

**REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE STAT3 E O
PAPEL DA PROTEÍNA STI1/HOP SECRETADA
EM GLIOBLASTOMA**

BRUNA ROZ RODRIGUES

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins

Co-Orientadora: Dra. Marilene Hohmuth Lopes

São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Rodrigues, Bruna Roz

Regulação da atividade de STAT3 e o papel da proteína STI1/Hop secretada em glioblastoma / Bruna Roz Rodrigues – São Paulo, 2014. 47p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Vilma Regina Martins

Descritores: 1. GLIOBLASTOMA. 2. ASTROCITOMA. 3. FATOR DE TRANSCRIÇÃO STAT3. 4. EXOSSOMOS. 5. STI1. 6. HOP.

“O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.”

(Grande Sertão Veredas - João Guimarães Rosa)

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha família. Aos meus pais, pelo amor incondicional e dedicação; à minha irmã, pela proteção e amizade e ao meu avô Lourenço cuja presença se faz mesmo na ausência, *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram para a feitura deste trabalho, direta e indiretamente. Registro aqui, nomes daqueles a quem agradeço e expresso meu reconhecimento e admiração.

Agradeço à minha orientadora, por quem nutro uma profunda admiração, Dra. Vilma Regina Martins, por ter partilhado comigo um pouco de sua sabedoria e entusiasmo pela ciência. Por se fazer sempre disponível, mesmo em meio a tantos compromissos, para a discussão de experimentos, dúvidas ou até mesmo um simples desabafo. Seu cuidado dentro e fora do laboratório com seus alunos e pesquisadores é inspirador.

À minha co-orientadora, Dra. Marilene Hohmuth Lopes, pela ajuda durante todo o meu doutorado com discussões científicas, correções e por me escutar nas horas difíceis.

Aos meus queridos amigos, amizade esta fruto da convivência no laboratório. Antuani, pelo companheirismo, inspiração e o gosto pelo café para aliviar os dias pesados; Arthur, pelas piadas e aprendizado sobre imuno-histoquímica; Bianca pela companhia agradabilíssima das manhãs e pela divisão do mau humor matinal incompreendido; Bruno, por ter me influenciado a apreciar Frank Sinatra; Eduardo, pela ajuda de sempre; Fernanda Giudice, pela admiração, por acreditar em mim e pela ajuda em tudo no laboratório; Gabriela, pelo otimismo; Giovanna, por sempre encontrar palavras confortantes para um final de dia ruim; Dra. Gláucia, pela oportunidade do primeiro artigo; Juliana, pela companhia de computador; Marcos, pela discussão do universo das vesículas e amizade; Martin, por ter acreditado, cientificamente, em mim, quando nem eu acreditava mais; Michele e Cleiton, pelas conversas e ajuda no laboratório; Nicolle, pela ajuda no início do mestrado e pela amizade que perdurou mesmo após este processo; Tiago, por estar sempre disposto a ajudar; Tonielli, pela positividade e iluminar o laboratório mesmo em dias nublados e aos meus

queridos Felipe, Danilo e Hildegardo, pelo ótimo trabalho e ajuda imprescindível na parte técnica do laboratório.

À Fernanda Carvalho e ao Roberto, pela amizade incondicional que foi além do CIPE e que hoje mantenho com muito carinho.

Aos meus amigos de iniciação científica, Marcela, Sheila, Carlos e Márcia, pela força no começo de tudo, que é sempre muito difícil.

Agradeço também aos funcionários do CIPE, Rogério pela ajuda com a parte burocrática das prestações de contas intermináveis, os seguranças e as faxineiras, que sempre me trataram com muito carinho.

Às amigas Mari e Marília, por acompanharem todo este processo de perto, mesmo não estando diretamente nele.

À Amanda, pelo apoio, paciência e doce companhia nesse caminho que desbravamos e percorremos juntas.

À minha irmã, Annie, por todas as palavras de conforto e por ser o meu exemplo, sempre.

Agradeço aos meus pais, Clenir e Francisco, pelo exemplo de honestidade e simplicidade, por todo o amor e apoio dedicado em todos os momentos da minha vida, pela confiança e compreensão. Toda a minha gratidão.

RESUMO

Rodrigues BR. **Regulação da atividade de STAT3 e o papel da proteína STI1/Hop secretada em glioblastoma.** São Paulo; 2014. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O Glioblastoma (GBM) é o tumor de células gliais mais comum e agressivo dentre os tumores cerebrais primários. Caracterizar mecanismos moleculares associados com a progressão desse tumor pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias para seu tratamento e garantir a maior sobrevida de pacientes. A proteína STAT3 (Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3) é um fator de transcrição ativado por fosforilação e conhecido por seu importante papel na gliomagenese. Com o uso de microarranjos de tecidos (TMAs) avaliamos a expressão total e a localização nuclear de STAT3 e de suas formas fosforiladas pSTAT3 (Y705) e pSTAT3(S727) em astrocitomas e tecido cerebral não tumoral. STAT3 possui uma localização nuclear aumentada em GBMs humanos, quando comparada com astrocitomas de menor grau ou tecido cerebral não tumoral. Interessantemente, o aumento da localização nuclear de STAT3 nos GBMs não está associado com o incremento de suas formas fosforiladas. Além disso, altos níveis de STAT3 nuclear em GBM estão correlacionados com o menor tempo livre de recidiva e a uma menor sobrevida nesses pacientes. Esse perfil não foi visto para as formas fosforiladas, indicando que outros mecanismos de ativação de STAT3, que não a via canônica de fosforilação, podem estar presentes nos GBMs. A identificação dessas modificações pode representar uma nova estratégia terapêutica para a abordagem desses tumores uma vez que as drogas disponíveis atualmente têm como alvo os domínios fosforilados de STAT3. Uma modificação pós-traducional que poderia contribuir para a translocação nuclear de STAT3 é a SUMOilação. A proteína PIAS1 (Proteína inibidora da atividade de STAT1) está envolvida neste mecanismo por mediar a adição de SUMO (Pequena proteína modificadora relacionada à ubiquitina) às proteínas-alvo. Nossos dados

mostraram que PIAS1 apresenta maior localização nuclear em GBM quando comparado ao tecido não tumoral. Além disso, PIAS1 promove o acúmulo nuclear da co-chaperona STI1/Hop (Proteína induzida por estresse 1 /Proteína organizadora das Hsp70-Hsp90) em astrócitos tratados com radiação gama, o que pode contribuir para a atividade nuclear de STI1/Hop em reparo de dano ao DNA e a maior sobrevivência celular. Nossos dados apontam para a existência do mesmo mecanismo em GBMs onde a alta localização nuclear de PIAS1 está diretamente correlacionada com os níveis de STI1/Hop no núcleo. STI1/Hop é um ligante da proteína príon celular e desempenha um papel importante na sobrevivência celular. A análise da expressão de STI1/Hop e de PrP^C em GBMs mostrou altas concentrações das duas proteínas quando comparados aos astrocitomas de menor grau. Além disso, nossos dados apontam que as altas concentrações de PrP^C e STI1/Hop estão diretamente associadas a maior proliferação celular nesses tumores e a menor sobrevida desses pacientes. Os mecanismos associados com a participação do complexo PrP^C-STI1/Hop na proliferação dos GBM foram detalhadamente descritos. A co-chaperona STI1/Hop é secretada em vesículas extracelulares (EV) de células de GBM e medeia a sinalização autócrina/parácrina pela ligação a PrP^C na superfície celular. Cinco linhagens de GBM foram usadas para determinar de que forma estas células podem modular a secreção de vesículas e validamos a proteína Rab27b como alvo para esta modulação. Uma vez que STI1/Hop é secretada em vesículas e sua ligação a PrP^C pode ter um papel chave nos GBM, este complexo pode representar um importante alvo terapêutico nesses tumores. Desta forma, desenvolvemos estudos pré-clínicos em camundongos *nude* onde mostramos que a inibição da interação de STI1/Hop-PrP^C por um peptídeo de STI1/Hop que mimetiza o sítio de ligação a PrP^C (STI1/Hop₂₃₀₋₂₄₅) leva a uma diminuição do crescimento tumoral e ao aumento na sobrevida destes animais. Portanto, os resultados gerados no presente estudo contribuíram para o entendimento de vias moleculares que estão modificadas nos GBMs e poderão ser utilizados prognósticos bem como alvos terapêuticos no tratamento desses tumores.

SUMMARY

Rodrigues BR. **[Regulation of STAT3 activity and the role of secreted STI1/Hop in glioblastoma]**. São Paulo; 2014. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Glioblastoma is the most common and aggressive primary brain tumor. This work was conducted to characterize molecular mechanisms associated with GBM progression that could assist in developing of new strategies for its treatment and ensure better overall survival of these patients. STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) is a transcription factor activated by phosphorylation and known for its important role in gliomagenesis. Using tissue microarrays (TMAs) we evaluated the total expression and nuclear localization of STAT3 and its phosphorylated forms, pSTAT3 (Y705) and pSTAT3 (S727) in astrocytomas and non-tumor brain tissue. GBMs showed higher levels of nuclear STAT3 compared to lower grade astrocytomas or non-tumor brain tissue. Interestingly, increased nuclear STAT3 in GBMs is not associated with the improvement of its phosphorylated forms. Moreover, high levels of nuclear STAT3 in GBMs correlate with lower free-recurrence survival and overall survival of these patients. This profile followed by its phosphorylated forms, indicating that other activation mechanisms besides than the canonical STAT3 phosphorylation is present in GBM. The identification of these post-translation modifications may represent new therapeutic strategies for the treatment of these tumors since the currently available drugs target only the phosphorylation sites of STAT3. A post-translational modification that could contribute to nuclear translocation of STAT3 is the SUMOylation although we were unable to see this interaction in cultured cells. On the other hand, GBMs have a higher nuclear PIAS1 compared to non-tumor brain tissue. PIAS1 protein (Protein Inhibitor of Activity of STAT1) is involved in protein SUMOylation by mediating the addition of SUMO to target proteins. Moreover, PIAS1 promotes nuclear

retention of the co-chaperone STI1/Hop (Stress inducible protein 1/Hsp70-Hsp90 organizing protein) in astrocytes treated with gamma radiation, which may contribute to the activity of DNA damage repair of STI1/Hop and increased survival of these cells. Our data point to the existence of a similar mechanism in GBMs where high nuclear PIAS1 is directly correlated with the levels of STI1/Hop in the nucleus. STI1/Hop is a ligand of the cellular prion protein and plays an important role in cell survival. Analysis of the expression of PrP^C in STI1/Hop and GBMs showed high levels of both proteins as compared to low-grade astrocytomas. Furthermore, our data suggest that high concentrations of PrP^C and STI1/Hop are directly associated with increased cell proliferation in these tumors and lower overall survival of these patients. The mechanisms associated with the participation of STI1/Hop-PrP^C complex proliferation of GBM were described in detail. The co-chaperone STI1/Hop is secreted into the extracellular vesicles (EVs) in GBM cells and autocrine loop mediates signaling by binding to PrP^C on the cell surface. Five GBM cell lines were used to determine a target for vesicles modulation and we identified and validated the Rab27b protein as a target for this modulation. Once STI1/Hop is secreted in vesicles and their binding to PrP^C may play a key role in the GBM, this complex may represent an important therapeutic target for these tumors. Thus, we developed preclinical studies showing that the inhibition of the interaction of STI1/Hop-PrP^C through a peptide that mimics the binding site PrP^C in STI1/Hop (STI1/Hop₂₃₀₋₂₄₅) leads to a decrease of tumor growth and an increase of survival of these animals. Thus, the results generated in this study contribute to the understanding of molecular pathways that are modified in GBMs and may be used as prognostic markers and therapeutic targets for treating these tumors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Padrão de evolução dos astrocitomas.....	5
Figura 2	Ativação canônica de STAT3.....	8
Figura 3	PIAS1 causa retenção nuclear de STI1/Hop após dano por irradiação gama.....	13
Figura 4	Efeito da interação STI1/Hop-PrP ^C em condições fisiológicas.....	17
Figura 5	Biogênese de vesículas extracelulares através da via endossomal.....	20
Figura 6	Composição típica das EVs derivadas de culturas celulares e fluidos biológicos.....	22
Figura 7	Representação dos principais resultados obtidos no trabalho nas células de GBM.....	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Astrocitoma Anaplásico
ATCC	Coleção Americana de Tipos de Cultura
CDKN2A	Ciclina cinase-dependente N2A
CHI3L1	Quitinase 3-tipo-1
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
Erk1/2	Proteína cinase regulada por sinais extracelulares 1/2
ESCRT	Complexo endossomal de seleção protéica para transporte
EVs	Vesículas extracelulares
EXPH5	Exofilina 5
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
GAS	Sequências IFN gama ativadas no DNA
GBM	Glioblastoma
GLUT1	Transportador de glicose 1
GP130	Glicoproteína 130
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol
HA	Hemaglutinina
HIF1α	Fator 1 α induzido por hipóxia
Hop	Proteína organizadora de Hsp70 e Hsp90
Hop₂₃₀₋₂₄₅	Peptídeo equivalente aos aminoácidos das posições 230 a 245 da proteína Hop
Hsp70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
Hsp90	Proteína de choque térmico de 90 kDa
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IDH1	Isocitrato Desidrogenase-1
IFN	Interferon
IL 6	Interleucina 6

IL12	Interleucina 12
IL8	Interleucina 8
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Imunoprecipitação
JAK	Janus cinase
kDa	<i>Kilo Daltons</i>
LIF	Fator inibidor de leucemia
MET	Receptor do fator de crescimento de hepatócito
MGMT	O(6)-Metilguanina-DNA Metiltransferase
MHC II	Molécula apresentadora de antígeno classe II
miRNA	Micro RNA
MRAS	Homólogo do oncogene viral RAS do músculo
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MVBs	Corpos multivesiculares
MW	Massa molecular
NFKβ	Fator de ativação nuclear k β
NLS	Sinal de localização nuclear
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSM	Oncostatina M
Pc2	Proteína policombo 2
PDGFRα	Receptor para o fator de crescimento derivado de plaquetas tipo alfa
PIAS1	Proteína inibidora da atividade de STAT 1
PIAS3	Proteína inibidora da atividade de STAT 3
PKA	Proteína cinase A
PrP^C	Proteína príon celular
PrP^{Sc}	Proteína príon scrapie
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina
PTPase	Proteína tirosina fosfatase
RANTES	Proteína expressa e secretada por células T normais

RNA	Ácido ribonucléico
SH2	Homólogo a Src 2
Slp4	Proteína tipo sinaptotagmina 4
SN	Sobrenadante
SNC	Sistema Nervoso Central
SOCS3	Supressor de sinalização de citocina 3
STAT	Proteína Transdutora de sinal e Ativadora de Transcrição
STAT1	Proteína Transdutora de sinal e Ativadora de Transcrição 1
STAT3	Proteína Transdutora de sinal e Ativadora de Transcrição 3
STI1	Proteína induzida por estresse 1
STI1/Hop	Proteína induzida por estresse 1/proteína organizadora de Hsp70 e Hsp90
SUMO	Proteína pequena modificadora relacionada à ubiquitina
TCGA	Atlas Genômico do Câncer
TMA	Microarranjos de tecido
TMZ	Temozolomida
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TP53	Proteína tumoral p53
TSEs	Encefalopatias espongiformes transmissíveis
TSG101	Gene Tumoral de susceptibilidade 101
Ubc9	Enzima 9 de conjugação à ubiquitina
U-STAT3	STAT3 não fosforiladas
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VPS27/HRS	Proteína Vacuolar 27/Fator de crescimento de hepatócito regulado por tirosina cinase
VPS4	Proteína Vacuolar de Seleção 4

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Glioblastoma.....	1
1.2	STAT3 e a sua localização nuclear em GBM	6
1.3	Proteína induzida por estresse 1/Proteína organizadora de Hsp70 e Hsp90 (STI1/Hop).....	11
1.4	A proteína príon celular (PrP ^C)	15
1.5	PrP ^C e sua interação com STI1/Hop.....	16
1.6	Vesículas extracelulares (EVs) e GBM.....	18
2	OBJETIVO	24
2.1	Objetivo Geral.....	24
2.1	Objetivos Específicos	24
3	RESULTADOS	25
3.1	O perfil de expressão de STAT3 e de suas formas fosforiladas em GBM	25
3.2	Localização nuclear de STI1/Hop e a sua correlação com PIAS1 em GBM	27
3.3	Avaliação do perfil de secreção de vesículas extracelulares (EVs) e a secreção de STI1/Hop em GBM.....	28
3.4	O perfil de expressão total de STI1/Hop em astrocitomas.....	29
4	CONCLUSÃO	31
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	34

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP da Fundação Antônio Prudente

- Anexo 2** Avaliação da interação entre STAT3 e STI1/Hop por co-immunoprecipitação.
- Anexo 3** Características clínico-patológicas dos pacientes pertencentes ao TMA utilizado neste projeto.
- Anexo 4** Correlação entre a localização nuclear de STI1/Hop, STAT3 e suas formas fosforiladas em astrocitomas humanos.
- Anexo 5** Artigo 1: Nuclear unphosphorylated STAT3 correlates with a worse prognosis in human glioblastoma.
- Anexo 6** Artigo 2: Regulation of Stress-Inducible Phosphoprotein 1 nuclear retention by Protein Inhibitor of Activated STAT PIAS1.
- Anexo 7** Artigo 3: Regulation of extracellular vesicles release by Rab27b in glioblastoma.
- Anexo 8** Índice proliferativo dos astrocitomas humanos através da marcação para KI-67.
- Anexo 9** Artigo 4: Disruption of prion protein-HOP engagement impairs glioblastoma growth and cognitive decline and improves overall survival

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLIOBLASTOMA

O glioblastoma (GBM) é o mais frequente e letal dos tumores cerebrais humanos. Possui origem a partir das células precursoras e/ou da glia e foi categorizado, histologicamente, em 2000 pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Os astrocitomas foram subdivididos em graus de 1 a 4, de acordo com a sua malignidade (KLEIHUES e SOBIN 2000; MAHER et al. 2001; LOUIS et al. 2007). Os astrocitomas malignos são designados por grau III (astrocitoma anaplásico, AA) e grau IV (GBM), sendo o último considerado de alta proliferação e pior prognóstico (HOLLAND et al. 2000; SATHORNSUMETEE et al. 2007).

Os GBMs correspondem a cerca de 50% de todos os astrocitomas e acometem mais homens que mulheres (razão 1,58: 1) sendo duas vezes mais comuns na população caucasiana, com respeito aos afrodescendentes (OSTROM et al. 2013). No Brasil, segundo dados do INCA, a estimativa de incidência de tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) foi 5,07 casos novos a cada 100 mil homens e 4,05 a cada 100 mil mulheres, sendo o GBM o tumor primário do SNC mais frequente em adultos (INCA, 2014).

Os GBMs são tumores heterogêneos tanto do ponto de vista clínico como histológico e molecular. Apresentam, classicamente, dois subtipos distintos que podem afetar pacientes de diferentes idades e têm seu

desenvolvimento associado a diferentes vias genéticas (OHGAKI e KLEIHUES 2007; LIM et al. 2011). O primário ou também chamado de “*de novo*” surge sem qualquer sinal clínico e acomete, principalmente, pacientes mais velhos, com uma média de 62 anos, embora exista relato de casos onde crianças, com uma média de 10 anos, são acometidas por este tumor (MAHVASH et al. 2011). O secundário, ou GBM progressivo, desenvolve-se lentamente através da progressão de astrocitomas de baixo grau ou anaplásico e acomete, em média, pacientes com idade em torno dos 45 anos (OHGAKI e KLEIHUES 2007; KANU et al. 2009; LIM et al. 2011).

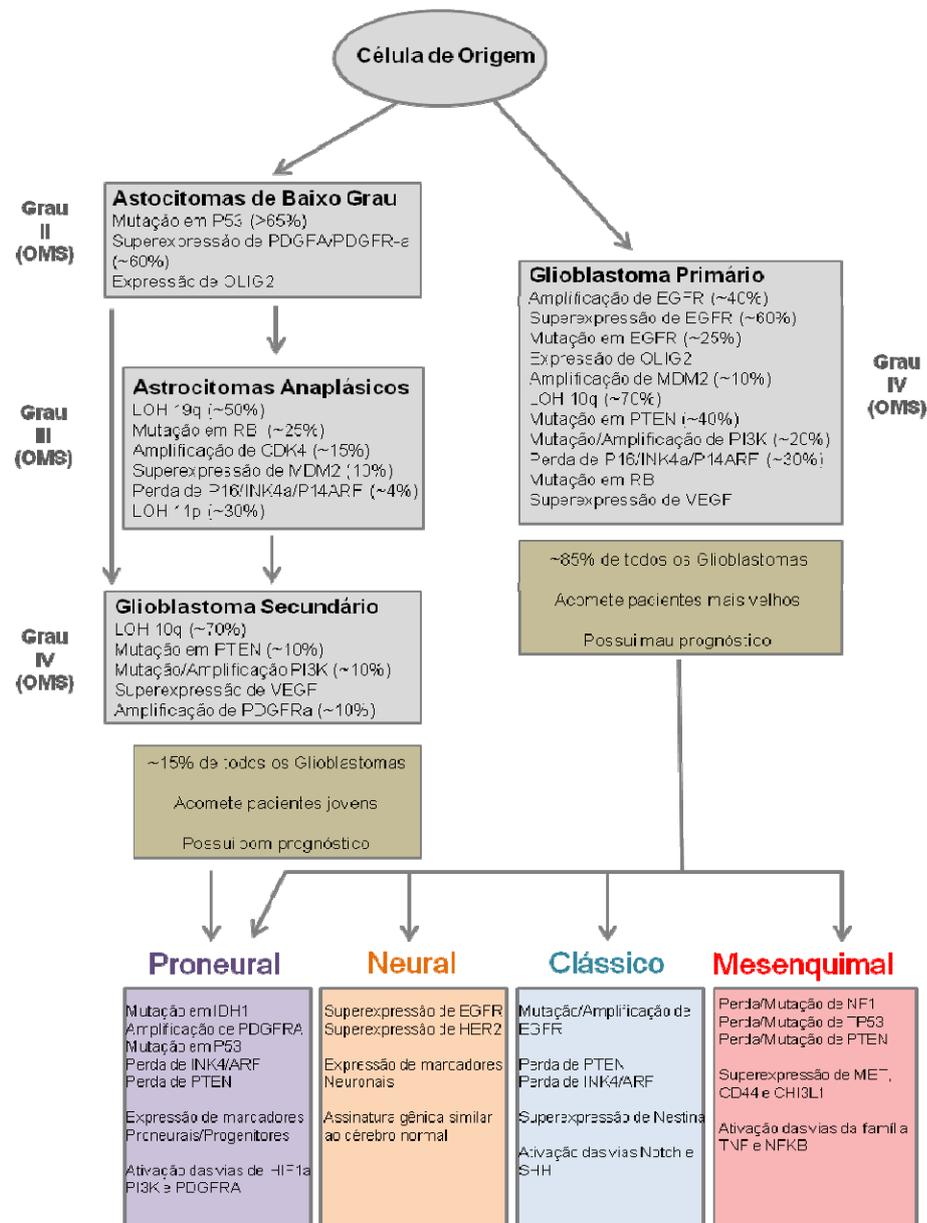
Os GBMs primários e secundários são histologicamente indistinguíveis, mas molecularmente cada um deles apresenta padrões distintos de alterações genéticas, o que direciona a diferentes vias de patogênese (BRENNAN 2011). Amplificações gênicas e mutações pontuais modificam vias celulares distintas de transdução de sinal. Por exemplo, amplificações no gene EGFR (Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico) e mutação no gene PTEN (Fosfatase homóloga a tensina) são alterações típicas de GBMs primários, enquanto mutações em TP53 (Proteína tumoral p53) são frequentes nos GBMs secundários (OHGAKI e KLEIHUES 2007). Recentemente, inúmeros estudos utilizando os dados do TCGA (Atlas Genômico do Câncer) têm incorporado alterações genômicas que permitem a distinção de subclasses dos GBMs (PHILLIPS et al. 2006; BLEEKER et al. 2012). Esta subclassificação se assemelha aos estágios de neurogênese e classificam os GBMs como proneural, neural, clássico e mesenquimal (PHILLIPS et al. 2006). O subtipo proneural é caracterizado

por mutação no gene IDH1 (Isocitrato desidrogenase-1), TP53 e alterações em PDGFR α (Receptor tipo alfa para o fator de crescimento derivado de plaquetas) sendo estas modificações correlacionadas com um melhor prognóstico. O subtipo neural é caracterizado pela expressão de marcadores neuronais e pela semelhança com o tecido cerebral sem neoplasia. Os GBMs clássicos apresentam amplificação de EGFR, monossomia do cromossomo 10 e deleção de CDKN2A (ciclina cinase-dependente N2A). Já os mesenquimais são conhecidos pela deleção ou mutação de CHI3L1 (Quitinase 3-tipo-1) (Figura 1). Além das diferentes alterações genômicas, esses subtipos também possuem diferentes respostas ao tratamento. Os GBMs clássicos e mesenquimais apresentam boa resposta à quimioterapia com Temozolomida (TMZ) com maior sobrevida do paciente, quando comparados ao proneural, possuindo este a pior resposta à terapia (VERHAAK et al. 2011). Dessa forma, a subdivisão dos GBMs pelo perfil de alterações genéticas permite um tratamento personalizado e mais eficiente.

De maneira geral, a média de sobrevida para pacientes com GBM após o diagnóstico é de 9 a 12 meses (LIM et al. 2011). Um prognóstico favorável inclui fatores como a idade, ausência ou mínimos sinais neurológicos e ressecção cirúrgica completa. À parte da sobrevida média, 3-5% dos pacientes acometidos por GBM são considerados "*long-term survivors*", pois sobrevivem por mais de três anos após a cirurgia (KREX et al. 2007). Os mecanismos ou fatores protetores que aumentam a sobrevida destes pacientes ainda não estão bem descritos, porém um estudo propõe que pacientes que possuem metilação em MGMT [O(6)-Metilguanina-DNA

Metiltransferase] têm um prognóstico favorável, com uma sobrevida além de quatro anos (GERBER et al. 2014). O tratamento padrão para astrocitomas malignos inclui cirurgia, radioterapia pós-operatória e quimioterapia adjuvante. O uso de TMZ, especificamente nos tumores primários cerebrais, aumenta a sobrevida em dois anos de 10% para 26% destes pacientes (STUPP et al. 2005). Recidivas ocorrem em quase 100% dos casos e a sobrevida após recorrência para GBM é de, em média, 25 semanas (SATHORNSUMETEE et al. 2007).

Desta forma, o tratamento de GBM continua sendo um grande desafio devido a baixa eficácia da terapêutica disponível. Assim, é necessária uma busca mais efetiva de marcadores de prognóstico e de novos alvos terapêuticos que possam melhorar a sobrevida de pacientes portadores de GBM.



Fonte: Adaptado de AGNIHOTRI et al. (2013)

Figura 1 - Padrão de evolução de astrocitomas. (a) Alterações genéticas envolvidas nos astrocitomas II e III e em GBM primário e secundário. Os GBM primários surgem sem qualquer sinal clínico e acometem pacientes mais velhos, enquanto o GBM secundário se desenvolve através de uma progressão de astrocitomas de menor grau e acomete pacientes mais jovens. Os subtipos de GBMs possuem aberrações genéticas em comum, mas sua frequência varia em cada um deles. (b) Integração gen mica de dados feita através de TCGA (Atlas Gen mico do Câncer) permitiu a subdivisão dos GBM em quatro subtipos distintos e caracterizados por alterações específicas.

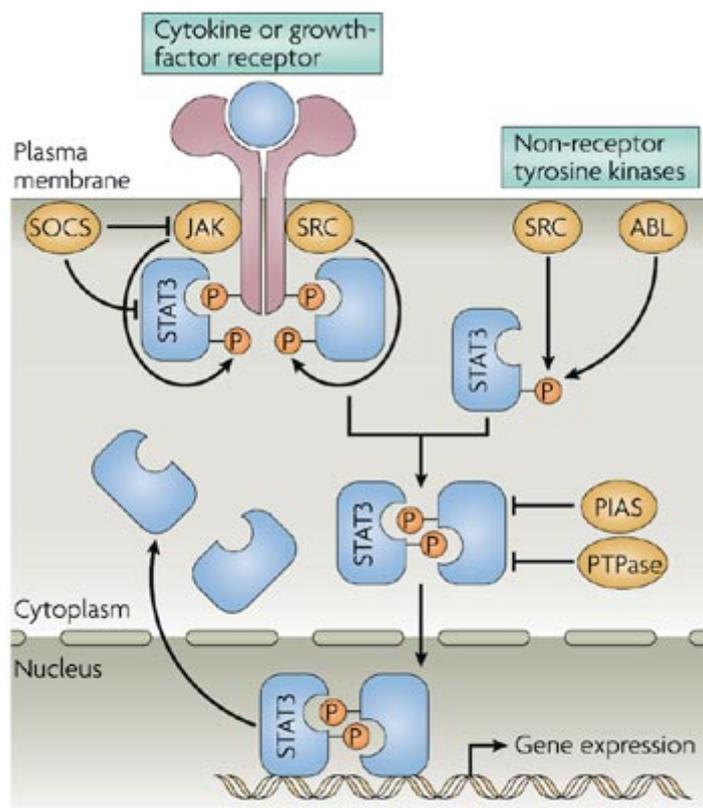
1.2 STAT3 E A SUA LOCALIZAÇÃO NUCLEAR EM GBM

As proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT) são fatores de transcrição pertencentes a uma família de sete membros: STAT1-4, STAT5 α , STAT5 β e STAT6. Todos os membros da família apresentam seis domínios estruturais distintos: N-terminal, *coiled-coil*, de ligação ao DNA, SH2 (Homólogo a Src 2), de transativação e C-terminal, este último contém um resíduo crítico de tirosina que pode ser fosforilado (VINKEMEIER et al. 1996). Além desses domínios, STAT1 e STAT3 possuem um resíduo de serina susceptível à fosforilação (BROMBERG et al. 1999). A atividade de STAT3 é, canonicamente, modulada pela fosforilação no resíduo específico de tirosina em resposta a ativação de um receptor na superfície celular, particularmente pela ligação de citocinas como IL-6 (Interleucina 6) e a IL-11 (Interleucina 11), OSM (Oncostatina M), LIF (fator inibidor de leucemia), FGF (fator de crescimento de fibroblasto) e EGF (fator de crescimento epidérmico) (WEN et al. 1995; BRANTLEY e BENVENISTE 2008). Após a interação destes ligantes aos seus receptores específicos, ocorre a formação de um complexo contendo gp130 (glicoproteína transmembrana 130) e as proteínas cinases JAKs (Janus cinase) que, por sua vez, promove a fosforilação no resíduo de tirosina 705 de STAT3, a sua dimerização através da interação com o domínio SH2 e a subsequente translocação nuclear (KISHIMOTO et al. 1995). STAT3 pode também ser ativada por uma rota alternativa através de Src, uma cinase envolvida em

várias funções celulares. BROMBERG et al. (1999) identificaram STAT3 como uma molécula efetora para a transformação de Src.

Uma segunda fosforilação no resíduo de Serina 727 (S727) maximiza a atividade de transcrição de STAT1 e STAT3 (WEN et al. 1995) que vai ligar a regiões promotoras de genes-alvos envolvidos no controle da apoptose, proliferação, angiogênese, de proteínas responsáveis pela sua própria regulação e também de reparo ao dano de DNA (DESRIVIÈRES et al. 2006; BRANTLEY e BENVENISTE 2008; KIM et al. 2010). Nos últimos anos foi descrito a fosforilação do resíduo de serina como um fator crítico para a localização de STAT3 na mitocôndria e, à parte do seu papel transcricional, seu envolvimento em metabolismo celular (ZHANG et al. 2013; HAN et al. 2014). Portanto, alterações pós-traducionais podem estar envolvidas nas diversas funções destas proteínas.

A regulação da atividade de STAT3 pode se ser feita em dois pontos principais: o primeiro no início da via, através da proteína SOCS3 que pode inibir a fosforilação de STAT3 no resíduo de tirosina e direcionar a proteína para a degradação via proteossomo (NICHOLSON et al. 2000). O segundo ocorre através de PIAS3, que sequestra a proteína já fosforilada no resíduo de tirosina impedindo a homodimerização, translocação nuclear e ativação de genes alvos (CHUNG et al. 1997) (Figura 2).



Nature Reviews | Immunology

Fonte: Adaptado de YU et al. (2007).

Figura 2 - Ativação canônica de STAT3. A ativação de STAT3 pode ser induzida por receptores tirosina-cinases, JAKs e Src tirosina-cinase. Em células transformadas, STAT3 pode ser também ativada por não receptores tirosina cinases como Src e Abl. Após a fosforilação no resíduo de tirosina, a molécula de STAT3 dimeriza e se transloca para o núcleo, onde permitirá a transcrição de genes específicos. A sinalização de STAT3 pode ser regulada por diversas moléculas inibidores, incluindo SOCS3, PIAS3 e PTPases (Proteína tirosina fosfatase). Em células tumorais, receptores e não receptores superativados promovem constitutiva fosforilação e ativação de STAT3.

LIU et al. (2005) mostraram que o tráfego de STAT3 para o núcleo também ocorre de maneira independente de sua fosforilação sendo a importina- α 3 uma das responsáveis por este transporte (CIMICA et al. 2011). Dessa forma, além de STAT3 ir para o núcleo independente da sua fosforilação (LIU et al. 2005), ainda mantém a sua capacidade de se ligar ao

DNA, através do domínio GAS (sequências IFN gama ativadas) e dirigir a expressão gênica através de mecanismos distintos daqueles usados por STAT3 fosforilada (YANG et al. 2007; TIMOFEEVA et al. 2012). A via não canônica de STAT3, no seu status não fosforilado (u-STAT3) culmina com a expressão de genes diferentes da via canônica, como MET (receptor de fator de crescimento de hepatócito), RANTES (Proteína expressa e secretada por células T normais), IL-6, IL-8 (interleucina 8) e MRAS (Homólogo do oncogene viral RAS do músculo) (YANG et al. 2007). Além disso, NF κ B (Fator de ativação nuclear κ B) não fosforilado (u- NF κ B) foi identificado como mais um parceiro da interação com u-STAT3. U- NF κ B associado a u-STAT3 ativada utiliza o sinal de localização nuclear (NLS) da última para se translocar para o núcleo e regular a expressão de genes que carregam elementos κ B (YANG et al. 2007; LIU et al. 2011).

A superexpressão de u-STAT3 inibe a proliferação de células do músculo liso vascular, sugerindo um importante papel em doenças vasculares (YUE et al. 2010). Mais um impacto de u-STAT3 foi descrito em doenças causadas por infecção e septicemia. U-STAT3, mas não a sua forma fosforilada, exibe efeitos anti-inflamatórios através da via de receptores nicotínicos alfa - 7 (MA e CAO 2006). Além disso, NF κ B medeia a expressão da proteína pró-inflamatória TNF (Fator de necrose tumoral) após a sua ligação a u-STAT3 (PEÑA et al. 2010).

Em GBM, STAT3 possui uma ativação aberrante, através da sua ativação clássica de fosforilação no resíduo tirosina 705, desempenha um papel importante na proliferação e sobrevivência celular, supressão do

sistema imune, invasão e angiogênese (CARPENTER e LO 2014). STAT3 regula genes específicos que desencadeiam uma maior proliferação celular em GBM, como ciclinas B e D1 (LI et al. 2009); VEGF (Fator de crescimento do endotélio vascular) e HIF1 α (Fator induzido por hipóxia 1 α) envolvidos em angiogênese (MAUSSANG et al. 2009). Além disto, a hiperregulação de STAT3 pode culminar em diferenciação anormal de células dendríticas e diminuir a expressão de MHC II (Molécula apresentadora de antígeno classe II), moléculas co-estimulatórias CD40 e moléculas IL-12 (Interleucina 12) (GABRILOVICH et al. 1996; WANG et al. 2004; CARPENTER e LO 2014). STAT3 é considerada uma reguladora principal na transformação mesenquimal, que é um fenótipo característico de agressividade em astrocitomas malignos humanos (CARRO et al. 2010).

Devido ao seu envolvimento em muitos dos mecanismos que culminam em maior malignidade dos astrocitomas, diversos inibidores têm sido desenhados tendo como alvo o seu sítio de fosforilação no resíduo de tirosina na molécula de STAT3 (KIM et al. 2014). Entretanto, apesar do sucesso destas drogas na capacidade de inibir a proliferação, invasão e a angiogênese em linhagens celulares (BALL et al. 2011; AGUDELO-GARCIA et al. 2011; BID et al. 2012) efeitos modestos foram observados em ensaios pré-clínicos (YUE e TURKSON 2009; FANG et al. 2014). Dessa forma, a avaliação de STAT3 e de suas formas fosforiladas em GBM humano pode ajudar a entender as alterações moleculares associadas a estes tumores e, dessa forma, intervir de maneira mais eficiente no seu tratamento.

1.3 PROTEÍNA INDUZIDA POR ESTRESSE 1/PROTEÍNA ORGANIZADORA DE HSP70 E HSP90 (STI1/HOP)

A proteína STI1 foi, primeiramente, descrita em *Saccharomyces cerevisiae*, onde está envolvida com a modulação da resposta das proteínas de choque térmico Hsp70 e Hsp90. É uma fosfoproteína com peso molecular aparente de 66 kDa, com atividade de co-chaperona e que possui uma proteína homóloga em humanos com 98,9% de similaridade também denominada Hop (Proteína organizadora do complexo Hsp70 e Hsp90) (NICOLET e CRAIG 1989; HONORÉ et al. 1992; ODUNUGA et al. 2004; LEE et al. 2012; SCHMID et al. 2012).

A distribuição intracelular de STI1/Hop é, predominantemente, citoplasmática. Entretanto, há relatos na literatura da presença desta proteína no núcleo em condições específicas (ODUNUGA et al. 2004; HONORÉ et al. 1992; LONGSHAW et al. 2004). Relatos mostram que a fosforilação de STI1/Hop modula a sua associação com a proteína Hsp90 (Proteína de choque térmico de 90) e que isto influencia o tráfego citoplasma-núcleo de STI1/Hop (DANIEL et al. 2008). Entretanto, sabe-se que condições de choque térmico são capazes de translocar a proteína para o núcleo mesmo na ausência de fosforilação e ligação à Hsp90 (DANIEL et al. 2008).

Para elucidar os mecanismos associados à compartimentalização celular de STI1/Hop, o grupo do Dr. Marco Prado (Robarts Institute, Canadá) em colaboração com o nosso grupo revelou, através de ensaios de duplo

híbrido em leveduras e imunoprecipitações com extratos de astrócitos, que a proteína STI1/Hop interage com enzimas envolvidas no processo pós-traducional denominado SUMOilação, que consiste na adição de resíduos SUMO (Pequena proteína modificadora relacionada à ubiquitina) à proteínas específicas que, entre outras funções, estão envolvidas em processos de translocação nuclear (PICHLER e MELCHIOR 2002). Entre os ligantes de STI1/Hop identificados está a Ubc9 (Enzima 9 de conjugação à ubiquitina), única E2 ligase envolvida no processo de SUMOilação, e três E3 ligases, PIAS (PIAS1 e 3) e Pc2 (Proteína policombo 2) (SOARES et al. 2013). Várias abordagens experimentais mostradas pelo grupo comprovaram que STI1/Hop pode sofrer modificação pós-traducionais pela adição de resíduos de SUMO. Além disso, STI1/Hop também sofre retenção nuclear em condições de superexpressão de PIAS1 (SOARES et al. 2013) (Figura 3). Esta última está envolvida na via de sinalização de STAT, no processo de SUMOilação e resposta a dano ao DNA por quebra na fita dupla, sugerindo que STI1/Hop nuclear e PIAS1 podem estar envolvidos nas vias de reparo de DNA (SOARES et al. 2013).

A SUMOilação é uma modificação pós-traducional que ajuda a manter a estabilidade de proteínas e facilita seu transporte núcleo-citoplasmático (GEISS-FRIEDLANDER e MELCHIOR 2007; MARTIN et al. 2007). Esses dados fortalecem a proposta que a compartimentalização nuclear de STI1/Hop pode ser modulada por componentes da via de SUMOilação.

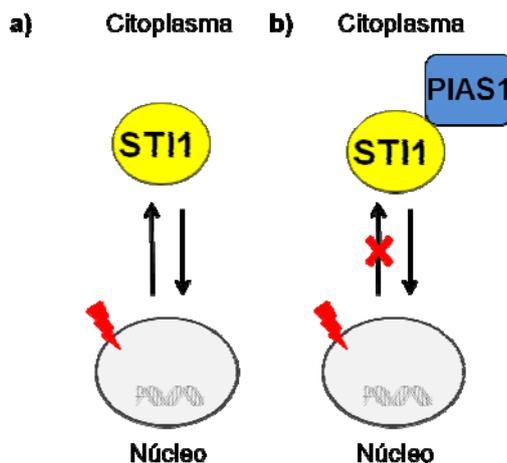


Figura 3 - PIAS1 causa retenção nuclear de STI1/Hop após dano por irradiação gama. (a) A radiação gama causa dano na fita dupla no DNA e leva a translocação nuclear de STI1/Hop, (b) Astrócitos que superexpressam a proteína PIAS1 foram irradiados e a proteína STI1/Hop translocada para o núcleo fica retida neste compartimento por mais de 24 horas.

Um estudo usando células-tronco embrionárias de camundongos descreveu um possível papel de STI1/Hop sobre a atividade do fator de transcrição STAT3. Quando a expressão de STI1/Hop foi inibida pelo uso de RNA de interferência a expressão e fosforilação de STAT3 foram diminuídas, levando ao acúmulo de STAT3 no citoplasma (LONGSHAW et al. 2009). Dados do nosso grupo mostraram ainda que em embriões de camundongos de 10.5 dias silenciados para o gene de STI1 ($STI1^{-/-}$) ocorre uma redução de 50% na expressão de STAT3 quando comparados com animais controle, evidenciando o papel de co-chaperona de STI1/Hop durante o desenvolvimento embrionário (BERALDO et al. 2013). Desta forma, é possível que STI1/Hop desempenhe um papel importante na regulação da atividade de STAT3. Vale ainda ressaltar que as E3 ligases da família PIAS

foram identificadas inicialmente por sua ligação e atividade sobre STAT (CHUNG et al. 1997; BRANTLEY e BENVENISTE 2008).

A proteína STI1/Hop pode estar localizada na membrana plasmática (MARTINS et al. 1997; ZANATA et al. 2002; ODUNUGA et al. 2004; LOPES et al. 2005) e também ser secretada no espaço extracelular. A secreção de STI1/Hop já foi descrita em linhagens tumorais e em culturas primárias de astrócitos e microglia (LIMA et al. 2007; ARANTES et al. 2009; FONSECA et al. 2012). Recentemente, nosso grupo demonstrou que STI1/Hop pode ser secretada por astrócitos tanto na forma solúvel, quanto associada a vesículas de tamanhos distintos (HAJJ et al. 2013). A STI1/Hop secretada funciona como um fator neurotrófico se ligando à Proteína Prion Celular (PrP^C) na superfície neuronal ou glial mediando a sobrevivência e diferenciação destes tipos celulares (ZANATA et al. 2002; LOPES et al. 2005; LIMA et al. 2007; ARANTES et al. 2009; HAJJ et al. 2013). Adicionalmente, foi demonstrado que STI1/Hop é capaz de inibir a proliferação de astrócitos normais (ARANTES et al. 2009).

A superexpressão de STI1/Hop já foi descrita em diversos tumores, como pâncreas, carcinoma hepatocelular e tumores de ovário (WALSH et al. 2009; SUN et al. 2007; WANG et al. 2010). Além disso, em tumores de cólon, STI1/Hop também está presente em altos níveis e sua superexpressão indica um pior prognóstico (KUBOTA et al. 2010; RUCKOVA et al. 2012).

A secreção de STI1/Hop foi descrita estar envolvida na proliferação celular servindo como um possível marcador em tumores de ovário (WANG

et al. 2010), e em células tumorais de mama triplo negativas, a sua secreção está envolvida com maior migração e invasão destes tumores (SIMS et al. 2011; WALSH et al. 2011). Em GBM, STI1/Hop possui um importante papel em proliferação (ERLICH et al. 2007).

1.4 A PROTEÍNA PRÍON CELULAR (PrP^C)

A proteína príon celular (PrP^C) foi, originalmente, descrita como uma isoforma normal da proteína infecciosa denominada príon. Os príons foram isolados a partir de encéfalos de ovelhas contaminadas com *scrapie*, doença relacionada ao grupo de encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) (PRUSINER 1998). O PrP^C é uma glicoproteína de, aproximadamente, 27 kDa e se encontra ligada à membrana plasmática através de uma âncora de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), preferencialmente localizada em domínios de membrana ricos em colesterol denominados “*lipid rafts*” (PRUSINER 1991; MADORE et al. 1999; LINDEN et al. 2008). PrP^C é um ligante específico de STI1/Hop e efeitos biológicos importantes como a neuroproteção e diferenciação neuronal já foram atribuídos a esta associação (CHIARINI et al. 2002; LOPES et al. 2005).

PrP^C tem sido associado ao processo tumoral. No adenocarcinoma ductal pancreático, PrP^C se apresenta alterado numa forma que foi denominada pro-PrP^C. Esta é capaz de interagir com a Filamina A e está associada com um pior prognóstico para estes pacientes (LI et al. 2010). Nos tumores colorretais, PrP^C pode regular as taxas glicolíticas através da

modulação dos níveis de GLUT1 (Transportador de glicose 1) (LI et al. 2011). Em tumores de mama, a interação de PrP^C com a proteína CD44 são, juntos, preditores de não resposta a quimioterapia neoadjuvante nestas células (CHENG et al. 2013).

1.5 PRP^C E SUA INTERAÇÃO COM STI1/HOP

A ligação entre PrP^C e STI1/Hop já foi caracterizada pelo nosso grupo e ocorre entre os resíduos 113-128 (GAAAAGAVVGGLGGYM) de PrP^C e nos aminoácidos 230-245 (ELGNDAYKKKDFDKAL) de STI1/Hop (CHIARINI et al. 2002).

Efeitos fisiológicos e patológicos já foram atribuídos a esta associação entre PrP^C e STI1/Hop. Em condições fisiológicas, essa interação foi descrita por mediar a ativação de sinais de neuroproteção em neurônios hipocâmpais e retinianos através da ativação de PKA (Proteína cinase A) (CHIARINI et al. 2002; LOPES et al. 2005), por promover o crescimento neurítico pela ativação de Erk1/2 (Cinase regulada por sinal extracelular 1/2) (LOPES et al. 2005), a síntese de proteínas através da via de mTOR (Proteína alvo da rapamicina em mamíferos) (ROFFÉ et al. 2010; BERALDO et al. 2010) e a autorrenovação e proliferação de progenitores de células-tronco neurais (SANTOS et al. 2011). (Figura 4)

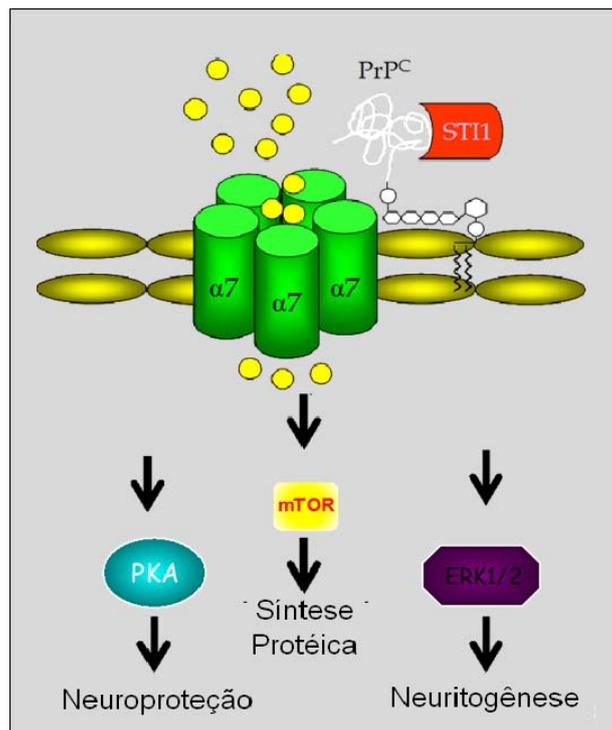


Figura 4 - O efeito da interação STI1/Hop-PrP^C em condições fisiológicas. STI1/Hop se liga à PrP^C na superfície celular e promove neuroproteção, através da ativação de PKA; síntese proteica com a ativação da via de mTOR e neuritogênese através de Erk1/2.

A interação entre STI1/Hop-PrP^C pode também ter um papel relevante na tumorigênese. Tumores de cólon possuem superexpressão de PrP^C e STI1/Hop e, ainda, anticorpos anti-PrP^C são capazes de retardar o processo de proliferação celular e induzir apoptose em linhagens humanas de tumores de cólon (MCEWAN et al. 2009).

Por outro lado, em linhagens de GBM humano, onde é possível observar a secreção de STI1/Hop, foi observado um efeito estimulatório na proliferação através da interação STI1/Hop-PrP^C na superfície celular (ERLICH et al. 2007).

1.6 VESÍCULAS EXTRACELULARES (EVS) E GBM

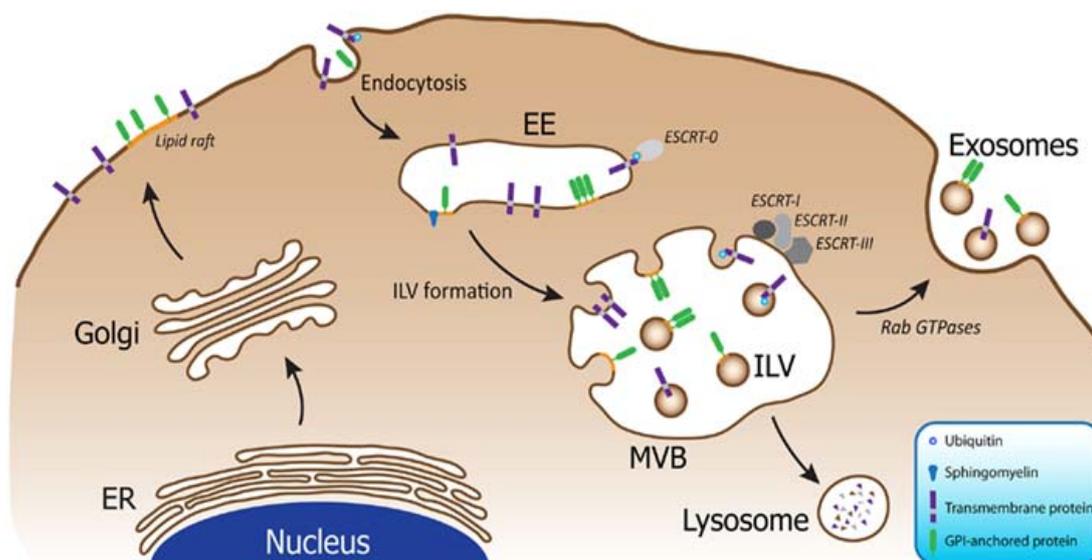
Muitas proteínas que exercem função fora da célula são secretadas em associação com vesículas lipídicas que são liberadas para o espaço extracelular e, entre elas, vesículas geradas por *shedding* da membrana plasmática ou pela fusão na membrana de corpos multivesiculares formados pelo sistema endossomal (MATHIVANAN et al. 2010). As vesículas extracelulares (EVs) permitem a comunicação autócrina e parácrina além daquela a longa distância sendo responsáveis pela entrega de material específico de células doadoras para células receptoras (AL-NEDAWI et al. 2008). Estão envolvidas em processos como transporte de proteínas e material genético (mRNA e micro-RNA), transferência de receptores e indução de sinalização celular (SKOG et al. 2008). Além disso, essas estruturas podem participar de processos patológicos importantes como inflamação e angiogênese (SKOG et al. 2008; KULSHRESHTHA et al. 2013). Uma concentração elevada destas EVs circulantes no sangue está associada com diversos tipos de câncer (DRAGOVIC et al. 2011). Os exossomos pertencem a uma classe de EVs cujo tráfego celular é melhor estudado; possuem origem endocítica e apresentam o diâmetro entre 50 e 200 nm (GYÖRGY et al. 2011).

Como demonstrado esquematicamente na figura 5, as EVs se formam a partir de invaginações da membrana plasmática e são transportadas para os endossomos iniciais e tardios que, por conseguinte, podem ser direcionados e dar origem aos MVBs (Corpos multivesiculares) (KELLER et

al. 2006). Os últimos podem se fundir à membrana plasmática e liberar as vesículas no ambiente extracelular, permitindo que estas atuem em processos de sinalização intercelular (DE GASSART et al. 2004). As proteínas Rab27a e Rab27b e seus respectivos efetores Slp4 (Proteína tipo sinaptotagmina 4) e EXPH5 (Exofilina 5) possuem diferentes papéis na liberação de EVs (OSTROWSKI et al. 2010). Rab27a é responsável pela fusão dos MVBs com a membrana plasmática e Rab27b medeia a transferência dos MVBs dos microtúbulos para a região cortical rica em actina e sua retenção na periferia celular (FUKUDA 2013).

Outro aspecto importante para a formação das vesículas endossomais é a seleção de proteínas que serão compartimentalizadas dentro dos MVBs. A mono-ubiquitinação parece ser uma marca para certas proteínas transmembranas serem selecionadas na via endossomal através de proteínas dos complexos ESCRT (Complexo endossomal de seleção protéica para transporte) (SMALHEISER 2007). A seleção das proteínas ubiquitinadas se inicia através do reconhecimento pela proteína VPS27/HRS (Proteína Vacuolar 27/Fator de crescimento de hepatócito regulado por tirosina cinase) que age como uma ponte entre as proteínas de membrana mono-ubiquitinadas e a clatrina nos endossomos. HRS recruta a proteína TSG101 (Gene tumoral de susceptibilidade 101) que é um dos componentes do complexo ESCRT I que também reconhece sítios de ubiquitinação. Por sua vez, ESCRT I recruta os complexos II e III que se conectam através da proteína Alix (Proteína X interagindo com Alg 2) (FÉVRIER e RAPOSO 2004). Esses componentes permitem a invaginação e brotamento de

vesículas e se dissociam da membrana do MVBs, mas a excisão da vesícula da membrana endossomal requer a ação da AAA ATPase VPS4 (Proteína Vacuolar de Seleção - 4) (SCHOREY e BHATNAGAR 2008).



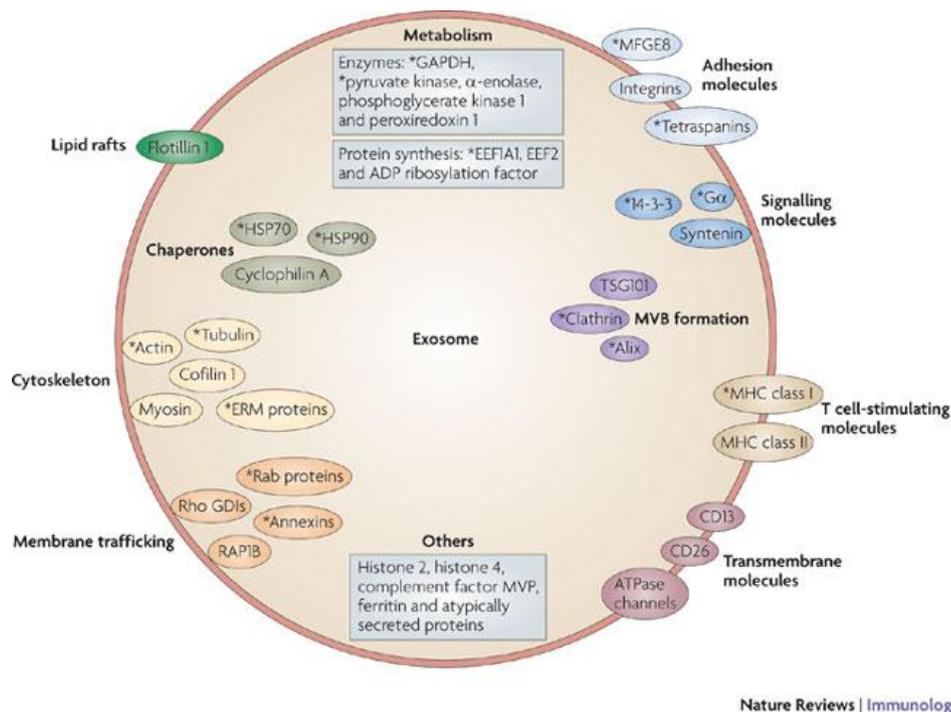
Fonte: Adaptado de BELLINGHAM et al. (2012).

Figura 5 – Biogênese de vesículas extracelulares através da via endossomal. O conteúdo endocitado é direcionado para o endossomo inicial (EE) onde será selecionado e empacotado em vesículas intraluminais (ILVs) nos corpos multivesiculares (MVB). A mono-ubiquitinação e a maquinaria de ESCRT podem facilitar este processo. Em seguida, os MVB podem se fundir aos lisossomos resultando em degradação do conteúdo, ou, podem se fundir à membrana plasmática, resultando na liberação das ILVs para o espaço extracelular, passo este regulado por proteínas Rab GTPases.

O carregamento das EVs pode variar de acordo com o tipo celular das suas células de origem e das condições nas quais elas se encontram (Figura 6) (MARLEAU et al. 2012; DE JONG et al. 2012). Em condições fisiológicas, as EVs derivadas de células B se destacam por seu papel em modulação do sistema imune através da capacidade de apresentação de antígenos

específicos (RAPOSO e STOOORVOGEL 2013). Já em tumores, as EVs carregam oncoproteínas, oncogenes, receptores, bem como fatores solúveis e transcritos de proteínas que podem contribuir para o pior prognóstico do tumor (PRINCIPE et al. 2013; MARTINS et al. 2013). PEINADO et al. (2012) descreveram que EVs derivados de linhagens de melanoma podem transferir MET para as células progenitoras da medula óssea, reforçando a mobilização celular destas células para os nichos pré-metastáticos. Assim, promovendo angiogênese e progressão metastática. Em glioblastoma, as células secretam EVs enriquecidas com EGFR e as células endoteliais recipientes podem incorporar estas EVs e aumentar a expressão de VEGF com a subsequente liberação deste fator que pode atuar de forma autócrina, aumentando a angiogênese deste tumor (AL-NEDAWI et al. 2008).

A transferência de miRNAs funcionais também tem se mostrado muito importante para a tumorigênese. Um trabalho recente aponta que EVs derivadas de células-tronco mesenquimais da medula óssea carregam miRNA-23b, que, por sua vez, são incorporadas e causam a latência das células tumorais, dificultando o tratamento quimioterápico destes tumores (ONO et al. 2014).



Fonte: Adaptado de THÉRY et al. (2009)

Figura 6 - Composição típica das EVs derivados de culturas celulares e fluidos biológicos. A avaliação foi baseada em 15 estudos de proteômica.

As células de GBM também secretam EVs que são importantes para a sua progressão. Utilizando EVs derivadas de linhagens celulares de GBM foi mostrada a transferência do oncogene EGFRvIII, forma truncada de EGFR, de uma célula positiva para uma negativa e, além disso, esta forma truncada proporciona um aumento na secreção de VEGF da célula receptora (SKOG et al. 2008; AL-NEDAWI et al. 2008). KUCHARZEWSKA et al. (2013) demonstrou que os EVs derivadas de células sob hipóxia refletem este estado. EVs de células hipóxia-induzidas são enriquecidas em mRNAs e proteínas envolvidas em hipóxia. Além disso, células HUVECs (Células endoteliais de veia umbilical humana) tratadas com essas EVs tiveram um

aumento no número de formação de túbulos, bem como de proliferação (KUCCHARZEWSKA et al. 2013).

Os miRNAs também podem ser encontrados em EVs, como o miRNA-21 (SKOG et al. 2008), envolvido no bloqueio da expressão de genes cruciais para a apoptose em GBM (CHAN et al. 2005). Um importante efeito das EVs em GBM é o de indução a quimioresistência. Os miRNA-451 e miRNA-27a foram descritos por serem secretados em EVs e regularem a expressão de proteínas envolvidas no processo de resistência a multidrogas (MDR), mecanismo importante para a resistência das células tumorais a uma variedade de drogas utilizadas para a quimioterapia (CHISTIAKOV e CHEKHONIN 2012). Interessantemente, assim como em outras patologias, EVs podem ser detectadas no sangue de pacientes e sua caracterização pode fornecer informações sobre marcadores diagnósticos relevantes, auxiliando em decisões terapêuticas em pacientes com GBM além de poder conter moléculas associadas ao processo tumoral que, quando identificadas, podem apontar para novos alvos terapêuticos (SKOG et al. 2008; SHAO et al. 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o papel de STAT3, STI1/Hop e da secreção de vesículas em GBMs.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Determinar o perfil de STAT3 e de suas formas fosforiladas em astrocitomas e correlacionar esses dados com os parâmetros clínico-patológicos dos pacientes;
- 2 Identificar o perfil de secreção de vesículas extracelulares em linhagens celulares de GBM e os mecanismos associados à biogênese e secreção destas vesículas;
- 3 Determinar o papel de vesículas extracelulares no processo de invasão em linhagens celulares de GBM;
- 4 Avaliar a expressão de proteínas envolvidas na maquinaria de biogênese e secreção de vesículas extracelulares em tecidos de astrocitomas e correlacioná-las com os parâmetros clínico-patológicos;
- 5 Determinar a expressão de STI1/Hop em astrocitomas e a sua correlação com os parâmetros clínico-patológicos.

3 RESULTADOS

3.1 O PERFIL DE EXPRESSÃO DE STAT3 E DE SUAS FORMAS FOSFORILADAS EM GBM

Os primeiros experimentos deste projeto foram iniciados na tentativa de confirmar dados da literatura que mostravam a interação direta entre STAT3 e STI1/Hop em células tronco embrionárias de camundongos (LONGSHAW et al. 2009). A abordagem inicial se baseava em entender a possível regulação de STAT3 por STI1/Hop em GBMs. Foram realizadas inúmeras abordagens na tentativa de co-imunoprecipitar as duas proteínas, mas não conseguimos resultados que confirmassem esta interação (**Anexo 2**), sugerindo fortemente que as duas proteínas não se associam. A expressão de STAT3, suas formas fosforiladas e de STI1/Hop foram ainda avaliadas por imuno-histoquímica em TMA (microarranjos de tecidos) contendo astrocitomas de graus I a IV (OMS, 2000) e também controles de tecidos cerebrais não neoplásicos provindos de cirurgias de epilepsia (**Anexo 1 e 3**). Foi encontrada uma correlação fraca/moderada entre a localização nuclear de STAT3 e de suas formas fosforiladas tirosina 705 [pSTAT3 (Y705)] e serina 727 [pSTAT3 (S727)] e a proteína STI1/Hop em astrocitomas (**Anexo 4**), o que não fortaleceu a nossa hipótese. Assim, as correlações das expressões em conjunto com os resultados das imunoprecipitações apontam para a ausência de associação direta entre

estas proteínas em GBM.

A expressão e localização nuclear de STAT3 e suas formas fosforiladas foram ainda correlacionadas com os parâmetros clínico-patológicos dos pacientes. Nossos resultados apontam para existência de uma via não canônica de ativação de STAT3, independente de suas fosforilações. GBMs possuem superexpressão da proteína STAT3 e altos níveis desta proteína no núcleo. Entretanto, o aumento de STAT3 nuclear não é acompanhado pelas suas formas fosforiladas, pSTAT3 (Y705) e pSTAT3 (S727). Sendo assim, sugerimos que em GBM STAT3 pode ser regulada através de uma via alternativa, que não através de fosforilação.

Desta forma, correlacionamos os níveis de STAT3 nuclear e de suas formas fosforiladas com a expressão da proteína MET, um marcador da via não fosforilada de STAT3 (u-STAT3). Uma correlação positiva foi encontrada entre STAT3 nuclear e MET, mas nenhuma associação foi encontrada com as formas fosforiladas pSTAT3 (Y705) e pSTAT3 (S727). Sugerindo que a via não fosforilada de STAT3 pode ser uma das responsáveis pela translocação desta proteína para o núcleo. Além disto, os altos níveis de STAT3 nuclear estão correlacionados com o menor tempo livre de recidiva e menor sobrevida global destes pacientes.

Estes resultados estão reunidos no artigo denominado “**Nuclear unphosphorylated STAT3 correlates with a worse prognosis in human glioblastoma**” que está como **Anexo 5** e já se encontra em processo de submissão.

3.2 LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DE STI1/HOP E A SUA CORRELAÇÃO COM PIAS1 EM GBM

A proteína STI1/Hop também foi avaliada por imuno-histoquímica no mesmo TMA utilizado para o trabalho anterior. Assim, temos que os GBMs possuem altos níveis de STI1/Hop nuclear, quando comparado aos astrocitomas de menor grau e ao controle não neoplásico. A translocação de STI1/Hop para o núcleo já foi descrita por alguns estudos o que acontece em condições específicas (HONORÉ et al. 1992; ODUNUGA et al. 2004; LONGSHAW et al. 2004; DANIEL et al. 2008). Apesar de diversos mecanismos propostos, a exata função de STI1/Hop nuclear permanecia desconhecida.

O grupo do nosso colaborador Dr. Marco Prado, no Robarts Institute (Canadá), começou a investigação através de um ensaio de duplo-híbrido com leveduras e caracterizou que STI1/Hop se associa à proteínas envolvidas em várias etapas do processo de SUMOilação (SOARES et al. 2013). A proteína PIAS1 se mostrou essencial para a manutenção de STI1/Hop no núcleo de astrócitos tratados com radiação gama (SOARES et al. 2013). Sabendo, a partir dos nossos dados anteriores, que GBM possui altos níveis de STI1/Hop nuclear, avaliamos a localização nuclear de PIAS1 nestas amostras. Nossos dados apontaram que existe uma correlação positiva entre a localização nuclear de STI1/Hop e PIAS1 em GBM. Desta forma, PIAS1 parece ter uma função importante na retenção de STI1/Hop no núcleo. Este acúmulo pode facilitar a atividade nuclear de STI1/Hop

supostamente relacionada à proteção contra quebra da dupla fita de DNA.

Estes resultados fazem parte do artigo “**Regulation of Stress-Inducible Phosphoprotein 1 nuclear retention by Protein Inhibitor of Activated STAT PIAS1**”, publicado em 2013 na revista *Molecular and Cellular Proteomics* (**Anexo 6**).

3.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SECREÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES (EVS) E A SECREÇÃO DE STI1/HOP EM GBM

Com o objetivo de avaliar o perfil de secreção de vesículas em GBM, utilizamos diferentes linhagens celulares humanas: LN-18, LN-229, U87MG, A172 e U118MG, todas comercialmente disponíveis pela ATCC (Coleção americana de tipos de cultura). O isolamento e quantificação destas EVs mostrou que os níveis de secreção são bem heterogêneos. Sobretudo duas linhagens, LN-18 e U87MG apresentaram dados muito diferentes com relação ao número de vesículas secretadas. Dessa forma, através de um *screening* de proteínas da via endossomal de secreção de vesículas, selecionamos a proteína Rab27b. A modulação nos níveis de Rab27b em GBMs se correlacionou diretamente com o número de vesículas secretadas e com o potencial invasivo nas células LN-18 e U87MG. Além da avaliação do número de vesículas, também avaliamos a secreção de STI1/Hop como uma proteína sabidamente secretada em vesículas (HAJJ et al. 2013) e com um papel importante para a progressão de GBM.

Todos estes resultados estão reunidos e discutidos no artigo intitulado

“Regulation of extracellular vesicles release by Rab27b in glioblastoma”. Este trabalho está em fase de finalização e alguns experimentos precisam ser repetidos para confirmar a sua significância estatística (**Anexo 7**).

3.4 O PERFIL DE EXPRESSÃO TOTAL DE STI1/HOP EM ASTROCITOMAS

Com o objetivo de explorar a expressão total de STI1/Hop em astrocitomas e correlacionar os achados com os aspectos clínico-patológicos desses pacientes, avaliamos não só a expressão total de STI1/Hop, mas também a do seu receptor PrP^C. Além disso, também utilizamos o marcador nuclear KI-67 para correlacionar a expressão das duas proteínas com a proliferação celular nestes tumores.

Nossos dados apontaram que os GBMs que possuem maior expressão de STI1/Hop e PrP^C, possuem um índice proliferativo maior e seus portadores apresentam uma menor sobrevida global dos pacientes acometido por este tumor. A avaliação de KI-67 em todos os graus de astrocitomas e o tecido cerebral não tumoral se encontra como **Anexo 8**.

Além disso, o tratamento de linhagens celulares com STI1/Hop promove o aumento da proliferação celular através da sua ligação à PrP^C na superfície celular e ativação das vias da MAPK e Erk1/2. Para confirmar este efeito do complexo STI1/Hop-PrP^C, as células foram pré-tratadas com o peptídeo Hop₂₃₀₋₂₄₅, que mimetiza o sítio de ligação de STI1/Hop à PrP^C e

depois tratadas com STI1/Hop e este efeito na proliferação não foi mais observado. Ensaios *in vivo* utilizando camundongos *nude* também foram realizados. As células de GBM foram injetadas nos animais e, quando os tumores já estavam estabelecidos, foram tratados com o peptídeo Hop₂₃₀₋₂₄₅ o que ocasionou o retardo do crescimento tumoral.

Estes dados estão no artigo intitulado “**Disruption of prion protein-HOP engagement impairs glioblastoma growth and cognitive decline and improves overall survival**”, recentemente aceito para publicação no periódico *Oncogene* (**Anexo 9**).

4 CONCLUSÃO

Os dados gerados neste projeto contribuíram para o maior entendimento da desregulação dos mecanismos moleculares associados à biologia do GBM. No primeiro artigo Rodrigues e colaboradores (submetido **Anexo 5**) dessa tese mostramos que uma via não canônica, na qual STAT3 pode se translocar para o núcleo independente de sua fosforilação, pode ser responsável por suas altas concentrações no núcleo o que se correlaciona com menor tempo livre de recidiva e sobrevida global do paciente com GBM. Assim, apontamos para a necessidade de inibidores que tenham como alvo não só os sítios de fosforilação da proteína, mas também outros domínios funcionais. Desta forma, poderá ser apontado um tratamento com maior sucesso que garanta a inibição exacerbada de STAT3.

A segunda parte do trabalho tem como foco a proteína STI1/Hop. Esta proteína apresenta localização citoplasmática onde possui, preferencialmente, papel na manutenção do complexo formado entre as proteínas de choque térmico Hsp70/Hsp90, mas também pode ser encontrada no núcleo sob condições específicas. Um estudo do grupo do Dr. Marco Prado do Robarts Institute no Canadá com a colaboração do nosso grupo descreveu a translocação e retenção nuclear de STI1/Hop após irradiação gama. Na presença da proteína PIAS1, STI1/Hop fica retida por mais de 24 horas no núcleo de astrócitos, o que pode facilitar a sua atividade de chaperona neste compartimento. Os GBM apresentam altos níveis de

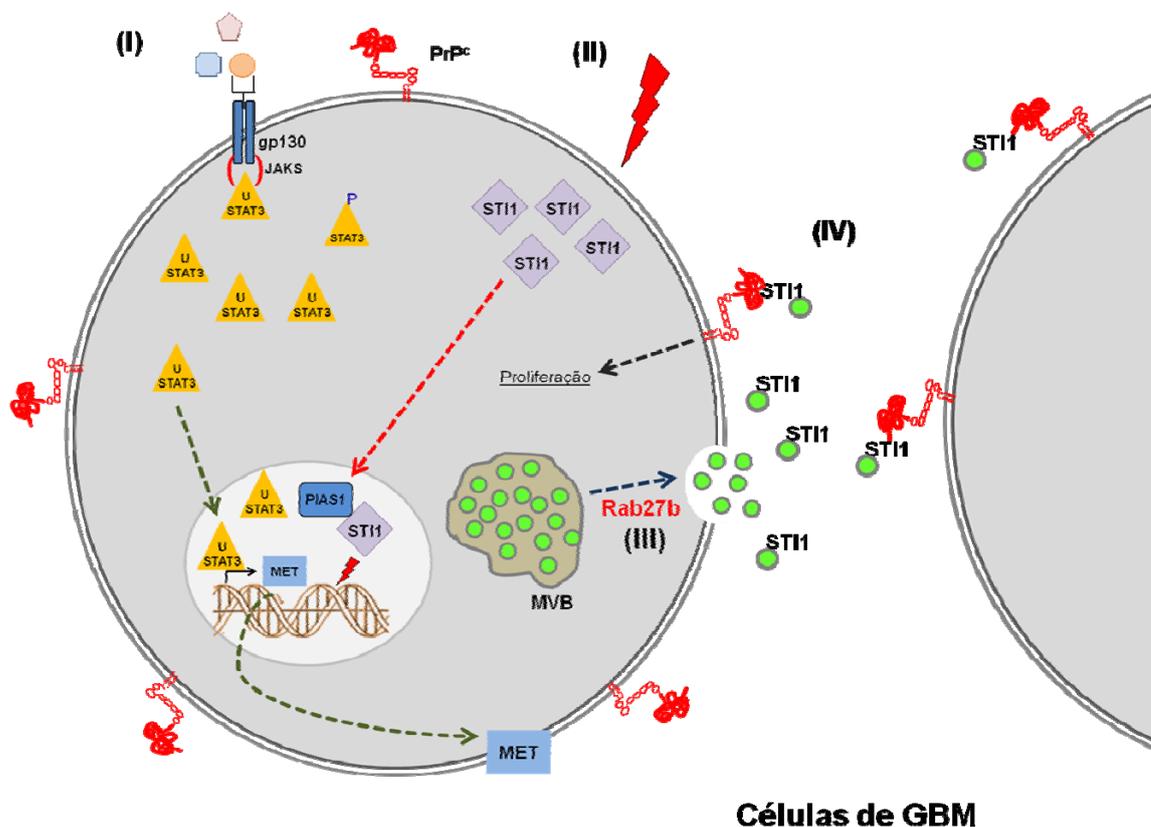
PIAS1 e STI1/Hop o que, provavelmente, pode acarretar na maior atividade de chaperona no núcleo, assim como nos astrócitos (SOARES et al. 2013).

Além do seu papel intracelular, STI1/Hop pode ser secretada em vesículas pelas células e atuar de maneira autócrina ou parácrina, através da sua ligação ao seu receptor PrP^C. STI1/Hop não possui peptídeo sinal para secreção por via clássica através de retículo endoplasmático-aparelho de golgi. Sendo assim, é secretada em associação com vesículas extracelulares, mecanismo este já descrito pelo nosso grupo (HAJJ et al. 2013). A proteína STI1/Hop extracelular pode se ligar a PrP^C e desencadear sinais associados à proliferação tumoral.

Avaliamos ainda toda a biogênese de vesículas extracelulares através da via endossomal e elencamos um possível alvo para modular a secreção de vesículas, Rab27b. A proteína foi validada e seus níveis correlacionaram com o potencial invasivo das células de GBM (Rodrigues e colaboradores, em preparação **Anexo 7**).

Desta forma, este trabalho descreve alterações em vias moleculares que contribuem para a atividade do GBM. Além disso, o peptídeo Hop₂₃₀₋₂₄₅ mostrou resultados muito promissores tanto *in vitro* quanto *in vivo* sobre a inibição do crescimento destes tumores mediada por STI1/Hop (Figura 7). Por outro lado, a modulação da secreção de vesículas também pode ser uma abordagem interessante com relação a estes tumores. Sendo estes tumores muito agressivos e com poucas possibilidades terapêuticas, maiores esforços na busca de novas e melhores terapias deve ser o alvo

principal de estudo visando o aumento da sobrevida dos pacientes acometidos por este tumor.



Células de GBM

Figura 7 - Esquema representativo dos principais resultados obtidos no trabalho com as células de GBM. (I) Possível mecanismo não canônico de translocação nuclear de STAT3 em GBM humano, independente de fosforilação (setas verdes); Altos níveis nucleares de u-STAT3 estão associados com a menor sobrevida livre de recidiva e menor sobrevida global destes pacientes. (II) Retenção nuclear de ST11/Hop por PIAS1 após radiação ionizante facilita a atividade nuclear de ST11/Hop na proteção contra o dano no DNA (seta vermelha). (III) Modulação da secreção de vesículas endossomais através da proteína Rab27b (seta azul) e (IV) O papel do complexo ST11/Hop-PrP^c em GBM; ST11/Hop é secretada em vesículas e estas podem se ligar à PrP^c de maneira autócrina ou parácrina e este complexo promove proliferação celular e crescimento tumoral (seta cinza). *MVB: Corpos multivesiculares.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, et al. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)** 2013; 61:25-41.

Agudelo-Garcia PA, De Jesus JK, Williams SP, et al. Glioma cell migration on three-dimensional nanofiber scaffolds is regulated by substrate topography and abolished by inhibition of STAT3 signaling. **Neoplasia** 2011; 13:831-40.

Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. **Nat Cell Biol** 2008; 10:619-24.

Arantes C, Nomizo R, Lopes MH, et al. Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development. **Glia** 2009; 57:1439-49.

Ball S, Li C, Li PK, Lin J. The small molecule, LLL12, inhibits STAT3 phosphorylation and induces apoptosis in medulloblastoma and glioblastoma cells. **PloS One** 2011; 6:e18820.

Bellingham SA, Guo BB, Coleman BM, Hill AF. Exosomes:vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? **Front Physiol** 2012; 3:124.

Beraldo FH, Arantes CP, Santos TG, et al. Role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in calcium signaling induced by prion protein interaction with stress-inducible protein 1. **J Biol Chem** 2010; 285:36542-50.

Beraldo FH, Soares IN, Goncalves DF, et al. Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein. **FASEB J** 2013; 27:3594-607.

Bid HK, Oswald D, Li C, London CA, Lin J, Houghton PJ. Anti-angiogenic activity of a small molecule STAT3 inhibitor LLL12. **PloS One** 2012; 7:e35513.

Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. **J Neurooncol** 2012; 108:11-27.

Brantley EC, Benveniste EN. Signal transducer and activator of transcription-3: a molecular hub for signaling pathways in gliomas. **Mol Cancer Res** 2008; 6:675-84.

Brennan C. Genomic profiles of glioma. **Current Neurol Neurosci Rep** 2011; 11:291-7.

Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Duvgan G, et al. Stat3 as an oncogene. **Cell** 1999; 98:295-303.

Carpenter RL, Lo HW. STAT3 target genes relevant to human cancers. **Cancers** 2014; 6:897-925.

Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, et al. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. **Nature** 2010; 463:318-25.

Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. **Cancer Res** 2005; 65:6029-33.

Cheng Y, Tao L, Xu J, et al. CD44/cellular prion protein interact in multidrug resistant breast cancer cells and correlate with responses to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. **Mol Carcinog** 2013. [Epub ahead of print].

Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO J** 2002; 21:3317-26.

Chistiakov DA, Chekhonin VP. Contribution of microRNAs to radio- and chemoresistance of brain tumors and their therapeutic potential. **Eur J Pharmacol** 2012; 684:8-18.

Chung CD, Liao J, Liu B, et al. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. **Science** 1997; 278:1803-5.

Cimica V, Chen HC, Iyer JK, Reich NC. Dynamics of the STAT3 transcription factor:nuclear import dependent on Ran and importin- β 1. **PloS One** 2011; 6:e20188.

Daniel S, Bradley G, Longshaw VM, Söti C, Csermely P, Blatch GL. Nuclear translocation of the phosphoprotein Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein) occurs under heat shock, and its proposed nuclear localization signal is involved in Hsp90 binding. **Biochim Biophys Acta** 2008;1783:1003-14.

de Gassart A, Géminard C, Hoekstra D, Vidal M. Exosome secretion:the art of reutilizing nonrecycled proteins? **Traffic** 2004; 5:896-903.

de Jong OG, Verhaar MC, Chen Y, et al. Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. **J Extracell Vesicles** 2012; 1:1-12.

Desrivières S, Kunz C, Barash I, Vafaizadeh V, Borghouts C, Groner B. The biological functions of the versatile transcription factors STAT3 and STAT5 and new strategies for their targeted inhibition. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2006; 11:75-87.

Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. **Nat Med** 1996; 2:1096-103.

Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using nanoparticle tracking analysis. **Nanomedicine** 2011; 7:780-8.

Erlich RB, Kahn SA, Lima FR, et al. ST11 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. **Glia** 2007; 55:1690-8.

Février B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. **Curr Opin Cell Biol** 2004; 16:415-21.

Fonseca AC, Romão L, Amaral RF, et al. Microglial stress inducible protein 1 promotes proliferation and migration in human glioblastoma cells. **Neuroscience** 2012; 200:130-41.

Fukuda M. Rab27 effectors, pleiotropic regulators in secretory pathways. **Traffic** 2013; 14:949-63.

Geiss-Friedlander R, Melchior F. Concepts in sumoylation: a decade on. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2007; 8:947-56.

Gerber NK, Goenka A, Turcan S, et al. Transcriptional diversity of long-term glioblastoma survivors. **Neuro Oncol** 2014; 0:1-10.

György B, Szabó TG, Pásztói M, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cell Mol Life Sci** 2011; 68:2667-88.

Hajj GN, Arantes CP, Dias MV,, et al. The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles. **Cell Mol Life Sci** 2013; 70:3211-27.

Han J, Yu C, Souza RF, Theiss AL. Prohibitin 1 modulates mitochondrial function of Stat3. **Cell Signal** 2014 Jun 26, [Epub ahead of print]

Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. **Nat Genet** 2000; 25:55-7.

Honoré B, Leffers H, Madsen P, Rasmussen HH, Vandekerckhove J, Celis JE. Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. **J Biol Chem** 1992; 267:8485-91.

McEwan JF, Windsor ML, Cullis-Hill SD. Antibodies to prion protein inhibit human colon cancer cell growth. **Tumor Biol** 2009; 30:141-7.

Kanu OO, Hughes B, Di C, et al. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. **Clin Med Oncol** 2009; 3:39-52.

Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. **Immunol Lett** 2006; 107:102-8.

Kim DJ, Tremblay ML, Digiovanni J. Protein tyrosine phosphatases, TC-PTP, SHP1, and SHP2, cooperate in rapid dephosphorylation of Stat3 in keratinocytes following UVB irradiation. **PloS One** 2010; 5:e10290.

Kim JE, Patel M, Ruzevick J, Jackson CM, Lim M. STAT3 activation in glioblastoma: biochemical and therapeutic implications. **Cancer** 2014; 6:376-95.

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. **Blood** 1995; 86:1243-54.

Kleihues P, Sobin LH. World Health Organization classification of tumors. **Cancer** 2000; 88:2887.

Krex D, Klink B, Hartmann C, et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. **Brain** 2007; 130:2596-606.

Kubota H, Yamamoto S, Itoh E, et al. Increased expression of co-chaperone HOP with HSP90 and HSC70 and complex formation in human colonic carcinoma. **Cell Stress Chaperones** 2010; 15:1003-11.

Kucharzewska P, Christianson HC, Welch JE, et al. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2013; 110:7312-7.

Kulshreshtha A, Ahmad T, Agrawal A, Ghosh B. Proinflammatory role of epithelial cell-derived exosomes in allergic airway inflammation. **J Allergy Clin Immunol** 2013; 131:1194-203.

Lee CT, Graf C, Mayer FJ, Richter SM, Mayer MP. Dynamics of the regulation of Hsp90 by the co-chaperone Sti1. **EMBO J** 2012; 3:1518-28.

Li C, Yu S, Nakamura F, et al. Pro-prion binds filamin A, facilitating its interaction with integrin beta1, and contributes to melanomagenesis. **J Biol Chem** 2010; 285:30328-39.

Li GH, Wei H, Chen ZT, Lv SQ, Yin CL, Wang DL. STAT3 silencing with lentivirus inhibits growth and induces apoptosis and differentiation of U251 cells. **J Neurooncol** 2009; 91:165-74.

Li QQ, Sun YP, Ruan CP, et al. Cellular prion protein promotes glucose uptake through the Fyn-HIF-2 α -Glut1 pathway to support colorectal cancer cell survival. **Cancer Sci** 2011; 102:400-6.

Lim SK, Llaguno SR, McKay RM, Parada LF. Glioblastoma multiforme: a perspective on recent findings in human cancer and mouse models. **BMB Rep** 2011; 44:158-64.

Lima FR, Arantes CP, Muras AG, Nomizo R, Brentani RR, Martins VR. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **J Neurochem** 2007; 103:2164-76.

Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. **Physiol Rev** 2008; 88:673-728.

Liu L, McBride KM, Reich NC. STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin-alpha3. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2005; 102:8150-5.

Liu Z, Hazan-Halevy I, Harris DM, et al. STAT-3 activates NF-kappaB in chronic lymphocytic leukemia cells. **Mol Cancer Res** 2011; 9:507-15.

Longshaw VM, Chapple JP, Balda MS, Cheetham ME, Blatch GL. Nuclear translocation of the Hsp70/Hsp90 organizing protein mSTI1 is regulated by cell cycle kinases. **J Cell Sci** 2004; 117:701-10.

Longshaw VM, Baxter M, Prewitz M, Blatch GL. Knockdown of the co-chaperone Hop promotes extranuclear accumulation of Stat3 in mouse embryonic stem cells. **Eur J Cell Biol** 2009; 88:153-66.

Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, et al. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **J Neurosci** 2005; 25:11330-9.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol** 2007; 114:97-109.

Ma J, Cao X. Regulation of Stat3 nuclear import by importin alpha5 and importin alpha7 via two different functional sequence elements. **Cell Signal** 2006; 18:1117-26.

Madore N, Smith KL, Graham CH, et al. Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. **EMBO J** 1999; 18:6917-26.

Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. **Genes Dev** 2001; 15:1311-33.

Mahvash M, Hugo HH, Maslehaty H, Mehdorn HM, Stark AM. Glioblastoma multiforme in children: report of 13 cases and review of the literature. **Pediatr Neurol** 2011; 45:178-80.

Marleau AM, Chen CS, Joyce JA, Tullis RH. Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. **J Transl Med** 2012; 10:134.

Martin S, Nishimune A, Mellor JR, Henley JM. SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission. **Nature** 2007; 447:321-5.

Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, et al. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nat Med** 1997; 3:1376-82.

Martins VR, Dias MS, Hainaut P. Tumor-cell-derived microvesicles as carriers of molecular information in cancer. **Curr Opin Oncol** 2013; 25:66-75

Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes:extracellular organelles important in intercellular communication. **J Proteomics** 2010; 73:1907-20.

Maussang D, Langemeijer E, Fitzsimons CP, et al. The human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes angiogenesis and tumor formation via cyclooxygenase-2. **Cancer Res** 2009; 69:2861-9.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2014 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Nicholson SE, De Souza D, Fabri LJ, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2000; 97:6493-8.

Nicolet CM, Craig EA. Isolation and characterization of ST11, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 1989; 9:3638-46.

Odunuga OO, Longshaw VM, Blatch GL. Hop:more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. **BioEssays** 2004; 26:1058-68.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **Am J Pathol** 2007; 170:1445-53.

Ono M, Kosaka N, Tominaga N, et al. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. **Sci Signal** 2014; 7:ra63.

Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. **Neuro Oncol** 2013; 15 Suppl 2:ii1-56.

Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. **Nat Cell Biol** 2010; 12:19-30.

Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. **Nat Med** 2012; 18:883-91.

Peña G, Cai B, Liu J, et al. Unphosphorylated STAT3 modulates alpha 7 nicotinic receptor signaling and cytokine production in sepsis. **Eur J Immunol** 2010; 40:2580-9.

Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. **Cancer Cell** 2006; 9:157-73.

Pichler A, Melchior F. Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. **Traffic** 2002; 3:381-7.

Principe S, Hui AB, Bruce J, Sinha A, Liu FF, Kislinger T. Tumor-derived exosomes and microvesicles in head and neck cancer: implications for tumor biology and biomarker discovery. **Proteomics** 2013; 13:1608-23.

Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. **Science** 1991; 252:1515-22.

Prusiner SB. Prions. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:13363-83.

Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles:exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol** 2013; 200:373-83.

Roffé M, Beraldo FH, Bester R, et al. Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:13147-52.

Ruckova E, Muller P, Nenutil R, Vojtesek B. Alterations of the Hsp70/Hsp90 chaperone and the HOP/CHIP co-chaperone system in cancer. **Cell Mol Biol Lett** 2012; 17:446-58.

Santos TG, Silva IR, Costa-Silva B, Lepique AP, Martins VR, Lopes MH. Enhanced neural progenitor/stem cells self-renewal via the interaction of stress-inducible protein 1 with the prion protein. **Stem Cells** 2011; 29:1126-36.

Sathornsumetee S, Reardon DA, Desjardins A, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Rich JN. Molecularly targeted therapy for malignant glioma. **Cancer** 2007; 110:13–24.

Schmid AB, Lagleder S, Gräwert MA, et al. The architecture of functional modules in the Hsp90 co-chaperone Sti1/Hop. **EMBO J** 2012; 31:1506-17

Schorey JS, Bhatnagar S. Exosome function:from tumor immunology to pathogen biology. **Traffic** 2008; 9:871-81.

Shao H, Chung J, Balaj L, et al. Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. **Nat Med** 2012; 18:1835-40.

Sims JD, McCreedy J, Jay DG. Extracellular heat shock protein (Hsp)70 and Hsp90 α assist in matrix metalloproteinase-2 activation and breast cancer cell migration and invasion. **PloS One** 2011; 6:e18848.

Skog J, Würdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nat Cell Biol** 2008; 10:1470-6.

Smalheiser NR. Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system. **Biol Direct** 2007; 2:35.

Soares IN, Caeta FA, Pinder J, et al. Regulation of stress-inducible phosphoprotein 1 nuclear retention by protein inhibitor of activated STAT PIAS1. **Mol Cell Proteomics** 2013; 12:3253-70.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med** 2005; 352:987-96.

Sun W, Xing B, Sun Y, et al. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by two-dimensional difference gel electrophoresis: novel protein markers in hepatocellular carcinoma tissues. **Mol Cell Proteomics** 2007; 6:1798-808.

Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nat Rev Immunol** 2009; 9:581-93.

Timofeeva OA, Chasovskikh S, Lonskaya I, et al. Mechanisms of unphosphorylated STAT3 transcription factor binding to DNA. **J Biol Chem** 2012; 287:14192–200.

Verhaak RG. W, Hoadley KA, Purdom E, et al. An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. **Cancer Cell** 2010; 17:98-110.

Vinkemeier U, Cohen SL, Moarefi I, Chait BT, Kuriyan J, Darnell JE Jr. DNA binding of in vitro activated Stat1a, Stat1 and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. **EMBO J** 1996; 15:5616–26.

Walsh N, O'Donovan N, Kennedy S, et al. Identification of pancreatic cancer invasion-related proteins by proteomic analysis. **Proteome Sci** 2009; 7:3.

Wang T, Niu G, Kortylewski M, et al. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. **Nat Med** 2004; 10:48-54.

Wang TH, Chao A, Tsai CL et al. Stress-induced phosphoprotein 1 as a secreted biomarker for human ovarian cancer promotes cancer cell proliferation. **Mol Cell Proteomics** 2010; 9:1873-84.

Wen Z, Zhong Z, Darnell JE, Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. **Cell** 1995; 82:241-50.

Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE, Stark GR. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. **Genes Dev** 2007; 21:1396-408.

Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells:role of STAT3 in the tumour microenvironment. **Nat Rev Immunol** 2007; 7:41-51.

Yue H, Li W, Desnoyer R, Karnik SS. Role of nuclear unphosphorylated STAT3 in angiotensin II type 1 receptor-induced cardiac hypertrophy. **Cardiovasc Res** 2010; 85:90-9.

Yue P, Turkson J. Targeting STAT3 in cancer:how successful are we? **Expert Opin Investig Drugs** 2009; 18:45-56.

Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO J** 2002; 21:3307-16.

Zhang Q, Raje V, Yakovlev VA, et al. Mitochondrial localized Stat3 promotes breast cancer growth via phosphorylation of serine 727. **J Biol Chem** 2013; 288:31280-8.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP da
Fundação Antônio Prudente



Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 28 de Janeiro de 2013.

À
Dra. Vilma Regina Martins

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1613/11
“Regulação da atividade de STAT3 e o papel da proteína STII/HOP secretada em glioblastoma multiforme”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 22/01/2013, **tomaram conhecimento e aprovaram** a seguinte documentação:

- Comunicação de mudança de nível de Mestrado para Doutorado da aluna Bruna Roz Rodrigues e alteração do título do projeto para “Regulação da atividade de STAT3 e o papel da proteína STII/HOP secretada em glioblastoma multiforme”, em carta datada de 22 de novembro de 2012;
- Declaração comprobatória de que Bruna Roz Rodrigues é aluna da Pós-graduação em Ciências da Fundação Antônio Prudente, datada de 23 de agosto de 2012;
- Relatório da Comissão Examinadora da Pós-graduação do Julgamento para mudança de nível de Mestrado para Doutorado, homologado em 21 de agosto de 2012;
- Projeto de Doutorado da aluna Bruna Roz Rodrigues, intitulado “Regulação da atividade de STAT3 e o papel da proteína STII/HOP secretada em glioblastoma multiforme”, datado de 18 de setembro de 2012.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa,