



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

TACIANE LADISLAU

**ESTUDO *IN VITRO* DA EFICÁCIA ANTINEOPLÁSICA DE
METFORMINA E DE EVEROLIMUS EM MONOTERAPIA E TERAPIA
COMBINADA COM ANTINEOPLÁSICOS CONVENCIONAIS NO
TRATAMENTO DO CÂNCER DE OVÁRIO**

Vitória
2013

TACIANE LADISLAU

**ESTUDO *IN VITRO* DA EFICÁCIA ANTINEOPLÁSICA DE
METFORMINA E DE EVEROLIMUS EM MONOTERAPIA E TERAPIA
COMBINADA COM ANTINEOPLÁSICOS CONVENCIONAIS NO
TRATAMENTO DO CÂNCER DE OVÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção o título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Leticia Batista Azevedo Rangel

**Vitória
2013**



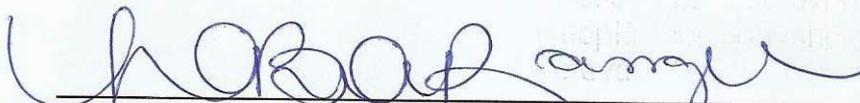
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

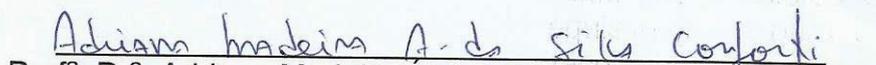
“Estudo *in vitro* da eficácia antineoplásica de metformina e de everolimus em monoterapia e terapia combinada com antineoplásicos convencionais no tratamento do câncer de ovário”

Taciane Ladislau

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada por:


Prof.ª. Dr.ª. Leticia Batista Azevedo Rangel (UFES)
Orientadora


Prof.ª. Dr.ª. Adriana Madeira Alvares da Silva Conforti (UFES)
Membro Interno


Prof.ª. Dr.ª. Etel Rodrigues Pereira Gimba (INCA/UFF)
Membro Externo

Vitória-ES, 20 de Novembro de 2013.

À minha avó, Mocinha, fonte de toda
inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente à Deus, por ter me proporcionado sabedoria e força para vencer todos os desafios.

À minha mãe, Luzia, pelos ensinamentos, dedicação e amor.

Aos meus familiares, especialmente meus avós e meus tios Matuzalém, Fabiana e Carmélia pelo apoio e confiança.

Ao Thiago pelo carinho, amor, companheirismo e compreensão.

A todos os amigos que acreditaram e torceram por minhas conquistas.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Leticia Batista Azevedo Rangel, pela orientação e grande contribuição para minha formação profissional.

Aos amigos do LBCMCH pelo carinho e companheirismo, e por fazerem do nosso laboratório um verdadeiro lar.

Ao laboratório de Pesquisa Clínica (SPC) do INCa, especialmente à Dr^a Cinthya Sternberg, pela oportunidade.

Ao Criobanco, especialmente o Bruno, pelas parcerias.

Aos farmacêuticos Luiz Farias Júnior e Jamile Ladislau por tão prontamente nos ajudar.

As Agências de Fomento CAPES, FAPES e CNPq.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo de travessia, e se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.

Fernando Pessoa

RESUMO

O câncer de ovário (CAOV) configura a malignidade ginecológica mais letal, em parte pela ausência de sinais e sintomas específicos, bem como estratégias de diagnóstico insuficientes. Grande parte das mulheres acometidas por CAOV são diagnosticadas em estádios avançados da doença, e apesar da responsividade inicial satisfatória aos antineoplásicos, eventualmente desenvolve-se quimiorresistência e recorrência. Com isso, novos agentes terapêuticos que atuem diretamente em alvos moleculares tem despontado como perspectiva de melhor prognóstico do CAOV. Neste contexto, investigamos a ação da metformina e do everolimus, agentes moduladores da proteína cinase *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR), em linhagens de CAOV ES-2 e A2780. Por meio do método MTT verificamos a redução da viabilidade celular metabólica (VCM) após o tratamento com metformina e everolimus em diversas concentrações, além da intensificação do efeito do paclitaxel. Ao combinarmos metformina 10 μ M com o taxano na concentração de 100nM a VCM foi reduzida em 56,55% na linhagem ES-2, e 71,38 % em A2780 em relação ao controle. De forma semelhante, everolimus 0,06nM adicionado ao paclitaxel 100nM diminuiu a VCM em 66,4% e 78,38% nas linhagens ES-2 e A2780, respectivamente. Ademais a manutenção da dose de metformina (10 μ M) e everolimus (0,06nM) associados ao paclitaxel 12,5nM promoveu uma VCM compatível à monoterapia com taxano à 100nM. Com o ensaio anexinaV/PI na linhagem ES-2, constatamos que a porcentagem total de células em apoptose/necrose induzida foi pequena, metformina 10 μ M 4,35%/3,85%, everolimus 0,06nM 1,25%/5,1%, contudo, verificamos sua ação sobre a VCM e assim, sugerimos a ocorrência de processos adicionais, como morte celular autofágica. Além disso, no tratamento com metformina e everolimus houve o predomínio de células na fase G0/G1, além de um aumento de células na fase G2/M na condição com metformina e na fase sub-G0 com everolimus. Nossos achados evidenciam a potencial empregabilidade de metformina e everolimus no tratamento do CAOV, um dos grandes desafios da clínica oncológica.

Palavras-chave: Câncer de ovário, Metformina, Everolimus.

ABSTRACT

Ovarian cancer (CAOV) is the most lethal of the gynecologic malignancies, partially due to the lack of specific signs and symptoms as well as diagnosis strategies insufficient. Most women affected by CAOV are diagnosed in advanced stages of the disease, and despite the initial satisfactory response to antineoplastic drugs, eventually develop chemoresistance and recurrence. Therefore, new therapeutic agents which focus on molecular targets has emerged as the prospect of better prognosis CAOV. In this context, we investigated the action of metformin and everolimus, modulators of protein kinase Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in the CAOV cell lines ES-2 and A2780. Metabolic cell viability (VCM) was reduced by metformin and everolimus in different concentrations, in addition intensifying the effect of paclitaxel. Combining metformin 10 μ M with taxane 100nM the VCM was reduced in 56,55% in the cell line ES-2, and 71,38% in A2780 compared to control. Similarly, everolimus 0,06 nM added to paclitaxel 100 nM decreased VCM in 66,4% and 73,38% in the cell lines ES-2 and A2780, respectively. Moreover the maintenance of metformin dose (10 μ m) and everolimus (0,06nM) associated with paclitaxel 12,5nM promoted a VCM compatible to taxane 100nM. We performed anexinaV/PI assay in ES-2 lineage, and a low percentage of apoptotic/necrotic cells was induced (metformin 10 μ M, 4.35%/3.85%; everolimus 0,06nM, 1.25%/5.1 %), however, we found its action on VCM and thus suggest occurrence of additional processes, such autophagic cell death. In addition, the cells predominated in phase GO/G1 with metformin and everolimus treatment, and there was an increase of cells in G2/M and sub-G0 phase with metformin and everolimus treatment, respectively. Our findings highlight the potential application of metformin and everolimus in the treatment of CAOV, a major challenge of clinical oncology.

Key words: Ovarian cancer, Metformin, Everolimus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via de sinalização de PI3K/AKT/mTOR.....	26
Figura 2 - Estrutura química do everolimus.....	31
Figura 3 - Estrutura química da metformina.....	33
Figura 4 - Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 e A2780 após o tratamento com cisplatina (A), paclitaxel (B) e doxorrubicina (C) em diferentes concentrações por 24h.....	47
Figura 5 - Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 e A2780 após o tratamento com metformina (A) e everolimus (B) em diferentes concentrações por 24h.....	49
Figura 6 - Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 (A) e A2780 (B) após o tratamento combinado com metformina e cisplatina por 24h.....	53
Figura 7 - Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 (A) e A2780 (B) após o tratamento combinado com metformina e paclitaxel por 24h.....	56
Figura 8: Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 (A) e A2780 (B) após o tratamento combinado com everolimus e cisplatina por 24h.....	59
Figura 9 - Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 (A) e A2780 (B) após o tratamento combinado com everolimus e paclitaxel por 24h.....	62
Figura 10 - Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 (A) e A2780 (B) após o tratamento combinado com metformina e doxorrubicina por 24h.....	64
Figura 11 - Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 (A) e A2780 (B) após o tratamento combinado com everolimus e doxorrubicina por 24h.....	65
Figura 12 - Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 (A) e A2780 (B) após o tratamento combinado entre everolimus e metformina por 24h.....	67
Figura 13 - Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 (A) e A2780 (B) após o tratamento com everolimus, metformina, cisplatina e	

paclitaxel em monoterapia ou em combinação por 24h.....	69
Figura 14 - Efeitos da combinação entre a metformina (10 μ M) e paclitaxel na viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 e A2780, em tratamento de 24 h.....	71
Figura 15 - Efeitos da combinação entre a metformina (10 μ M) e cisplatina na viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 e A2780, em tratamento de 24 h.....	72
Figura 16 - Efeitos da combinação entre a everolimus (0,06 nM) e paclitaxel na viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 e A2780, em tratamento de 24 h.....	73
Figura 17 - Efeitos da combinação entre a everolimus (0,06nM) e cisplatina na viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 e A2780, em tratamento de 24h.....	75
Figura 18 - Análise do ciclo celular na linhagem ES-2 tratada por 24h com metformina, everolimus, paclitaxel e cisplatina em diferentes concentrações e em combinação.....	82
Figura 19 - Esquemas terapêuticos antineoplásicos eficazes nas linhagens de CAO, à base de metformina e everolimus, determinados no presente estudo, e os possíveis mecanismos celulares deflagrados.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações das drogas clínicas utilizadas para cálculo de IC50....	40
Tabela 2 - Concentrações das drogas utilizadas na curva dose-resposta.....	40
Tabela 3 - Condições experimentais utilizadas no ensaio de indução de apoptose.....	42
Tabela 4 - Condições experimentais utilizadas na análise do ciclo celular.....	43
Tabela 5: Concentrações dos valores de IC50 estimada das drogas utilizadas nas linhagens ES-2 e A2780.....	45
Tabela 6: Indução de apoptose e necrose na linhagem de CAO V ES-2 após o tratamento com metformina, everolimus e quimioterápicos em monoterapia ou combinados.....	77

LISTA DE SIGLAS

- AMP – Adenosina monofosfato
- AMPK – Proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina
- AKT – Proteína cinase B
- ATP – Adenosina trifosfato
- A2780 – Linhagem de COE seroso
- CaMKK β - *Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase β*
- CAOV – Câncer de Ovário
- CA125 – Antígeno de câncer 125
- CISP – Cisplatina
- CSCs – Células tronco tumorais
- COEs – Carcinomas ovarianos epiteliais
- DEPTOR – *DEP-domain-containing mTOR-interacting protein*
- DLP – Doxorubicina Lipossomal Peguilada
- DMSO – Dimetilsufóxido
- DM2 – Diabetes mellitus tipo 2
- DOXO - Doxorubicina
- EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico
- ERK – Cinase controlada pela sinalização extracelular
- ES-2 – CAOV de células claras
- 4EBP-1 - *Translational inhibitor eIF-4E inhibitory protein*
- EO – Epitélio ovariano
- EVER - Everolimus
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FIGO - *International Federation of Gynecology and Obstetrics*
- FKBP12 – *FK506 binding protein 12*
- FRB - Domínio ligante da rapamicina-FKBP12
- FS – Fosfatidilserina
- GAP – Proteína ativadora de GTPase
- HER-2 – *Human epidermal growth factor receptor 2*
- IGF - Fator de crescimento semelhante à insulina
- IGFBP1 – Proteína ligante do fator de crescimento semelhante à insulina 1
- IGF-1R – Insulin-like Growth Factor-1 Receptor

IRS-1- Receptor de fatores de crescimento semelhante à insulina 1
Ki67 – Marcador de proliferação celular
LKB1 – *Liver Kinase B1*
MET - Metformina
MEK - Proteína cinase ativada por mitógeno
mLST8/GβL – *Mammalian lethal with Sec13 protein 8/G-protein β-subunit-like protein*
mSIN1 – *Mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1*
mTOR – Alvo da rapamicina em mamíferos
mTORC1 – Complexo 1 de mTOR
mTORC2 – Complexo 2 de mTOR
MTT – Metil-Tiazol-Tetrazólio
OCT1 – Transportador de cátion orgânico 1
PACLI - Paclitaxel
PI – Iodeto de propídeo
PI3K – Fosfatidil Inositol-3-Cinase
PIK3CA – Gene que codifica a subunidade catalítica de PI3K
PIK3R1 – Gene que codifica a subunidade regulatória de PI3K
PIP2 – Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3 – Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PDK1 – *Phosphoinositide-dependent Kinase 1*
PKC – Proteína cinase C
PRAS40 – *Proline-Rich Akt Substrate 40 kDa*
PROTOR - *Protein observed with RICTOR*
PTEN – *Phosphatase and tensin homolog*
p53 – Proteína tumoral 53
RAPTOR – *Regulatory-associated protein of mTOR*
Ras – Oncogene Ras
Rheb – *Ras homologue enriched in brain*
RICTOR – *Rapamycin-insensitive companion of mTOR*
RTKs – Receptores tirosino cinases
SGK – *Serum-and Glucocorticoid-regulated kinase*
S6K – *p70 S6 kinase*
TSC2 – *Tuberous Sclerosis Complex 2*
TSC1/TSC2 – Complexo supressor tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 O CÂNCER DE OVÁRIO.....	15
1.2 CLASSIFICAÇÃO E ESTADIAMENTO DO CAO.....	17
1.3 TRATAMENTO DO CAO.....	19
1.4 mTOR.....	23
1.4.1 mTORC1	26
1.4.2 mTORC2	28
1.4.3 Mecanismos de ativação de mTOR independentes de PI3K/AKT	28
1.5 EVEROLIMUS.....	30
1.6 METFORMINA.....	33
2 OBJETIVOS	36
2.1 GERAL.....	36
2.2 ESPECÍFICOS.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 CULTURA DE CÉLULAS.....	37
3.1.1 Linhagem Celular	37
3.1.2 Descongelamento	37
3.1.3 Cultivo	38
3.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA.....	38
3.2.1 Plaqueamento	38
3.2.2 Cálculo de IC50 estimado das drogas clínicas	39
3.2.3. Determinação do efeito da combinação entre as drogas sobre a viabilidade celular metabólica	40
3.2.4 Ensaio de MTT	41
3.3 ENSAIO DE INDUÇÃO DE APOPTOSE POR ANEXINA V/PI.....	41
3.4 ANÁLISE DO CICLO CELULAR.....	43
3.5 ANÁLISE DOS DADOS E TESTES ESTATÍSTICOS.....	44

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 EFEITOS DE METFORMINA E EVEROLIMUS NA VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA DE LINHAGENS DE CAOV.....	45
4.2 EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE QUIMIOTERÁPICOS CONVENCIONAIS COM METFORMINA E EVEROLIMUS NA VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA DE LINHAGENS DE CAOV.....	50
4.2.1 Efeitos da combinação de cisplatina com metformina na viabilidade celular metabólica de linhagens de CAOV	51
4.2.2 Efeitos da combinação de paclitaxel com metformina na viabilidade celular metabólica de linhagens de CAOV	54
4.2.3 Efeitos da combinação de cisplatina com everolimus na viabilidade celular metabólica de linhagens de CAOV	58
4.2.4 Efeitos da combinação de paclitaxel com everolimus na viabilidade celular metabólica de linhagens de CAOV	60
4.2.5 Efeitos da combinação de doxorubicina com metformina ou everolimus na viabilidade celular metabólica de linhagens de CAOV	63
4.2.6 Efeitos da combinação de metformina com everolimus na viabilidade celular metabólica de linhagens de CAOV	66
4.3 CONCENTRAÇÕES BAIXAS DE METFORMINA E DE EVEROLIMUS POTENCIALIZAM OS EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS DO PACLITAXEL, MAS NÃO DA CISPLATINA, NAS LINHAGENS DE CAOV ES-2 E A2780.....	70
4.4 EFEITO DA METFORMINA E DO EVEROLIMUS SOBRE A INDUÇÃO DE MORTE CELULAR NA LINHAGEM DE CAOV ES-2.....	75
4.5 EFEITOS DA METFORMINA E DO EVEROLIMUS SOBRE O CICLO CELULAR DE CÉLULAS DE CAOV ES-2.....	80
5 CONCLUSÃO	84
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	86
REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER DE OVÁRIO

O câncer de ovário (CAOV) representa o décimo câncer mais incidente entre as mulheres e configura a malignidade ginecológica mais letal. Estima-se que, em 2013, cerca de 22.240 mulheres serão diagnosticadas com CAOV nos Estados Unidos e aproximadamente 14.000 irão a óbito em decorrência dessa enfermidade (ACS, 2013). No Brasil, espera-se para o biênio 2012-2013 mais de 6.000 novos casos da doença, com risco estimado de 6 casos a cada 100.000 mulheres (INCA, 2011).

A incidência de CAOV aumenta com a idade, sendo 63 anos a idade média ao diagnóstico (Revisado por MORGAN et al., 2011; ACS, 2013), fato observado no Espírito Santo em um estudo epidemiológico sobre o CAOV, realizado por nosso grupo, que demonstrou a prevalência do CAOV em mulheres com idade superior a 60 anos (PAES et al., 2011). Considerando o envelhecimento populacional na sociedade moderna, vislumbra-se um crescimento impactante no número de casos de mulheres acometidas por essa neoplasia maligna, situação que reflete significativamente nos sistemas de saúde público e privado (Revisado por MAGALHÃES, 2013).

Estima-se que 90% dos CAOV ocorram esporadicamente, isto é, independem de herança familiar. Contudo, o histórico familiar de CAOV em parentes de primeiro grau triplica a chance de desenvolvimento dessa neoplasia (Revisado por CLARKE-PEARSON, 2009). Mulheres que apresentam mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 desenvolvem o CAOV mais cedo quando comparado àquelas acometidas por cânceres esporádicos, com um risco de vida de 39-45% para portadoras de mutações em BRCA1 e de 11-25% para as que exibem mutações no gene BRCA2 (Revisado por NGUYEN et al., 2013). Com isso, mulheres com histórico familiar de risco de desenvolvimento de CAOV, particularmente as portadoras de mutações em BRCA1 e BRCA2, são aconselhadas a realizarem salpingo-ooforectomia bilateral a fim de reduzir o risco de desenvolvimento dessa neoplasia no futuro. A mesma intervenção é proposta às pacientes jovens diagnosticadas com carcinoma ovariano

endometrióide ou seroso de alto grau, objetivando a redução da mortalidade das vítimas da doença (BEREK; CRUM; FRIEDLANDER, 2012).

Diversos fatores, além do envelhecimento e da hereditariedade, têm sido relacionados ao desenvolvimento do CAO, entre eles, menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade e histórico de infertilidade. Assim, esses estudos sugerem que a ovulação contínua predispõe à transformação maligna ovariana (INCA, 2011; ACS, 2013; MØRCH et al., 2009). Em adição aos fatores reprodutivos, a literatura indica como fatores de risco para o CAO a terapia de reposição hormonal pós-menopausa, uso de drogas para infertilidade, endometriose, inflamações crônicas, tabagismo e consumo de álcool. Por outro lado, elementos como multiparidade, amamentação e uso de contraceptivos orais são considerados fatores protetores contra o CAO (INCA 2011; Revisado por JELOVAC; ARMSTRONG, 2011). Cumpre salientar, entretanto, que esse ainda é um assunto controverso tanto entre pesquisadores quanto clínicos.

Aproximadamente 70% das pacientes de CAO são diagnosticadas em estádios avançados da doença, circunstância em que há comprometimento peritoneal e metástases à distância, corroborando o cenário ainda dramático do CAO. Quando o diagnóstico de CAO é realizado em estádios iniciais, mais de 90% das mulheres acometidas pela doença apresentam sobrevida de cinco anos ou mais. Entretanto, somente 15% dos casos de CAO são detectados precocemente (ACS, 2013; PAES et al., 2011). O diagnóstico ineficiente e tardio do CAO pode ser explicado, ao menos parcialmente, pela ausência de sinais e sintomas patognomônicos em suas fases iniciais. Dentre os sintomas inespecíficos, muitas vezes confundidos com condições benignas gastrointestinais, geniturinárias e ginecológicas, há inchaço e/ou dor pélvica ou abdominal, dificuldade em se alimentar ou rápida sensação de saciedade, sintomas urinários como urgência e alta frequência urinária e raro sangramento vaginal (ROSSING et al., 2010; Revisado por MORGAN et al., 2011). O sinal mais comum do CAO é o inchaço do abdômen, causado pelo acúmulo de líquido, caracterizando quadros de ascites indicativos de progressão da doença em seus estadiamentos mais avançados. Outro aspecto limitante para o diagnóstico precoce do CAO é a localização dos ovários dentro da

cavidade pélvica e consequente dificuldade de palpação (Revisado por GUBBELS et al., 2010).

Atualmente, as abordagens diagnósticas para investigação do CAO V na prática clínica envolvem o exame pélvico, ultrassonografia e quantificação de níveis séricos de CA125 (BEREK; CRUM; FRIEDLANDER, 2012). Contudo, estas técnicas não são suficientemente precisas para a detecção precoce da doença, sendo que o diagnóstico definitivo é confirmado apenas após a cirurgia e exame histopatológico. De fato, dificilmente o exame físico e a ultrassonografia permitem o rastreamento de tumores malignos de ovário em estadiamentos iniciais (ACS, 2013; Revisado por CLARKE-PEARSON, 2009).

Apesar do CA125 ser o biomarcador mais amplamente utilizado na clínica do CAO V e se apresentar elevado em 80% dos casos da doença, somente em 50% é detectado em estadios iniciais (Revisado por JELOVAC; ARMSTRONG, 2011). Além disso, o CA125 pode ser encontrado também em níveis anormais em outras condições neoplásicas e não neoplásicas incluindo cânceres do colo do útero, pulmão, cólon, pâncreas, cistos ovarianos, endometriose, apendicite e diverticulite, além de condições fisiológicas como gravidez e menstruação, resultando em alta taxa de resultados falso-positivos de CAO V (COLOMBO et al., 2010). Dessa forma, o CA125 não deve ser visto como um marcador diagnóstico do CAO V definitivo, mas como uma ferramenta de monitoramento e avaliação da resposta da paciente à terapia, uma vez que o decréscimo no nível de CA125 durante a quimioterapia é um importante fator prognóstico e representa um parâmetro de resposta clínica e progressão da doença (UZUNOGLU et al., 2013; LEVY et al., 2013). Diante do exposto, a descoberta e aplicação de biomarcadores tumorais do CAO V têm significativa importância para melhorias da situação atual de rastreamento do câncer.

1.2 CLASSIFICAÇÃO E ESTADIAMENTO DO CAO V

O ovário normal é um tecido complexo e contém três tipos principais de células: as células germinativas, que se diferenciam em ovócitos; células endócrinas e intersticiais, produtoras de estrogênio e progesterona e células epiteliais, que

revestem o ovário. Os três tipos celulares ovarianos podem originar tumores, sendo que os carcinomas ovarianos epiteliais (COEs) correspondem a aproximadamente 90% de todas as neoplasias malignas ovarianas, o que demonstra a importância de se estudar esses tumores (Revisado por ROMERO; BAST, 2012).

Os COEs constituem grupo de neoplasias heterogêneas, as quais foram inicialmente consideradas como sendo originadas a partir do epitélio ovariano (EO). Entretanto, as bases celulares e moleculares dos COEs permanecem em discussão, pois a sua origem vem sendo revisada por diversos grupos de pesquisa que verificaram semelhanças diversas entre células cancerosas ovarianas e células epiteliais de sítios extraovarianos no trato reprodutor feminino. A teoria emergente da origem do COEs propõe que os subtipos seroso e endometrióide são morfologicamente similares aos carcinomas de tuba uterina e endométrio, respectivamente (Revisado por DUBEAU, 2008; PRZYBYCIN et al., 2010). Acreditava-se que o subtipo mucinoso era semelhante ao carcinoma de endocérvix, porém estudos mais recentes verificaram características de mucosa intestinal (Revisado por KURMAN; SHIH, 2010). Adicionalmente, o COEs de células claras e o endometrióide podem surgir a partir de condição benigna, a endometriose (WIEGAND et al., 2010; YAMAMOTO et al., 2011).

Mesmo havendo questionamento quanto ao sítio exato de sua origem, os COEs são tradicionalmente classificados de acordo com o tipo de diferenciação do componente epitelial exibindo quatro principais subtipos: seroso, células claras, mucinoso e endometrióide. Os tumores serosos correspondem a cerca de 70%, os endometrióides 10%, os mucinosos 10%, e os de células claras a menos de 10% de todos os COEs diagnosticados (Revisado por JELOVAC; ARMSTRONG, 2011; BEREK; CRUM; FRIEDLANDER, 2012). Neste texto usaremos o termo CAOv em referência à COE.

O perfil histológico e o estadiamento preciso dos tumores ovarianos são necessários antes do tratamento sistêmico do CAOv. Neste contexto, o estadiamento do CAOv é realizado durante a laparotomia exploratória, seguindo os critérios estabelecidos pela *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO). Os achados operatórios determinam o padrão de extensão tumoral e

permitem o estadiamento do CAO. O tumor pode estar confinado nos ovários (estadio I), atingir estruturas pélvicas (estadio II), se expandir para a cavidade abdominal e linfonodos (estadio III), ou avançar além da cavidade peritoneal (estadio IV) onde, comumente, apresenta lesões no parênquima do fígado e efusões pleurais malignas (BEREK; CRUM; FRIEDLANDER, 2012). Como dito anteriormente, pacientes com doença diagnosticada no estadio I possuem melhor prognóstico, apresentando taxa de sobrevivência em cinco anos de 90-95% após o tratamento cirúrgico, enquanto nos estádios III e IV, a taxa cai para 20-30% e 10%, respectivamente, apesar do uso de quimioterapia adjuvante nas pacientes (ACS, 2013; Revisado por LALWANI et al., 2011). Infelizmente, aproximadamente 75% das mulheres são diagnosticadas com CAO nos estádios III ou IV, corroborando o caráter agressivo da doença previamente discutido (ACS, 2013; PAES et al., 2011; Revisado por GUBBELS et al., 2010).

1.3 TRATAMENTO DO CAO

O tratamento padrão do CAO inclui cirurgia citorrredutora seguida de quimioterapia baseada em derivados de platina (cisplatina e carboplatina) e taxanos (paclitaxel e docetaxel). O tratamento cirúrgico envolve salpingo-ooforectomia bilateral, histerectomia total, omentectomia, juntamente com biópsias e lavagens peritoneais (Revisado por MORGAN et al., 2011; BRASIL, Portaria nº 458, de 21 de maio de 2012; BEREK; CRUM; FRIEDLANDER, 2012). Em mulheres com tumores em estádios iniciais, a própria cirurgia de estadiamento está relacionada aos melhores resultados, enquanto que para pacientes com doença avançada, a remoção de todas as metástases abdominais maiores que um centímetro aumenta a eficácia da quimioterapia adjuvante, logo conferindo melhor possibilidade de desfecho clínico satisfatório à doente (BRISTOW et al., 2002; PANICI et al., 2005; CHANG; BRISTOW; RYU, 2012). Pacientes acometidas por tumores de graus III e IV inoperáveis à cirurgia devem ser submetidas à quimioterapia neoadjuvante, seguida de cirurgia citorrredutora e quimioterapia adjuvante (VERGOTE et al., 2010; RAUH-HAIN et al., 2013; ACS, 2013).

As estratégias quimioterápicas para o CAOV têm evoluído nas últimas décadas a fim de melhorar o prognóstico da doença e a qualidade de vida das portadoras dessa malignidade. Nas décadas de 1960 e 1970, as primeiras abordagens quimioterápicas para o CAOV envolviam agentes alquilantes, como o melfalano e ciclofosfamida, que induziam taxa de resposta à terapia de apenas 20-30% (Revisado por BAST Jr., 2011; Revisado por VAUGHAN et al., 2011). Ainda na década de 1970, ensaios clínicos demonstraram a atividade da cisplatina em casos de CAOV avançados e recorrentes. Com o advento da terapia baseada em cisplatina, a resposta inicial satisfatória à terapia foi observada em 70% dos casos de CAOV. Todavia, constatou-se o risco de mielossupressão e nefrotoxicidade nas pacientes submetidas ao tratamento supracitado (Revisado por BAST Jr., 2011; Revisado por CRISTEA et al., 2010). Com o intuito de sobrepor a toxicidade da cisplatina, outros análogos equipotentes à droga foram posteriormente desenvolvidos, como é o caso da carboplatina, os quais se provaram menos tóxicos que a molécula pioneira no que diz respeito à incidência de náuseas, neuropatia, oto e nefrotoxicidade. Há, por outro lado maior incidência de mielossupressão nas pacientes em uso de carboplatina quando comparado às usuárias de cisplatina (ALBERTS et al., 1992; DU BOIS et al., 2003).

De forma complementar, o paclitaxel foi empregado como opção terapêutica para o manejo clínico do CAOV. Ensaio clínicos evidenciaram que pacientes submetidas à quimioterapia combinada de paclitaxel e cisplatina apresentaram benefícios comparados à combinação padrão de cisplatina e ciclofosfamida (MCGUIRE et al., 1996; PICCART et al., 2000). Ao confrontar a utilização do taxano com cisplatina e carboplatina, não foram verificadas diferenças significantes entre os fatores prognósticos, mas o emprego desta última droga refletiu em redução da toxicidade metabólica (OZOLS et al., 2003; DU BOIS et al., 2003). Vale ressaltar que a utilização de taxanos está intimamente relacionada à ocorrência de neurotoxicidade e mielossupressão. Esses estudos foram fundamentais para a padronização do regime quimioterápico atual para o CAOV, constituído por derivados de platina e taxanos (Revisado por CRISTEA et al., 2010)

Por se tratar da terapia padrão de combate ao CAOV, abordaremos, resumidamente, os mecanismos de ação de platina e taxano. A cisplatina e seus

análogos produzem ligações cruzadas com as bases púricas do DNA gerando distorções da conformação do mesmo e consequente inibição dos processos de replicação e transcrição celular, culminando em interrupção do ciclo celular e apoptose (PINTO; LIPPARD, 1985; GESKE et al., 2000). O paclitaxel, por sua vez, atua estabilizando os microtúbulos o que provoca a desestabilização do fuso mitótico e induz, assim, o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, resultando em apoptose celular (JORDAN et al., 1993; Revisado por JORDAN; WILSON, 2004).

Apesar do sucesso inicial após o estabelecimento do tratamento padrão para o CAOV, cerca de 70% das pacientes apresentam relapso da doença e eventualmente desenvolvem quimiorresistência (Revisado por LEDERMANN et al., 2013). Em estudo epidemiológico realizado por nosso grupo constatou-se que 17,1% das mulheres acometidas por esta malignidade exibiam resistência à terapia baseada em platina, no Brasil esta frequência pode atingir 80% (PAES et al., 2011). De maneira complementar, recente pesquisa avaliando pacientes com CAOV em estádios III e IV detectou que 44,2% das mulheres que haviam sido submetidas à quimioterapia neoadjuvante desenvolveram resistência à platina, frente a 31,2% das pacientes que não utilizaram este tratamento (RAUH-HAIN et al., 2013). A elevada incidência de CAOV refratários ou com resistência adquirida à cisplatina é fator de impacto para a saúde pública visto que estes casos são extremamente agressivos e quase sempre culminam no óbito da paciente (Revisado por LEDERMANN et al., 2013; PAES et al., 2011; SHERMAN-BAUST et al., 2003).

O tratamento para as pacientes com doença recorrente resistente à platina (recorrência em menos de 6 meses do término da quimioterapia inicial) é realizado com agentes de segunda ou terceira linhas, que visam adiar a progressão tumoral, bem como manter a qualidade de vida e prolongar a sobrevida da paciente, tendo em vista a baixa taxa de sobrevida nesses casos (menos de 12 meses). Entre as opções terapêuticas temos o paclitaxel e docetaxel em monoterapia, além da doxorrubicina lipossomal peguilada (DLP) (MARKMAN et al., 2006; FERRANDINA et al., 2008; Revisado por MORGAN et al., 2011). DLP é antibiótico citostático que intercala no DNA e que difere da forma convencional não lipossomal por apresentar meia-vida plasmática longa e permitir alcance de concentração maior do fármaco no ambiente tumoral do que com a droga livre, assim, também reduzindo o grave perfil

cardiotóxico decorrente da utilização de doxorrubicina (Revisado por GUIMARÃES et al., 2013). Outra opção é o etoposídeo, inibidor da topoisomerase II, comumente utilizado como agente de terceira linha do tratamento do OVCA no Brasil. Ademais, o topotecan, inibidor da topoisomerase I e a gencitabina, análogo de pirimidina também podem compor a estratégia empregada no tratamento de CAO V (ABUSHAHIN et al., 2008; FERRANDINA et al., 2008; BRASIL, Portaria nº 458, de 21 de maio de 2012). Contudo, as diversas possibilidades terapêuticas listadas não refletem em redução da taxa de morbi-mortalidade do CAO V recorrente e resistente à platina, ressaltando a urgência em se determinar novas estratégias terapêuticas de manejo da doença (BEREK; CRUM; FRIEDLANDER, 2012).

Por outro lado, em pacientes com CAO V recorrente sensível à platina (recorrência após 6 meses ou mais), pode-se manter a terapia com platina e paclitaxel, e/ou substituir o taxano por outro composto quimioterápico, como docetaxel, DLP ou gencitabina. Ocasionalmente, mulheres submetidas ao mesmo esquema terapêutico (combinação de derivado de platina e paclitaxel) podem apresentar neurotoxicidade significativa, portanto, nestes casos combinações de novos fármacos com platina têm sido exploradas (BRASIL, Portaria nº 458, de 21 de maio de 2012; Revisado por MORGAN et al., 2011).

Como descrito anteriormente, os atuais regimes quimioterápicos empregados no CAO V eventualmente induzem à quimiorresistência das células tumorais, além de apresentarem grave perfil toxicológico às pacientes. Nesse contexto, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que atuem diretamente em alvos moleculares como receptores de fatores de crescimento, elementos de vias de tradução de sinais, reguladores de ciclo celular e de mecanismos angiogênicos envolvidos no crescimento, proliferação e sobrevivência celular vem se destacando no combate ao câncer (Revisado por LADISLAU et al., 2013). De fato, o aprofundamento no conhecimento da biologia do CAO V tem permitido a identificação de múltiplos alvos moleculares e a seletividade dos novos agentes possibilitando, ao menos em parte, a redução de toxicidade sistêmica. Contudo, a intervenção nos mecanismos supracitados, seja em esquemas monoterápicos ou politerápicos, permanece sob investigação (Revisado por PIGNATA et al., 2011).

Entre os possíveis alvos moleculares utilizados no combate ao câncer, destaca-se a via de sinalização de fosfatidil inositol-3-cinase/ proteína cinase B/ alvo da rapamicina em mamíferos (PI3K/Akt/mTOR), tendo em vista que mutações nos componentes de vias de sinalização envolvidas na tumorigênese, frequentemente, convergem em ativação de mTOR (MABUCHI et al., 2009). Por exemplo, receptores tirosino cinases (RTKs) tais como receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e receptor de fatores de crescimento relacionados à insulina 1 (IGF-1R) estão, muitas vezes, aberrantemente ativos em células cancerosas e funcionam como gatilho para a ativação de múltiplas cinases citoplasmáticas. Adicionalmente, em diversos tipos de câncer, dentre eles o CAOV, foram detectadas amplificação e superexpressão nos genes que codificam a subunidade catalítica e regulatória de PI3K (PIK3CA e PIK3R1, respectivamente), AKT e cinase dependente de fosfatidilinositol 1 (PDK1), além de inativação ou perda de função de *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) e de outros reguladores negativos de mTOR, como *tuberous sclerosis complex 2* (TSC2), p53 e *liver kinase B1* (LKB1) (Revisado por WILLEMS et al., 2012; HUANG et al., 2011). Apesar do papel desenvolvido por mTOR durante a progressão tumoral, ainda não foi bem estabelecido se mTOR constitui um proto oncogene (MURUGAN; ALZHRANI; XING, 2013). No CAOV, 40% dos casos apresentam amplificação em PIK3CA, e, entre essas pacientes, 40% também possuem mutações no gene PIK3R1 ou PTEN (Revisado por DOBBIN; LANDEN, 2013; HUANG et al., 2011). Sendo assim, alterações genéticas que culminam com a desregulação funcional da via de PI3K parecem contribuir para o desenvolvimento e/ou a progressão do CAOV, destacando, portanto, a importância de intervir farmacologicamente na mesma como estratégia de combate ou de controle à doença.

1.4 mTOR

mTOR foi caracterizado no início dos anos 90 ao ser estabelecido o alvo celular da rapamicina, composto inicialmente empregado como antifúngico. mTOR é uma serina treonina cinase que possui 289kDa e pertence à família das proteínas cinases relacionadas à PI3K (família PIKK), sendo bem conservada durante a evolução dos organismos eucarióticos (SABATINI et al., 1994; CHEN et al., 1995).

Representa proteína efetora da via de sinalização de PI3K que regula processos de crescimento, proliferação e sobrevivência celular. Além disso, encontra-se frequentemente ativada no CAOV e configura importante mecanismo de resistência à quimioterapia (Revisado por LIU et al., 2009).

Em sua porção C-terminal, mTOR contém o sítio catalítico de cinase, que apresenta homologia ao domínio catalítico de PI3K. Nesta região, fosforilações em treonina 2446, serina 2448 e serina 2481 são correlacionadas com altos níveis de atividade de mTOR. Ademais, o domínio ligante da rapamicina-FKBP12 (domínio FRB), considerado sítio inibitório de interação entre rapamicina, seus análogos e mTOR, está localizado adjacente ao domínio catalítico de cinase (KUNZ et al., 1993; CHEN et al., 1995; Revisado por SCHMELZLE; HALL, 2000). Por fim, mTOR possui em sua região N-terminal, aproximadamente 20 repetições em *tandem* de 40 aminoácidos agrupadas em dois blocos, denominadas repetições HEAT. Dessas repetições se formam estruturas secundárias helicoidais envolvidas na interação de complexos multiproteicos (Revisado por ZHOU; HUANG, 2010).

mTOR é o componente catalítico de dois complexos multiproteicos, o complexo 1 de mTOR (mTORC1) e o complexo 2 de mTOR (mTORC2). mTORC1, considerado sensível à rapamicina, é composto por mTOR, *mammalian lethal with Sec13 protein 8/ G-protein β -subunit-like protein* (mLST8/G β L), *regulatory-associated protein of mTOR* (RAPTOR), *proline-rich Akt Substrate 40 kDa* (PRAS40) e *DEP-domain-containing mTOR-interacting protein* (DEPTOR) (HARA et al., 2002; KIM et al., 2002; PETERSON et al., 2009). Por sua vez, mTORC2, o complexo de mTOR resistente à rapamicina, compreende mTOR, mLST8/G β L, DEPTOR, *rapamycin-insensitive companion of mTOR* (RICTOR), *protein observed with RICTOR* (PROTOR) e *mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1* (mSIN1) (SARBASSOV et al., 2004; PETERSON et al., 2009).

As proteínas que compõem os complexos de mTOR (mTORCs) controlam a sinalização de mTOR, mantêm a integridade dos complexos e regulam a especificidade ao seu substrato. RAPTOR regula positivamente a atividade de mTOR e recruta substratos de mTORC1 (HARA et al., 2002; KIM et al., 2002). Por outro lado, PRAS40 regula mTOR negativamente (SANCAK et al., 2007) enquanto

que a função de mLST8/GβL ainda não é compreendida. DEPTOR, recentemente descoberto, regula negativamente os mTORCs, entretanto constatou-se que a superexpressão proteínica é necessária à ativação de PI3K e AKT em um conjunto de mielomas múltiplos. Além disso, mTORCs também atuam diretamente sobre PRAS40 e DEPTOR, os inativando por fosforilação e, em consequência, mantendo a ativação da sinalização de mTOR (PETERSON et al., 2009; Revisado por EFEYAN; SABATINI, 2010). Em mTORC2, RICTOR e mSin1 interagem, formando a base estrutural deste complexo, proporcionando seus sítios de interação com substratos, enquanto a função de PROTOR permanece sob investigação, uma vez que ainda não foram descobertos domínios funcionais no mesmo (FRIAS et al., 2006; Revisado por GUERTIN; SABATINI, 2007). Os dois complexos de mTOR, bem como a via de sinalização de PI3K/AKT/mTOR, estão representados na Figura 1.

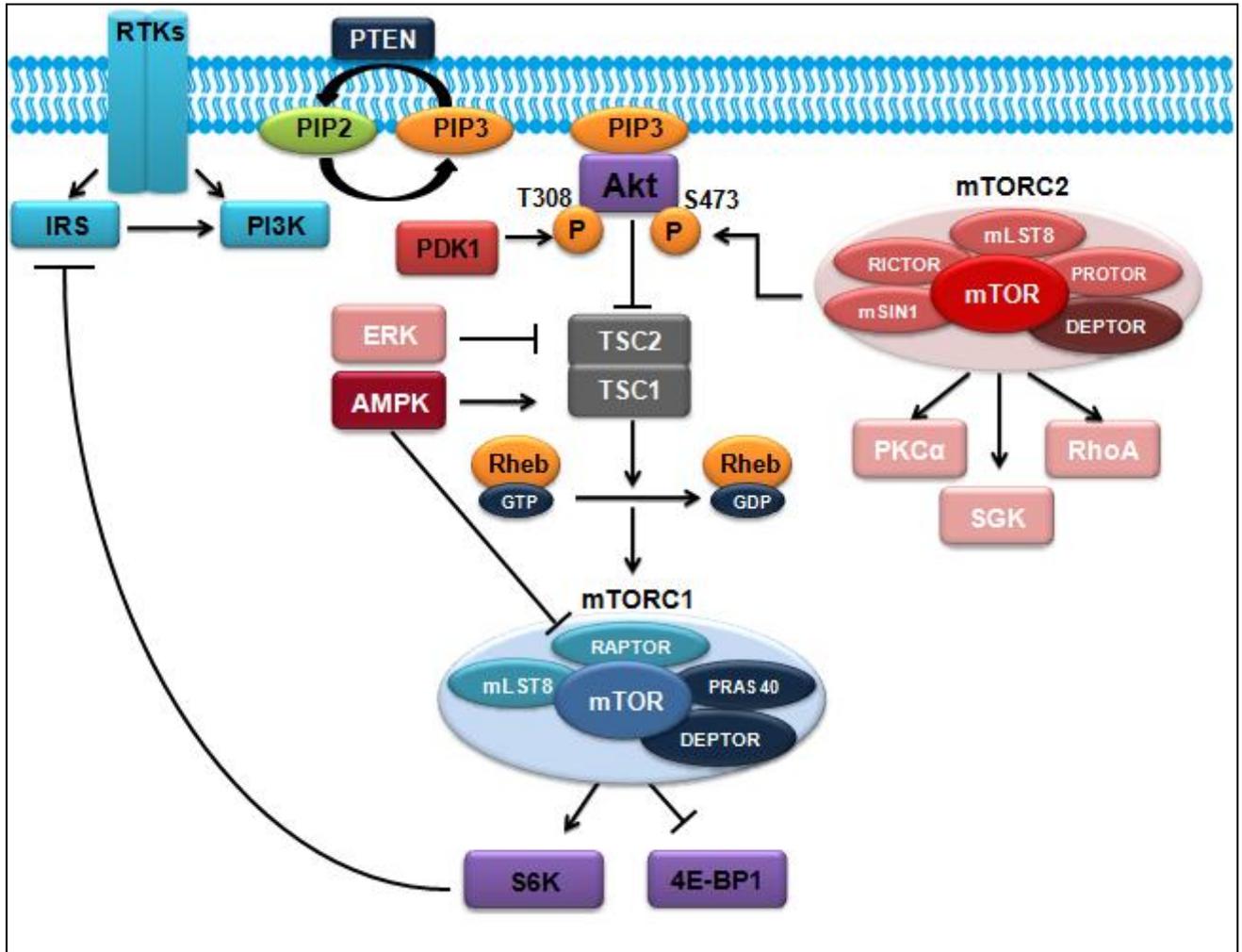


FIGURA 1: A Via de sinalização de PI3K/AKT/mTOR pode ser ativada por estímulos extracelulares, como fatores de crescimento, que interagem com RTKs. PI3K ativada converte PIP2 à PIP3 em processo revertido por PTEN. PIP3 atrai AKT à membrana plasmática permitindo sua ativação por PDK1 e mTORC2. AKT, atua sobre TSC1/TSC2, levando à ativação de mTORC1, que fosforila S6K e 4E-BP1 induzindo à síntese proteica, crescimento e proliferação celular. S6K exerce um mecanismo de retroalimentação negativa sobre IRS. mTORC1 pode ser regulado positivamente por ERK, ou negativamente por AMPK. mTORC2 também estimula processos proliferativos por atuar sobre AKT, PKC, SGK e GTPases RhoA.

1.4.1 mTORC1

mTORC1 regula ampla variedade de processos celulares, incluindo crescimento celular, proliferação e síntese protéica por meio da fosforilação de seus efetores *downstream*, *p70 S6 kinase* (S6K) e *translational inhibitor eIF-4E inhibitory protein* (4EBP-1) (Revisado por GUERTIN; SABATINI, 2007). Este complexo de mTOR também inibe autofagia (GANLEY et al., 2009), regula síntese lipídica (PORSTMANN et al., 2008), e o metabolismo mitocondrial (SCHIEKE et al., 2006).

A ativação de mTORC1 pode ocorrer via PI3K por meio de estímulos extracelulares como fatores de crescimento, insulina e citocinas que interagem com RTKs, como EGFR, IGF-1R, and *human epidermal growth factor receptor 2* (HER-2 ou ERBB2) ou ativada por oncogenes como Ras (Revisado por COURTNEY; CORCORAN; ENGELMAN, 2010). Uma vez ativada, PI3K fosforila seu substrato fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2), levando à geração do segundo mensageiro lipídico fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), processo antagonizado por PTEN. Por meio de PIP3, PDK1 e AKT são recrutadas à membrana plasmática, AKT é fosforilada e ativada por PDK1 no resíduo 308 de treonina e por mTORC2 no resíduo 473 de serina (SARBASSOV et al., 2005).

Por sua vez, AKT propaga a sinalização intracelular ao fosforilar TSC2 e inativar o complexo supressor tumoral TSC1/TSC2. Com isso, TSC2 que atua como Proteína Ativadora de GTPase (GAP) sobre *Ras homologue enriched in brain* (Rheb), permite o acúmulo de RhebGTP e consequente ativação de mTORC1. Outra ação de AKT é fosforilar e inativar PRAS40 no domínio 246 de treonina, reduzindo a inibição de mTORC1 (SANCAK et al., 2007). Vale salientar que existem evidências de que a interação entre AKT e TSC2-Rheb-mTORC1 seja etapa crítica em processos tumorigênicos mediados pela via de sinalização celular de PI3K (Revisado por ZONCU; EFEYAN; SABATINI, 2011).

Uma vez ativado, mTORC1 promove suas ações principais por fosforilação de seus efetores S6K e 4EBP-1, proteínas envolvidas na tradução de mRNA e regulação da síntese protéica. Entretanto, S6K está envolvida em mecanismo regulatório de retroalimentação negativa por intermédio da inibição e degradação do receptor de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IRS-1) culminando em supressão da via de PI3K/AKT/mTOR (Figura 1). Este mecanismo reflete negativamente nas respostas terapêuticas baseadas na inibição de mTOR, visto que ao bloquear esta proteína se extingue a regulação da via por S6K resultando em sua ativação e consequentemente promoção de sobrevida celular e quimiorresistência (O'REILLY et al., 2006; Revisado por EFEYAN; SABATINI, 2010).

1.4.2 mTORC2

mTORC2 regula a sobrevivência celular, anabolismo e proliferação através da fosforilação de AKT, no sítio da serina 473, e de *serum-and glucocorticoid-regulated kinase* (SGK). Além de promover a organização do citoesqueleto celular por ativação da proteína cinase C (PKC) e por interação com a família de GTPases Rho. Apesar da descrição destas ações, o mecanismo de ativação de mTORC2 não está completamente elucidado (JACINTO et al., 2004; SARBASSOV et al., 2004; SARBASSOV et al., 2005; PETERSON et al., 2009).

Foi proposto que mTORC2 seja ativado por fatores de crescimento ou diretamente por PIP3. Além disso, a sinalização via PI3K estimula a associação de mTORC2 aos ribossomos envolvidos na tradução de AKT. Com isso, mTORC2 fosforila o peptídeo recém formado no sítio 450 de treonina, de modo a garantir a conformação de AKT (OH et al., 2010). Em contraste ao observado em relação ao mTORC1, estudos recentes revelaram que o complexo TSC1/TSC2 promove atividade de mTORC2 por interação com RICTOR de forma independente de Rheb (HUANG et al., 2008). Além disso, observou-se que mTORC2 também pode ser regulado pela GTPase Rac1 (família de GTPases Rho) bem como por P-Rex 1 (fator de troca de nucleotídeos guanina de Rac1) que promovem a atração de mTORC2 à membrana plasmática e sua ativação por mecanismos ainda não esclarecidos (HERNÁNDEZ-NEGRETE et al., 2007; SACI; CANTLEY; CARPENTER, 2011).

Adicionalmente, foram elucidadas outras vias que regulam a atividade de mTOR, independente de PI3K/AKT, o que poderia fornecer novos alvos terapêuticos para inibir a proteína cinase referida no câncer e contribuir para a avaliação da resposta dos inibidores de mTOR desenvolvidos (Revisado por MEMMOTT; DENNIS, 2009).

1.4.3. Mecanismos de ativação de mTOR independentes de PI3K/AKT

O processo de tumorigênese desencadeado por mTOR, além de ser modulado por PI3K/AKT, sofre interferência de outros mecanismos que envolvem

integração de sinais mitogênicos, alterações no nível energético intracelular, disponibilidade de aminoácidos e hipóxia (Revisado por MEMMOTT; DENNIS, 2009). Entre estes iremos enfatizar o envolvimento de cinase controlada pela sinalização extracelular (ERK) e proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) na regulação desta proteína.

A via de sinalização de Ras/ proteína cinase ativada por mitógeno (MEK)/ERK, discutida adiante, pode regular a atividade de mTOR por meio da inibição de TSC2 por ERK, fato que fornece evidências da ação sinérgica de PI3K/AKT e Ras/MEK/ERK na inibição do complexo TSC1/TSC2 (Revisado por STEELMAN et al., 2011). ERK integra via de sinalização iniciada por mitógenos por meio do estímulo de RTKs, como EGFR, HER-2 e IGF-1R, e funciona como principal efetor da oncoproteína Ras. ERK fosforila fatores de transcrição, alterando o padrão de expressão gênica dos mesmos, o que reflete em indução de genes que promovem a divisão celular, motilidade e sobrevivência de células (Revisado por MENDOZA; ER; BLENIS, 2011).

Uma forma de regulação negativa de mTOR envolve AMPK por meio da ativação de TSC2, ou diretamente por meio da fosforilação de RAPTOR (GWINN et al., 2008; Revisado por MEMMOTT; DENNIS, 2009). AMPK configura o principal regulador metabólico celular e promove o equilíbrio entre o suprimento de nutrientes com a demanda energética. Esta cinase é ativada em condições de estresse energético, quando há desequilíbrio entre a produção de ATP e o seu consumo, aumentando a relação AMP/ATP. O processo envolve fosforilação de AMPK no resíduo 172 de treonina, catalisado por LKB1, conhecido supressor tumoral. Diferentemente, em resposta à elevação dos níveis de cálcio intracelular, independente da taxa AMP/ATP, AMPK pode ser ativada por *Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase β* (CaMKK β) (SHAW et al., 2004; WOODS et al., 2005; Revisado por FOGARTY; HARDIE, 2010). Uma vez ativada, AMPK estimula a oxidação de ácidos graxos e absorção de glicose a fim de promover a produção de ATP e, paralelamente, reduz a utilização de ATP por processos de síntese de ácidos graxos e gliconeogênese, visando recuperar o balanço energético celular (Revisado por MEMMOTT; DENNIS, 2009).

1.5 EVEROLIMUS

O bloqueio da via de PI3K/AKT/mTOR tem sido bem sucedido em diversos tipos de câncer, e alguns agentes inibidores de mTOR já estão disponíveis para o uso clínico. O primeiro composto desenvolvido foi a rapamicina; entretanto, devido à sua baixa hidrossolubilidade, que reflete negativamente na sua biodisponibilidade, foram desenvolvidos alguns análogos da rapamicina com fins à melhoria de seus parâmetros farmacocinéticos insatisfatórios. Entre eles, pode-se listar everolimus (RADD001, Novartis) (Figura 2), temsirolimus (CCI-779, Wyeth, NJ) e ridaforolimus (AP23573, Ariad Pharmaceuticals) (Revisado por ZAYTSEVA et al., 2012).

Everolimus, um análogo da rapamicina, executa seu mecanismo de ação por inibição de mTOR. Assim como a rapamicina, o everolimus se associa ao receptor intracelular *FK506 binding protein 12* (FKBP12) e, então, este complexo interage com o domínio FRB de mTOR, em mecanismo de inibição alostérica da cinase. A sensibilidade diferencial dos mTORCs à rapamicina e seus derivados provavelmente deriva da oclusão do domínio FRB em mTORC2 (KUNZ et al., 1993; CHEN et al., 1995; Revisado por ALVARADO et al., 2011). Contudo, estudos têm demonstrado a capacidade destes fármacos em inibir mTORC2 de maneira dependente da dose utilizada, tempo de tratamento e tipo celular. Verificou-se que o tratamento prolongado com rapamicina compromete os níveis de mTORC2 em linhagens de câncer de pulmão e mama, entre outras, inclusive ovário (dados não publicados no nosso laboratório), sendo a mesma ação observada em linhagens de leucemia mielóide aguda tratadas com everolimus e temsirolimus por 24h (SARBASSOV et al., 2006; ZENG et al., 2007).

Infelizmente, ao bloquear mTORC1, o everolimus promove a ativação da sinalização de PI3K devido ao bloqueio do mecanismo de retroalimentação negativa de S6K sobre IRS-1 (Revisado por ZAYTSEVA et al., 2012). Em consequência, mTORC2 é superativado e mantém a sinalização via AKT. Adicionalmente, há ativação compensatória da via de ERK, fato que promove proliferação, crescimento e sobrevivência celulares, constituindo mecanismo de resistência a este composto (CARRACEDO et al., 2008). Contudo, o efeito não desejado pode ser evitado pela inibição concomitante de PI3K ou AKT e mTORC1 e mTORC2, bem como da via de

ERK. Recentemente, alguns grupos independentes têm gerado inibidores competitivos de ATP que bloqueiam as ações de ambos os complexos mTORC1 e mTORC2, e inibidores duplos de mTOR e PI3K (Revisado por LADISLAU et al., 2013).

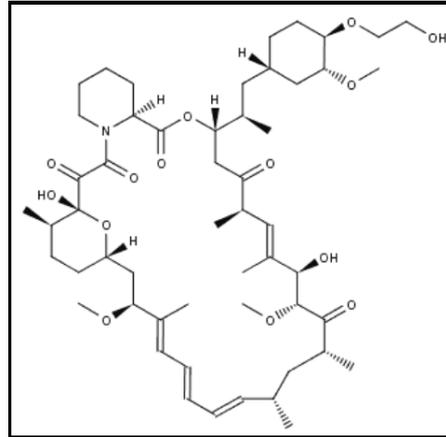


FIGURA 2: Estrutura química do everolimus
Fonte: TSENG; LI; HSIEH (2013).

Desde o ano 1996, o everolimus tem sido empregado como agente imunossupressor em casos de transplantes de órgãos sólidos, a fim de evitar a rejeição aos mesmos (Revisado por AGARWALA; CASE, 2010). Em suma, o bloqueio da via de PI3K promove a redução da proliferação de células T por induzir parada do ciclo celular na fase G1 e apoptose celular (FLECHNER; KOBASHIGAWA; KLINTMALM, 2008). A eficácia do everolimus como agente antineoplásico vem sendo investigada e seu uso foi aprovado, pelas agências internacionais *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicines Agencies*, para tratamento de carcinoma renal de células claras, tumores pancreáticos neuroendócrinos e, recentemente, para câncer de mama HER-2 negativo em combinação com exemestano, após falha na terapia com letrozol ou anastrozol (Revisado por O'REILLY; MCSHEEHY, 2010; FDA). Recentemente, no Brasil, a Agência Nacional de Saúde, lançou a Resolução Normativa nº 338, de 21 de outubro de 2013, incluindo o everolimus para o manejo do câncer de mama nas condições de falh terapêutica citada anteriormente. Contudo, o tratamento com everolimus pode ocasionar efeitos adversos dependendo da dose utilizada, sendo os mais comuns mucosite, anemia, fadiga, estomatite, dor abdominal e diarreia, também há relatos de infecções como pneumonite (O'DONELL et al., 2008; MOTZER et al., 2008).

No que se refere às observações acerca do efeito do everolimus no CAO, resultados *in vitro* têm demonstrado acentuada inibição da proliferação em células de CAO seroso e de células claras, bloqueio da fosforilação dos efetores *downstream* de mTORC1, 4EBP-1 e S6K, e redução de fatores envolvidos na angiogênese e invasividade tumoral. Ademais, notou-se aumento da apoptose induzida por cisplatina em células com alta atividade de AKT/mTOR. De forma complementar, quando avaliado *in vivo*, o everolimus também conseguiu inibir o crescimento tumoral, a angiogênese, a metástase, além de reduzir a incidência do desenvolvimento de ascite, e ainda constatou-se aumento na sobrevivência de camundongos xenográficos (MABUCHI et al., 2007a; MABUCHI et al., 2007b; MABUCHI et al., 2009; HARASAWA et al., 2011).

Com o intuito de investigar possíveis efeitos aditivos ou sinérgicos antineoplásicos, o everolimus tem sido testado em combinação com regimes quimioterápicos padrão. Mabuchi e colaboradores (2007b) verificaram, que a combinação terapêutica de everolimus com cisplatina aumentou a indução de apoptose em células de CAO com alta atividade AKT/mTOR comparado à monoterapia com cisplatina. Da mesma forma, *in vivo*, observaram o aumento da resposta à cisplatina quando combinada com everolimus.

Outros grupos alcançaram resultados satisfatórios ao associar everolimus ao docetaxel, ao gefitinib (inibidor de EGFR), à gencitabina e ao paclitaxel em cânceres de mama, pulmão e linfoma não-Hodgkin, respectivamente (ZHANG et al., 2012; DONG et al., 2012; CHIANG et al., 2010). Atualmente, alguns estudos clínicos estão em andamento com o intuito de avaliar a eficácia clínica do everolimus contra o CAO em monoterapia (NCT01149434), bem como em combinação com agentes como carboplatina ou DLP (NCT01281514) ou bevacizumab (anticorpo monoclonal anti fator de crescimento endotelial vascular/VEGF) (NCT00886691, NCT01031381) (U.S. National Institute of Health, acesso em: 10 set. 2013).

1.6 METFORMINA

A metformina (1,1-dimeti-bis-guanidina), hipoglicemiante oral pertencente à classe das biguanidas, representa o tratamento de escolha para o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), sendo a droga antidiabética oral mais prescrita no mundo (Revisado por SAHRA et al., 2010) (Figura 3). Foi aprovada pelo FDA em 1995 e possui perfil de segurança bem estabelecido. Além de não provocar hipoglicemia em seus usuários, causa apenas baixa incidência de acidose láctica (<1/10.000) nos mesmos. Seus efeitos adversos mais comuns são náuseas e diarreia; porém, ocasionalmente diminui os níveis séricos de vitamina B12 (DEFRONZO; GOODMAN, 1995; Revisado por RATTAN; ALI FEHMI; MUNKARAH, 2012). Por outro lado, este antidiabético reduz as taxas de doenças cardiovasculares e mortalidade, comparado a pacientes em uso de outras terapias hipoglicemiantes (EVANS et al., 2006).

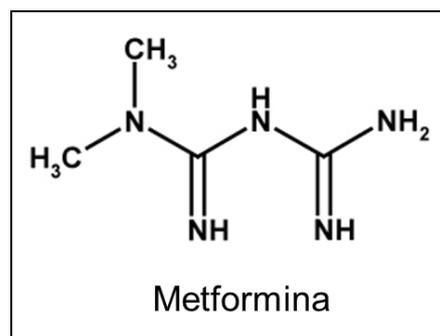


FIGURA 3: Estrutura química da metformina
Fonte: STRACK (2008).

A metformina atinge o meio intracelular por intermédio do transportador de cátion orgânico 1 (OCT1), atua na mitocôndria onde suprime o complexo I da cadeia respiratória e, conseqüentemente, diminui a produção de ATP. Assim, aumenta a relação AMP/ATP intracelular, ativa AMPK e induz a redução da gliconeogênese hepática, aumenta a captação de glicose nos músculos esqueléticos, e melhora a sensibilidade à insulina resultando em diminuição de glicose e insulina na corrente sanguínea. Além dessas ações, estimula vias catabólicas de oxidação de ácidos graxos induzindo a redução do conteúdo lipídico e inibição da lipogênese (CUSI; CONSOLI; DEFONZO, 1996; HUNDAL et al., 2000; Revisado por POLLAK, 2012).

Certamente os efeitos hipoglicemiantes da metformina se destacam em sua aplicação na terapia de DM2, mas é importante enfatizar que têm sido observados

efeitos benéficos da metformina no tratamento da síndrome do ovário policístico (MOGHETTI et al., 2000), doença hepática gordurosa não-alcoólica (MARCHESINI et al., 2001), puberdade prematura (IBANEZ et al., 2006) e síndrome metabólica (ORCHARD et al., 2005). Além disso, recentes relatos apontam para seu potencial efeito antineoplásico in vitro, em modelos animais, em estudos epidemiológicos e clínicos.

Conforme já descrito anteriormente, AMPK promove a inibição de mTORC1, então a metformina consegue desencadear este processo e subsequentemente suprime a progressão tumoral. Paralelamente, a droga reduz a ativação de IGF-1R por aumentar a concentração de proteínas ligantes do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGFBP1), reduzindo a atividade do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e, assim, impedindo a ativação da via de PI3K (Revisado por POLLAK, 2012). Estudos sugerem a associação da expressão de IGF-1R e IGFBP1 à tumorigênese ovariana e à resistência à cisplatina (ECKSTEIN et al., 2009; Revisado por BEAUCHAMP et al., 2010). Cumpre citar que a produção de IGFBP1 é regulada negativamente pela insulina, e os níveis glicêmicos e insulinêmicos são reduzidos pela ação da metformina (revisado por ALJADA; MOUSA, 2012).

O interesse em avaliar a metformina como opção terapêutica para o câncer foi iniciado quando estudos epidemiológicos relataram que pacientes diabéticos em tratamento com metformina apresentavam um menor risco de desenvolvimento de neoplasias. Evans e colaboradores (2005) foram os primeiros a demonstrar a menor incidência de câncer em diabéticos usuários desta biguanida (risco relativo (RR) de 0,86; Intervalo de Confiança (CI) = 95%). Em outros estudos, observou-se resultados semelhantes e complementares de que o uso da metformina tem sido associado às menores taxas de mortalidade por câncer e à maiores taxas de resposta patológica completa à quimioterapia (JIRALERSPONG et al., 2009; BOWKER et al. 2006). Atualmente, triagens clínicas que investigam a inserção de metformina como adjuvante à quimioterapia padrão já fornecem as vantagens desta combinação, como a redução do marcador de proliferação celular Ki67 e aumento da taxa de apoptose das células tumorais (NIRAULA et al., 2012; HADAD et al. 2011).

Em relação ao CAOV, estudos *in vitro* demonstram que metformina induz ao decréscimo do crescimento celular de maneira dose dependente e potencializa o efeito de cisplatina, carboplatina e paclitaxel (GOTLIEB et al., 2008; ERICES et al., 2013). Suas ações envolvem ativação de AMPK e seus efetores, atenuando a atividade de mTOR e a síntese protéica e lipídica, a parada do ciclo celular em G1 por diminuição da expressão de ciclina D1 e aumento de p21 (RATTAN et al., 2011b), entretanto em diferentes linhagens de câncer tem sido detectada o aumento de células nas fases S e G2/M do ciclo celular (YASMEEN et al., 2011; ERICES et al., 2013). Observou-se, *in vivo*, que esta droga reduziu significativamente o crescimento tumoral e inibiu angiogênese e metástases (RATTAN et al., 2011a; WU et al., 2012). Ademais, Hirsch e colaboradores (2009), reportaram as ações da metformina sobre células tronco tumorais (CSCs) em linhagens de câncer de mama. A teoria das CSCs postula que populações celulares com capacidade de auto renovação e diferenciação em fenótipos distintos mantêm a massa tumoral, e clinicamente, as CSCs correlacionam-se à quimiorresistência, ao aparecimento de metástases e ao relapso da doença (revisado por MCDERMOTT; WICHA, 2010).

Em face ao exposto, em virtude da baixa sobrevida e alta taxa de mortalidade das pacientes acometidas pelo CAOV, bem como a aquisição de quimiorresistência aos tratamentos padrão e a toxicidade dos mesmos, os fármacos everolimus e metformina surgem como novas opções terapêuticas para esta malignidade, visto que a inibição da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR potencialmente suprime o processo tumorigênico e reverte a resistência aos tratamentos convencionais (Revisado por WILLEMS et al., 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo geral a investigação da eficácia antineoplásica dos fármacos everolimus e metformina em linhagens de CAOVS ES-2 (CAOV de células claras, resistentes à cisplatina) e A2780 (CAOV seroso, sensível à cisplatina, mas que progride para o fenótipo resistente à droga), em monoterapia e em combinações politerápicas contendo agentes antineoplásicos convencionais, bem como o entendimento de mecanismos modulados pelos mesmos.

2.2 ESPECÍFICOS

Para atender ao objetivo geral proposto, delineamos os objetivos específicos, a saber:

1. Avaliação da eficácia de everolimus e metformina, em monoterapia e em combinação com quimioterápicos convencionais empregados contra o CAOVS, cisplatina, paclitaxel e doxorrubicina em linhagens de CAOVS ES-2 e A2780;
2. Caracterização da possível aplicabilidade de baixas concentrações de metformina e everolimus, no tratamento do CAOVS;
3. Verificação dos possíveis mecanismos antineoplásicos de everolimus e metformina na linhagem de CAOVS ES-2 incluindo avaliação do ciclo celular e indução de apoptose/necrose.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTURA DE CÉLULAS

3.1.1 Linhagem Celular

Para a realização do presente projeto de pesquisa, utilizou-se duas linhagens de CAO V, ES-2, representante do subtipo histológico de células claras resistente à cisplatina, e A2780, modelo de CAO V seroso sensível à cisplatina, com possibilidade de progressão para o fenótipo resistente à droga. Ambas as linhagens foram cedidas pelo Dr. Patrice J. Morin, NIH, EUA.

Todas as linhagens foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), acrescido de soro fetal bovino a 10% v/v (SFB, Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA), solução estabilizada de Penicilina-Estreptomicina (10000 u/mL - 10 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e Anfotericina B (250 µg/mL) (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA). A manipulação das células foi realizada em capela de fluxo laminar, sendo as mesmas mantidas em incubação em estufa com condições controladas de temperatura (37°C), com atmosfera de 5% de CO₂, condições adequadas para o crescimento de células de mamíferos. A passagem das células foi realizada de duas a três vezes por semana, de acordo com o tempo de crescimento, utilizando-se PBS (tampão fosfato salina) para lavagem e solução de tripsina/EDTA (0,25 µg/mL de tripsina e 1 µg/mL de EDTA) para rompimento da matriz extracelular que mantém as células aderidas à garrafa de cultura em monocamada.

3.1.2 Descongelamento

As alíquotas das linhagens celulares armazenadas em freezer -80°C foram descongeladas bruscamente a 37°C. O conteúdo armazenado em microtubo de 1,5 mL foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL estéril, livre de DNase e RNase, com 10 mL de meio RPMI-1640 acrescido de SFB a 10% v/v, 1% (v/v) de solução estabilizada de Penicilina-Estreptomicina e 0,5% (v/v) de Anfotericina B. Em

seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 450 g a 27°C. Após a centrifugação, foi observado um pellet no fundo do tubo, e o sobrenadante foi descartado. As células foram então ressuspensas em 15 mL de RPMI-1640 com SFB e antibióticos, citados anteriormente, e transferidas para uma garrafa de cultura de 75 cm² que foi incubada em estufa com 5% de CO₂.

3.1.3 Cultivo

As linhagens foram cultivadas em garrafas de 75 cm², com adição de 6 mL de meio RPMI16-40 suplementado com 10% de SFB inativado, acrescido de solução estabilizada de penicilina-estreptomicina nas concentrações previamente especificadas. O cultivo se deu em estufa a 37°C e com atmosfera de 5% de CO₂ até a subconfluência. Diariamente, as garrafas foram analisadas em microscópio óptico de luz invertida para avaliação do aspecto do meio e das células em cultivo, bem como de sua taxa de crescimento, confluência e morfologia.

3.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA

3.2.1 Plaqueamento

As duas linhagens celulares foram cultivadas em garrafas de 75 cm² até a subconfluência para cada um dos experimentos. Os experimentos foram realizados até a passagem 10 das linhagens celulares em questão. Após seguir o método previamente reportado, foi retirada uma alíquota de 10 µL para a preparação de uma suspensão na proporção de 1:1 com a solução de Azul de Tripán (v/v) (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA), com fins de quantificação de células viáveis no cultivo, pois esta tem a finalidade de marcar as células que perderam a integridade da membrana. Para a contagem do número de células viáveis, foi utilizada a câmara de Neubauer. Encostou-se a ponta da pipeta na borda da lamínula e a câmara foi então cuidadosamente preenchida com a suspensão preparada. Após as células sedimentarem por 2 minutos, a câmara de Neubauer foi levada ao microscópio

óptico e a área demarcada foi focalizada com a objetiva de menor aumento. A seguinte fórmula foi usada para o cálculo do número total de células:

$$\text{N}^\circ \text{ de células/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de células}}{\text{N}^\circ \text{ de quadrantes contados (4)}} \times \text{Fator de diluição (2)} \times 10^4$$

O valor encontrado, referente ao número de células por mL, era empregado numa nova equação:

$$\text{Volume final} = \text{Volume inicial} \times \frac{\text{Concentração desejada/mL (10}^5\text{)}}{\text{N}^\circ \text{ de células/mL da suspensão final}}$$

Com isso, foi possível obter uma solução final na concentração de $7,5 \times 10^5$ células/mL. Posteriormente adicionou-se 100 μL /poço da suspensão em placas de 96 poços, incubada por 24 horas a 37°C , em atmosfera de 5% de CO_2 .

3.2.2 Cálculo de IC₅₀ estimado das drogas clínicas

Para a realização dos experimentos de determinação de IC₅₀ estimado foram utilizadas as seguintes drogas clínicas: Cisplatina (Incel, Darrow), Paclitaxel (Acoord Farmacêutica LTDA), Doxorubicina (Bergamo LTDA), Metformina (PharmaNostra) e Everolimus (LC Laboratories). Para cada uma das drogas, foram realizadas diluições seriadas em PBS 1x, no caso de cisplatina, doxorubicina e metformina, em DMSO (Dimetilsulfóxido) 10% (v/v), no caso de paclitaxel e everolimus, a fim de se obter as concentrações descritas na Tabela 1. As alíquotas diluídas foram utilizadas para a determinação dos valores da concentração inibitória de 50% da proliferação celular (IC₅₀) a partir da curva dose resposta feita para cada droga, seguindo o protocolo do ensaio com brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, conhecido como metil-tiazol-tetrazólio (MTT) descrito abaixo. A análise estatística para o cálculo de IC₅₀ foi realizada através do *software* GraphPad Prisma versão 5.

TABELA 1 - Concentrações das drogas clínicas utilizadas para cálculo de IC₅₀

Quimioterápicos	Concentrações obtidas				
Cisplatina (CISP)	100µM	10µM	1µM	0,1µM	0,01µM
Paclitaxel (PACLI)	1000nM	100nM	10nM	1nM	0,1nM
Doxorrubicina (DOXO)	100 µM	10 µM	1µM	0,1µM	0,01µM
Metformina (MET)	100mM	10mM	1mM	0,1mM	0,01mM
Everolimus (EVER)	10nM	1nM	0,1nM	0,01nM	0,001nM

Após as 24 horas iniciais de incubação, as placas foram vertidas para remoção do meio e início dos tratamentos. Adicionou-se 90 µL de meio de cultura starving em cada poço juntamente com 10 µL de cada composto na concentração descritas na Tabela 1. Todas as condições tratadas foram analisadas em triplicata. Os controles utilizados foram 4 poços tratados apenas com DMSO 1% (v/v), 4 poços tratados apenas com PBS, 4 poços com células na ausência de qualquer droga ou diluente e 4 poços sem células apenas com meio de cultura (branco). Cada experimento foi realizado por 4 vezes, em momentos independentes.

3.2.3 Determinação do efeito da combinação entre as drogas sobre a viabilidade celular metabólica

Com fins de avaliar as interações entre as drogas utilizadas nas linhagens ES-2 e A2780, realizou-se curvas dose-reposta, pelo método do MTT, das drogas utilizadas neste estudo em concentrações baseadas em seus valores de IC₅₀ na linhagem ES-2, tendo em vista seu perfil de resistência à cisplatina (Tabela 2).

Além disso, realizamos combinações entre estas drogas nas concentrações de IC₅₀ e mais baixas, consideradas semelhantes aos níveis alcançados na corrente sanguínea após a terapia em doses usuais. A saber: cisplatina 1µM, paclitaxel 100nM, doxorrubicina 1µM, metformina 10µM e everolimus 0,06nM (HIMMELSTEIN et al., 1981; HUIZING et al., 1993; GEWIRTZ, 1999; STAMBOLIC et al., 2009; O'DONNELL et al., 2008). A análise estatística para estes ensaios foi realizada através do *software* GraphPad Prisma versão 5.

TABELA 2 - Concentrações das drogas utilizadas na curva dose-resposta

	Cisplatina	Paclitaxel	Doxorrubicina	Metformina	Everolimus
IC_{6,5}	5µM	12,5nM	5µM	0,625mM	2nM
IC_{12,5}	10µM	25nM	10µM	1,25mM	4nM
IC₂₅	20µM	50nM	20µM	2,5mM	8nM
IC₅₀	40µM	100nM	40µM	5mM	16nM
IC₇₅	60µM	150nM	60µM	7,5mM	24nM
2xIC₅₀	80µM	200nM	80µM	10nM	32nM

3.2.4 Ensaio de MTT

Após as 24 horas de incubação com os compostos listados nas Tabelas 1 e 2, em monoterapia ou em combinação, o meio foi removido e 15 µL de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio (MTT) na concentração de 5 mg/mL foram adicionados em cada poço. A incubação com MTT se deu por 4 horas, protegido da luz, e, em seguida, adicionou-se 100µL de DMSO para dissolução dos cristais de formazan formados. Vale ressaltar que o método de análise colorimétrica com o MTT permite mensurar o metabolismo celular pela redução deste sal por ação da succinato-desidrogenase mitocondrial, ocorrendo a formação de cristais de formazan, cuja produção é proporcional ao número de células metabolicamente ativas. A leitura dos resultados foi realizada em leitor de microplaca (MR-96 A, Bioclin, Minas Gerais, Brasil) no comprimento de onda de 560nm.

3.3 ENSAIO DE AVALIAÇÃO DE APOPTOSE POR ANEXINA V/PI

O ensaio de detecção de apoptose por anexina V/PI foi utilizado para determinar a porcentagem de apoptose induzida pelos tratamentos realizados. A anexina V faz parte de uma família de proteínas que possuem capacidade de se ligar a fosfolipídios da membrana plasmática, em um processo dependente de cálcio. Durante a apoptose ocorrem várias alterações celulares dentre elas a perda da simetria da membrana plasmática, resultando na exposição de fosfatidilserina (FS) na face externa da membrana celular. A anexina V não é capaz de penetrar na

membrana plasmática de células viáveis, havendo a marcação apenas naquelas que apresentarem exposição da FS. Na análise dessa marcação por citometria de fluxo, a anexina é então conjugada à um fluorocromo (FITC). E para diferenciar células vivas, em apoptose inicial, apoptose tardia ou necrose utilizou-se um intercalante de DNA, PI. Desta forma, células vivas não serão marcadas nem por anexina V nem por PI; células em apoptose inicial apresentam marcação positiva para anexina V e negativa para PI; células em apoptose tardia são positivas tanto para anexina V quanto para PI; e células em necrose apresentam marcação positiva somente para PI.

As células ES-2 foram plaqueadas seguindo a metodologia já descrita para o ensaio de viabilidade celular. A mesma fórmula foi usada para o cálculo do número total de células, sendo possível o ajuste à concentração de células desejadas ($3,8 \times 10^5$ células) para cada um dos 6 poços da placa de cultura, acrescentando-se o volume calculado da suspensão e o volume de RPMI-1640 necessário para a totalização de 3 mL em cada poço da placa. Utilizou-se placas de 6 poços para a execução dos tratamentos, descritos na tabela 3.

TABELA 3 - Condições experimentais utilizadas no ensaio de indução de apoptose

Condições experimentais		
Met 10 μ M	Pacli 100nM	Cisp 40 μ M
Met 5mM	Pacli 100nM + Met 10 μ M	Cisp 40 μ M + Met 10 μ M
Ever 0,06nM	Pacli 100nM + Met5mM	Cisp 40 μ M + Met 5mM
	Pacli 100nM + Ever 0,06nM	

Depois dos tratamentos por 24h, coletou-se o sobrenadante e as células foram tripsinadas com 300 μ L de Tripsina/EDTA (0,25 μ g/mL de tripsina e 1 μ g/mL de EDTA). Realizou-se a inativação do meio com o sobrenadante coletado e as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 450 g a 27°C. As células foram então ressuspendidas com o tampão de ligação (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM e CaCl₂ 1,8 mM), centrifugadas por 5 minutos a 450 g a 27°C e então incubadas, por 15 minutos em temperatura ambiente, protegidas da luz, com 100 μ L de tampão com adição de 5 μ L de anexina V (BD Biosciences, Califórnia, EUA) nos tubos, exceto nos controles. No momento da leitura adicionou 5 μ L de PI (1 mg/mL).

A leitura foi efetuada no citômetro BD Accuri[®] C6 FlowCytometer utilizando o canal FL-1 (530 nm) para a anexina V-FITC e o FL-2 (585 nm) para o PI. Um total de 10.000 eventos (células) foi adquirido por amostra e os dados analisados pelo software Summit v.4.3.

3.4 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

A avaliação do conteúdo de DNA para análise do ciclo celular foi realizado na linhagem ES-2. Para tal, foi utilizado um intercalante de DNA fluorescente, o iodeto de propídeo (PI), que entra na célula após sua permeabilização. O citômetro detecta a fluorescência do PI, permitindo avaliar o conteúdo de DNA referente a cada fase do ciclo celular. As células foram plaqueadas e tratadas seguindo a metodologia já descrita para o ensaio de indução de apoptose por anexina V/PI, e as condições de tratamento estão listadas na tabela 4.

TABELA 4 - Condições experimentais utilizadas na análise do ciclo-celular

Condições experimentais		
Met 10 μ M	Pacli 100nM	Cisp 40 μ M
Met 5mM	Pacli 100nM + Met 10 μ M	Cisp 40 μ M + Met 10 μ M
Ever 0,06nM	Pacli 100nM + Met5mM	Cisp 40 μ M + Met 5mM
Ever 16nM	Pacli 100nM + Ever 0,06nM	Cisp 40 μ M + Ever 0,06nM
	Pacli 100nM + Ever 16nM	Cisp 40 μ M + Ever 16nM

Após as 24h de tratamento, coletou-se o sobrenadante e as células foram tripsinadas com 300 μ L de Tripsina/EDTA (0,25 μ g/mL de tripsina e 1 μ g/mL de EDTA). Realizou-se a inativação do meio com o sobrenadante coletado e centrifugou as amostras por 5 minutos a 450 g a 27°C. Em seguida foi descartado o sobrenadante e realizado duas lavagens com PBS e subseqüentes centrifugações por 5min a 450 g a 27°C. O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* ressuspendido em 500 μ L de tampão de permeabilização, composto por Tris-Cl 3,4 mM em pH 7,6, NaCl 10 mM, NP40 0,1% (v/v), RNase 700u/L e PI 0,075 mM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). As amostras foram então incubadas no tampão por 15 minutos sob resfriamento, protegidas da luz e a leitura foi efetuada no

citômetro BD Accuri[®] C6 FlowCytometer utilizando o canal FL-2 (585nm). Um total de 10.000 eventos (células) foi adquirido por amostra e os dados analisados pelo software Summit v.4.3.

3.5 ANÁLISE DOS DADOS E TESTES ESTATÍSTICOS

As análises estatísticas foram efetuadas usando o Teste ANOVA de uma via, com significância de 5%. Em seguida, utilizou-se o Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni. O programa usado para os cálculos estatísticos foi o GraphPad Prisma versão 5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFEITOS DE METFORMINA E EVEROLIMUS NA VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA DE LINHAGENS DE CAO V

Primeiramente, procedemos com a determinação das concentrações dos valores de IC₅₀ estimada, por meio do método de MTT, dos quimioterápicos cisplatina, paclitaxel, doxorrubicina, comumente empregados na terapia contra o CAO V, assim como dos fármacos investigados neste estudo, metformina e everolimus, nas linhagens de CAO V ES-2 e A2780, representantes dos subtipos de CAO V de células claras e seroso, respectivamente. As concentrações de IC₅₀ de cada quimioterápico para as linhagens estudadas estão listadas na Tabela 5.

TABELA 5: Concentrações dos valores de IC₅₀ estimada das drogas utilizadas nas linhagens ES-2 e A2780

Drogas	IC ₅₀	
	ES-2	A2780
Cisplatina	4x10 ⁻⁵ M	1,2x10 ⁻⁵ M
Paclitaxel	1x10 ⁻⁷ M	1,15x10 ⁻⁶ M
Metformina	5x10 ⁻³ M	8x10 ⁻³ M
Doxorrubicina	4,3x10 ⁻⁵ M	8,8x10 ⁻⁷ M
Everolimus	1,6x10 ⁻⁸ M	6,2x10 ⁻⁹ M

Em concordância com as características de sensibilidade à cisplatina pelas linhagens estudadas, observamos que a linhagem ES-2 apresentou menor sensibilidade à cisplatina e doxorrubicina quando comparada à linhagem A2780. Em relação ao paclitaxel, a linhagem ES-2 foi mais sensível à droga que A2780. Considerando as drogas de interesse deste estudo, observamos diferentes respostas entre as linhagens. Enquanto ES-2 apresentou maior sensibilidade à metformina (IC₅₀ = 5mM) que A2780 (IC₅₀ = 8mM), o contrário foi observado em relação à sensibilidade das linhagens de CAO V ao everolimus (ES-2: IC₅₀ = 16nM vs. A2780: IC₅₀ = 6,2nM). Assim, podemos inferir que metformina foi, aparentemente, 1,6 vezes mais potente contra ES-2 do que contra A2780, ao passo

que everolimus se mostrou mais 2,5 vezes mais potente contra A2780 do que contra ES-2.

A fim de padronizar as concentrações utilizadas nos experimentos realizados no presente estudo, tomamos como base os valores de IC50 estimada para a linhagem ES-2, tendo em vista seu perfil de resistência diante ao quimioterápico cisplatina, amplamente utilizado no tratamento de primeira linha para o CAOV e que eventualmente desencadeia quimiorresistência nas pacientes submetidas ao mesmo (PAES et al., 2011; revisado por LEDERMANN et al., 2013). Com isso, procedemos com a avaliação da viabilidade celular metabólica (VCM) na presença dos quimioterápicos convencionais utilizados no tratamento do CAOV, cisplatina, paclitaxel e doxorrubicina, bem como os agentes em investigação, everolimus e metformina em diferentes concentrações, baseadas nos valores de IC50 estimada em ES-2.

Conforme dados compilados na Figura 4A, verificamos que as duas linhagens de CAOV estudadas, quando tratadas com cisplatina, apresentaram redução dose-dependente na VCM, sendo o efeito máximo observado com 40 μ M da droga. Ainda, como esperado, observamos que a linhagem A2780 foi mais sensível à cisplatina quando comparado à ES-2, havendo diferença estatística na VCM obtida nas duas linhagens quando submetidas às mesmas condições de tratamento, exceto na concentração de 5 μ M da droga. Vale informar que além da maior potência, cisplatina foi mais eficaz contra A2780 (redução da VCM de 80% em relação ao controle não tratado) do que contra ES-2 (redução da VCM de 60% em relação ao controle não tratado). Quando avaliamos a VCM das linhagens estudadas mediante tratamento com paclitaxel, notamos que a droga foi mais potente e mais eficaz contra ES-2 do que contra A2780, sendo a VCM reduzida em 40% em ES-2 e 20% em A2780 em relação ao controle não tratado (Figura 4B). Por fim, no que concerne aos quimioterápicos comumente utilizados no tratamento do CAOV, observamos que a droga foi mais potente e mais eficaz contra A2780 (redução da VCM em 80% em relação ao controle não tratado) do que contra ES-2 (diminuição da VCM em 60% em relação ao controle não tratado) (Figura 4C).

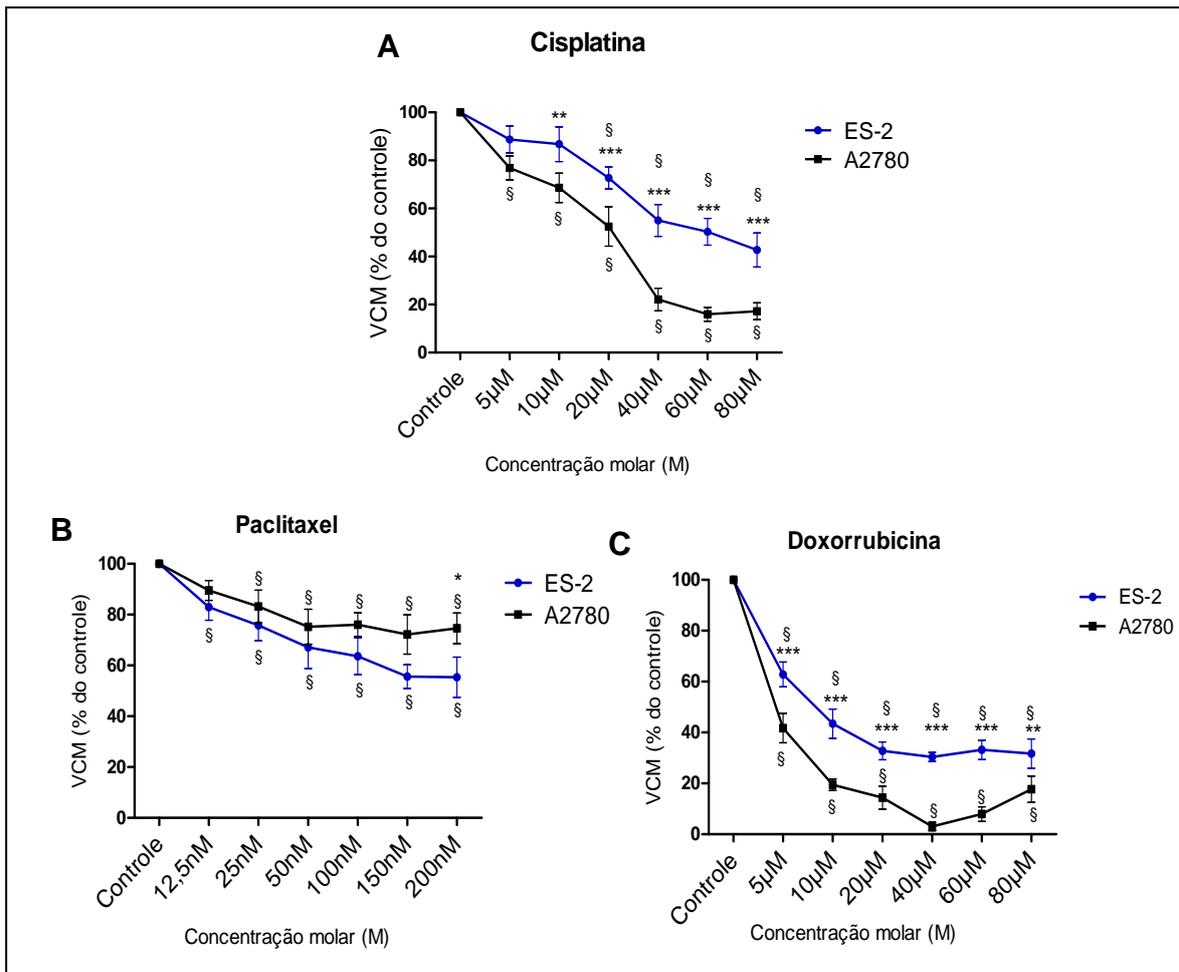


FIGURA 4: Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 e A2780 após o tratamento com cisplatina (A), paclitaxel (B) e doxorrubicina (C) em diferentes concentrações por 24h. O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA de uma via com *post test* de Bonferroni. § $p < 0,05$ quando comparado à condição controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparadas as condições de tratamento correspondentes entre as linhagens. Os resultados representam a média e desvio padrão (\pm) de 3 experimentos independentes.

Ao avaliarmos as ações da metformina (Figura 5A), verificamos que este fármaco exerceu efeito sobre a VCM nas duas linhagens avaliadas, demonstrando diferença significativa nas condições de tratamentos avaliadas ao compararmos os correspondentes em cada linhagem. Neste sentido, observamos que a VCM da linhagem A2780 diminuiu de modo dose-dependente por metformina. Contudo, o efeito inibidor da VCM em A2780 causado por metformina não foi saturado com as concentrações da droga testadas, sendo o parâmetro testado, portanto, progressivamente diminuído. Por outro lado, não obstante à redução dose-dependente da VCM de ES-2 por metformina, o efeito máximo da droga foi alcançado nas condições experimentais adotadas no presente trabalho, sendo essa igual a 5mM. Sendo assim, nossos dados são sugestivos de maior potência de

metformina contra ES-2 do que A2780; entretanto, a droga parece ser mais eficaz em A2780 (diminuição da VCM em pelo menos 70% em relação ao controle não tratado) do que em ES-2 (inibição da VCM em 50% em relação ao controle não tratado). Convém salientar, no entanto, que a segurança do uso de metformina em concentrações elevadas, duas ordens de grandeza superiores aos 10 μ M usualmente usados no manejo do DM2, permanece sem esclarecimento. Sendo assim, somente com os dados apresentados, não podemos sugerir que concentrações mais altas de metformina sejam administradas em pacientes portadoras de CAOV seroso sem antes avaliar a toxicidade sistêmica, aguda e crônica, do regime terapêutico em questão. Nesse contexto, é relevante informar que os experimentos referidos serão conduzidos por nosso laboratório em parceria com a Divisão de Pesquisa Clínica do INCa. Por sua vez, everolimus foi mais potente contra ES-2 e mais eficaz contra A2780, promovendo redução na VCM em 50% e 20%, respectivamente, em relação ao controle não tratado (Figura 5B). De relevância clínica, a concentração circulante titulada de everolimus em pacientes de câncer de mama receptor de estrogênio positivo (RE+) cuja doença progrediu após tratamento com terapia endócrina e que passaram a ser tratadas com everolimus e exemestane foi entre 5,22nM a 15,65nM (triagem clínica BOLERO-2), as quais estão na mesma ordem de grandeza das concentrações utilizadas no presente estudo de investigação de sua ação contra o CAOV (BEAVER; PARK, 2012). Como previamente informado, nas concentrações de everolimus empregadas na clínica oncológica, seus principais efeitos adversos são diarreia, náusea/vômito, diminuição do apetite, alteração do paladar, sangramento nasal, pele seca, cefaleia e inflamação/dor na cavidade oral e na garganta. Embora não tenhamos conduzido ensaios com everolimus para o fim, é possível propor que sua toxicidade sistêmica, nas concentrações empregadas até o momento no presente estudo, em pacientes com CAOV seja muito similar à observada com pacientes com câncer de outra etiologia.

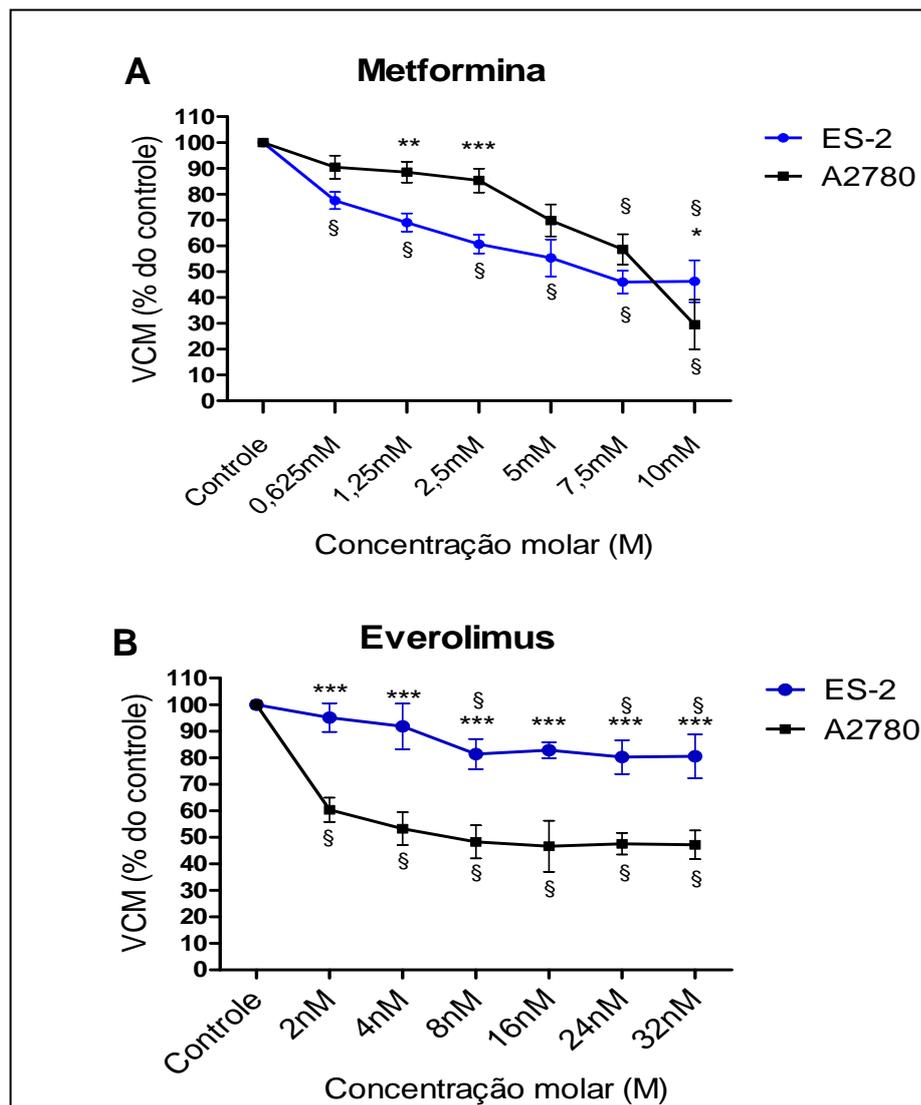


FIGURA 5: Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 e A2780 após o tratamento com metformina (A) e everolimus (B) em diferentes concentrações por 24h. O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. § $p < 0,05$ quando comparados ao controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparadas as condições de tratamento correspondentes entre as linhagens. Os resultados representam a média e desvio padrão (\pm) de 3 experimentos independentes.

Considerando que o CAOV representa câncer ginecológico altamente letal e que, eventualmente, as pacientes acometidas pela doença desenvolvem quimiorresistência em detrimento da responsividade inicial satisfatória aos antineoplásicos convencionais empregados no seu tratamento, a identificação de alternativas terapêuticas contra o CAOV é imperativa. A literatura consta de relatos que apontam para a eficácia terapêutica da metformina e do everolimus contra os diferentes subtipos de CAOV (GOTLIEB et al., 2008, RATTAN et al., 2011, MABUCHI et al., 2007, MABUCHI et al., 2009), tal a projetar ambas as drogas como

opções terapêuticas promissoras de controle da doença. Esses dados são corroborados pelo nosso estudo, pois tanto a linhagem de CAOV de células claras ES-2 quanto a linhagem serosa A2780 tiveram inibição significativa da viabilidade celular metabólica com o tratamento com metformina ou everolimus. Sentimo-nos motivados, em seguida, a compreendermos a potencialidade terapêutica da combinação de metformina ou everolimus com as drogas clínicas empregadas convencionalmente no tratamento de pacientes com CAOV.

4.2 EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE QUIMIOTERÁPICOS CONVENCIONAIS COM METFORMINA E EVEROLIMUS NA VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA DE LINHAGENS DE CAOV

Considerando a eficácia na redução da taxa da VCM nas linhagens ES-2 e A2780 pelos fármacos de interesse neste estudo, metformina e everolimus, julgamos importante a determinação de tratamentos alternativos contra o CAOV com base nos agentes terapêuticos referidos, incluindo, entretanto, o teste das substâncias em concentrações mais baixas e potencialmente menos tóxicas à paciente de CAOV, usualmente debilitada pela gravidade intrínseca da patologia. O fato se faz imperioso em casos da doença recorrente e resistente à terapia baseada em platina, casos comumente submetidos aos agentes de segunda linha como a doxorrubicina, estando, portanto, expostos à severa cardiotoxicidade irreversível causada pela antraciclina, fator limitante à continuidade da quimioterapia em casos de progressão da doença.

Diante do proposto, visando avaliar a possível aplicabilidade de novos esquemas terapêuticos antineoplásicos envolvendo a combinação de quimioterápicos convencionais com metformina ou everolimus, efetuamos estes tratamentos combinados, por 24h, nas linhagens de CAOV ES-2 e A2780 e mensuramos a resposta a terapêutica através da VCM obtida pelo método de MTT. Além disso, motivados pelo fato da metformina ser um medicamento barato e amplamente empregado no tratamento do DM2 tendo perfil de segurança bem estabelecido para as dosagens usuais no controle desta doença, submetemos as linhagens de CAOV ao tratamento com concentração de metformina inferior àquelas

normalmente empregadas em estudos pré-clínicos e clínicos de manejo de câncer com a biguanida e que corresponde ao valor empregado no controle do DM2 (10 μ M, logo 500 vezes inferior à IC50 de metformina em ES-2) (STAMBOLIC et al., 2009), tendo como racional o fato de que se trata de concentração bem tolerada em humanos e cuja segurança é comprovada. Seguindo raciocínio análogo, endereçamos a possibilidade do uso de concentrações de everolimus inferiores à IC50 em ES-2 (linhagem menos sensível à droga que A2780) com o intuito de verificarmos possíveis benefícios clínicos com menor toxicidade potencial à paciente de CAO. Sendo assim, nos dedicamos a estudar o efeito anticâncer do everolimus em concentração cerca de 250 vezes inferior à maior concentração circulante titulada em pacientes avaliados na triagem clínica BOLERO-2 (correspondente à concentração cerca de 267 vezes inferior à IC50 da droga em ES-2), isto é, 0,06nM (BEAVER; PARK, 2012). Testamos, ainda, a VCM das linhagens de CAO mediante tratamento com as drogas convencionais em concentrações similares às circulantes em pacientes de câncer. Empregamos, então, cisplatina 1 μ M (HIMMELSTEIN et al., 1981) e doxorubicina 1 μ M (GEWIRTZ, 1999), concentrações cerca de 40 vezes inferiores às IC50 das duas drogas em ES-2, bem como paclitaxel 100nM (HUIZING et al., 1993), exatamente sua IC50 em ES-2.

4.2.1 Efeitos da combinação de cisplatina com metformina na viabilidade celular metabólica de linhagens de CAO

Conforme dados compilados na Figura 6A, a VCM de ES-2 não foi modificada, em relação à condição controle não tratada, nem por metformina 10 μ M tampouco por cisplatina 1 μ M ou pela combinação de metformina 10 μ M com cisplatina 1 μ M. Por outro lado e conforme esperado, metformina 5mM e cisplatina 40 μ M (IC50 das drogas em ES-2) reduziram a VCM de ES-2 em 44,65% e 45%, respectivamente, em relação ao controle não tratado. Cumpre informar que a associação de metformina, tanto em 10 μ M quanto em 5mM, não resultou em sinergismo com cisplatina 40 μ M, resultando em redução de 47,4% e 57,5% na VCM de ES-2, respectivamente, em relação ao controle não tratado. Nosso dados nos conduzem à análise de extrema relevância clínica. Como dito anteriormente no presente texto, a linhagem de CAO ES-2 foi obtida a partir de tecido canceroso de

paciente portadora de CAOV do tipo células claras. Não obstante à baixa incidência de CAOV de células claras, este configura manifestação da doença de prognóstico ruim, aspecto fortemente relacionado à quimiorresistência aos derivados de platina (Revisado por LEDERMANN et al., 2013). Ainda em observância ao conteúdo já explorado nesta dissertação, cisplatina é droga tanto eficaz contra tumores malignos sólidos humanos quanto tóxica ao doente. Os efeitos adversos da cisplatina são severos, por vezes restritivos, e envolvem, dentre outros, neurotoxicidade periférica e nefrotoxicidade (Revisado por GUIMARÃES et al., 2013). Se levarmos em consideração os dados ora apresentados, a VCM de ES-2 somente foi controlada com cisplatina, em 50%, mediante uso de concentração da droga 40 vezes superior à sua concentração plasmática em doentes de câncer. Acreditamos que, nesta circunstância, a toxicidade da cisplatina possa exceder a tolerabilidade de pacientes de CAOV, restringindo, assim, seu uso. Interessantemente, nesse cenário, a metformina surge como alternativa terapêutica de combate ao CAOV de células claras. Vale a ressalva, todavia, de que a eficácia da metformina contra ES-2 foi observada em sua IC50, a qual corresponde à concentração 500 vezes superior àquela sabidamente segura da droga. Faz-se, portanto, crucial a avaliação da toxicidade sistêmica de metformina 5mM. Como dito, estudos de avaliação da toxicidade sistêmica aguda e crônica da metformina serão conduzidos por nosso grupo em parceria com a Divisão de Pesquisa Clínica do INCa. De modo similar, metformina não conferiu benefícios terapêuticos à linhagem A2780, seja em mono quanto em politerapia com cisplatina (Figura 6B). Em contraste aos dados obtidos em ES-2, entretanto, metformina 5mM não parece ser alternativa terapêutica à cisplatina em A2780 posto que a VCM foi reduzida em 30% com metformina 5mM e em 77,91% com cisplatina 40µM, em relação ao controle não tratado. Outrossim, nossos dados reiteram a maior sensibilidade das células A2780 à cisplatina em relação à ES-2 e, acima de tudo, corroboram com nossa hipótese de que a metformina pode ser droga importante no controle de tumores malignos de ovário quimiorresistentes à cisplatina. Por fim, um detalhe de nossos achados nos chamou a atenção. De fato, observamos que o uso concomitante de cisplatina 40µM e metformina 10µM resultou em padrão de tendência ao sinergismo entre as drogas, mas o mesmo não vale em relação à combinação de cisplatina 40µM e metformina 5mM. Embora ainda não tenhamos como explicar nossas observações, é possível

que metformina, quando combinada à cisplatina, mas não em monoterapia, module mecanismos celulares distintos.

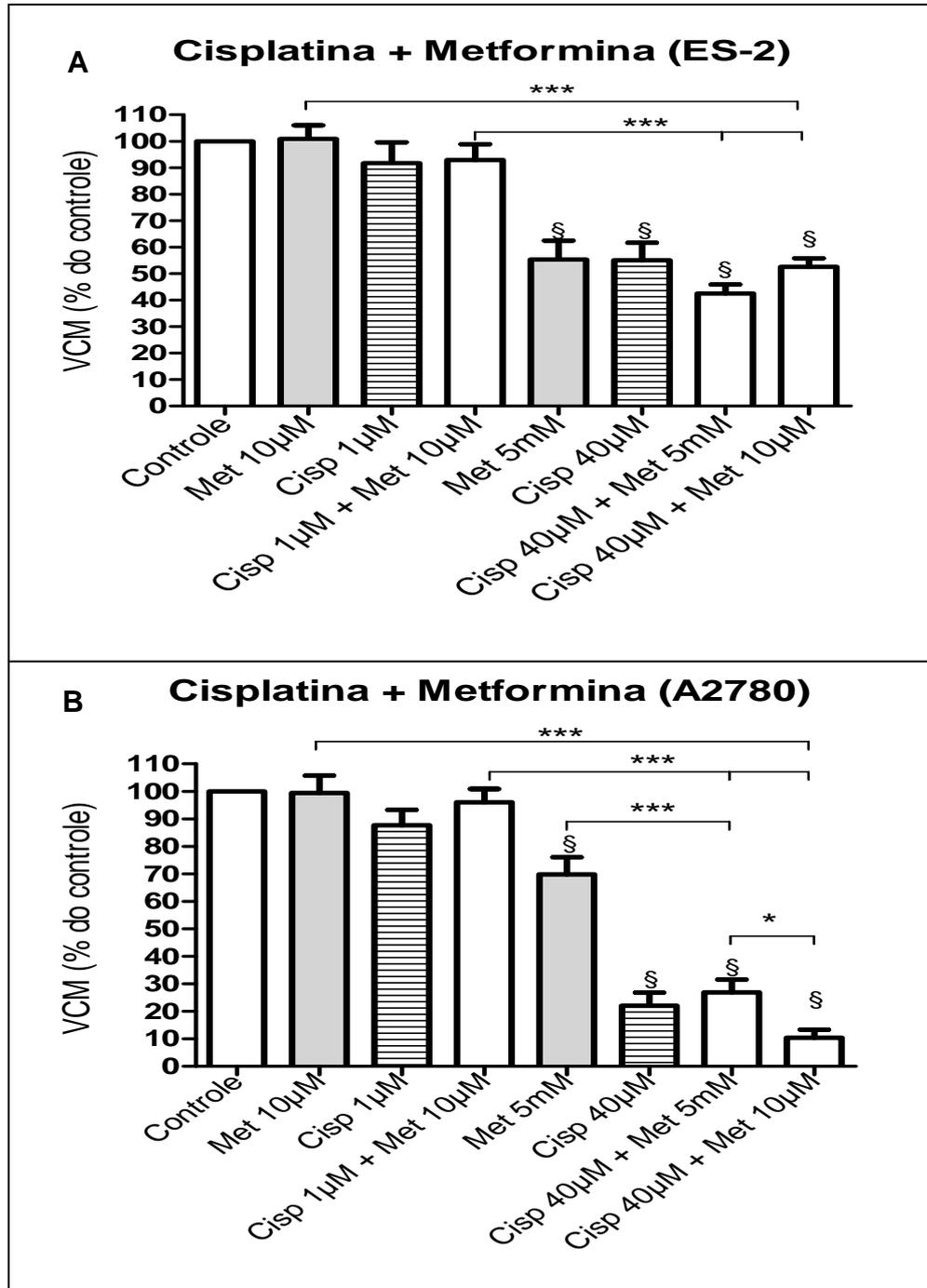


FIGURA 6: Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 (A) e A2780 (B) após o tratamento combinado com metformina e cisplatina por 24h. O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. $\$p < 0,001$ quando comparado à condição controle. $***p < 0,001$ ao compararmos as condições Met 10 μ M com Cisp 40 μ M + Met 10 μ M (A e B); Cisp 1 μ M + Met 10 μ M com Cisp 40 μ M + Met 5mM e Cisp 40 μ M + Met 10 μ M (A e B); Met 5mM com Cisp 40 μ M + Met 5mM (B). $*p < 0,05$ ao compararmos as condições Cisp 40 μ M + Met 5mM e Cisp 40 μ M + Met 10 μ M (B). Os resultados representam a média e desvio padrão (\pm) de 3 experimentos independentes.

Por outro lado, Shank e colaboradores (2012) demonstraram o efeito sinérgico da combinação entre metformina e cisplatina na linhagem celular A2780. A discrepância entre nossos achados e aqueles dos autores supracitados pode ser explicada pelas diferenças nas condições experimentais adotadas pelos dois grupos de pesquisa. Diferentemente do nosso desenho experimental, Shank e colaboradores (2012) procederam com tratamento prolongado das células durante 72h e utilizaram concentrações distintas das drogas testadas, cisplatina 1,6 μ M e 4,9 μ M e metformina 100 μ M, 300 μ M e 1mM. Dados da literatura e resultados não publicados de nosso grupo dão conta de que a rapamicina, quando empregada em concentrações elevadas por 72h, pode inibir não somente mTORC1, mas também mTORC2 (SARBASSOV et al., 2006). Em nosso laboratório, por exemplo, notamos que o pré-tratamento de células de CAO V do tipo seroso e resistentes à cisplatina (OVCAR-3) têm restaurada a sensibilidade ao agente alquilante após receber o pré-tratamento com rapamicina 100nM por 72h. Esse fato também foi constatado *in vivo* por Rattan e colaboradores (2011b) que testaram o efeito da combinação de metformina 100mg/kg ou 200mg/kg e cisplatina 4mg/kg, em tratamento por 4 semanas, no crescimento de tumores xenotransplantados. Desta forma, não descartamos a possibilidade da adição de metformina à terapia com cisplatina e vislumbramos realizar novos tratamentos em diferentes concentrações destas drogas. Em conjunto, as informações ora apresentadas confirmam a complexidade de mecanismos celulares envolvidos no tratamento do câncer tanto com quimioterápicos convencionais quanto com drogas incrementais e reforçam a urgência no delineamento apropriado de triagens clínicas no que tange às concentrações das moléculas adotadas e na ordem cronológica do emprego de drogas quando usadas em politerapia.

4.2.2 Efeitos da combinação de paclitaxel com metformina na viabilidade celular metabólica de linhagens de CAO V

Ao contrário do observado pelo nosso grupo em relação à combinação entre cisplatina e metformina, a biguanida teve efeito sinérgico quando usada concomitantemente ao paclitaxel tanto na linhagem ES-2 quanto na A2780 (Figura 7). Os dados compilados na Figura 7A mostram que, conforme previamente

verificado, metformina 10 μ M não modificou a VCM de ES-2 em relação ao controle não tratado; entretanto, quando empregada em sua IC₅₀, isto é, 5mM, a biguanida reduziu a VCM em 44,65% em relação ao controle não tratado. Por sua vez, a monoterapia com paclitaxel 100nM (que corresponde tanto às concentrações plasmáticas da droga em pacientes de câncer quanto à sua IC₅₀ em ES-2) reduziu a VCM de ES-2 em 36,38% em relação ao controle não tratado. É importante destacar que a combinação com paclitaxel 100nM e metformina 10 μ M ou 5mM foi sinérgica quando comparada à monoterapia com o taxano, promovendo diminuição na VCM de ES-2 em 54,19% e 56,55%, respectivamente, em relação ao controle não tratado. Considerando a segurança sistêmica do uso de metformina 10 μ M, em adição ao seu sinergismo anticâncer com paclitaxel 100nM, os achados são importantes posto que a combinação de drogas desponta como alternativa terapêutica contra tumores malignos de ovário com resistência *de novo* ou adquirida aos derivados de platina. Ademais, nossos resultados nos motivam a especular acerca da possibilidade de tratar pacientes de CAO V com concentração menor de paclitaxel do que a empregada atualmente. De extrema relevância clínica, muitos dos casos de CAO V resistentes à cisplatina são tratados com monoterapia de paclitaxel. Contudo, os efeitos adversos causados pelo uso do paclitaxel são frequentes e severos, com destaque para a neurotoxicidade (Revisado por CRISTEA et al., 2010), muitas vezes limitando seu uso no combate à doença. Dessa forma, combinações que permitam aventar a redução da dose do taxano, mantendo inalterada sua eficácia antineoplásica, podem configurar futuro marco no manejo clínico do câncer. Cumpre atentar, ainda, à equivalência do controle da VCM de ES-2 alcançado tanto com metformina 5mM (redução da VCM em 44,65% em relação ao controle não tratado) quanto com paclitaxel 100nM (redução da VCM em 36,33% em relação ao controle não tratado). Isso porque, como supramencionado, a toxicidade sistêmica do paclitaxel configura efeito limitante ao seu emprego em número significativo de mulheres com CAO V. Muito embora ainda tenhamos que averiguar a segurança sistêmica, aguda e crônica, do uso de metformina 5mM, essa parece estratégia terapêutica com potencialidade de controlar o CAO V em casos resistentes à cisplatina ou ao paclitaxel, bem como quando o uso das drogas é limitado por sua toxicidade.

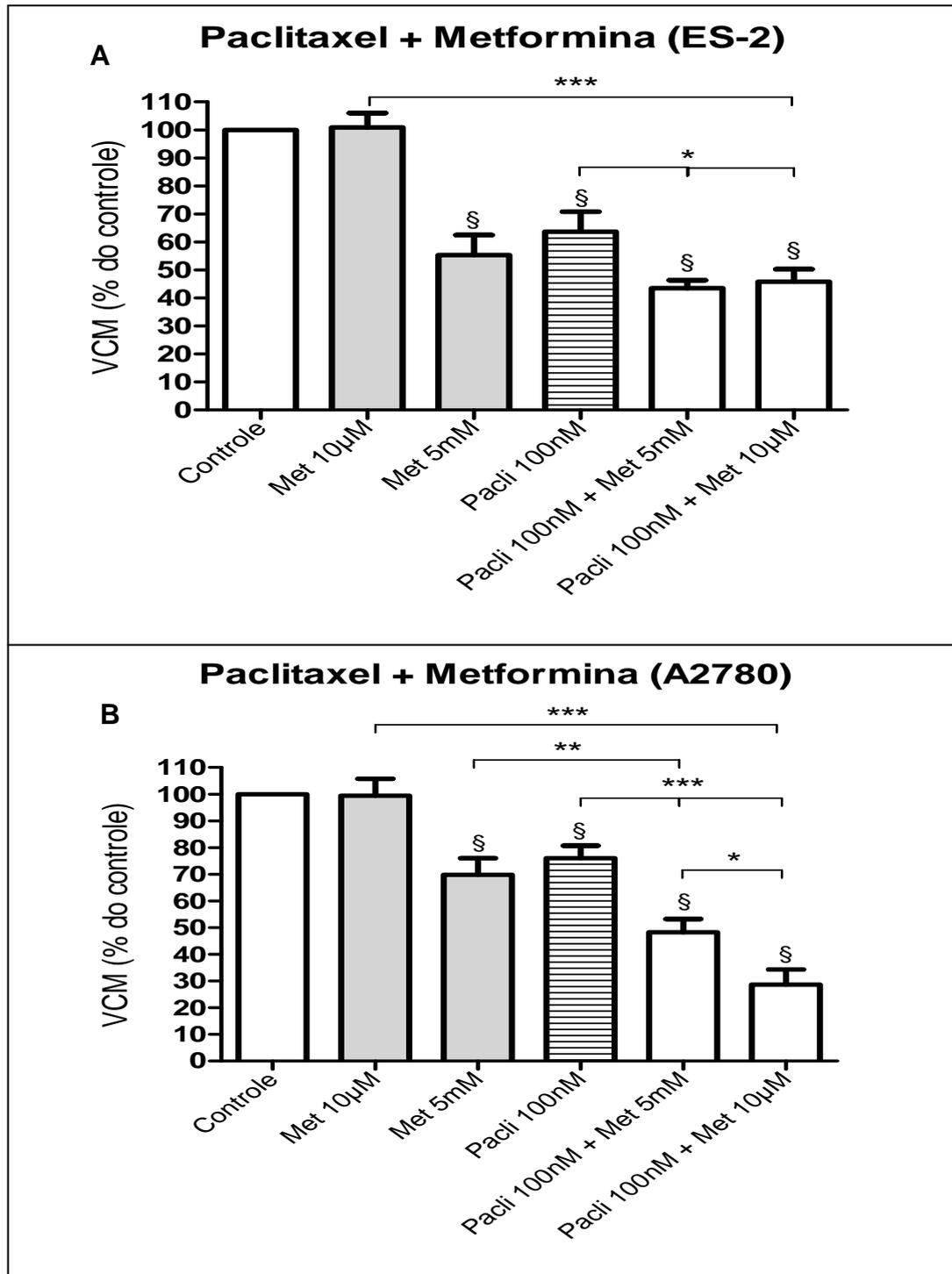


FIGURA 7: Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 (A) e A2780 (B) após o tratamento combinado com metformina e paclitaxel por 24h. O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. § $p < 0,01$ quando comparado ao controle. *** $p < 0,001$ ao compararmos as condições Met 10µM e Pacli 100nM + Met 10µM (A e B); Pacli 100nM com Pacli 100nM + Met 5mM e Pacli 100nM + Met 10µM (B). ** $p < 0,01$ ao compararmos as condições Met 5mM e Pacli 100nM + Met 5mM (B). * $p < 0,05$ ao compararmos as condições Pacli 100nM com Pacli 100nM + Met 5mM e Pacli 100nM + Met 10µM (A); Pacli 100nM + Met 5mM com Pacli 100nM + Met 10µM (B). Os resultados representam a média e desvio padrão (\pm) de 3 experimentos independentes.

Perfil análogo de controle da VCM foi observado em A2780, tal que a mesma linha de raciocínio adotado na linhagem ES-2 pode ser transposto à linhagem A2780 em relação ao uso de paclitaxel e/ou metformina, em mono ou politerapia (Figura 7B). De fato, a VCM de A2780 não foi alterada por metformina 10 μ M em relação ao controle não tratado, mas sim por metformina 5mM (VCM reduzida em 30,17% em relação ao controle não tratado). Ainda, enquanto paclitaxel 100nM reduziu a VCM de A2780 em 23,93% em relação ao controle não tratado, houve sinergismo quando a droga foi usada em associação com metformina 5mM (diminuição da VCM em 51,71% em relação ao controle não tratado) e 10 μ M (redução da VCM em 71,38% em relação ao controle não tratado). A diferença se faz no uso concomitante de paclitaxel 100nM e metformina 10 μ M, condição em que A2780 se mostrou mais sensível à combinação de drogas do que ES-2. O fato é intrigante porque paclitaxel parece ser mais potente contra ES-2 do que em A2780 (IC₅₀ estimadas 100nM em ES-2 vs. 1,15 μ M em A2780), situação em que se notou redução da VCM em 36,38% na ES-2 e em 23,93% na A2780, em relação ao controle não tratado. Sendo assim, nossos resultados nos permitem especular que os mecanismos modulados em ES-2 e A2780, na presença de paclitaxel, são distintos ou, se similares, parecem ocorrer em maior magnitude em A2780.

Resultados semelhantes aos obtidos pelo nosso grupo vêm sendo demonstrados em outros estudos. Erices e colaboradores (2013) verificaram a redução da viabilidade celular ao submeterem as linhagens celulares A2780 e SKOV3 à terapia com metformina 20 μ M em adição ao paclitaxel, carboplatina e doxorrubicina, em tratamentos de 72h. No que se refere ao tratamento de A2780 com o taxano, os resultados foram mais expressivos nas condições em que as células foram pré-tratadas com metformina 20 μ M por 24h e, então, com o quimioterápico e novamente a mesma dose da biguanida por 48h, não havendo efeito significativo ao combinarem das drogas apenas por 48h sem o pré-tratamento com metformina.

Assim como vem sendo descrito por outros pesquisadores, nossos resultados demonstram a possibilidade de eficácia anticâncer incremental com uso de metformina como droga sinérgica ao paclitaxel, ou mesmo em monoterapia, no tratamento adjuvante de pacientes com CAOV. A proposta parece ser aplicável tanto

aos casos de CAOV de células claras, subtipo histológico raro, porém agressivo, da doença, com índices elevados de quimiorresistência à cisplatina e derivados, contra o qual há praticamente nenhuma estratégia eficaz de combate, quanto para pacientes com CAOV seroso que representa o subtipo histológico de CAOV mais frequente entre as mulheres acometidas por esta neoplasia, sendo inicialmente responsivo ao tratamento padrão à base de platina, mas evoluindo ao fenótipo resistente à droga (PAES et al., 2011, Revisado por JELOVAC; ARMSTRONG, 2011).

4.2.3 Efeitos da combinação de cisplatina com everolimus na viabilidade celular metabólica de linhagens de CAOV

Como dito em seção prévia do presente estudo, o uso de everolimus em associação ao exemestane foi recentemente aprovado por agências regulatórias americana, europeia e brasileira para tratar pacientes de câncer de mama RE+ com doença progressiva apesar do uso de inibidores de aromatase, tendo como respaldo técnico os resultados da triagem clínica BOLERO-2 (BEAVER; PARK, 2012). Além disso, o benefício clínico de everolimus tem sido verificado por meio da triagem clínica BOLERO-3, a qual está sendo conduzida em pacientes de câncer de mama HER-2+ cujos tumores progridem mesmo em uso de trastuzumabe (U.S. National Institute of Health, acesso em: 10 set. 2013). É pertinente informar, também, que há triagens clínicas em andamento que avaliam o benefício e a segurança de se intervir farmacologicamente na via de PI3K/AKT/mTOR em pacientes de CAOV. Isso dito, nos sentimos motivados a investigarmos, *in vitro*, o efeito de everolimus, tanto em mono quanto em politerapia associada com cisplatina ou paclitaxel, na IC50 da droga em ES-2 e em concentração cerca de 250 vezes inferior àquela empregada no estudo BOLERO-2, em observância ao racional previamente descrito neste trabalho. Os dados agrupados na Figura 8 (A e B) mostram que, embora tenha havido significância estatística entre as diferenças de VCM de ES-2 e de A2780 nas diversas condições terapêuticas testadas, não se constatou sinergismo entre everolimus e cisplatina. De fato a VCM de ES-2 foi reduzida, em relação ao controle não tratado, em 45%, 44,47% e 39,71% com o tratamento das células com

cisplatina 40 μ M, cisplatina 40 μ M/everolimus 16nM e cisplatina 40 μ M/everolimus 0,06nM, respectivamente.

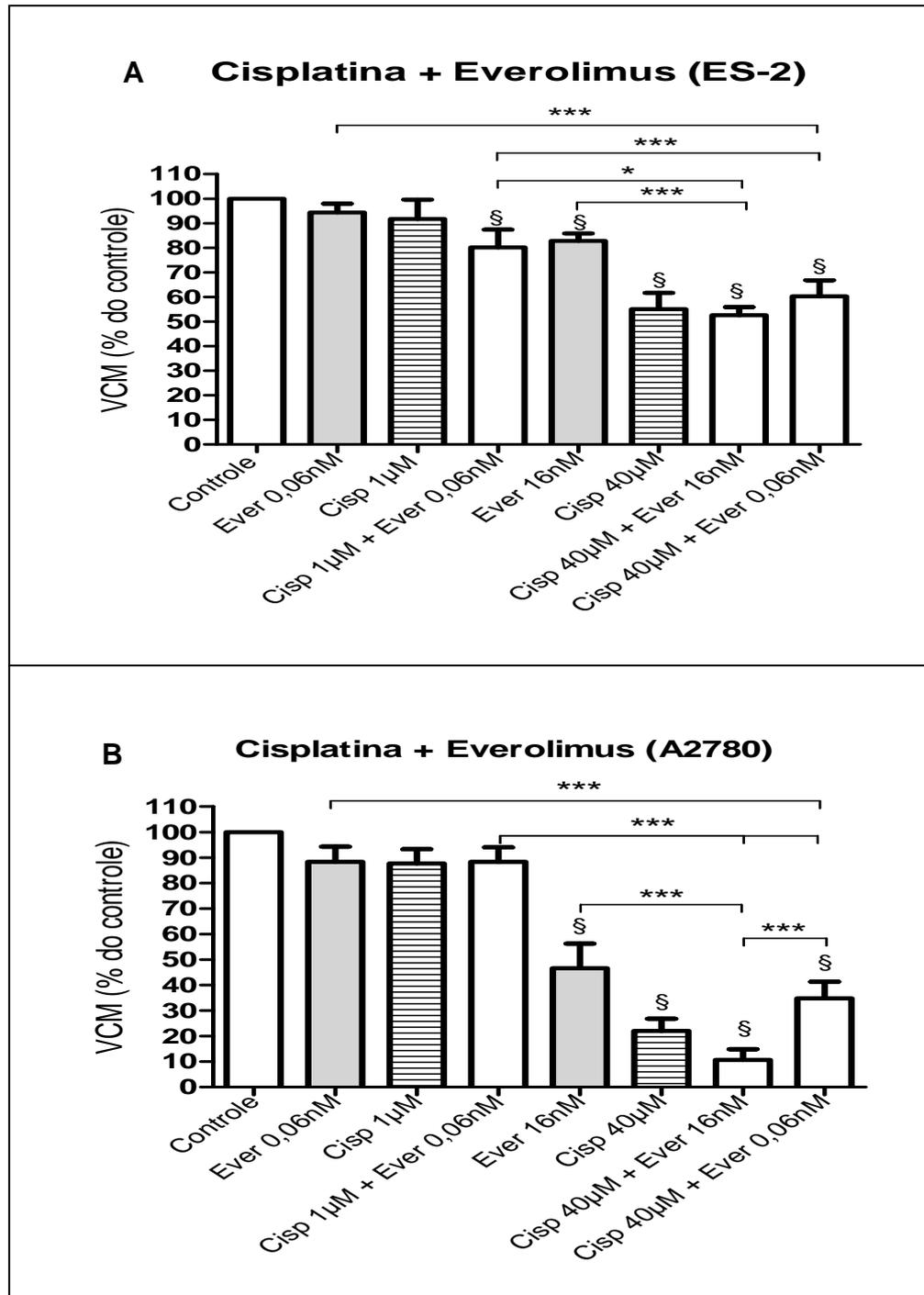


FIGURA 8: Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 (A) e A2780 (B) após o tratamento combinado com everolimus e cisplatina por 24h. O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados estatisticamente por meio do teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. \$ p <0,05 quando comparado com o controle. *** p <0,001 quando comparamos as condições Ever 0,06nM com Cisp 40 μ M + Ever 0,06nM; Ever 16nM com Cisp 40 μ M + Ever 16nM; Cisp 1 μ M + Ever 0,06nM com Cisp 40 μ M + Ever 0,06nM (A e B); Cisp 1 μ M + Ever 0,06nM com Cisp 40 μ M + Ever 16nM; Cisp 40 μ M + Ever 16nM com Cisp 40 μ M + Ever 0,06nM (B). * p <0,05 quando comparamos as condições Cisp 1 μ M + Ever 0,06nM com Cisp 40 μ M + Ever 16nM (A). Os resultados representam a média e desvio padrão (\pm) de 3 experimentos independentes.

Em A2780 (Figura 8B), por sua vez, a VCM foi reduzida, em relação ao controle não tratado, em 77,91%, 89,34% e 65,18% com o tratamento das células com cisplatina 40 μ M, cisplatina 40 μ M/everolimus 16nM e cisplatina 40 μ M/everolimus 0,06nM, respectivamente. Vale destacar o efeito anticâncer de everolimus 16nM em monoterapia observado exclusivamente em A2780, e não em ES-2. Nessa condição de tratamento, a VCM de ES-2 foi mantida em 82,86%, ao passo que foi reduzida em 53,41% em A2780, em relação ao controle não tratado. Nossos resultados corroboram com achados prévios deste trabalho que nos permitem postular que everolimus 16nM, concentração próxima aos maiores valores de concentração circulante titulados em pacientes de câncer de mama incluídos no estudo BOLERO-2, tem potencialidade de integrar regimes terapêuticos em CAOVS seroso. Há uma pendência nesse grupo de experimentos no que diz respeito ao esclarecimento da possível ocorrência de sinergismo entre cisplatina 1 μ M e everolimus 16nM. Os ensaios referidos estão em andamento.

Contudo não excluimos a adição de everolimus como adjuvante no tratamento do CAOVS juntamente com cisplatina, uma vez que foi demonstrado que em outras linhagens de CAOVS, SKOV-3 e OVCAR10, que esta droga aumentou a apoptose induzida por cisplatina. De acordo com os autores, o uso de cisplatina 10 μ M e everolimus 20nM promoveu redução na proliferação celular, na formação de colônias e aumentou a fragmentação de DNA, sugestivo de apoptose. Os ensaios *in vitro* foram confirmados por meio de avaliação *in vivo* conduzidos em camundongos xenotransplantados com SKOV3, nos quais foi observada melhoria na eficácia terapêutica da cisplatina 3mg/Kg com o uso concomitante de everolimus 5mg/kg (MABUCHI et al., 2007b).

4.2.4 Efeitos da combinação de paclitaxel com everolimus na viabilidade celular metabólica de linhagens de CAOVS

Prosseguimos com a nossa investigação, neste instante focando no esquema combinatório de everolimus com paclitaxel, por intermédio da qual obtivemos dados promissores e de extrema importância para a clínica do CAOVS. Tal como se conclui por meio dos resultados mostrados na Figura 9A, enquanto que a VCM de ES-2 se

manteve inalterada por everolimus 0,06nM, o parâmetro foi reduzido em 36,38% na presença de paclitaxel 100 nM, em 49,57% após tratamento com paclitaxel 100nM/everolimus 16nM e em 78,48% na presença de paclitaxel 100nM e everolimus 0,06nM. O sinergismo impressionante entre paclitaxel 100nM e everolimus 0,06nM clama por discussão concernente a alguns aspectos específicos. Em primeiro lugar, observamos que o controle da VCM de ES-2 foi superior ao obtido com combinação de cisplatina 1 μ M/paclitaxel 100nM (tratamento padrão contra o CAOV nas concentrações plasmáticas usuais das drogas) e de cisplatina 40 μ M/paclitaxel 100nM (IC50 das drogas em ES-2) (dados mostrados na Figura 13). Em segundo, os resultados nos levam a especular que o uso de everolimus em associação ao paclitaxel pode servir como estratégia que viabilize a diminuição da dose do taxano, mantendo inalterada a sua eficácia terapêutica ao mesmo tempo em que se minimiza a incidência de seus efeitos adversos (principalmente a neurotoxicidade). Por fim, os dados nos motivam a experimentos futuros de investigação das menores doses efetivas de everolimus e paclitaxel contra o CAOV de células claras. Tomados em conjunto, e em quaisquer circunstâncias supracitadas, nosso estudo comporta corpo consubstanciado de evidências para o benefício clínico do uso de everolimus em concentrações dramaticamente inferiores, logo menos tóxicas, às empregadas no tratamento do câncer de mama (BOLERO-2) e em associação ao paclitaxel no combate ao CAOV de células claras, usualmente refratária aos derivados de platina e altamente letal, em muito, pela inexistência de possibilidades terapêuticas contra a mesma. É válido destacar que, diferentemente de ES-2, A2780 tem sua VCM diminuída por everolimus 16nM em monoterapia (redução na VCM de A2780 em 53,41% em relação ao controle não tratado) (Figura 9B). Ainda, o sinergismo entre paclitaxel 100nM e everolimus também foi observado em A2780 (16nM com redução na VCM em 56,19% e 0,06nM com diminuição na VCM em 66,4%); contudo, o sinergismo entre paclitaxel e everolimus não foi superior ao visto com o uso concomitante de cisplatina e paclitaxel (dados mostrados na Figura 13). De todo modo e em conclusão, tal como foi observado em relação ao CAOV de células claras, CAOV seroso inicialmente responsivo ao tratamento baseado em derivados de platina mas que progride como doença quimiorresistente pode ser potencialmente combatido com o emprego de everolimus, em monoterapia se usado na concentração já testada em câncer de mama ou em

politerapia combinada com paclitaxel, circunstância em que se pode ajustar sua concentração para valores significativamente inferiores aos referidos.

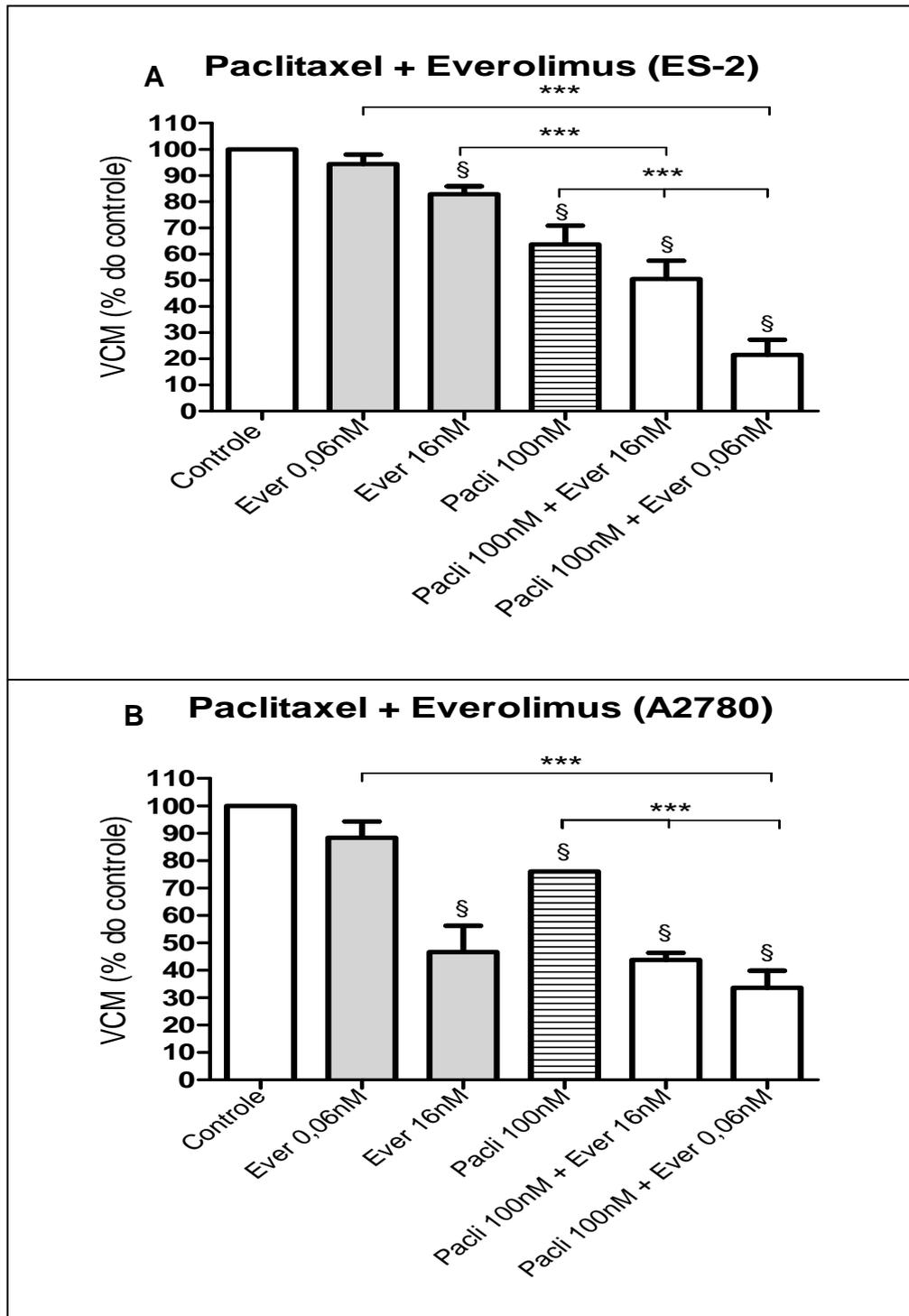


FIGURA 9: Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 (A) e A2780 (B) após o tratamento combinado com everolimus e paclitaxel por 24h. O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. § $p < 0,01$ quando comparado ao controle. *** $p < 0,001$ quando comparamos as condições Ever 0,06nM com Pacli 100nM + Ever 0,06nM (A e B); Ever 16nM com Pacli 100nM + Ever 16nM (A); Pacli 100nM com Pacli 100nM + Ever 16nM e com Pacli 100nM + Ever 0,06nM (A e B). Os resultados representam a média e desvio padrão (\pm) de 3 experimentos independentes.

A vantagem na utilização de terapia combinada entre everolimus e paclitaxel vem sendo descrita em estudos pré-clínicos para outros tipos de câncer, como linfoma não Hodgkin e de células do manto (HARITUNIANS et al., 2007, CHIANG et al., 2010), assim como em associação com o docetaxel em linhagens de câncer de mama (ZHANG et al., 2012). Também foi verificado que a rapamicina, droga da qual se originou o everolimus, potencializa o efeito antiproliferativo do paclitaxel em linhagens celulares de câncer endometrial e de cabeça e pescoço (SHAFER et al., 2010, AISSAT et al., 2008). Complementarmente, pesquisas clínicas estão investigando o valor clínico da combinação de everolimus e paclitaxel em alguns tipos de cânceres, como de mama, de pulmão, de bexiga, dentre outros (U.S. National Institute of Health, acesso em: 10 set. 2013).

4.2.5 Efeitos da combinação de doxorrubicina com metformina ou everolimus na viabilidade celular metabólica de linhagens de CAO V

Adicionalmente, procedemos com a combinação de metformina e everolimus com doxorrubicina, porém não obtivemos efeito adicional na VCM nas linhagens de CAO V ES-2 ou A2780, ou seja, a elevada citotoxicidade da doxorrubicina foi predominante nestes tratamentos (Figura 10 e 11). Além disso, não se pode negligenciar o fato de que a doxorrubicina induz a uma cardiotoxicidade irreversível em pacientes, tal que não se recomenda a reutilização da droga em caso de progressão do câncer (Revisado por THORN et al., 2011). Contudo, foi demonstrado, em modelos animais, que a combinação entre metformina e doxorrubicina preveniu a cardiotoxicidade induzida pelo quimioterápico por meio de seus efeitos antioxidantes (ASHOUR et al., 2012). Com isso, podemos sugerir que a metformina exerce efeitos extra proliferativos, como a proteção cardíaca, em esquemas antineoplásicos baseados em antraciclinas.

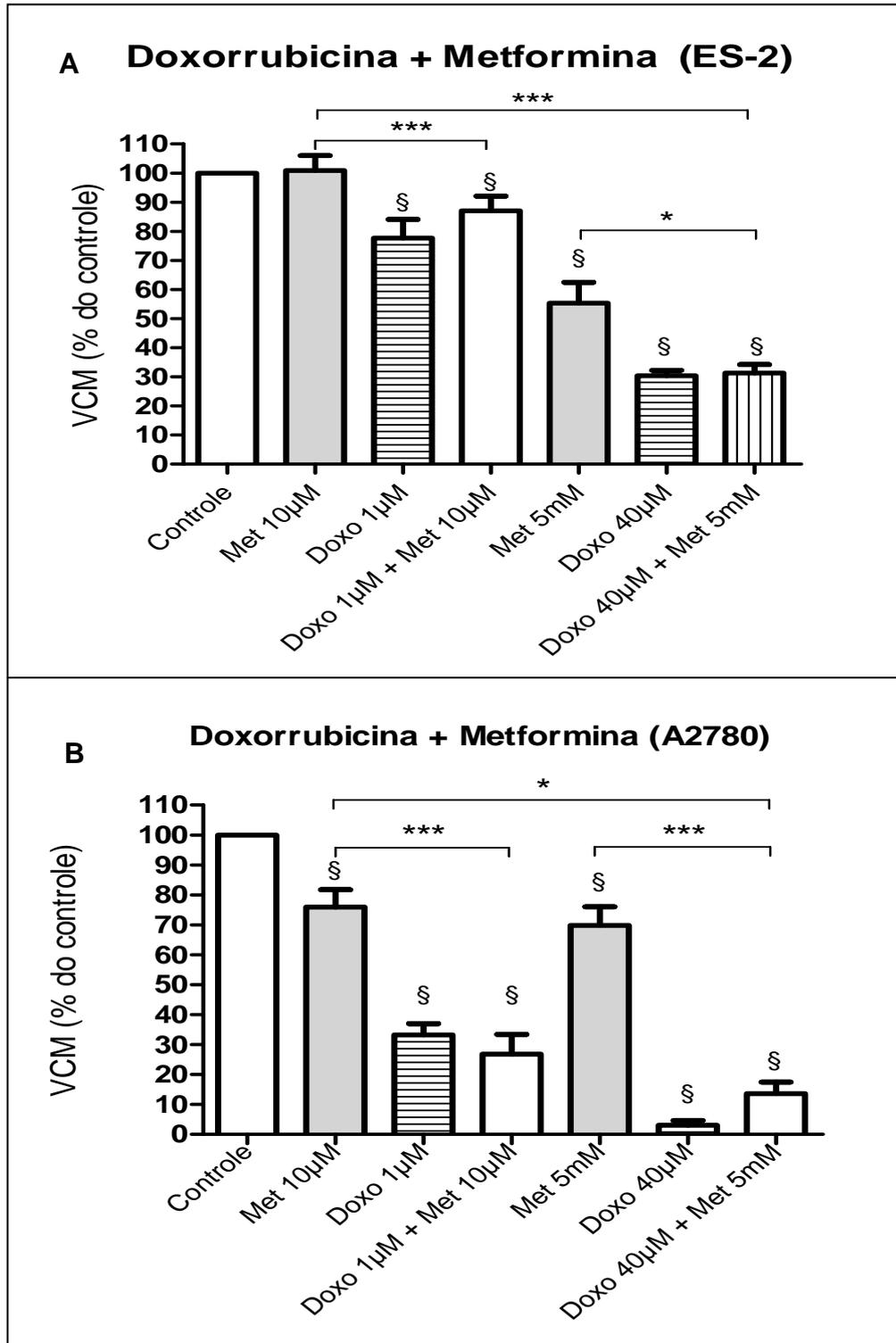


FIGURA 10: Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 (A) e A2780 (B) após o tratamento combinado com metformina e doxorubicina por 24h. O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. § $p < 0,001$ quando comparado ao controle. *** $p < 0,001$ quando comparamos as condições Met 10µM com Doxo 1µM + Met 10µM (A e B); Met 5mM com Doxo 40µM + Met 5mM (B) e Met 10µM com Doxo 40µM + Met 5mM (A). * $p < 0,05$ quando comparamos as condições Met 5mM com Doxo 40µM + Met 5mM (A) e Met 10µM com Doxo 40µM + Met 5mM (B). Os resultados representam a média e desvio padrão (\pm) de 3 experimentos independentes.

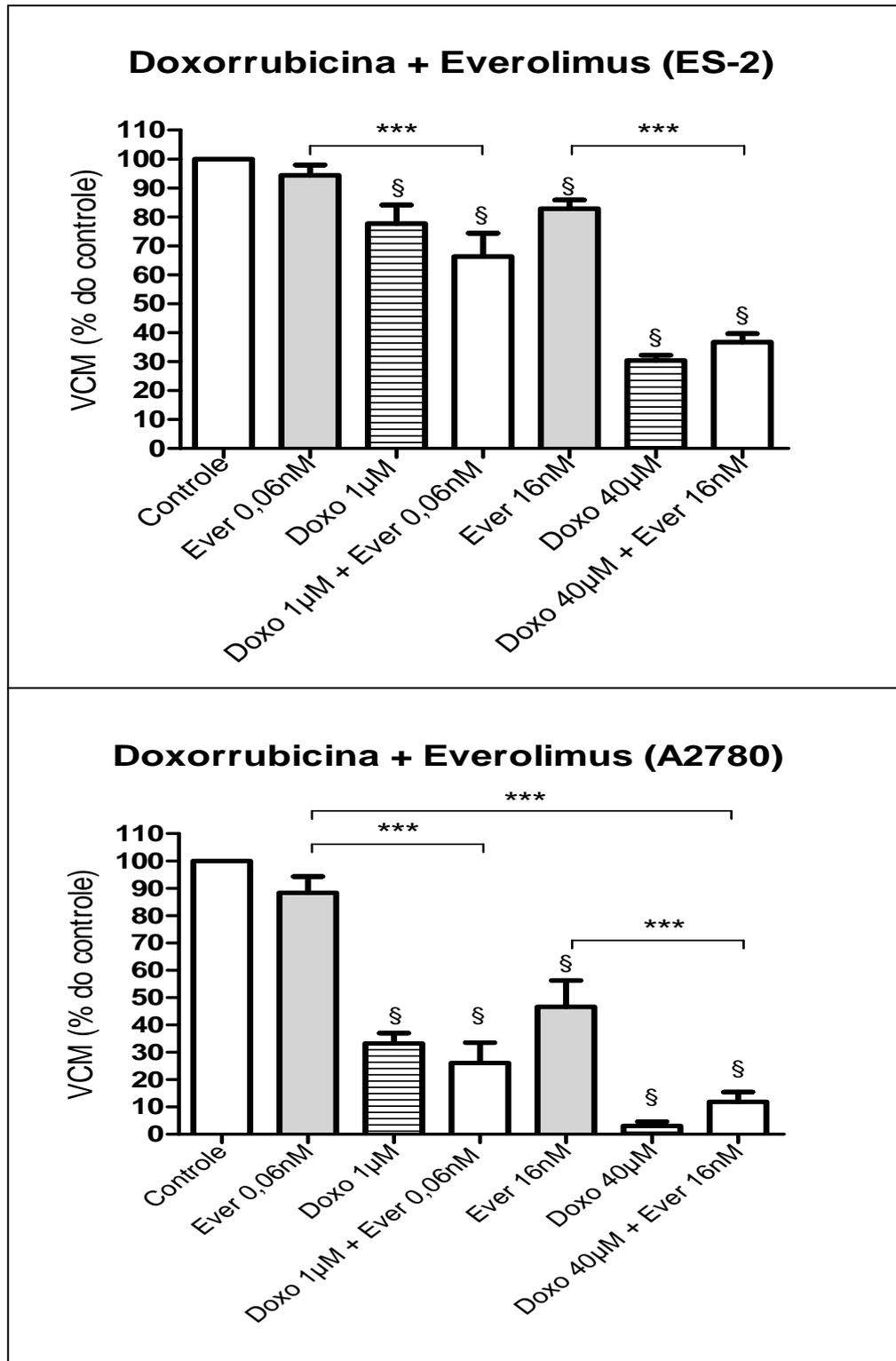


FIGURA 11: Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 (A) e A2780 (B) após o tratamento combinado com everolimus e doxorrubicina por 24h. O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. § $p < 0,01$ quando comparado ao controle. *** $p < 0,001$ quando comparamos as condições Ever 0,06nM com Doxo 1µM + Ever 0,06nM (A e B); Ever 16nM com Doxo 40µM + Ever 16nM (A e B); Ever 0,06nM com Doxo 40µM + Ever 16nM (A e B). Os resultados representam a média e desvio padrão (\pm) de 3 experimentos independentes.

4.2.6 Efeitos da combinação de everolimus com metformina na viabilidade celular metabólica de linhagens de CAO V

Em seguida, questionamo-nos acerca do possível benefício clínico da combinação de metformina com everolimus na luta contra o CAO V. Isso porque, além das duas drogas agirem inibindo a atividade de mTOR, mecanismos anticâncer múltiplos têm sido atribuídos à metformina, os quais podem ser modulados pelo everolimus. Na linhagem de CAO V ES-2, a utilização de metformina em conjunto com everolimus, ambas as drogas em concentrações reduzidas 10 μ M e 0,06nM respectivamente, reduziu a VCM em 17,79% em relação ao everolimus 0,06nM em monoterapia e em 24,29% frente à metformina 10 μ M em monoterapia (Figura 12A). Em relação ao controle não tratado, houve redução da VCM de ES-2 em 23,38% quando as células foram tratadas com metformina 10 μ M e everolimus 0,06nM. Empregando-se as IC₅₀ de metformina e everolimus em ES-2, isto é, 5mM e 16nM respectivamente, constatamos benefício da combinação somente em relação ao everolimus em monoterapia, promovendo inibição da VCM em 28,07%, e em relação ao controle não tratado, situação em que a VCM baixou em 45,21%. Concomitantemente, submetemos A2780 às mesmas combinações. Verificamos vantagem apenas na combinação entre everolimus 0,06nM e metformina 10 μ M em relação à metformina em monoterapia na dose correspondente (Figura 12B). Contudo, combinando everolimus 16nM com metformina 5mM (VCM=60,81%) observamos maior redução da VCM em relação à combinação desses fármacos em doses reduzidas (VCM=84,07%), sendo o efeito estatisticamente significativo. Em relação ao controle não tratado, houve redução da VCM em 15,93% na combinação entre metformina 10 μ M e everolimus 0,06nM, e em 39,19% no tratamento com essas drogas nas concentrações de IC₅₀ (metformina 5mM e everolimus 16nM).

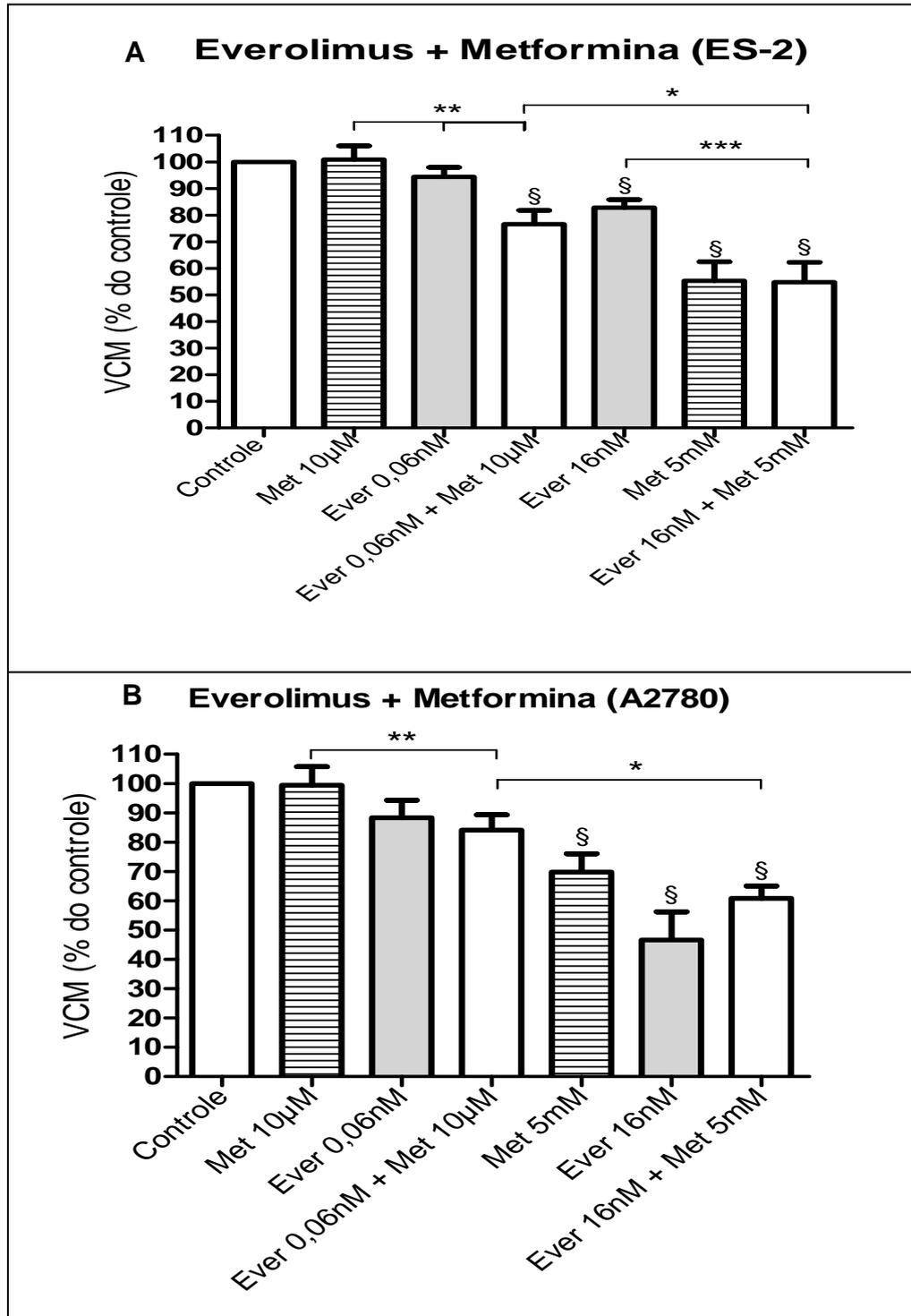


FIGURA 12: Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 (A) e A2780 (B) após o tratamento combinado entre everolimus e metformina por 24h. O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. § $p < 0,05$ quando comparado ao controle. *** $p < 0,001$ ao compararmos as condições Ever 16nM e Ever 16nM + Met 5mM (A). ** $p < 0,01$ ao compararmos as condições Met 10µM e Ever 0,06nM + Met 10µM (A e B); Ever 0,06nM e Ever 0,06nM + Met 10µM (A). * $p < 0,05$ ao compararmos as condições Ever 0,06nM + Met 10µM e Ever 16nM + Met 5mM (A e B). Os resultados representam a média e desvio padrão (\pm) de 3 experimentos independentes.

Há relatos na literatura demonstrando o efeito sinérgico de metformina e everolimus em linhagens de câncer de mama, BT-474, MCF-7, MDA-MB-231 e T47D, sugerindo o emprego deste esquema terapêutico no tratamento da neoplasia (LIU et al., 2012). Além disso, triagens clínicas envolvendo o emprego de metformina e everolimus juntamente com letrozol em pacientes com câncer endometrial (NCT01797523) e com exemestano em mulheres acometidas por neoplasia maligna de mama (NCT01627067) estão em andamento (U.S. National Institute of Health, acesso em: 10 set. 2013). Digno de nota, a ativação de AKT, resultante da liberação do mecanismo de retroalimentação negativa promovido por S6K sobre IRS-1 em resposta à inibição de mTOR, é reduzida pela ação da metformina, pois esta induz a fosforilação do sítio inibitório de IRS-1 (serina 789), enquanto que a rapamicina diminui esta fosforilação. Assim, metformina e everolimus combinados exercem efeitos antineoplásicos pronunciados em linhagem de câncer de mama MCF-7 (ZAKIKHANI et al., 2010). Similarmente, empregamos o everolimus e metformina contra modelos *in vitro* de CAOVS seroso (A2780) e de células claras (ES-2) e observamos efeitos sinérgicos na combinação das drogas em concentrações reduzidas em ES-2, enquanto que em A2780 o benefício foi apenas em relação à metformina apesar do aumento das suas concentrações refletir em aumento tendencial da inibição da VCM.

Interessantemente, ao compararmos a eficácia terapêutica de controle da VCM de ES-2 alcançada com a combinação de metformina e everolimus (nas concentrações 10 μ M/0,06nM e 5mM/16nM) com aquela observada mediante tratamento combinado com cisplatina e paclitaxel (nas concentrações 1 μ M/100nM e 40 μ M/100nM), observamos equivalência de efeitos, com a VCM de ES-2 reduzida em 23,38%, 45,21%, 36,8% e 56,55%, em relação ao controle não tratado, mediante adição de metformina 10 μ M/everolimus 0,06nM, metformina 5mM/everolimus 16nM, cisplatina 1 μ M/paclitaxel 100nM e cisplatina 40 μ M/paclitaxel 100nM, respectivamente (Figura 13A). Nossos resultados sugerem fortemente a possibilidade de substituição dos esquemas terapêuticos usuais no manejo do CAOVS de células claras, seja em caso de ocorrência de quimiorresistência ou de intolerabilidade da paciente às drogas convencionais, por novos agentes terapêuticos como everolimus e metformina. Por sua vez, na linhagem A2780 constatamos efeitos equivalentes ao compararmos as condições de tratamento

everolimus 16nM/metformina 5mM com cisplatina 1 μ M/paclitaxel 100nM (Figura 13B). Logo, as drogas investigadas neste estudo surgem como possíveis alternativas na terapia do CAOv seroso, de modo análogo e com o mesmo racional ao exposto em relação ao CAOv de células claras.

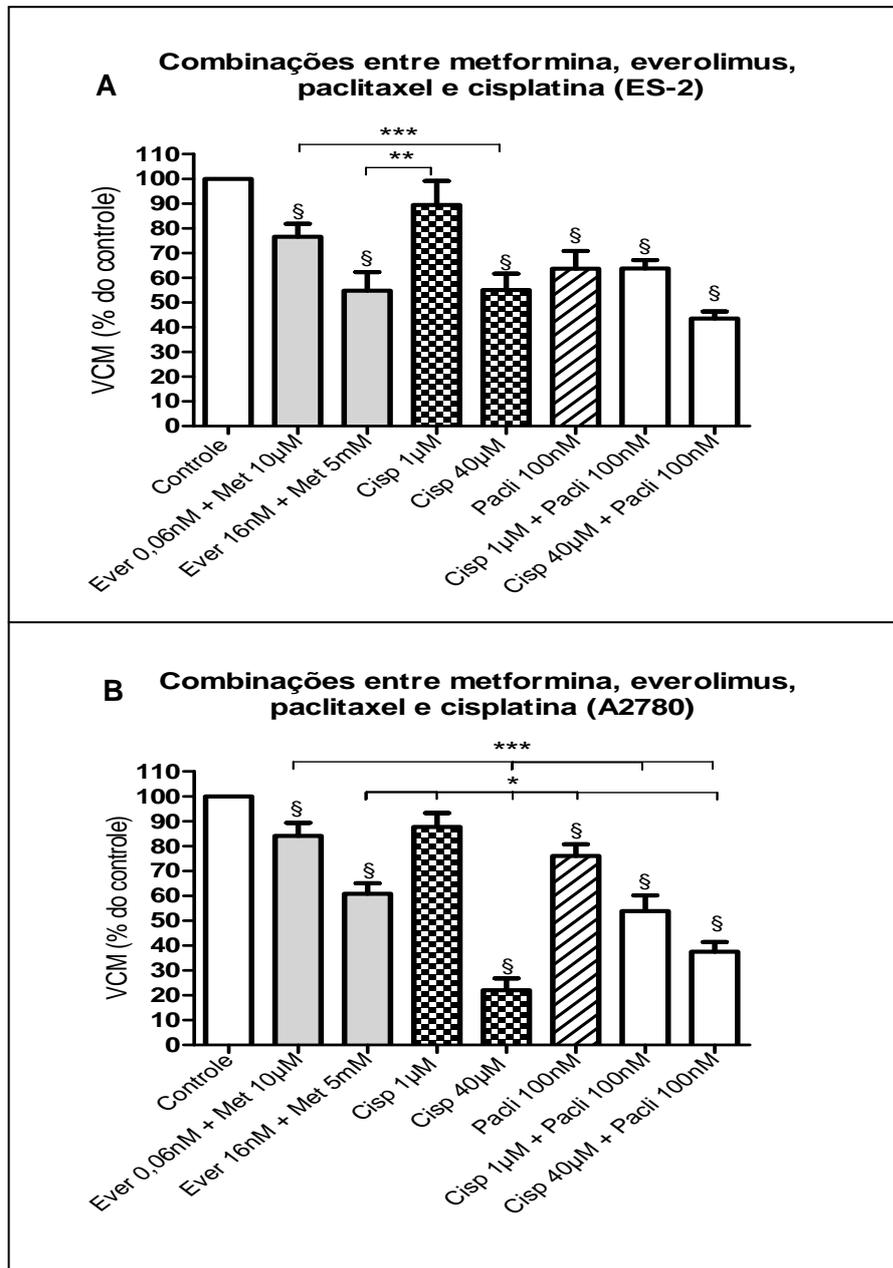


FIGURA 13: Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 (A) e A2780 (B) após o tratamento com everolimus, metformina, cisplatina e paclitaxel em monoterapia ou em combinação por 24h. O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. $\$p < 0,05$ quando comparado ao controle. $***p < 0,001$ ao compararmos as condições Ever 0,06nM + Met 10 μ M com Cisp 40 μ M (A e B); e com Cisp 1 μ M + Pacli 100nM e Cisp 40 μ M + Pacli 100nM (B). $**p < 0,01$ ao compararmos as condições Ever 16nM + Met 5mM com Cisp 40 μ M (A). $*p < 0,5$ ao compararmos as condições Ever 16nM + Met 5mM com Cisp 1 μ M, Cisp 40 μ M, Pacli 100nM e Cisp 40 μ M + Pacli 100nM (B).

4.3 CONCENTRAÇÕES BAIXAS DE METFORMINA E DE EVEROLIMUS POTENCIALIZAM OS EFEITOS DO PACLITAXEL NA REDUÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA DAS LINHAGENS DE CAOVS ES-2 E A2780

Com o intuito de investigarmos a possível redução da dose dos quimioterápicos convencionais amplamente utilizados no tratamento do CAOVS, realizamos esquemas experimentais envolvendo metformina e everolimus em concentrações baixas, 10 μ M e 0,06nM respectivamente, combinados com paclitaxel e cisplatina em doses variadas por um período de 24h. Constatamos que o emprego adicional de metformina 10 μ M ao paclitaxel em concentrações abaixo de sua IC50 conferiu significativa redução da VCM nas duas linhagens de CAOVS estudadas frente à monoterapia com o quimioterápico (Figura 14). Este efeito foi mais pronunciado na linhagem de CAOVS A2780, que respondeu satisfatoriamente a estes esquemas experimentais, exibindo VCM de 56,19% na combinação de metformina 10 μ M com paclitaxel 12,5nM frente à 89,52% após tratamento com o taxano em monoterapia na dosagem correspondente. Esta redução significativa também se manteve constante ao empregarmos doses crescentes de paclitaxel, a saber, 25nM, 50nM e 100nM, combinados com metformina 10 μ M, promovendo a diminuição da VCM em 39,56%, 41,81% e 47,45%, respectivamente. Com isso, verificamos que o emprego de metformina demonstrou importante vantagem à ação do taxano, sendo que as menores doses de paclitaxel empregadas no esquema combinatório (12,5nM, 25nM e 50nM) potencializaram a ação do mesmo, atingindo maiores efeitos do que a condição paclitaxel 100nM ($p < 0,05$).

Na linhagem ES-2, a associação de metformina e paclitaxel promoveu inibição significativa na VCM apenas nas concentrações de 12,5nM e 100nM do taxano comparando-se às condições de paclitaxel nas mesmas doses em monoterapia, alcançando redução na VCM de 21,64% e de 17,81%, respectivamente (Figura 14). Interessantemente, não houve diferença estatística na VCM obtida após a associação de metformina 10 μ M e paclitaxel 12,5nM, 25nM ou 50nM em relação à condição paclitaxel 100nM, ou seja, o efeito produzido na VCM de ES-2 por menor dose de paclitaxel (12,5nM) em adição à biguanida se equipara ao resultado da utilização do taxano em sua maior concentração. Sendo a concentração de efeito máximo de paclitaxel em ES-2, quando há associação com

metformina 10 μ M (concentração sabidamente segura da droga), 8 vezes inferior à sua IC₅₀ nas células (lembrando que essa é também a concentração usual do taxano em pacientes de câncer), é possível prospectar redução significativa da toxicidade sistêmica do paclitaxel no combate ao CAOV, principalmente nos casos agressivos e quimiorresistentes aos derivados de platina. Estes resultados corroboram com achados de estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa em linhagem de câncer de mama MDAMB231, em que observamos a ação adicional da metformina ao efeito do paclitaxel (dados ainda não publicados). Desta forma, do ponto de vista clínico, em que se vislumbra sempre o risco-benefício dos tratamentos ao paciente, a metformina, ao potencializar a ação do paclitaxel e permitir a redução da dose do mesmo, confere à paciente com CAOV maior possibilidade de tolerar o tratamento por não aumentar as chances de desenvolvimento de neurotoxicidade.

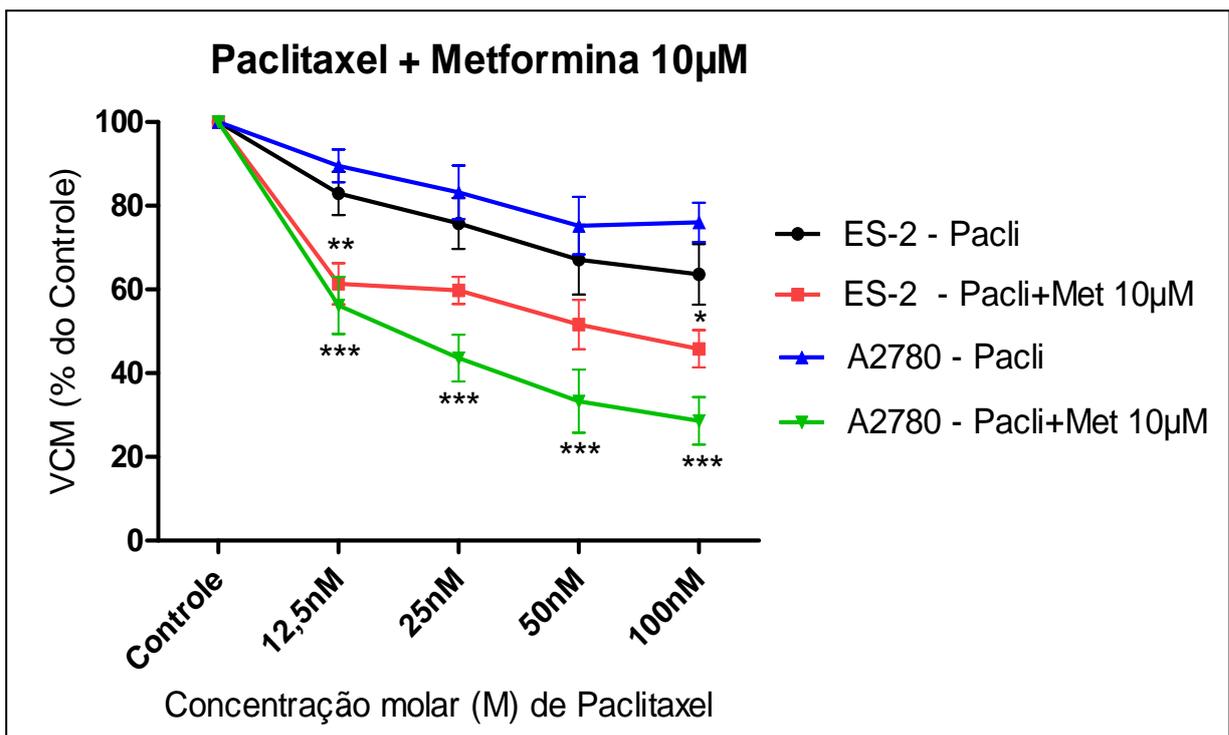


FIGURA 14: Efeitos da combinação entre a metformina (10 μ M) e paclitaxel na viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 e A2780, em tratamento de 24 horas, avaliada pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. ***p < 0,001 quando comparamos as condições de combinação com Pacli em monoterapia na linhagem A2780. **p<0,01 quando comparamos as condições Met 10 μ M + Pacli 12,5nM com Pacli 12,5nM na linhagem ES-2. *P<0,05 quando comparamos as condições Met 10 μ M + Pacli 100nM com Pacli 100nM na linhagem ES-2. Os resultados representam a média e desvio padrão (\pm) de 3 experimentos independentes.

Os resultados compilados na Figura 15 revelam que o uso da metformina 10 μ M não induziu efeito adicional à cisplatina na redução da VCM em ambas as

linhagens de CAOV avaliadas, fato que complementa os achados nos experimentos anteriores envolvendo a combinação destas duas drogas em outras concentrações (Figura 6). Ainda, observamos a melhor resposta à terapia combinada com metformina 10 μ M na linhagem de CAOV A2780, seguindo o mesmo perfil de redução da VCM induzida pela cisplatina em monoterapia (Figura 4). Consideramos de suma importância ressaltar que, em conjunto, os dados apresentados até o presente momento, dão suporte substancial ao uso de metformina em casos de CAOV que progridem ao tratamento com derivados de platina, abrindo uma avenida de possibilidades terapêuticas de manejo de casos de CAOV agressivos e metastáticos que culminam com o óbito da paciente na maioria das vezes.

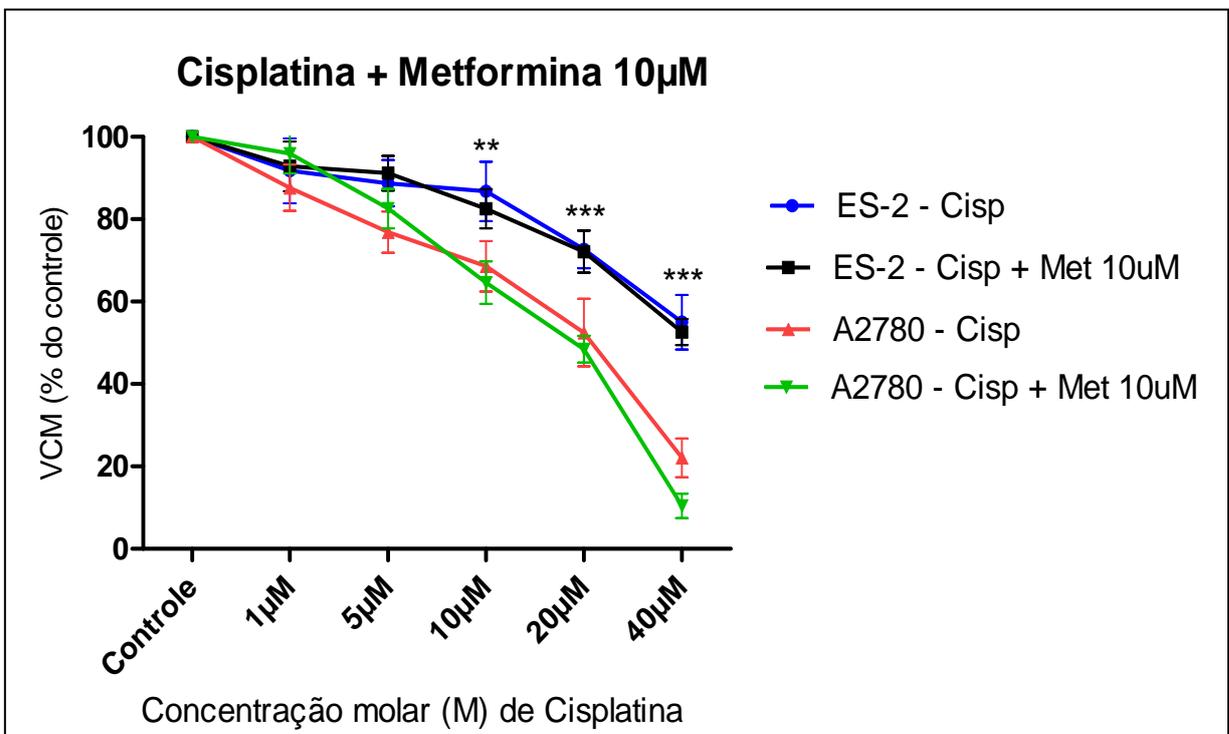


FIGURA 15: Efeitos da combinação entre a metformina (10 μ M) e cisplatina na viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 e A2780, em tratamento de 24 horas, avaliada pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. ** $p < 0,001$ ao compararmos as condições Met 10 μ M + Cisp 20 μ M e Met 10 μ M +40 μ M entre as duas linhagens. * $p < 0,01$ ao compararmos as condições Met 10 μ M + Cisp 10 μ M entre as duas linhagens. Os resultados representam a média e desvio padrão (\pm) de 3 experimentos independentes.

De acordo com a figura 16, ao submetermos as linhagens de CAOV ES-2 e A2780 ao tratamento concomitante de everolimus 0,06nM com concentrações crescentes de paclitaxel, constatamos efeito pronunciado de diminuição da VCM em ambas linhagens de CAOV estudadas, ES-2 e A2780. Ao compararmos a redução

da VCM nas condições de tratamento usando combinação com a condição envolvendo o paclitaxel apenas, verificamos na linhagem representante do subtipo histológico de CAO V de células claras, ES-2, redução constante da VCM de 40,6%, 41,32%, 39,08% e 42,10% nos esquemas terapêuticos utilizando concentrações de paclitaxel de 12,5nM, 25nM, 50nM e 100nM. Cabe enfatizar que a manutenção da dose de everolimus (0,06nM) permite o emprego de menores doses do taxano, tendo em vista que a adição de everolimus 0,06nM ao paclitaxel 12,5nM promoveu uma redução da VCM (21,25%) estatisticamente significativa em relação à condição paclitaxel 100nM, bem como as combinações empregando 25nM (29,17%) e 50nM (35,58%) ($p < 0,001$).

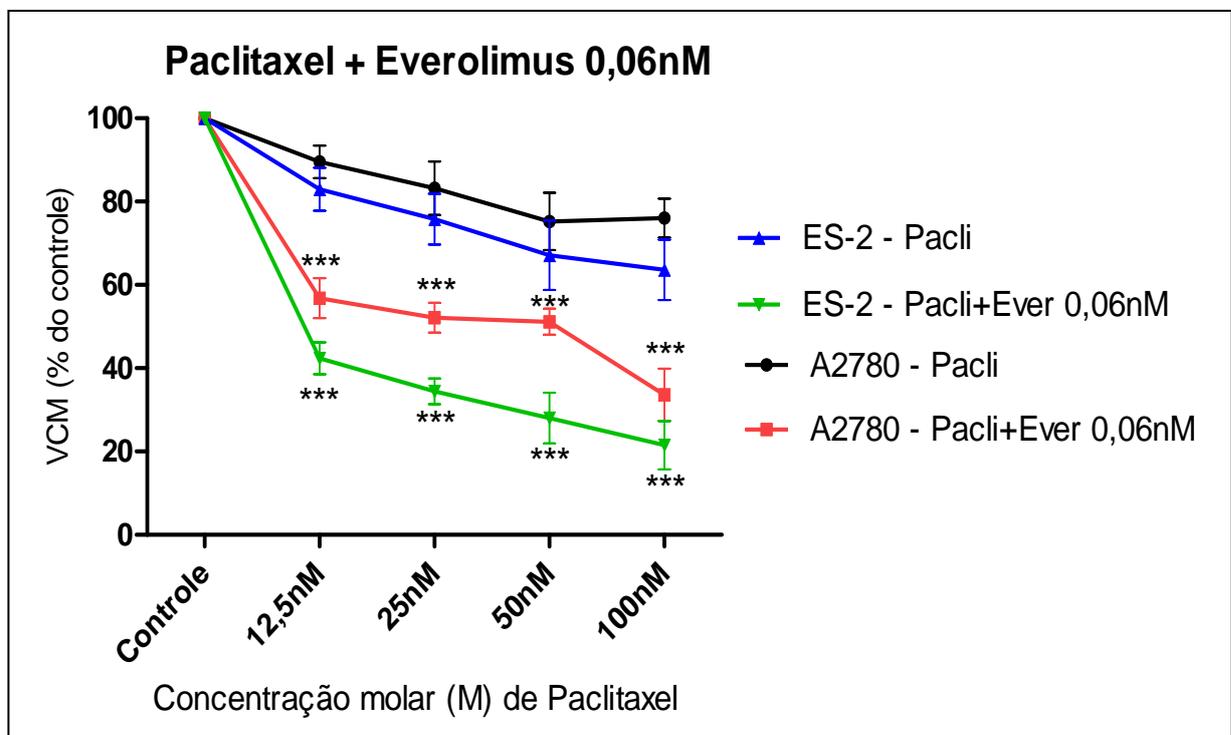


FIGURA 16: Efeitos da combinação entre a everolimus (0,06 nM) e paclitaxel na viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 e A2780, em tratamento de 24 horas, avaliada pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. OS dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. * $p < 0,001$ quando comparamos as condições de combinação com paclitaxel em monoterapia em cada linhagem. Os resultados representam a média e desvio padrão (\pm) de 3 experimentos independentes.

Da mesma forma, na linhagem de CAO V A2780, o everolimus 0,06nM potencializou a inibição da VCM promovida pelo paclitaxel. Observamos redução significativa da VCM desde os esquemas combinatórios envolvendo doses mais baixas do taxano. Ao comparamos as condições do quimioterápico em monoterapia na concentração 12,5nM com a combinação envolvendo everolimus 0,06nM e

paclitaxel 12,5nM, notamos que a VCM passou de 89,52% para 56,82%. Ainda, as demais combinações utilizando concentrações crescentes do taxano promoveram marcante redução da VCM em relação às condições empregando apenas o quimioterápico nas doses correspondentes. Assim, nas doses de 25nM, 50nM e 100nM de paclitaxel constatamos uma diminuição da VCM de 31,08%, 24,06% e 42,47% respectivamente. Também podemos inferir a possibilidade de redução da dose do quimioterápico, pois Nas combinações com as menores doses do mesmo, 12,5nM, 25nM e 50nM, e o everolimus 0,06nM houve inibição da VCM estatisticamente significativa em relação ao paclitaxel 100nM de 19,25%, 23,96% e 24,31%, respectivamente ($p < 0,01$). De acordo com estes resultados, sugerimos que o emprego do everolimus em conjunto com o paclitaxel no tratamento do CAOv possa viabilizar a redução da dose do taxano empregado tradicionalmente no manejo desta neoplasia, fato que refletirá positivamente na qualidade de vida da paciente e no sucesso terapêutico de controle da doença.

Por sua vez, ao procedermos com a estratégia de tratamento compreendida por everolimus 0,06nM associado à cisplatina em concentrações variadas (Figura 17), encontramos benefício na promoção da inibição da VCM em relação ao tratamento com o quimioterápico em monoterapia apenas na condição em que usamos 10 μ M de cisplatina na linhagem ES-2 (17,28%), não sendo observado maior efeito com o aumento da dose da droga. Do mesmo modo, não verificamos vantagens nas condições de combinação destes fármacos em concentrações de IC₅₀ (Figura 8).

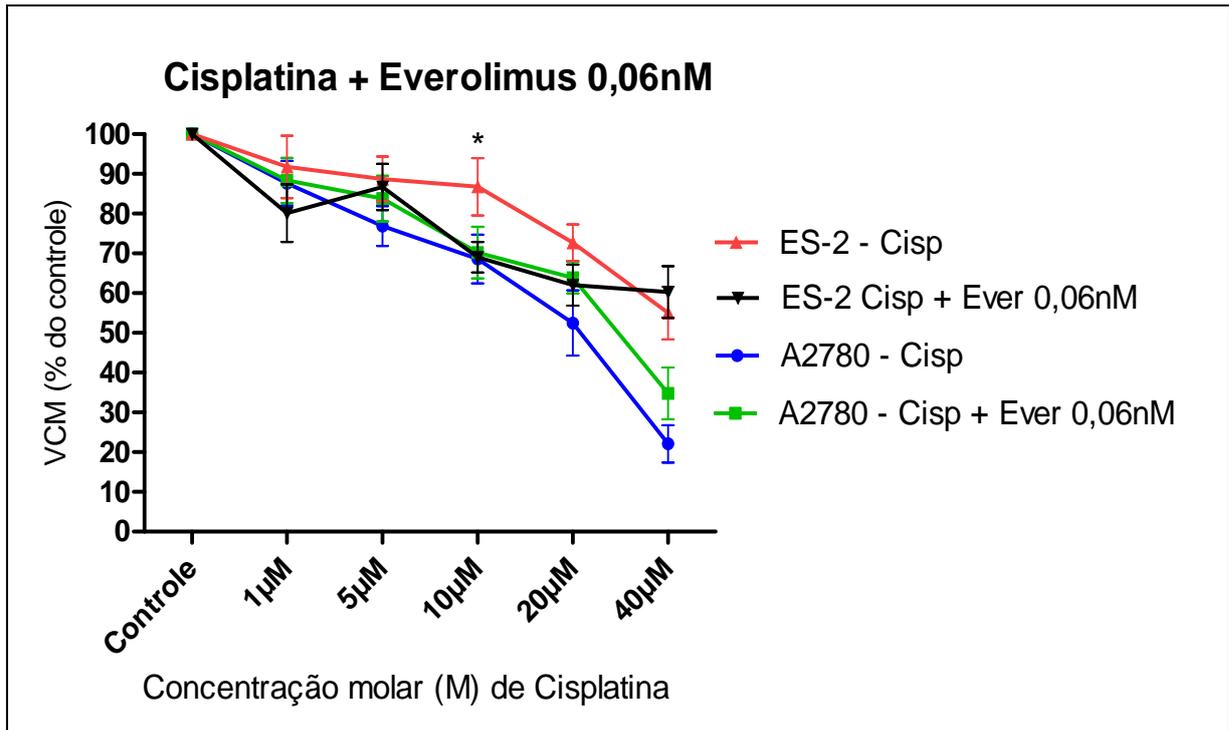


FIGURA 17: Efeitos da combinação entre a everolimus (0,06nM) e cisplatina na viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens ES-2 e A2780, em tratamento de 24 horas, avaliada pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. * $p < 0,05$ ao compararmos as condições Ever 0,06nM + Cisp 10µM com Cisp 10µM na linhagem ES-2. Os resultados representam a média e desvio padrão (\pm) de 30 experimentos independentes.

4.4 EFEITO DA METFORMINA E DO EVEROLIMUS SOBRE A INDUÇÃO DE MORTE CELULAR NA LINHAGEM DE CAOVS ES-2

Motivados pelos resultados dos experimentos que avaliaram o efeito dos esquemas combinatórios envolvendo metformina ou everolimus com os quimioterápicos, principalmente o paclitaxel, sobre a VCM da linhagem de CAOVS ES-2, e instigados pela realidade dramática do CAOVS de células claras contra o qual praticamente não há opções terapêuticas eficazes, investigamos a possível contribuição da ocorrência de apoptose e necrose como mecanismos de controle da viabilidade celular dessas em ES-2. Para tanto, realizamos o ensaio de anexina V FITC/PI. Sabemos que uma célula em apoptose sofre diversas modificações, entre elas a perda da simetria da membrana plasmática, o que ocasiona a translocação de fosfatidilserina (FS) para o meio extracelular. Essa exposição também ocorre na necrose; entretanto, a permeabilidade membranar nos dois processos de morte celular é distinta. No início da apoptose, as células ainda mantêm a integridade da

membrana celular, enquanto que, na necrose, as células estão permeáveis. A anexina V é uma proteína de ligação aos fosfolípidos cálcio-dependentes que possui elevada afinidade para a FS, mas somente consegue interagir com as células se a FS estiver exposta na face externa da membrana plasmática, uma vez que não é capaz de penetrar nas células com membrana plasmática íntegra. Na análise desta interação por citometria de fluxo, empregamos a anexina V conjugada ao fluorocromo (FITC), juntamente com o agente intercalante de DNA, iodeto de propídeo (PI), que atua somente em células permeáveis (revisado por VERMES et al., 1995), sendo possível, assim, distinguir as células em: viáveis (anexina V FITC - e PI-), apoptóticas em estágio inicial (anexina V FITC + e PI -), apoptóticas avançadas (anexina V FITC + e PI +) e necróticas (anexina V FITC - e PI +).

Nas condições de tratamento envolvendo metformina, everolimus, paclitaxel e cisplatina, em monoterapia ou combinados, observamos que uma pequena fração das células avaliadas sofreu morte celular por apoptose ou necrose. Os resultados compilados na Tabela 6 mostram a fração de células avaliadas afetada pelos fenômenos, a saber: i) metformina 10 μ M: 3,05% e 1,3% de células apoptóticas iniciais e tardias, respectivamente, e 3,85% de células necróticas; ii) metformina 5mM: 1,15% e 2,75% das células sofreram apoptose inicial e tardia, respectivamente, e 5,1%, necrose. Assim como os achados no ensaio de MTT, a utilização de metformina em uma maior concentração (IC50 5mM) não alterou a resposta celular comparada às suas concentrações empregadas no manejo do DM2 (10 μ M), o que reforça a ideia do seu emprego em doses baixas e sabidamente seguras como opção terapêutica contra o CAO. Por sua vez, o tratamento com everolimus induziu à apoptose inicial e tardia em apenas 0,9% e 0,35%, respectivamente, e necrose em 3,45% das células avaliadas. O paclitaxel 100nM em monoterapia induziu apoptose inicial e tardia em 1,9% e 1,0% das células, respectivamente, e 5,6% das células sofreram necrose. A terapia com cisplatina levou à apoptose inicial de 1,75%, apoptose tardia de 1,0%, e necrose de 5,6% das células. Os esquemas combinatórios mantiveram o mesmo perfil de indução destes fenômenos de morte celular que as condições compostas pelas drogas em monoterapia.

TABELA 6: Indução de apoptose e necrose na linhagem de CAO V ES-2 após o tratamento com metformina, everolimus e quimioterápicos em monoterapia ou combinados.

Tratamento	Condição celular			
	Apoptose inicial (Média ± DP)	Apoptose tardia (Média ± DP)	Necrose (Média ± DP)	Células viáveis (Média ± DP)
Metformina 10µM	3,05% (2,4)	1,3% (0,5)	3,85% (2,3)	91,8% (5,3)
Metformina 5mM	1,15% (0,4)	2,75% (2,4)	5,1% (2,9)	91,0% (5,9)
Everolimus 0,06nM	0,9% (0,8)	0,35% (0,07)	3,45% (2,7)	95,3% (3,6)
Paclitaxel 100nM	1,9% (0,9)	1,0% (0,4)	5,6% (3,6)	91,5% (6,0)
Cisplatina 40µM	1,75% (1,2)	1,0% (0,5)	5,6% (4,6)	91,65% (6,4)
Paclitaxel 100nM + Metformina 10µM	0,9% (0,42)	1,4% (0,9)	6,2% (4,5)	91,5% (5,9)
Paclitaxel 100nM + Metformina 5mM	2,2% (1,83)	0,8% (0,28)	4,35% (2,33)	92,65% (4,45)
Cisplatina 40uM + Metformina 10µM	1,4% (0,84)	0,85% (0,35)	6,45% (4,8)	91,3% (6)
Cisplatina 40µM + Metformina 5mM	1,45% (1,3)	0,65% (0,21)	5,85% (3,3)	92,05% (4,8)
Paclitaxel 100nM + Everolimus 0,06nM	2,15 (1,7)	1,2% (0,4)	6,0% (5,0)	90,65% (7,2)

Os resultados encontrados são intrigantes frente aos achados no ensaio de avaliação da VCM de ES-2 por meio dos quais constatamos benefício do emprego de metformina e everolimus em combinação com o paclitaxel. Mas devemos ressaltar que estes ensaios avaliam condições celulares distintas, enquanto que o método de MTT avalia a atividade enzimática mitocondrial das células, ou seja, sua viabilidade metabólica, o método anexina V/PI investiga a ocorrência de morte celular por apoptose ou necrose. Estes achados podem ser justificados, em parte, pelo tempo de 24h de tratamento ser curto ou a dose utilizada das drogas não serem suficientes para a visualização destes fenômenos de morte celular, e que, nas

condições aplicadas neste estudo, as células apenas começam a perder sua viabilidade, e, possivelmente, se mantivermos estes tratamentos por tempo prolongado constataremos a ocorrência destes mecanismos de morte celular.

Nossos resultados estão em concordância com aqueles obtidos por Chang e colaboradores (2012) que sugeriram pequena contribuição da morte celular apoptótica após tratarem células de câncer de mama (MCF7) e de fibrossarcoma murino (FSall) com metformina 1mM ou 5mM por 24h e com radioterapia por 24h, observando maior ocorrência de necrose do que de apoptose. Outros estudos também têm demonstrado a ocorrência de apoptose após o tratamento com esta biguanida. Yasmineen e colaboradores (2011) utilizaram metformina 5mM por 72h e verificaram a ocorrência de apoptose em cerca de 1% das células de CAOV seroso, OVCAR-3 e OVCAR-4, enquanto que empregando 20mM desta droga, obtiveram 4% de apoptose. Ainda, constataram que a atividade de caspase 3/7 também aumentou de maneira dose dependente. Devemos considerar as características específicas de cada linhagem assim como as condições experimentais, que em nosso estudo, foram diferentes do que o executado por estes pesquisadores.

Referindo-se à utilização da terapia com everolimus, Crazzolará e colaboradores (2009) constataram que a apoptose não foi o principal processo de morte celular após tratarem camundongos modelos de leucemia linfoblástica aguda com everolimus e observaram a ocorrência de vacúolos autofágicos por microscopia eletrônica, sugerindo o envolvimento de morte celular autofágica. Outro estudo realizado por Zhang e colaboradores (2012) constatou a ocorrência de apoptose em aproximadamente 6% de células de câncer de mama MDAMB-231 tratadas com everolimus 100nM e em 15% das células submetidas à combinação desta droga com docetaxel por 24h. A concentração utilizada foi 2,5 vezes menor que a IC50 de everolimus para esta linhagem, enquanto que em nosso estudo a concentração 0,06nM usada neste ensaio representa concentração 250 vezes menor que a IC50 na linhagem ES-2. Sendo assim, a indução de morte celular por metformina e everolimus na linhagem de CAOV ES-2 necessita de maior investigação.

Um aspecto a ser investigado futuramente é a ocorrência de morte celular autofágica. Classicamente, a autofagia constitui um processo fisiológico necessário

à sobrevivência celular em situações de privação nutricional extrema, hipóxia e estresse metabólico. Entretanto, se estas condições de estresse celular persistirem, podem resultar em indução continuada ou excessiva da autofagia, culminando com morte celular (Revisado por NOTTE; LECLERE; MICHIELS, 2011). Por sua vez, na morte celular programada do tipo II ou morte celular autofágica, ocorre a formação de vacúolos autofágicos desde os momentos iniciais do processo, além de ser marcada pela perda da integridade de organelas (KLIONSKY; CUERVO; SEGLIN, 2007; KLIONSKY et al., 2008). Cabe enfatizar, no entanto, que morte celular autofágica e apoptose são mecanismos de respostas celulares às alterações das condições microambientais fisiológicas ou patológicas e que não são fenômenos mutuamente excludentes (BURSCH et al., 2000). Estudos têm demonstrado o envolvimento de mecanismos autofágicos nos fenômenos de morte celular em linhagens de melanoma tratadas com metformina (JANJETOVIC et al., 2011), e em modelos *in vivo* de leucemia linfoblástica aguda após a terapia com everolimus (CRAZZOLARA et al., 2009).

Como discutido anteriormente, mTOR regula negativamente a autofagia e, ao inibir esta proteína, utilizando-se everolimus ou metformina, podemos induzir este processo de maneira constante até desencadear uma morte celular autofágica. Além disso, por se tratar de evento de morte celular programada mais tardio, especulamos que as células viáveis encontradas pelo ensaio anexina V/PI agrupem células em morte celular autofágica. Tomando nossos resultados em conjunto com a literatura que também relata a ocorrência deste tipo de morte celular após a inibição de ambos os complexos de mTOR (WANG et al., 2009), bem como o estudo desenvolvido por Zeng e colaboradores (2007) demonstrando a supressão destes complexos protéicos em linhagens de leucemia mielóide aguda após o tratamento com everolimus 20nM, sugerimos que nossas condições experimentais envolvendo everolimus e metformina também possam induzir a uma morte celular autofágica.

4.5 EFEITO DA METFORMINA E DO EVEROLIMUS SOBRE O CICLO CELULAR DE CÉLULAS DE CAOVS ES-2

Com o intuito de melhor compreendermos o mecanismo antineoplásico desempenhado pela metformina e pelo everolimus, avaliamos se estes exercem efeitos sobre o ciclo celular da linhagem de CAOVS ES-2. No tratamento com metformina 10 μ M ou 5mM observamos o predomínio da fase G0/G1 do ciclo celular, em relação às demais fases do mesmo, contudo comparando-se com a condição controle observamos um aumento na porcentagem de células em G2/M de aproximadamente 4,5% ($p < 0,05$) (Figura 18).

Ao avaliarmos o efeito da combinação de paclitaxel 100nM com metformina 10 μ M ou 5mM sobre o ciclo celular de ES-2, constatamos a manutenção celular na fase S alcançada com o tratamento com paclitaxel em monoterapia e um discreto aumento na fase G2/M em relação ao controle. Fato tanto inusitado quanto intrigante, uma vez que classicamente, o paclitaxel inibe a despolimerização dos microtúbulos bloqueando o ciclo celular em G2/M (revisado por GUIMARÃES et al., 2013), entretanto nossas condições experimentais estão favorecendo uma situação que antecede esta fase, fato que continuaremos investigando. Adicionalmente, a combinação paclitaxel 100nM com metformina 5mM promoveu um aumento de 2,58% de células na fase G0/G1 em relação ao paclitaxel em monoterapia ($p < 0,05$), e de 8,76% na fase subG0 ($p < 0,05$), marcada por células em estágio de morte celular avançado, em comparação ao controle. Nossos resultados podem explicar, ao menos parcialmente, o sinergismo observado entre as duas drogas nos experimentos de VCM.

Outros estudos tem demonstrado a modulação do ciclo celular por metformina, Yasmeen e colaboradores (2011) demonstraram um aumento de 13,17% de células nas fases S e G2/M do ciclo celular após o tratamento das linhagens de CAOVS OVCAR-3 e OVCAR-4 com metformina 10mM por 72h em relação ao controle, atestaram ainda uma parada do ciclo celular especificamente na fase S. Cumpre ressaltar que nossas condições experimentais envolveram um menor tempo de tratamento o que pode explicar, ao menos parcialmente, a menor expressividade de nossos resultados em relação ao estudo anteriormente citado. De

maneira complementar, Erices e colaboradores (2013), verificaram um pequeno aumento de células nas fases S e G2/M do ciclo celular ao tratar as linhagens de CAO V A2780 e SKOV3 com metformina 20 μ M em relação ao controle. De encontro a estes achados, outros estudos têm demonstrado que o tratamento com metformina induz a uma parada do ciclo celular na fase G0/G1 do ciclo celular, inclusive na linhagem de CAO V A2780 (RATTAN et al., 2011b; ZHUANG; MISKIMINS, 2008; BEN SAHRA et al., 2008). Recentemente, nosso grupo também constatou este efeito em linhagens de câncer de mama triplo negativo MDAMB-231 (Dados não publicados). Entretanto temos que considerar que cada linhagem possui características peculiares.

Por sua vez, no tratamento com everolimus 0,06nM e 16nM, também constatamos a preponderância de células na fase G0/G1. E interessante, a condição everolimus 16nM induziu a um aumento de 14,1% de células na fase sub-G0 em relação ao controle ($p < 0,05$). Corroborando nossos achados, Haritunians e colaboradores (2007), relataram uma parada do ciclo celular em G1 ao tratarem células de linfoma com everolimus. Na combinação desta droga com o paclitaxel, ainda observamos a manutenção de células na fase subG0 (10,14% com paclitaxel 100nM + everolimus 0,06nM; 9,65% com paclitaxel 100nM + everolimus 16nM), além de um predomínio das células na fase G0/G1 (40,39% com paclitaxel 100nM + everolimus 0,06nM e 36,58% com paclitaxel 100nM + everolimus 16nM). Em relação ao everolimus em monoterapia constatamos um aumento de 23,12% na fase S no esquema combinatório utilizando everolimus 0,06nM e de 27,15% com everolimus 16nM, bem como de 10,94% na fase G2/M nesta última condição ($p < 0,05$). Assim, acreditamos que o entre sinergismo entre paclitaxel e everolimus é mútuo, sendo o efeito resultante sobre o ciclo celular dependente da concentração de everolimus utilizada como estratégia terapêutica.

Ao combinarmos cisplatina 40 μ M com metformina 10 μ M verificamos um aumento de 13,18% de células na fase G0/G1 ($p < 0,05$), observado também em 7,89% das células submetidas à combinação com metformina 5mM ($p < 0,05$) comparados à este quimioterápico em monoterapia. Ainda, constatamos aumento da fração celular na fase sub-G0, marcada por células em estágio de morte celular, nas condições de tratamento com cisplatina, principalmente em monoterapia (aumento

de 16,52% em relação ao controle). De maneira similar, na combinação everolimus com cisplatina, também predominaram as células na fase G0/G1, cumpre citar que em relação à cisplatina em monoterapia a combinação com everolimus 0,06nM promoveu um aumento de 8,71% nesta fase, assim como 6,47% com everolimus 16nM ($p < 0,05$). Contudo, a frequência de células na fase sub-G0 manteve-se entre 10 à 13%. Como nos ensaios em que avaliamos a VCM nestas condições experimentais não verificamos benefício nesta combinação, observamos que a modulação do ciclo celular não é um mecanismo decisivo na indução de morte celular por cisplatina.

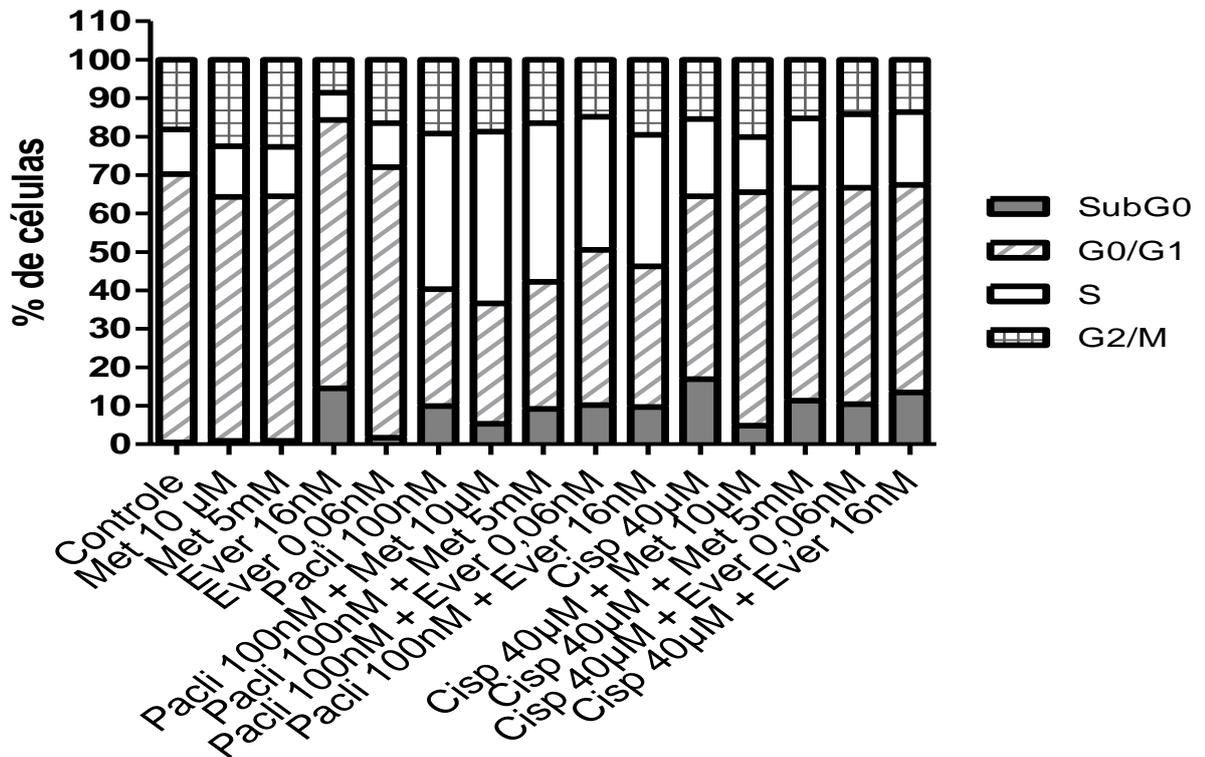


FIGURA 18: Análise do ciclo celular na linhagem ES-2 tratada por 24h com metformina, everolimus, paclitaxel e cisplatina em diferentes concentrações e em combinação. As análises foram feitas no equipamento BD Accuri® C6 FlowCytometer, utilizando o software Summit v.4.3. Foram adquiridos 10.000 eventos (células) por amostra utilizando o canal FL-2 (585nm). Células não tratadas foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni ($p < 0,05$).

Por fim, analisados em conjunto, nossos resultados demonstram os benefícios da utilização de metformina e de everolimus em adição aos

quimioterápicos padrão utilizados no tratamento de CAO, principalmente o paclitaxel, configurando possíveis estratégias terapêuticas para o manejo clínico desta doença. Ainda, postulamos que o benefício antineoplásico da metformina e do everolimus pode decorrer de, mas não exclusivamente, em células CAO por indução de morte celular autofágica e modulação de outras vias de sinalização além de PI3K/AKT/mTOR, como MEK/ERK e NFkB (Figura 19).

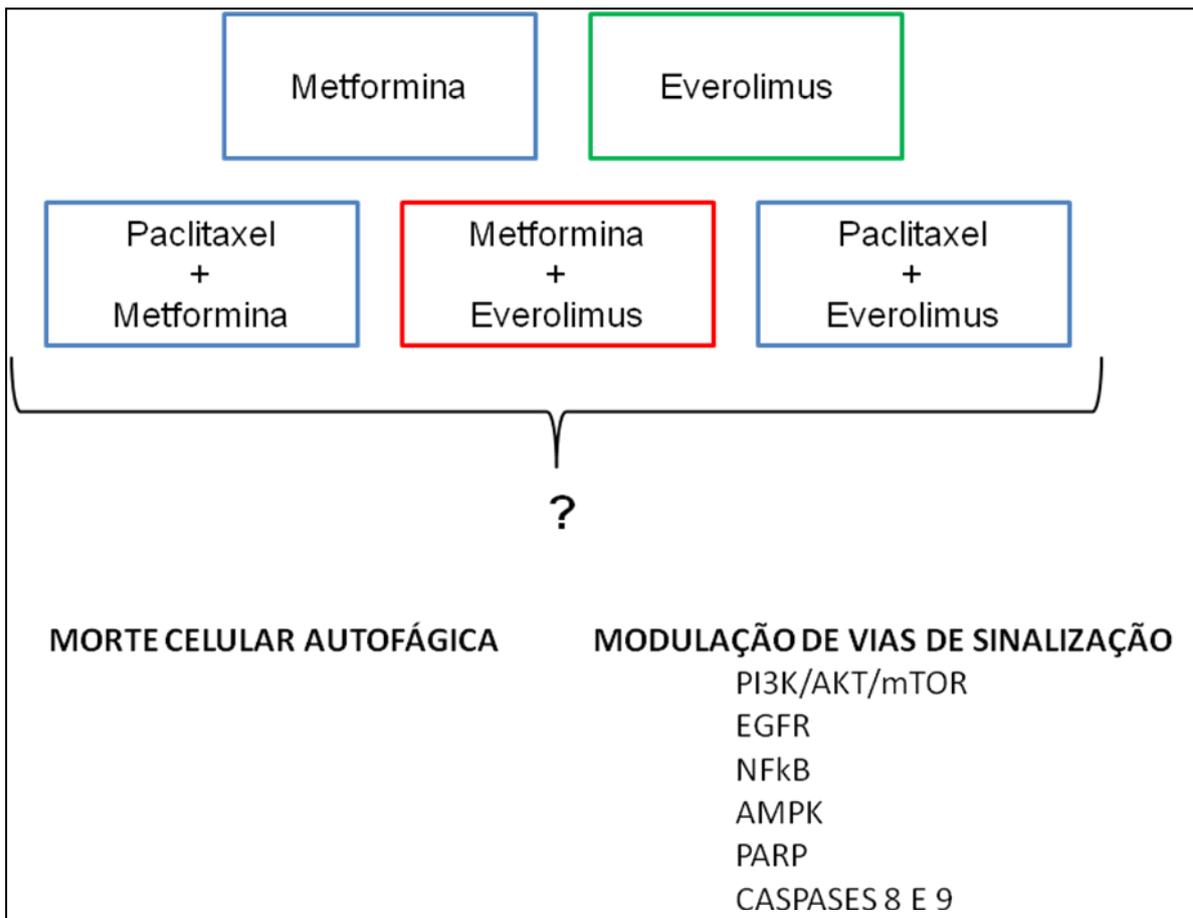


FIGURA 19: Esquemas terapêuticos antineoplásicos eficazes nas linhagens de CAO, à base de metformina e everolimus, e hipóteses de possíveis mecanismos celulares induzidos por estes fármacos.

5 CONCLUSÃO

Os dados do presente trabalho nos permitem concluir que:

1. Metformina e everolimus exercem redução da VCM em linhagens de CAO V representativas dos subtipos histológicos células claras (ES-2) e seroso (A2780);
2. Concentrações consideradas plasmáticas, compatíveis com as empregadas na clínica, de metformina e everolimus potencializam o efeito antineoplásico de paclitaxel nas linhagens de CAO V ES-2 e A2780, não sendo constatada vantagem adicional no uso de doses maiores destes fármacos;
3. A combinação de metformina ou everolimus com paclitaxel parece exercer ação sinérgica sobre a viabilidade celular das linhagens de CAO V ES-2 e A2780, o que pode possibilitar, futuramente na clínica, a redução da dose do quimioterápico e conseqüentemente seus efeitos adversos, aumentando as chances de adesão ao tratamento e a qualidade de vida das pacientes;
4. O principal processo de morte celular causado por metformina e everolimus aparentemente não é a apoptose, e outros mecanismos podem estar sendo induzidos como a morte celular autofágica em células de CAO V ES-2;
5. O ciclo celular da linhagem ES-2 pode ser modulado pelo tratamento com metformina e everolimus, situação em que ocorre um predomínio de células na fase G₀/G₁, além de um aumento de células na fase G₂/M na condição com metformina e na fase sub-G₀ com everolimus.
6. Em suma, acreditamos que nossas investigações futuras podem conduzir ao descobrimento de aspectos moleculares relacionados à ação de metformina e everolimus sobre mTOR, fornecendo embasamento para a

inserção destes fármacos como opções terapêuticas para o manejo do CAO, que se configura como um dos grandes desafios à saúde global.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Em virtude da importância clínica do presente estudo, nosso grupo pretende prosseguir com as investigações da aplicabilidade da metformina e de everolimus em regimes terapêuticos contra o CAO, conforme descrito a seguir:

1. Avaliar diferentes condições experimentais, a fim de melhor compreendermos as condições ideais para se obter os benefícios clínicos da metformina e do everolimus, como monoterapia ou politerapia combinada com agentes antineoplásicos convencionais, no tratamento do CAO, a saber: i) conduzir ensaios em tempos maiores, 48h e 72h; ii) investigar da ordem cronológica de administração dos fármacos; iii) avaliar o efeito de diversas concentrações de metformina e everolimus e das demais drogas a serem testadas;
2. Conduzir estudos de determinação dos mecanismos de ação da metformina e de everolimus em monoterapia ou em politerapia combinada com agentes antineoplásicos convencionais, no tratamento do CAO: investigação do possível envolvimento de PI3K, AKT, mTOR (mTORC1 e mTORC2), AMPK, EGFR, MEK, ERK, PARP, caspases, NFkB, dentre outros, e a ocorrência de morte celular autofágica.

REFERÊNCIAS

ABUSHAHIN, F. et al. Weekly topotecan for recurrent platinum resistant ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 108, n. 1 p. 53–57, 2008.

AGARWALA, S. S.; CASE, S. Everolimus (RAD001) in the treatment of advanced renal cell carcinoma: a review. **The Oncologist**, v. 15, n. 3, p. 236–245, 2010.

AISSAT, N. et al. Antiproliferative effects of rapamycin as a single agent and in combination with carboplatin and paclitaxel in head and neck cancer cell lines. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 62, n. 2, p. 305–313, 2008.

ALBERTS, B. D. S. et al. Cyclophosphamide Versus Cisplatin Plus Cyclophosphamide: Randomized Trial in Stages III and IV Ovarian Cancer. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 10, n. 5, p. 707–717, 1992.

ALJADA A.; MOUSA S. A.; Metformin and neoplasia: implications and indications. **Pharmacology & Therapeutics**, v.133, n.1, p.108-115, 2012.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). Cancer Facts and Figures 2013. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-036845.pdf>>. Acesso em: 15 de Agosto de 2013.

ASHOUR, A. E. et al. Metformin rescues the myocardium from doxorubicin-induced energy starvation and mitochondrial damage in rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 434195, 2012.

BAST Jr., R. C. Molecular approaches to personalizing management of ovarian cancer. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 22, n. 8, p. viii5–viii15, 2011.

BEAUCHAMP, M. C. et al. Targeting insulin and insulin-like growth factor pathways in epithelial ovarian cancer. **Journal of oncology**, v. 2010, p. 1–11, 2010.

BEAVER, J.A; PARK, B.H. The BOLERO-2 trial: the addition of everolimus to exemestane in the treatment of postmenopausal hormone receptor-positive advanced breast cancer. **Future Oncology**, v. 8, n. 6, p. 651-657, 2012.

BEN SAHRA, I. et al. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. **Oncogene**, v. 27, n. 25, p. 3576–3586, 2008.

BEREK, J.; CRUM, C.; FRIEDLANDER, M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 119, n. 2, p. 118–129, 2012.

BOWKER S. L. et al. Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. **Diabetes Care**, v. 29, n.2, p. 254-258, 2006.

BRASIL. Portaria nº 458, de 21 de maio de 2012. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2012/prt0458_21_05_2012.html>. Acesso em: 30 out. 2013.

BRASIL. Resolução normativa nº 338, de 21 de outubro de 2013. Disponível em: <http://www.ans.gov.br/index2.php?option=com_legislacao&view=legislacao&task=TextoLei&format=raw&id=2591>. Acesso em: 30 de out. 2013.

BRISTOW, R. E. et al. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. **Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 20, n. 5, p. 1248–59, 2002.

CARRACEDO, A. et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 9, p. 3065–3074, 2008.

CHANG, S.J.; BRISTOW, R. E.; RYU, H.S. Prognostic significance of systematic lymphadenectomy as part of primary debulking surgery in patients with advanced ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 126, n. 3, p. 381–386, 2012.

CHEN, J. et al. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 11, p. 4947–4951, 1995.

CHIANG, C. T. et al. Combinations of mTORC1 inhibitor RAD001 with gemcitabine and paclitaxel for treating non-Hodgkin lymphoma. **Cancer letters**, v. 298, n. 2, p. 195–203, 2010.

CLARKE-PEARSON, D. L. Screening for Ovarian Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n.2, 2009.

COLOMBO, N. et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 21, n. 5, p. 23–30, 2010.

COURTNEY, K. D.; CORCORAN, R. B.; ENGELMAN, J. A. The PI3K pathway as drug target in human cancer. **Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 6, p. 1075–1083, 2010.

CRAZZOLARA, R. et al. Potentiating effects of RAD001 (Everolimus) on vincristine therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.113, n.14, p.3297-3306, 2009.

CRISTEA, M. et al. Practical considerations in ovarian cancer chemotherapy. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 2, n. 3, p. 175-187, 2010.

CUSI K.; CONSOLI A.; DEFRONZO R. A. Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81, n.11, p. 4059-4067,1996.

DEFRONZO, R. A.; GOODMAN, A. M. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **The New England journal of medicine**, v. 333, n. 9, p. 541–549, 1995.

DOBBIN, Z. C.; LANDEN, C. N. The importance of the PI3K/AKT/MTOR pathway in the progression of ovarian cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 8213–8227, 2013.

DONG, S. et al. Everolimus synergizes with gefitinib in non-small-cell lung cancer cell lines resistant to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 70, n. 5, p. 707-716, 2012.

DU BOIS, A. et al. A Randomized Clinical Trial of Cisplatin/Paclitaxel Versus Carboplatin/Paclitaxel as First-Line Treatment of Ovarian Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 17, p. 1320–1329, 2003.

DUBEAU, L. The cell of origin of ovarian epithelial tumours. **The Lancet Oncology**, v. 9, n. 12, p. 1191–1197, 2008.

ECKSTEIN, N. et al. Hyperactivation of the Insulin-like Growth Factor Receptor I Signaling Pathway Is an Essential Event for Cisplatin Resistance of Ovarian Cancer. **Cancer Research**, v. 69, n. 7, p. 2996–3003, 2009.

EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR and cancer: many loops in one pathway. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 2, p. 169-176, 2010.

ERICES, R. et al. Metformin, at concentrations corresponding to the treatment of diabetes, potentiates the cytotoxic effects of carboplatin in cultures of ovarian cancer cells. **Reproductive sciences**, v.20, n.12, 2013.

EVANS J. M. et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. **BMJ**, v. 330, n. 7503; p. 1304-1305, 2005.

EVANS, J. M. M. et al. Risk of mortality and adverse cardiovascular outcomes in type 2 diabetes: a comparison of patients treated with sulfonylureas and metformin. **Diabetologia**, v. 49, n. 5, p. 930–936, 2006.

FERRANDINA, G. et al. Phase III trial of gemcitabine compared with pegylated liposomal doxorubicin in progressive or recurrent ovarian cancer. **Journal of Clinical Oncology : Official Journal of The American Society of Clinical Oncology**, v. 26, n. 6, p. 890-896, 2008.

FLECHNER, S. M.; KOBASHIGAWA, J.; KLINTMALM, G. Calcineurin inhibitor-sparing regimens in solid organ transplantation: focus on improving renal function and nephrotoxicity. **Clinical Transplantation**, v. 22, n. 1, p. 1–15, 2008.

FOGARTY, S.; HARDIE, D. G. Development of protein kinase activators: AMPK as a target in metabolic disorders and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1804, n. 3, p. 581-591, 2010.

FRIAS, M. A et al. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. **Current biology : CB**, v. 16, n. 18, p. 1865-1870, 2006.

GANLEY, I. G. et al. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 18, p. 12297–12305, 2009.

GESKE, F. J. et al. DNA repair is activated in early stages of p53-induced apoptosis. **Cell death and differentiation**, v. 7, n. 4, p. 393–401, 2000.

GEWIRTZ, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, n. 7, p. 727–741, 1999.

GOTLIEB, W. H. et al. In vitro metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer. **Gynecologic oncology**, v. 110, n. 2, p. 246-250, 2008.

GUBBELS, J. A. et al. The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer. **Journal of ovarian research**, v. 3, n. 8, p.1-11, 2010.

GUERTIN, D. A; SABATINI, D. M. Defining the role of mTOR in cancer. **Cancer cell**, v. 12, n. 1, p. 9-22, 2007.

GUIMARÃES I. S. et al. Conventional Cancer Treatment. In: RANGEL, L. B. A. (Ed.). **Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches**. 1. ed. Rijeka: InTech, 2013. p. 3–36.

GWINN, D. M. et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. **Molecular cell**, v. 30, n. 2, p. 214–226, 2008.

HARA, K. et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 177–189, 2002.

HARASAWA, M. et al. Analysis of mTOR inhibition-involved pathway in ovarian clear cell adenocarcinoma. **Acta histochemica et cytochemica**, v. 44, n. 2, p. 113–8, 2011.

HARITUNIANS, T. et al. Antiproliferative activity of RAD001 (everolimus) as a single agent and combined with other agents in mantle cell lymphoma. **Leukemia**, v. 21, n. 2, p. 333–339, 2007.

HERNÁNDEZ-NEGRETE, I. et al. P-Rex1 links mammalian target of rapamycin signaling to Rac activation and cell migration. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 32, p. 23708–23715, 2007.

HIMMELSTEIN, K. J. et al. Clinical kinetics on intact cisplatin and some related species. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, n. 5, p. 658–664, 1981.

HIRSCH H. A. et al. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. **Cancer Research**, v.69, n.19, p. 7507-7511, 2009.

HUANG, J. et al. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 12, p. 4104-4115, 2008.

HUANG, J. et al. Frequent genetic abnormalities of the PI3K/AKT pathway in primary ovarian cancer predict patient outcome. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 50, n. 8, p. 606–618, 2011.

HUIZING, M. T. et al. Pharmacokinetics of paclitaxel and metabolites in a randomized comparative study in platinum-pretreated ovarian cancer patients. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 11, n. 11, p. 2127–2135, 1993.

IBANEZ, L. et al. Metformin treatment to prevent early puberty in girls with precocious pubarche. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n.8, p. 2888-2891, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil, 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: 15 de Agosto de 2013.

HADAD S. et al. Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: a pre-operative, window-of-opportunity, randomized trial. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 128, n. 3, p. 783-794, 2011.

HUNDAL, R. S. et al. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 49, n. 12, p. 2063–2069, 2000.

JACINTO, E. et a. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. **Nature cell biology**, v. 6, n. 11, p. 1122-1128, 2004.

JANJETOVIC, K. et al. In vitro and in vivo anti-melanoma action of metformin. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, n. 3, p. 373–382, 2011.

JELOVAC, D.; ARMSTRONG, D. Recent Progress in the Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 3, p. 183–203, 2011.

JIRALERSPONG S. et al. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v.27, n.20, p. 3297-3302, 2009.

JORDAN, M. A et al. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 20, p. 9552–6, 15 out. 1993.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 4, p. 253-265, 2004.

KIM, D. H. et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 163-175, 2002.

KLIONSKY, D.J.; CUERVO, A.M.; SEGLEN, P.O. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. **Autophagy**, v. 3, n. 3, p. 181-206, 2007.

KUNZ, J. et al. Target of Rapamycin in Yeast , TOR2 , Is an Essential Phosphatidylinositol Kinase Homolog Required for G1 Progression. **Cell**, v. 73, p. 585–596, 1993.

KURMAN, R.; SHIH, I. The Origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer-a proposed unifying theory. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 34, n. 3, p. 433–443, 2010.

LADISLAU, T. et al. Target Cancer Therapy. In: RANGEL, L. B. A. (Ed.). **Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches**. 1. ed. Rijeka: InTech, 2013. p. 37–63.

LALWANI, N. et al. Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment. **Radiographics**, v. 31, n. 3, p. 625–646, 2011.

LEDERMANN, J. A. et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 24, n. 6, p. vi24–vi32, 2013.

LEVY, T. et al. The significance of the pattern of serum CA125 level ascent to above the normal range in epithelial ovarian, primary peritoneal and tubal carcinoma patients. **Gynecologic Oncology**, v. 129, n. 1, p. 165-168, 2013.

LIU, P. et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway in cancer. **Nature reviews. Drug Discovery**, v. 8, n. 8, p. 627–644, 2009.

LIU, H. et al. Metformin and the mTOR inhibitor everolimus (RAD001) sensitize breast cancer cells to the cytotoxic effect of chemotherapeutic drugs in vitro. **Anticancer research**, v. 32, n. 5, p. 1627–1638, 2012.

MABUCHI, S. et al. RAD001 (Everolimus) delays tumor onset and progression in a transgenic mouse model of ovarian cancer. **Cancer Research**, v. 67, n. 6, p. 2408–2413, 2007a.

MABUCHI, S. et al. RAD001 inhibits human ovarian cancer cell proliferation, enhances cisplatin-induced apoptosis, and prolongs survival in an ovarian cancer model. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 14, p. 4261–4270, 2007b.

MABUCHI, S. et al. mTOR is a promising therapeutic target both in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant clear cell carcinoma of the ovary. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 17, p. 5404–5413, 2009.

MAGALHÃES, J. P. How ageing processes influence cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 5, p. 357-365, 2013.

MARCHESINI, G. et al. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. **Lancet**, v. 358, n. 9285, p. 893–894, 2001.

MARKMAN, M. et al. Phase II trial of weekly paclitaxel (80 mg / m²) in platinum and paclitaxel-resistant ovarian and primary peritoneal cancers : A Gynecologic Oncology Group study. **Gynecologic Oncology**, v. 101, n.3, p. 436–440, 2006.

MCDERMOTT, S. P.; WICHA, M. S. Targeting breast cancer stem cells. **Molecular Oncology**, v. 4, n. 5, p. 404-419, 2010.

MCGUIRE, W. et al. CYCLOPHOSPHAMIDE AND CISPLATIN COMPARED WITH PACLITAXEL AND CISPLATIN IN PATIENTS WITH STAGE III AND STAGE IV OVARIAN CANCER. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 1, p. 1–6, 1996.

MEMMOTT, R. M.; DENNIS, P. A. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 5, p. 656–64, maio 2009.

MENDOZA, M.C; ER, E.E; BLENIS, J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 36, n 6, p. 320-328, 2011.

MOGHETTI, P. et al. Metformin effects on clinical features, endocrine and metabolic profiles, and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled 6-month trial, followed by open, long-term clinical evaluation. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 1, p. 139-146, 2000.

MØRCH, L. S. et al. Hormone therapy and ovarian cancer. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 302, n. 3, p. 298–305, 2009.

MORGAN, R. J. et al. Epithelial Ovarian Cancer. **The Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 9, n. 1, p. 81–113, 2011.

MOTZER, R.J et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. **Lancet**, v. 372, n. 9637, p. 449-456, 2008.

MURUGAN, A. K.; ALZHRANI, A.; XING, M. Mutations in critical domains confer the human mTOR gene strong tumorigenicity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 2, p. 6511–6521, 2013.

NIRAULA S. et al. Metformin in early breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 135, n. 3, p. 821-830, 2012.

NGUYEN, L. et al. Biomarkers for early detection of ovarian cancer. **Women's Health (London, England)**, v. 9, n. 2, p. 171–85, 2013.

NOTTE, A.; LECLERE, L.; MICHIELS, C. Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 5, p. 427–434, 2011.

O'DONNELL, A. et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in patients with advanced solid tumors. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 26, n. 10, p. 1588–1595, 2008.

ORCHARD T. J. et al. The effect of metformin and intensive lifestyle intervention on the metabolic syndrome: the diabetes prevention program randomized trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 142, n. 8, p. 611-619, 2005.

O'REILLY, K. E. et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. **Cancer research**, v. 66, n. 3, p. 1500-1508, 2006.

O'REILLY, T.; MCSHEEHY, P. Biomarker development for the clinical activity of the mTOR inhibitor everolimus (RAD001): processes, limitations, and further proposals. **Translational oncology**, v. 3, n. 2, p. 65–79, 2010.

OH, W. J. et al. mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. **The EMBO journal**, v. 29, n. 23, p. 3939–3951, 2010.

OZOLS, R. F. et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 21, n. 17, p. 3194–3200, 2003.

PAES, M. F. et al. A retrospective analysis of clinicopathological and prognostic characteristics of ovarian tumors in the State of Espírito Santo, Brazil. **Journal of ovarian research**, v. 4, p. 14, 2011.

PANICI, P. B. et al. Systematic aortic and pelvic lymphadenectomy versus resection of bulky nodes only in optimally debulked advanced ovarian cancer: a randomized clinical trial. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 8, p. 560–566, 2005.

PERACCHIO, C. et al. Involvement of autophagy in ovarian cancer: a working hypothesis. **Journal of ovarian research**, v. 5, n. 1, p. 22, 2012.

PETERSON, T. R. et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. **Cell**, v. 137, n. 5, p. 873-886, 2009.

PICCART, M. J. et al. Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 9, p. 699–708, 2000.

PIGNATA, S. et al. Chemotherapy in epithelial ovarian cancer. **Cancer Letters**, v. 303, n. 1, p. 73-83, 2011.

PINTO, A.; LIPPARD, S. Sequence-dependent termination of in vitro DNA synthesis by cis- and trans-diamminedichloroplatinum (II). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. July, p. 4616–4619, 1985.

POLLAK, M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. **Nature Reviews. Cancer**, v. 12, n. 3, p. 159–169, 2012.

PORSTMANN, T. et al. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. **Cell metabolism**, v. 8, n. 3, p. 224–36, 2008.

PRZYBYCIN, C. G. et al. Are all pelvic (nonuterine) serous carcinomas of tubal origin? **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 34, n. 10, p. 1407–1416, out. 2010.

RATTAN, R. et al. Metformin suppresses ovarian cancer growth and metastasis with enhancement of cisplatin cytotoxicity in vivo. **Neoplasia**, v. 13, n. 5, p. 483–491, 2011a.

RATTAN, R. et al. Metformin attenuates ovarian cancer cell growth in an AMP-kinase dispensable manner. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 1, p. 166–178, 2011b.

RATTAN, R.; ALI FEHMI, R.; MUNKARAH, A. Metformin: an emerging new therapeutic option for targeting cancer stem cells and metastasis. **Journal of Oncology**, v. 2012, p. 928127, 2012.

RAUH-HAIN, J. A. et al. Platinum resistance after neoadjuvant chemotherapy compared to primary surgery in patients with advanced epithelial ovarian carcinoma. **Gynecologic Oncology**, v. 129, n. 1, p. 63-68, 2013.

ROMERO, I.; BAST Jr, R. C. Human ovarian cancer: biology, current management, and paths to personalizing therapy. **Endocrinology**, v. 153, n. 4, p. 1593–602, 2012.

ROSICH, L. et al. Counteracting autophagy overcomes resistance to everolimus in mantle cell lymphoma. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n.19, p.5278-5289, 2012.

ROSSING, M. A. et al. Predictive Value of Symptoms for Early Detection of Ovarian Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n. 4, p. 222- 229, 2010.

SABATINI, D. M. et al. RAFTI: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. **Cell**, v. 78, n. 1, p. 35–43, 1994.

SACI, A.; CANTLEY, L. C.; CARPENTER, C. L. Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size. **Molecular Cell**, v. 42, n. 1, p. 50–61, 2011.

SANCAK, Y. et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. **Molecular Cell**, v. 25, n. 6, p. 903–915, 2007.

SARBASSOV, D. D. et al. Rictor , a Novel Binding Partner of mTOR , Defines a Rapamycin-Insensitive and Raptor-Independent Pathway that Regulates the Cytoskeleton. **Current biology : CB**, v. 14, p. 1296–1302, 2004.

SARBASSOV, D. D. et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, v. 307, n. 5712, p. 1098–1101, 2005.

SARBASSOV, D.D. et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. **Molecular Cell**, v. 22, n. 2, p. 159-168, 2006.

SHANK, J.J, et al. Metformin targets ovarian cancer stem cells in vitro and in vivo. **Gynecologic Oncology**, v. 127, n. 2, p.390-397, 2012.

SCHIEKE, S. M. et al. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 37, p. 27643-27652, 2006.

SCHMELZLE, T.; HALL, M. N. TOR, a central controller of cell growth. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 253–262, 2000.

SHAFER, A. et al. Rapamycin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells through inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 5, p. 1144–1154, 2010.

SHAW, R. J. et al. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3329–35, 2004.

SHERMAN-BAUST, C. A et al. Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. **Cancer cell**, v. 3, n. 4, p. 377–386, 2003.

STAMBOLIC V. et al. Utility of metformin in breast cancer treatment, is neoangiogenesis a risk factor? **Breast Cancer Research And Treatment**, v. 114, n. 2, 2009.

STEELMAN, L. S. et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. **Aging**, v. 3, n. 3, p. 192–222, 2011.

STRACK, T. Metformin: a review. **Drugs Today**. v. 44, p. 303-314, 2008.

THORN, C. F. et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 21, n. 7, p. 440–446, 2011.

TSENG, H. W.; LI, W. T.; HSIEH, J.F. Targeted agents for the treatment of melanoma: an overview. In: Davids, M. (Ed.). **Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma**. 1. ed. Rijeka: InTech, 2013. p. 231–251.

U.S. National Institute of Health. Clinical Trials.gov. Disponível em: <<http://clinicaltrials.gov/ct2/search>>. Acesso em: 10 set. 2013.

UZUNOGLU, S. et al. Assessment of CA-125 area under the curve as a prognostic factor in patients with ovarian cancer. **Medical oncology**, v. 30, n. 1, p. 447-452, 2013.

VAUGHAN, S. et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 10, p. 719–725, 2011.

VERGOTE, I. et al. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 10, p. 943–953, 2010.

VERMES I. et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v.184, n. 1, p.39–51, 1995.

WANG, J. et al. A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin 1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 32, p. 21412–21424, 2009.

WIEGAND, K. et al. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 16, p. 1532–1543, 2010.

WILLEMS, L. et al. PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies. **Current Oncology Reports**, v. 14, n. 2, p. 129–138, 2012.

WOODS, A. et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. **Cell Metabolism**, v. 2, n. 1, p. 21–33, 2005.

WU, B. et al. Metformin inhibits the development and metastasis of ovarian cancer. **Oncology Reports**, v. 28, n. 3, p. 903–908, set. 2012.

YAMAMOTO, S. et al. PIK3CA mutation is an early event in the development of endometriosis-associated ovarian clear cell adenocarcinoma. **The Journal of Pathology**, v. 225, n. 2, p. 189–194, 2011.

YASMEEN, A. et al. Induction of apoptosis by metformin in epithelial ovarian cancer: involvement of the Bcl-2 family proteins. **Gynecologic Oncology**, v. 121, n. 3, p. 492–498, 2011.

ZAKIKHANI, M. et al. Metformin and rapamycin have distinct effects on the AKT pathway and proliferation in breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 123, n. 1, p. 271–279, 2010.

ZAYTSEVA, Y. Y. et al. mTOR inhibitors in cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 319, n. 1, p. 1–7, 2012.

ZENG, Z. et al. Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. **Blood**, v.109, n. 8, p.3509 - 3512. 2007.

ZHANG, X. et al. Effects of the combination of RAD001 and docetaxel on breast cancer stem cells. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 10, p. 1581–1592, jul. 2012.

ZHOU, H.; HUANG, S. mTOR signaling in cancer cell motility and tumor metastasis. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 20, n. 1, p. 1–16, 2010.

ZHUANG, Y.; MISKIMINS, W. K. Cell cycle arrest in Metformin treated breast cancer cells involves activation of AMPK, downregulation of cyclin D1, and requires p27Kip1 or p21Cip1. **Journal of molecular signaling**, v. 3, p. 18, 2008.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 1, p. 21–35, 2011.