT, P.J., **Early clinical experience with the novel proteasome inhibitor PS-519.** Br J Clin Pharmacol, 54 (2002) 269-76.
18. LIST, A., ZEILER, E., GALLASTEGUI, N., RUSCH, M., HEDBERG, C., SIEBER, S.A., E GROLL, M., **Omuralide and Vibralactone: Differences in the Proteasome- β -Lactone- γ -Lactam Binding Scaffold Alter Target Preferences.** Angewandte Chemie International Edition, 53 (2014) 571-574.
19. Estudos e ensaios clínicos, marizomib. [Acedido a: 08 de julho de 2014]. Disponível na Internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=marizomib&Search=Search>
20. VERDOES, M., WILLEMS, L.I., VAN DER LINDEN, W.A., DUIVENVOORDEN, B.A., VAN DER MAREL, G.A., FLOREA, B.I., KISSELEV, A.F., E OVERKLEEF, H.S., **A panel of subunit-selective activity-based proteasome probes.** Org Biomol Chem, 8 (2010) 2719-27.
21. Kyprolis (carfilzomib) Oncologic Drugs Advisory Committee June 20, 2012. [Acedido a: 11 de julho de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.fda.gov/downloads/advisorycommittees/committeesmeetingmaterials/drugs/oncologicdrugsadvisorycommittee/ucm310859.pdf>
22. Estudos e ensaios clínicos, oprozomib. [Acedido a: 05 de julho de 2014]. Disponível na Internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=oprozomib&Search=Search>
23. MCMINN, D., Targeting the Immunoproteasome, CDD Community Meeting, April 4, 2014. [Acedido a: 02 de julho de 2014]. Disponível na Internet: http://cdn2.hubspot.net/hub/146552/file-705984150-pdf/McMinn,_CDD_Community_Meeting_20140331,_CDD.pdf?t=1398727393017

24. SINGH, A.V., BANDI, M., AUJAY, M.A., KIRK, C.J., HARK, D.E., RAJE, N., CHAUHAN, D., E ANDERSON, K.C., **PR-924, a selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP-7, blocks multiple myeloma cell growth both in vitro and in vivo.** *Br J Haematol*, 152 (2011) 155-63.
25. KUHN, D.J., HUNSUCKER, S.A., CHEN, Q., VOORHEES, P.M., ORLOWSKI, M., E ORLOWSKI, R.Z., **Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors.** *Blood*, 113 (2009) 4667-76.
26. KUHN, D.J. E ORLOWSKI, R.Z., **The immunoproteasome as a target in hematologic malignancies.** *Semin Hematol*, 49 (2012) 258-62.
27. ZANGARI, M., AUJAY, M., ZHAN, F., HETHERINGTON, K.L., BERNO, T., VIJ, R., JAGANNATH, S., SIEGEL, D., KEITH STEWART, A., WANG, L., ORLOWSKI, R.Z., BELCH, A., JAKUBOWIAK, A., SOMLO, G., TRUDEL, S., BAHLIS, N., LONIAL, S., SINGHAL, S., KUKRETI, V., E TRICOT, G., **Alkaline phosphatase variation during carfilzomib treatment is associated with best response in multiple myeloma patients.** *Eur J Haematol*, 86 (2011) 484-7.
28. LIU, F.T., AGRAWAL, S.G., MOVASAGHI, Z., WYATT, P.B., REHMAN, I.U., GRIBBEN, J.G., NEWLAND, A.C., E JIA, L., **Dietary flavonoids inhibit the anticancer effects of the proteasome inhibitor bortezomib.** *Blood*, 112 (2008) 3835-46.
29. PERRONE, G., HIDESHIMA, T., IKEDA, H., OKAWA, Y., CALABRESE, E., GORGUN, G., SANTO, L., CIRSTEA, D., RAJE, N., CHAUHAN, D., BACCARANI, M., CAVO, M., E ANDERSON, K.C., **Ascorbic acid inhibits antitumor activity of bortezomib in vivo.** *Leukemia*, 23 (2009) 1679-86.
30. ARASTU-KAPUR, S., ANDERL, J.L., KRAUS, M., PARLATI, F., SHENK, K.D., LEE, S.J., MUCHAMUEL, T., BENNETT, M.K., DRIESSEN, C., BALL, A.J., E KIRK, C.J., **Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events.** *Clin Cancer Res*, 17 (2011) 2734-43.
31. NIEWERTH, D., VAN MEERLOO, J., JANSEN, G., ASSARAF, Y.G., HENDRICKX, T.C., KIRK, C.J., ANDERL, J.L., ZWEEGMAN, S., KASPERS, G.J., E CLOOS, J., **Anti-leukemic activity and mechanisms underlying resistance to the novel immunoproteasome inhibitor PR-924.** *Biochem Pharmacol*, 89 (2014) 43-51.
32. SHAUGHNESSY, J.D., JR., QU, P., USMANI, S., HEUCK, C.J., ZHANG, Q., ZHOU, Y., TIAN, E., HANAMURA, I., VAN RHEE, F., ANAISSIE, E., EPSTEIN, J., NAIR, B., STEPHENS, O., WILLIAMS, R., WAHEED, S., ALSAYED, Y., CROWLEY, J., E

- BARLOGIE, B., **Pharmacogenomics of bortezomib test-dosing identifies hyperexpression of proteasome genes, especially PSMD4, as novel high-risk feature in myeloma treated with Total Therapy 3.** *Blood*, 118 (2011) 3512-24.
33. SMITH, A.J., DAI, H., CORREIA, C., TAKAHASHI, R., LEE, S.H., SCHMITZ, I., E KAUFMANN, S.H., **Noxa/Bcl-2 protein interactions contribute to bortezomib resistance in human lymphoid cells.** *J Biol Chem*, 286 (2011) 17682-92.
34. YANG, Y., KITAGAKI, J., DAI, R.M., TSAI, Y.C., LORICK, K.L., LUDWIG, R.L., PIERRE, S.A., JENSEN, J.P., DAVYDOV, I.V., OBEROI, P., LI, C.C., KENTEN, J.H., BEUTLER, J.A., VOUSDEN, K.H., E WEISSMAN, A.M., **Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics.** *Cancer Res*, 67 (2007) 9472-81.
35. XU, G.W., ALI, M., WOOD, T.E., WONG, D., MACLEAN, N., WANG, X., GRONDA, M., SKRTIC, M., LI, X., HURREN, R., MAO, X., VENKATESAN, M., BEHESHTI ZAVAREH, R., KETELA, T., REED, J.C., ROSE, D., MOFFAT, J., BATEY, R.A., DHE-PAGANON, S., E SCHIMMER, A.D., **The ubiquitin-activating enzyme E1 as a therapeutic target for the treatment of leukemia and multiple myeloma.** *Blood*, 115 (2010) 2251-9.
36. CECCARELLI, D.F., TANG, X., PELLETIER, B., ORLICKY, S., XIE, W., PLANTEVIN, V., NECULAI, D., CHOU, Y.C., OGUNJIMI, A., AL-HAKIM, A., VARELAS, X., KOSZELA, J., WASNEY, G.A., VEDADI, M., DHE-PAGANON, S., COX, S., XU, S., LOPEZ-GIRONA, A., MERCURIO, F., WRANA, J., DUROCHER, D., MELOCHE, S., WEBB, D.R., TYERS, M., E SICHERI, F., **An allosteric inhibitor of the human Cdc34 ubiquitin-conjugating enzyme.** *Cell*, 145 (2011) 1075-87.
37. MITSIADES, C.S., MITSIADES, N.S., MCMULLAN, C.J., POULAKI, V., KUNG, A.L., DAVIES, F.E., MORGAN, G., AKIYAMA, M., SHRINGARPURE, R., MUNSHI, N.C., RICHARDSON, P.G., HIDESHIMA, T., CHAUHAN, D., GU, X., BAILEY, C., JOSEPH, M., LIBERMANN, T.A., ROSEN, N.S., E ANDERSON, K.C., **Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition.** *Blood*, 107 (2006) 1092-100.
38. RICHARDSON, P.G., CHANAN-KHAN, A.A., LONIAL, S., KRISHNAN, A.Y., CARROLL, M.P., ALSINA, M., ALBITAR, M., BERMAN, D., MESSINA, M., E ANDERSON, K.C., **Tanespimycin and bortezomib combination treatment in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: results of a phase I/2 study.** *Br J Haematol*, 153 (2011) 729-40.