



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **Terapêutica dirigida a vias moleculares no Carcinoma Hepatocelular – Importância do inibidor do mTOR, da farnesiltransferase e do proteasoma**

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro, Doutora Sílvia Neves e da Professora Doutora Carmen Alpoim (Universidade de Coimbra)

---

Mafalda Maria Duarte da Cunha Martins Dinis

2013





## **IV | Terapêutica dirigida a vias moleculares no Carcinoma Hepatocelular – Importância do inibidor do mTOR, da farnesiltransferase e do proteasoma**

---

## **Agradecimentos**

**VI | Terapêutica dirigida a vias moleculares no Carcinoma Hepatocelular –  
Importância do inibidor do mTOR, da farnesiltransferase e do proteasoma**

---

Apesar de ser um trabalho de realização individual não queria deixar de agradecer àqueles que sempre me ajudaram directa ou indirectamente, na sua realização. Por isso agradeço:

À Professora Doutora Ana Bela Sarmento, pela sua orientação, disponibilidade, atenção, pelo grande exemplo que é na dedicação à investigação e em especial pela confiança!

À Professora Doutora Carmen Alpoim pela sua disponibilidade e pelo gosto que demonstra no trabalho que desempenha.

À Doutora Sílvia Neves, pela sua disponibilidade, pela transmissão de conhecimentos, pela ajuda prestada, mesmo longe fisicamente, e pela sua dedicação desde o início da realização deste projecto.

À Mestre Cristina Gonçalves e à Mestre Raquel Alves, pela sua disponibilidade, apoio e ensinamentos tão importantes na realização deste projecto.

Ao laboratório de Biologia Molecular Aplicada da Faculdade de Medicina da UC, a todos os seus investigadores e colaboradores, um obrigada pela ajuda prestada em cada momento.

Ao Professor Doutor Manuel Santos Rosa, director do serviço de Imunologia (FMUC), e à Dra. Vera Alves, pela disponibilidade e apoio na realização deste trabalho.

Ao Francisco, por todo o apoio e carinho, que me dedicou. E me ter mostrado o que é coragem.

À Cátia, por ter estado sempre presente e me ter apoiado nos momentos de adversidade. Obrigada por seres quem és, amiga!

À Lili, à Ana Rosa, à Cindy e à Rita, obrigada por todos estes anos tornarem cada momento difícil num sorriso acompanhado das palavras: “nós conseguimos!”.

A todos aqueles amigos que não estão aqui referidos de uma forma directa, o meu muito obrigada por serem o que de mais especial existe.

À minha mãe, pelo seu carinho e apoio incondicional, e me ter mostrado, que com empenho e dedicação, conseguimos alcançar os nossos objectivos e sonhos. Obrigada mãe!

À minha mana, Ana Catarina, por me ter ajudado sempre que necessitei e me ter tentado animar, mesmo quando não estava receptiva ao seu apoio e amizade. Adoro-te!

Aos meus manos, Frederico e Gustavo, pela alegria que sempre me transmitiram. Adoro-vos!

Ao Gonçalo, o meu muito obrigada por teres estado lá quando precisei.

Ao meu pai, pelos seus conselhos construtivos e apoio.

Aos meus avós, Céu e Octávio, por terem sido o grande apoio de toda a minha vida, nunca me desiludiram e guiaram-me, de forma sábia, nas várias etapas da minha vida. Por todo o carinho que me envolveram desde que nasci, bem-hajam!

À minha tia Tezá e Tio Miguel, a dupla fantástica, que sempre me “aturaram” e ajudaram com todo o seu empenho e boa disposição. Para além, de todo o carinho e disponibilidade para mim. Obrigada por tudo, tios e primos!

Para a minha restante família, o meu muito obrigada, pelo seu amor e carinho.

## **Resumo/Abstract**

**X| Terapêutica dirigida a vias moleculares no Carcinoma Hepatocelular – Importância do inibidor do mTOR, da farnesiltransferase e do proteasoma**

---

## Resumo

O Carcinoma Hepatocelular (CHC) representa um conjunto de doenças biológica e clinicamente heterogêneas, com uma elevada incidência global associada a mau prognóstico. Apesar da sua incidência, existe apenas um número limitado de opções terapêuticas, muitas das quais com um benefício clínico mínimo, visto que é frequentemente diagnosticado em estádios avançados da doença e é altamente resistente aos agentes quimioterapêuticos existentes, para além de raramente ser sensível à radioterapia. De facto, avanços na compreensão da biologia do tumor abriram novos caminhos para a prevenção e tratamento do CHC, através do desenvolvimento de terapias dirigidas. O desenvolvimento de fármacos que regulem vias relacionadas com o cancro, tais como a inibição das vias de proliferação tais como as vias *rat sarcoma/mitogen activated protein kinase* (RAS/MAPK) e fosfatidilinositol-3-cinase/*protein kinase B/mammalian target of rapamycin* (PI3K/AKT/mTOR), ou a activação da apoptose, são essenciais para o alargamento dos horizontes no tratamento do CHC.

Esta necessidade de encontrar opções terapêuticas seguras e eficientes, levou-nos desenvolver um estudo em que se avaliou o potencial terapêutico de alguns fármacos dirigidos a vias moleculares, especificamente inibidores do mTOR (Everolimus), da farnesiltransferase (L-744,832) e do proteasoma (MG-262) quer em monoterapia, quer em combinação entre si ou com a terapia convencional, em células de Carcinoma Hepatocelular. Avaliamos ainda alguns dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade e/ou na sensibilidade das células a estes fármacos.

Para tal, as células HepG2 foram incubadas com concentrações crescentes de Everolimus, L-744,832 e MG-262 em monoterapia e em associação entre si ou com terapia convencional, Doxorubicina e 5-Fluorouracilo, durante diferentes intervalos de tempo. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste do *Alamar Blue* e o tipo de morte por microscopia óptica e citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação com anexina V (AV) e iodeto de propídeo (IP), bem como pela expressão da proteína relacionada com a morte celular, a proteína BAX, utilizando um anticorpo anti-BAX.

Uma vez, que a acção dos fármacos também pode estar relacionada com a sua capacidade anti-proliferativa ou seja de induzir um bloqueio no ciclo celular, também se analisou o ciclo celular e a expressão da ciclina D1 por citometria de fluxo,

## **XII | Terapêutica dirigida a vias moleculares no Carcinoma Hepatocelular – Importância do inibidor do mTOR, da farnesiltransferase e do proteasoma**

---

recorrendo à marcação com iodeto de propídeo e RNase, e anticorpo anti-ciclina D1, respectivamente. Os mecanismos envolvidos na acção dos fármacos, nomeadamente, a expressão de laminas A/C, de conjugados de ubiquitina e de NF- $\kappa$ B, também foram analisados por citometria de fluxo recorrendo a anticorpos monoclonais.

Assim, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os fármacos em estudo induzem diminuição na proliferação e viabilidade celular de forma dependente da dose e do tempo de exposição. O IC50, às 48h, é atingido pelo Everolimus na concentração de 10 $\mu$ M, para o L-744,832 a 50  $\mu$ M e para o MG-262 a 25nM.

Além disso, o fármaco Everolimus e o MG-262 induzem morte celular maioritariamente por apoptose, em monoterapia. No entanto a combinação do Everolimus ou do MG-262 com terapia convencional, Doxorrubicina ou 5-FU, não demonstrou um aumento no efeito citotóxico. Pelo contrário, o L-744,832 não induz efeito citotóxico em monoterapia, apesar de a sua associação com o 5-FU, induzir morte celular por apoptose.

Para além da combinação com a terapia convencional, também se avaliou as combinações entre os fármacos dirigidos a alvos moleculares, sendo que a única associação, entre os fármacos dirigidos a alvos moleculares, que efetivamente, tem a capacidade de aumentar o efeito citotóxico, em relação os fármacos em monoterapia, é a do L-744,832 com o MG-262, aumentando a apoptose.

Assim, o principal mecanismo de morte envolvido na acção destes fármacos é a apoptose, confirmada por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação AV/PI e análise morfológica, o que pode estar relacionado com o aumento BAX.

Os efeitos citostáticos do Everolimus, L-744,832 e MG-262 são mediados por um bloqueio do ciclo celular, em G1 para o Everolimus e em G2 para o L-744,832 e MG-262. Contrariamente, ao esperado a expressão de ciclina D1 não se relacionava corretamente com alguns dos resultados obtidos no ciclo celular, sendo necessário um estudo mais aprofundado. Para expressão das laminas e do NF- $\kappa$ B, não se obteve os resultados esperados, no entanto, parece que o aumento da expressão das laminas pode estar associado à concentração do fármaco L-744,832 e o aumento do NF- $\kappa$ B pode ser explicado por um mecanismo independente do proteasoma e da activação do

I $\kappa$ B. Os conjugados de ubiquitina aumentaram, como era esperado, mostrando a inibição do proteasoma

Em suma, podemos concluir que os fármacos dirigidos a alvos moleculares utilizados neste estudo, o inibidor do mTOR (Everolimus), da farnesiltransferase (L-744,832) e do proteasoma (MG-262), podem constituir uma nova abordagem terapêutica promissora no Carcinoma Hepatocelular, quer em monoterapia para o Everolimus e MG-262, quer em combinação com a Doxorrubicina para o Everolimus, L-744,832 e MG-262, para além destas, a combinação do L-744,832 com o MG-262.

**Palavras-chave:**

- Carcinoma Hepatocelular
- Terapia dirigida a alvos moleculares
- Inibidor do mTOR
- Inibidor da farnesiltransferase
- Inibidor do proteasoma

## ***Abstract***

Hepatocellular carcinoma (HCC) represents a biologically and clinically heterogeneous group of diseases, with a high worldwide incidence and associated with a poor prognosis. Despite its significance, there are only limited therapeutic options, many with negligible clinical benefit, since it is often diagnosed at an advanced stages and it is highly resistant to currently available chemotherapeutic agents, being also rarely amenable to radiotherapy. In fact, advances in the understanding of tumor biology open new paths for the prevention and treatment of HCC through the development of targeted therapies. The design of drugs that regulate cancer-related pathways, such as the inhibition of proliferation pathways *rat sarcoma/mitogen activated protein kinase* (RAS/MAPK) e phosphatidylinositide 3-kinases /*protein kinase B/mammalian target of rapamycin* (PI3K/AKT/mTOR), or activation of apoptosis pathways are essential to the opening of new horizons in the HCC treatment.

The need to find safe and efficient therapeutic options, led us to develop a study to evaluate the therapeutic potential of some molecular pathways targeting drugs, specifically mTOR (Everolimus), farnesyltransferase (L-744,832) and proteasome inhibitors (MG-262) in monotherapy or in combination between themselves or with conventional therapy, in a HCC cell line. We also evaluated some mechanisms involved in cytotoxicity and cell sensibility to these drugs.

For this purpose, HepG2 cells were incubated in monotherapy with rising concentrations of Everolimus, L-744,832 e MG-262 and in association between themselves or conventional therapy, Doxorubicin and 5- Fluorouracil, during different times. Cellular viability was assessed by *Alamar Blue* test and the type of cell death by optical microscopy (*May-Grünwald* stain) and flow cytometry using annexin V (AV) and propidium iodide (PI), as well as death related proteins, BAX, expression using an anti-BAX antibody. Once, these drugs can also be related to their capacity to induce an arrest in cellular proliferation, we analyzed cell cycle and cyclin D1 expression by flow cytometry using propidium iodide staining and anti-cyclin D1 antibody, respectively. The mechanisms involved in these drug's actions, namely, lamin A/C expression, ubiquitin conjugates and NF- $\kappa$ B expression, was also analyzed by flow cytometry using monoclonal antibodies.

The results obtained in this work, showed that the drugs used in this study induce a reduction in cell viability in a dose and time of exposure manner. IC<sub>50</sub>, at 48 hours, was obtained for Everolimus at a concentration of 10  $\mu$ M, for L-744,832 at 50  $\mu$ M and for MG-262 at 25nM.

Furthermore, Everolimus and MG-262 induces cell death mainly by apoptosis, in monotherapy. Although, Everolimus or MG-262 associated with conventional therapy, Doxorubicin and 5- Fluorouracil (5-FU), did not show an increase in cytotoxic effect

Cell death induced by this drugs occurs mainly by apoptosis for Everolimus and MG-262 in monotherapy and some combinations, although for L-744,832 in monotherapy did not show an increase in cell death, but in association, it is capable of inducing a cytotoxic effect, in comparison with the effect of the drugs in monotherapy. On the other hand, L-744,832 did not show a cytotoxic effect in monotherapy, even though its association with 5-FU, induces cell death by apoptosis.

Beside the combination with conventional therapy, we also evaluated the combination between the molecular targeted drugs, and we observed that the only association, among molecular targeted drugs, with ability to increase cytotoxic effect, in comparison with the effect of the drugs in monotherapy, is L-744,832 with MG-262.

So, the main mechanism of cell death involved in this drugs action, confirmed by flow cytometry, using AV/IP staining e morphological analyses, which may be related to an increase in BAX expression.

Cytostatic effects of Everolimus, L-744,832 e MG-262 are mediated by a cell cycle arrest, in which we observed an accumulation of cells in G1 phase for Everolimus and G2 phase for L-744,832 e MG-262.

Contrary to the expected, cyclin D1 expression did not relate correctly with some results obtained in cell cycle analysis, requiring further study. For the expression of lamins and NF- $\kappa$ B, we did not obtain the expected results, however, it seems that the increase in lamins expression may be related to L-744,832 concentration and NF- $\kappa$ B expression increase may be explained by an independent mechanism of I $\kappa$ B activation. Ubiquitin conjugates increase as expected, showing an inhibition of proteasome.

In sum, we can conclude that the molecular targeted drugs used in this study, mTOR inhibitor (Everolimus), farnesyltransferase inhibitor (L-744,832) and proteasome

## **XVI | Terapêutica dirigida a vias moleculares no Carcinoma Hepatocelular – Importância do inibidor do mTOR, da farnesiltransferase e do proteasoma**

---

inhibitor (MG-262), may be a new promising therapeutic approach in Hepatocellular Carcinoma, either in monotherapy for Everolimus and MG-262 or in combination with Doxorubicin for Everolimus, L-744,832 and MG-262, and, in addition to these, the combination of L-744,832 with MG-262.

### **Key-words:**

- Hepatocellular Carcinoma
- Molecular targeted therapy
- mTOR inhibitor
- Farnesyltransferase inhibitor
- Proteasome inhibitor

## Índice

**XVIII | Terapêutica dirigida a vias moleculares no Carcinoma Hepatocelular –  
Importância do inibidor do mTOR, da farnesiltransferase e do proteasoma**

---

## Índice

Agradecimentos.....	V
Resumo .....	XI
<i>Abstract</i> .....	XIV
Capítulo 1. Introdução .....	1
1.1 Carcinoma Hepatocelular .....	3
1.2 Epidemiologia e Etiologia do Carcinoma Hepatocelular .....	3
1.3 Hepatocarcinogénese .....	5
1.3.1- Hepatocarcinogénese induzida por vírus .....	5
1.3.1.1-Vírus da Hepatite B.....	5
1.3.1.2.- Vírus da Hepatite C.....	7
1.3.2- Hepatocarcinogénese induzida por consumo crónico de álcool.....	9
1.4 Progressão Histopatológica do Carcinoma Hepatocelular .....	10
1.5 Vias de sinalização intracelular.....	11
1.5.1- Via de sinalização WNT/ $\beta$ -catenina .....	11
1.5.2- Via de sinalização EGF/EGFR.....	14
1.5.3- Via de sinalização IGF/IGFR.....	14
1.5.4- Via de sinalização RAS/MAPK .....	16
1.5.5- Via de sinalização PI3K/AKT/mTOR.....	17
1.5.6- Vias de sinalização VEGF/VEGFR, FGF/FGFR e PDGF/PDFGR .....	17
1.5.7- Proteína supressora tumoral p53 .....	18
1.5.8 - Via do NF- $\kappa$ B.....	19
1.6 Estadiamento do Carcinoma Hepatocelular.....	19
1.7 Tratamento do Carcinoma Hepatocelular.....	21
1.7.1- Tratamentos Curativos.....	21
1.7.1.1.- Ressecção hepática .....	21
1.7.1.2- Transplante hepático.....	21
1.7.1.3- Ablação local .....	22
1.7.2- Tratamentos Não-Curativos.....	23
1.7.2.1.- Quimioembolização Transarterial.....	23
1.7.2.1.- Sorafenib .....	24
1.8 - Outras terapias dirigidas a alvos moleculares.....	24
1.8.1-Inibidores do mTOR .....	25
1.8.2- Inibidores da farnesiltransferase .....	25
1.8.3- Inibidores do proteasoma.....	26

**XX | Terapêutica dirigida a vias moleculares no Carcinoma Hepatocelular –  
Importância do inibidor do mTOR, da farnesiltransferase e do proteasoma**

---

1.9 - Objectivos .....	27
Capítulo 2. Materiais e Métodos .....	29
2.1 Linha celulares .....	31
2.2.1- Propagação e Manutenção das linhas celulares .....	31
2.3 - Análise da viabilidade e proliferação celular .....	31
2.4 - Citometria de fluxo .....	33
2.4.1 - Análise da morte celular por dupla marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo .....	33
2.4.2-Análise de mecanismos envolvidos na citotoxicidade induzida pelos fármacos ..	35
2.4.2.1- Análise da expressão de BAX .....	35
2.4.2.2- Análise da expressão de Ciclina D1 .....	36
2.4.2.3- Análise da expressão de laminas.....	36
2.4.2.4- Análise da expressão conjugados de ubiquitina .....	37
2.4.2.5- Expressão de NF-kB .....	37
2.4.3- Análise do Ciclo Celular .....	37
2.5 - Análise Morfológica das células .....	38
2.6 - Análise estatística .....	39
Capítulo 3. Resultados .....	41
3.1- Avaliação do potencial terapêutico dos fármacos: curvas dose-resposta.....	43
3.1.1 - Avaliação do potencial terapêutico dos fármacos utilizados em monoterapia. .....	43
3.1.1.1 - Curvas dose-resposta da Doxorrubicina e 5-Fluoruracilo em monoterapia em células HepG2.....	43
3.1.1.2 - Curvas dose-resposta do Everolimus, L-744,832 e MG-262, em monoterapia.....	45
3.1.2 - Avaliação do potencial terapêutico dos fármacos dirigidos a alvos moleculares em combinação com fármacos convencionais ou entre si.....	48
3.2- Avaliação dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade.....	53
3.2.1- Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação de Anexina V/Iodeto de propídeo.....	54
3.2.2- Avaliação da expressão de BAX por citometria de fluxo.....	56
3.2.3- Avaliação da morte celular por microscopia óptica .....	57
3.3- Avaliação do efeito antiproliferativo dos fármacos.....	59
3.3.1- Análise do ciclo celular.....	59
3.3.2- Avaliação da expressão de Ciclina D1 .....	62
3.4- Avaliação da expressão de laminas, conjugados de ubiquitina e de NF-kB por citometria de fluxo .....	63

---

3.4.1- Avaliação da expressão de laminas .....	64
3.4.2- Avaliação de marcadores de inibição do proteasoma.....	65
3.4.2.2-Avaliação da expressão de conjugados de ubiquitina .....	65
3.4.2.3-Avaliação da expressão do NF-kB .....	66
Capítulo 4. Discussão .....	69
Capítulo 5. Conclusão .....	83
Capítulo 6. Referências Bibliográficas .....	87



## Índice Figuras

<b>Figura 1-</b> Variações regionais nas taxas de mortalidade do CHC categorizadas por taxas de mortalidade ajustadas à idade. ....	3
<b>Figura 2-</b> Progressão das alterações histopatológicas e características moleculares do CHC. ....	10
<b>Figura 3-</b> Esquema simplificado da via de sinalização canónica da WNT/ $\beta$ -catenina.....	13
<b>Figura 4-</b> Representação esquemática das vias de sinalização PI3K/PTEN/AKT/mTOR e RAS/MAPK após estimulação do receptor de tirosina cinase por um factor de crescimento. ....	15
<b>Figura 5-</b> Sistema de estadiamento BCLC e estratégia terapêutica do CHC (adaptado de EASL-EORTC practice guideline, 2012).....	20
<b>Figura 6</b> – Dot plot representativo da análise da viabilidade e morte celular por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação das células com Anexina V e Iodeto de propídeo (IP).....	34
<b>Figura 7</b> - Efeito da Doxorrubicina na viabilidade das células HepG2.....	44
<b>Figura 8-</b> Efeito do 5- FU na viabilidade das células HepG2.....	45
<b>Figura 9-</b> Avaliação da viabilidade celular após incubação das células HepG2 com Everolimus.....	46
<b>Figura 10-</b> Efeito do L-744,832 na viabilidade das células HepG2 .....	47
<b>Figura 11-</b> Efeito do MG-262 na viabilidade das células HepG2.....	48
<b>Figura 12-</b> Efeito da combinação de Everolimus com Doxorrubicina e 5-FU na viabilidade celular das células HepG2.....	49
<b>Figura 13-</b> Efeito da combinação de L-744,832 com Doxorrubicina e 5-FU na viabilidade das células HepG2.....	50
<b>Figura 14-</b> Efeito da combinação deMG-262 com Doxorrubicina e 5-FU na viabilidade das células HepG2.....	51
<b>Figura 15-</b> Efeito da combinação dos três fármacos em estudo, na viabilidade das células HepG2.....	53
<b>Figura 16-</b> Avaliação do tipo de morte celular induzida pelos fármacos Everolimus, L-744,832, MG-262, Doxorrubicina e 5-FU em monoterapia, por citometria de fluxo.....	54

<b>Figura 17-</b> Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo recorrendo á dupla marcação AV/PI.....	55
<b>Figura 18-</b> Avaliação da expressão de BAX por citometria de fluxo.....	57
<b>Figura 19-</b> Análise do tipo de morte celular por microscopia óptica.....	58
<b>Figura 20-</b> Imagens obtidas para a análise do ciclo celular por citometria de fluxo.....	60
<b>Figura 21-</b> Avaliação da expressão de ciclina D1 nas células HepG2 por citometria de fluxo.....	63
<b>Figura 22-</b> Avaliação da expressão de laminas, nas células HepG2, incubadas com o inibidor da farnesiltransferase (L-744,832), em monoterapia, e em combinação com Doxorrubicina e 5-FU.....	64
<b>Figura 23-</b> Avaliação da expressão dos conjugados de ubiquitina por citometria de fluxo, nas células HepG2, incubadas com o fármaco MG-262, em monoterapia e em terapia combinada.....	65
<b>Figura 24-</b> Avaliação da expressão de NF-kB fosforilado, nas células HepG2, incubadas com o fármaco MG-262, em monoterapia e em terapia combinada.....	66





## **Lista de Abreviaturas**



**4E-BP1**, *eukariotic initiation factor 4E-binding protein 1*

**5-FU**, 5-Fluorouracilo

**A549**, *linha celular de cancro do pulmão*

**AASLD**, *American Association for study of liver diseases*

**ADN**, ácido desoxirribonucleico

**AFB1**, Aflatoxina B1

**AKT**, *protein kinase B*

**APAF-1**, *apoptosis protease activating factor 1*

**APC**, *adematous lipoprotein-related protein*

**ARF**, ablação por radiofrequência

**ARN**, ácido ribonucleic

**ATP**, trifosfato de adenosina

**AV**, anexina V

**BAK**, *BCL-2 antagonist/killer 1*

**BAX**, *BCL-2 associated X protein*

**BCL-2**, *B cell lymphoma-2*

**BCLC**- *Barcelona clicic liver cancer*

**BCL-XL**, *B-cell lymphoma extra large*

**BID**, *BH3-interacting domain death agonist*

**BRAF**, *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

**CDK**, cinase dependente de ciclina

**CENP-E**, *centromere associated proteins E*

**CENP-F**, *centromere associated proteins F*

**CHC**, Carcinoma Hepatocelular

**c-JUN**, *celular Ja-Nana*

**CK1**, cinase caseína 1

**c-KIT**, proto-oncogene que é um homólogo celular de *feline sarcoma viral oncogene v-kit*

**c-MYC**, *celular myelocytomatosis viral oncogene homolog*

**CREB**, *cAMP response element-binding protein*

**DIABLO**- *direct IAP binding protein with low pI*

**DMEM**, *Dulbecco's minimal essential medium*

**CTL**, controlo

**Doxo**, Doxorubicina

**Dvl**, disheveled

**EASL**, *European Association for study of liver* (EASL)

**EGF**, *epidermal growth factor*

**EGFR**, *epidermal growth factor receptor*

**ELK-1**, *E-262-like protein 1*

**ERAF**, *alpha-hemoglobin-stabilizing protein*

**ERK**, *extracellular signal-regulated kinase*

**ERK1**, *extracellular signal-regulated kinase 1*

**ERK2**, *extracellular signal-regulated kinase 2*

**Eve**, Everolimus,

**FAK**, *Focal Adhesion Kinase*

**FC**, factores de crescimento

**FDA**, *Food and Drug Administration*

**FBS**, soro bovino fetal

**FGF**- *fibroblast growth factor*

**FITC**, isocianato de fluoresceína

**FOS**, proto-oncogene

**FSC**, *forward scatter*

**FT**, farnesil-transferase

**FTL-3**, *FMS-like tyrosine kinase 3*

**FZD**, receptors *Frizzled*

**GATA-1**, *globin transcription factor 1*

**GSK-3 $\beta$** , cinase sintetase de glicogénio 3 $\beta$

**GTP**, trifosfato de guanosina

**h**, horas

**HBx**, proteína codificada pelo gene X do vírus da Hepatite B

**HepG2**, linha celular de Carcinoma Hepatocelular

**HGF**, *hepatocyte growth factor*

**HIF- $\alpha$** , *Hypoxia-inducible factors gamma*

**hTERT**, *telomerase reverse transcription*

**HUH-7**, linha celular de Carcinoma Hepatocelular

**IAP**, *inhibitor of apoptosis protein*

**IC50**, concentração à qual um composto o«possui a capacidade de reduzir a viabilidade celular para 50%.

**IFN $\gamma$** , interferão gamma

**IFT**, inibidores da farnesil-transferase

**IGF**, *insulin growth factor*

**IGF-1R**, receptor IGF do tipo 1

**IGFR**, *insulin growth factor receptor*

**IGF $\alpha$** , *insulin growth factor alpha*

**IKB $\alpha$** , inibidor do NF- $\kappa$ B alpha

**IkB**, inibidor do NF- $\kappa$ B

**IKK**- cinase I $\kappa$ B

**IL1**, interleucina 1

**IL6**, interleucina 6

**IP**, inibidores do proteossoma

**IP**, iodeto de propídeo

**IPE**, injeção percutânea de etanol

**JAK**, *just another kinase*

**JNK**, cinase c-JUN terminal

**L-744**, L-744,832

**LEF**, *lymphoid enhancer factor*

**MAPK**, *mitogen activated protein kinase*

**MAPK1**, *mitogen activated protein kinase 1*

**mARN**, ARN mensageiro

**MCL-1**, *myeloid cell leukemia sequence 1*

**MEK1**, *MAP kinase extracellular signal-regulated kinase 1*

**MEK2**, *MAP kinase extracellular signal-regulated kinase 2*

**MIF**, média de intensidade de fluorescência

**MG**, MG-262

**MRP**, *multi-resistência a fármacos*

**mTOR**, *mammalian target of rapamycin*

**NF- $\kappa$ B**, nuclear factor-Kappa B

**NORE1A**, *RAS-effector 1A*

**NS3**, *non structural protein 3*

**NS4B**, *non structural protein 4B*

**NS5A**, *non structural protein 5A*

**p53**, proteína envolvida na progressão do ciclo celular

**P70<sup>S6</sup>**, *40S ribosomal protein kinase*

**PBS**, tampão fosfato

**PDGF**, *platelet derived growth factor*

**PDGFR $\beta$** , *platelet derived growth factor receptor  $\beta$*

**PDGF $\beta$** , *platelet derived growth factor  $\beta$*

**PDK**, cinase dependente de fosfatidilinosídeos

**PE**, ficoeritrina

**PI3K**, fosfatidilinositol-3-cinase

**PIP2**, 4,5-bifosfato-fosfatidil de inositol

**PIP3**, 3,4,4-trifosfato-fosfatidil de inositol

**PKB**, *protein kinase B*

**PKC**, *protein kinase C*

**PKC**, proteína cinase C

**pRb**, proteína do retinoblastoma

**PT**, proteína terminal

**PTEN**, gene supressor tumoral

**RAF**, *RAS function*

**RAS**, *rat sarcoma*

**RASSF1A**, *associated domain family 1A*

**RE**, retículo endoplasmático

**RHOB**, RAS homolog family member B

**RKIP**, Raf kinase inhibitor protein

**ROS**, espécies reactivas de oxigénio

**siARN**, pequenos ARN de interferência ( do inglês, *small interference RNA*)

**SMAC**, *second mitochondria-derived activator of caspase*

**SPRED**, *Sprouty-related protein with EVH-1 domain*

**Src**, família de tirosinas cinase

**SH2**, *Src-homology 2*

**SOS**, *son of sevenless*

**SREBP**, *sterol regulatory element binding protein*

**SSC**, *side scatter*

**STAT 1**, *signal transducers and activators protein 1*

**STAT**, *signal transducers and activators*

**STAT3**, *signal transducers and activators protein 3*

**SUP**, sistema ubiquitina-proteossoma

**TACE**, quimioembolização transarterial

**TCF**, *T cell receptor*

**TGF- $\beta$** , factor de crescimento transformante  $\beta$

**TNF $\alpha$** , factor de necrose tumoral alpha (do inglês, tumor necrosis factor alpha)

**TRAIL**, TNF-related apoptosis inducing ligand

**TRK**, receptores com actividade de tirosina cinase (*do inglês tyrosine receptors kinase*)

**V600BRAF**, mutação V600 do gene BRAF

**VEGF**, *vascular endothelial growth factor*

**VEGFR**- *vascular endothelial growth factor receptor*

**VHB**, Vírus da Hepatite B

**VHC**, Vírus da Hepatite C

**XXXIV | Terapêutica dirigida a vias moleculares no Carcinoma Hepatocelular –  
Importância do inibidor do mTOR, da farnesiltransferase e do proteasoma**

---

## **Capítulo 1. Introdução**

## **2 | Terapêutica dirigida a vias moleculares no Carcinoma Hepatocelular – Importância do inibidor do mTOR, da farnesiltransferase e do proteasoma**

---

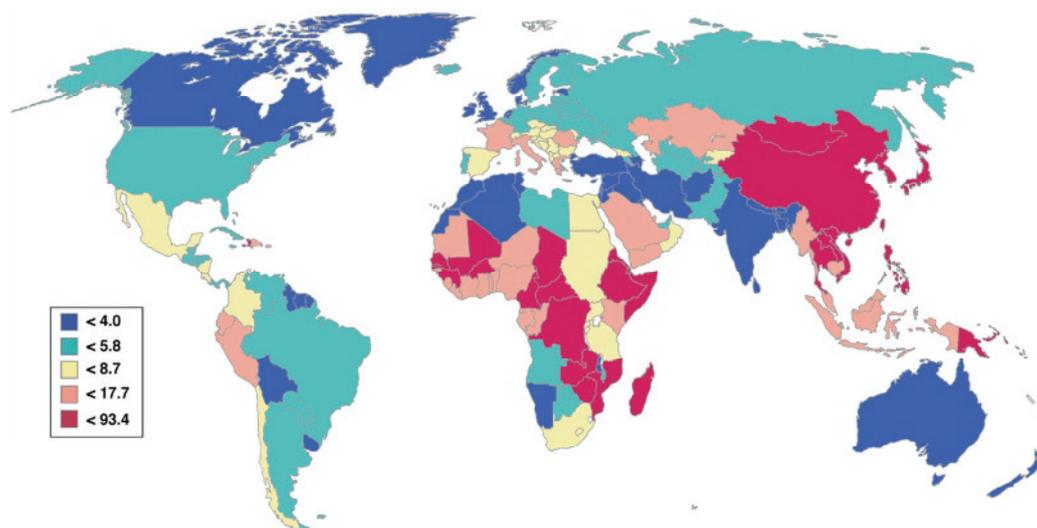
## 1.1 Carcinoma Hepatocelular

O Carcinoma Hepatocelular (CHC) apresenta uma elevada incidência, sendo o sexto cancro mais diagnosticado em todo o mundo. É ainda uma das neoplasias mais agressivas e com pior prognóstico em todo um mundo, sendo a terceira causa de morte relacionada com cancro, sendo o número de mortes praticamente igual ao número de casos diagnosticado por ano (EASL–EORTC Clinical Practice Guidelines, 2012 e Lope, C. *et al.*, 2012).

O CHC é o cancro do fígado mais comum, representando 83% de todos os casos, sendo que este tipo de cancro compreende neoplasias hepáticas primárias diversas, que incluem o carcinoma hepatocelular, carcinoma do ducto biliar intrahepático (colangiocarcinoma), hepatoblastoma, cistoadenocarcinoma do ducto biliar, hemangiossarcoma e hemangioma epitelióide (Farazi, P. & DePinho, R., 2006).

## 1.2 Epidemiologia e Etiologia do Carcinoma Hepatocelular

A incidência do CHC tem vindo a aumentar (EASL–EORTC Clinical Practice Guidelines, 2012) e apresenta uma dispersão heterogénea (Figura 1), que reflecte as diferenças regionais na prevalência de factores etiológicos específicos.



**Figura 1-** Variações regionais nas taxas de mortalidade do CHC categorizadas por taxas de mortalidade ajustadas à idade. As taxas são por 100,000 pessoas (adaptado de El-Serag, H & Rudolph, L., 2007)

#### **4 | Terapêutica dirigida a vias moleculares no Carcinoma Hepatocelular – Importância do inibidor do mTOR, da farnesiltransferase e do proteasoma**

---

A maioria dos casos de CHC (80%) têm origem na Ásia Oriental e África Subsariana, em que o factor de risco dominante é infecção crónica pelo vírus da Hepatite B (VHB), em conjunto com a exposição à aflatoxina B1 (AFB1). Por outro lado, na América do Norte, Europa e Japão, a infecção pelo vírus da Hepatite C (VHC) é o principal factor de risco, bem como o consumo de álcool (Forner, A. *et al.*, 2012). O sexo masculino é muito mais afectado por esta patologia do que o feminino, sendo o ratio global de 2.4, no entanto em zonas muito afectadas aumenta (Vennok, A. *et al.*, 2010).

Assim, os principais factores de risco do CHC são a infecção crónica pelo vírus da Hepatite B e C, o consumo crónico de álcool e a comida contaminada pela aflatoxina B1. Os mecanismos pelos quais, cada condição, pode levar ao desenvolvimento de CHC serão discutidos posteriormente.

Por outro lado, existem outros factores etiológicos capazes de induzir o desenvolvimento de CHC, como algumas doenças metabólicas, nas quais se incluem, a hemocromatose, que está relacionada com o aumento da absorção hepática de ferro que provoca danos nas células hepáticas, a porfiria cutânea tardia, qua também está associada a um aumento ferro no fígado, que, por sua vez, pode estar associada a um aumento da inflamação, necrose e fibrose, e a deficiência de  $\alpha$ 1-antitripsina, que leva ao aparecimento de polímeros de antitripsina nos hepatócitos levando à sua morte e aparecimento de cirrose (Badvie, S., 2000).

A diabetes parece também ser um possível factor de risco para o desenvolvimento de CHC, pois já foi descrita uma maior incidência de CHC em doentes diabéticos, sem historial de doenças hepáticas ou outros factores de risco (El-Serag, H. *et al.*, 2004). Esta predisposição pode estar relacionada com a resistência à insulina, e com o aumento e acumulação hepática de ácidos gordos livres. Este aumento intrahepático de ácidos gordos pode provocar danos celulares, apoptose das células hepáticas, indução de citocinas, geração de espécies reactivas de oxigénio, devido à oxidação dos ácidos gordos e, em última análise, ao desenvolvimento de fibrose (Farrel, G & Larter, C., 2004).

As patologias conhecidas como fígado gordo não-alcoólico e esteato-hepatite não alcoólica, também podem contribuir para o desenvolvimento de fibrose e cirrose, podendo, assim, levar ao desenvolvimento de CHC (Farrel, G & Larter, C., 2004).

## **1.3 Hepatocarcinogénese**

O Carcinoma Hepatocelular, pode ser induzido por vários factores etiológicos, entre os quais salientamos os vírus da Hepatite B e C, a aflatoxina B1 e o álcool, fazendo com que o mecanismo indutor de carcinogénese subjacente a cada factor seja diferente.

### **1.3.1- Hepatocarcinogénese induzida por vírus**

Os mecanismos de desenvolvimento de tumores hepáticos associados a vírus são complexos e envolvem tanto factores virais como do hospedeiro. Existem dois tipos de vírus de Hepatite associados ao desenvolvimento de CHC, sendo estes o vírus da Hepatite B (VHB) e da Hepatite C (VHC), no entanto os mecanismos pelos quais provocam hepatocarcinogénese são diferentes.

#### **1.3.1.1-Vírus da Hepatite B**

Apesar da maioria dos casos de CHC evoluir a partir de fígados cirróticos, uma parte significativa deste tipo de cancro relacionado com o VHB ocorre num contexto de infecção crónica viral na ausência de cirrose hepática, o que indica um papel mais directo de VHB no processo tumoral (Neuveut, C., 2010).

O vírus da Hepatite B é um vírus de dupla cadeia de ADN parcial, não citopático mas hepatrópico, que é classificado como membro da família *Hepadnaviridae* (Farazi, P. & DePinho, R., 2006).

O VHB tem dois mecanismos principais pelo qual induz hepatocarcinogénese, contribuindo especificamente para o desenvolvimento do Carcinoma Hepatocelular (Chemin, I. & Zoulim, F., 2008), sendo estes a integração do ácido desoxirribonucleico

## 6 | Terapêutica dirigida a vias moleculares no Carcinoma Hepatocelular – Importância do inibidor do mTOR, da farnesiltransferase e do proteasoma

---

(ADN) viral no genoma do hospedeiro e as interações vírus-hospedeiro. Desta forma, o VHB parece ter um envolvimento no processo directo na transformação hepática maligna, pois está associado a microdelecções de ADN nos hepatócitos dos hospedeiros (Farazi, P. & DePinho, R., 2006), tendo preferência por genes envolvidos na sinalização celular ou proliferação (oncogenes), para além de amplificar a instabilidade cromossómica (Cougot, D., 2005). Assim, esta integração não-aleatória de ADN viral pode levar à activação de genes relevantes no cancro, tais como os que regulam a imortalização celular, como a *telomerase reverse transcription* (hTERT), a proliferação celular, como a *mitogen activated protein kinase 1* (MAPK1), a ciclina A e o *platelet-derived-growth-factor-β* (PDGFβ) e a viabilidade celular, como o *receptor-associated protein 1 do Tumor Necrosis Factor* (TNF-R1)), promovendo a hepatocarcinogénese (Neuveut, C., 2010 e Chemin, I. & Zoulim, F., 2008).

O gene X do VHB codifica uma pequena proteína (HBx) que é essencial para a replicação do vírus, mas cuja função continua parcialmente desconhecida (Neuveut, C., 2010 e Chemin, I. & Zoulim, F., 2009). Apesar das funções da proteína HBx não serem completamente conhecidas, sabe-se que está envolvida na transformação maligna dos hepatócitos, ou seja pode promover a hepatocarcinogénese em ambientes propensos ao desenvolvimento de cancro (Kew, M., 2011 e Chemin, I. & Zoulim, F., 2008). A sua capacidade carcinogénica está relacionada com as suas actividades pleiotrópicas sobre a regulação do ciclo celular, de vias de sinalização tais como a *rat sarcoma* (RAS), *RAS function* (RAF), *cellular jun-nana* (c-JUN), *mitogen activated protein kinase* (MAPK), *nuclear factor-kappa B* (NF-κB), *just another kinase-signaltransducers and activators* (JAK-STAT), FAK, e as vias da *Protein Kinase C* (PKC), bem como as vias de sinalização dependentes da família de tirosinas cinase Src e cascata de sinalização fosfatidilinosital-3-cinase (PI3K) (Kew, M. 2011) e reparação do ADN (Neuveut, C., 2010). Para além disto, a proteína HBx pode ligar-se e inactivar ou reduzir a expressão do gene supressor tumoral *p53*, aumentando a proliferação celular e a sobrevivência, e comprometendo a reparação do ADN, bem como de outros genes supressores tumorais e de factores relacionados com a senescência celular (Kew, M., 2011 e Farazi, P. & DePinho, R., 2006)

As interacções entre o vírus e o retículo endoplasmático (RE) do hospedeiro parecem também contribuir para a hepatocarcinogénese induzida por VHB por provocar stresse no RE, devido à grande quantidade de proteínas virais sem estrutura ou com uma estrutura incorrecta que são sintetizadas pelos hepatócitos infectados. Esta situação induz stresse oxidativo e lesão no ADN mediada por radicais livres e activação de células estreladas, predispondo as células à transformação maligna (Chemin, I. & Zoulim, F., 2008)

As células T vão ter uma resposta imune vigorosa para combater a infecção, no entanto, esta resposta contribui para a necrose dos hepatócitos, inflamação e, conseqüente, regeneração, podendo conduzir à carcinogénese hepática. No caso de infecção crónica pelo VHB esta leva a ciclos recorrentes de necrose-inflamação-regeneração, sendo que essa replicação contínua dos hepatócitos pode possibilitar a propagação de lesões oncogénicas e erosão dos telómeros com a conseqüente instabilidade genómica (Farazi, P. & DePinho, R., 2006).

#### **1.3.1.2.- Vírus da Hepatite C**

O vírus da hepatite C induz hepatocarcinogénese num contexto de lesão hepática crónica, seguida de regeneração, provocando fibrose e, muito provavelmente, cirrose. (Bouchard, M. & Navas-Martin, S., 2011). No entanto, a progressão da fibrose é altamente variável e é influenciada por vários factores, como o consumo de álcool, a idade em que ocorre a infecção pelo VHC, o grau de inflamação e a existência de co-infecções com outros vírus. (Severi, T. *et al.*, 2010)

O vírus da Hepatite C é um vírus ARN de cadeia única de sentido positivo, não citopático, que é classificado como membro da família *Flaviviridae*. (Szabó, E. *et al.*, 2004).

O ciclo de vida do VHC está confinado ao citoplasma da célula hospedeira, pois este não expressa uma transcriptase reversa (como o VHB), não sendo, por isso, capaz de se integrar no genoma do hospedeiro, o que sugere, tal como referido anteriormente, que o seu papel na carcinogénese é mediado por processos crónicos de necrose-inflamação, para além do efeito directo que as proteínas virais têm nos

## 8 | Terapêutica dirigida a vias moleculares no Carcinoma Hepatocelular – Importância do inibidor do mTOR, da farnesiltransferase e do proteasoma

---

hepatócitos, alterando uma série de vias de sinalização intracelulares (Severi, T. *et al.*, 2010).

A proteína do núcleo do VHC é capaz de regular a proliferação celular e o ciclo celular por diferentes mecanismos, como a ligação ou modulação de várias proteínas supressoras tumorais, como a p53, a p73 e a proteína do retinoblastoma (pRb) ou os seus alvos, com activação de algumas vias intracelulares. A p21/WAF, que é um alvo transcricional da p53, que regula a actividade do complexo ciclina/cinase dependente de ciclina (CDK), é também modelada pela proteína do núcleo do VHC. Para além de actuar nas vias referidas anteriormente, a proteína do núcleo do VHC também activa a cascata MAPK, uma via essencial para a promoção da proliferação celular (Marra, M., *et al.*, 2011). Além disso, esta proteína do núcleo do VHC também activa a via WNT/ $\beta$ -catenina, que pode controlar a síntese de ADN e a progressão do ciclo celular, e a via de sinalização factor de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que é capaz de regular a proliferação, a apoptose e a diferenciação celular (Bouchard, M. & Navas-Martin, S., 2011).

As proteínas não-estruturais do VHC, como as proteínas não estruturais 3, 4B, 5A (NS3, NS4B e NS5A, respectivamente) parecem também ter um contributo, embora mais reduzido (ou indirecto), para a hepatocarcinogénese. A proteína NS3 também interage com a p53, levando à supressão da proteína p21/WAF. A proteína NS4B, por seu lado, é capaz de induzir stresse no RE e regular o metabolismo dos lípidos, através da activação da via de sinalização *Steral Regulatory Element-Binding Protein* (SREBP) e PI3K, levando à acumulação de lípidos. Por último, a proteína NS5A é capaz de modular várias vias intracelulares de evasão à resposta imunitária do hospedeiro, para além de aumentar os níveis de espécies reacctivas de oxigénio (ROS), de NF- $\kappa$ B e de *Signal Transducer and activator of Transcription 3* (STAT3) (Bouchard, M. & Navas-Martin, S., 2011)

### **1.3.2- Hepatocarcinogénese induzida por consumo crónico de álcool**

Em geral, qualquer condição que conduza a inflamação crónica no fígado, tal como consumo crónico de álcool, causa alterações genómicas e mitocondriais nas células, o que facilita o desenvolvimento de neoplasias (Lachemayer, A., et al., 2010).

O consumo crónico de álcool tem sido associado à produção de citocinas pró-inflamatórias que estimulam as células de Kupffer a libertar quimiocinas e citocinas, tais como TNF $\alpha$ , Interleucina 1 $\beta$  (IL1  $\beta$ ), Interleucina 6 (IL6) e Prostaglandina E<sub>2</sub>. Estas citocinas vão ter um efeito desfavorável na sobrevivência dos hepatócitos (Farazi, P. & DePinho, R., 2009), uma vez que criam um ambiente propício para a ocorrência de ciclos contínuos de destruição-regeneração crónica, que levam a cirrose e, em última análise, a CHC, devido ao aumento da sensibilidade dos hepatócitos ao TNF $\alpha$ .

O álcool também interfere com os mecanismos de stresse oxidativo, provocando um aumento de fibrose e cirrose, que são essenciais para um microambiente permissivo para o desenvolvimento de CHC (Yang, J. et al., 2011). Os efeitos pró-carcinogénicos do microambiente cirrótico, vão activar as células estreladas, aumentando significativamente a fibrose, bem como alterar vias de sinalização, tal como a redução da *Signal Transducer and activator of Transcription 1* (STAT1), diminuindo os efeitos protectores do interferão gamma (IFN $\gamma$ ) (Farazi, P. & DePinho, R., 2009 e Yang, J. et al., 2011)

### **1.3.3- Hepatocarcinogénese induzida por Aflatoxina B1**

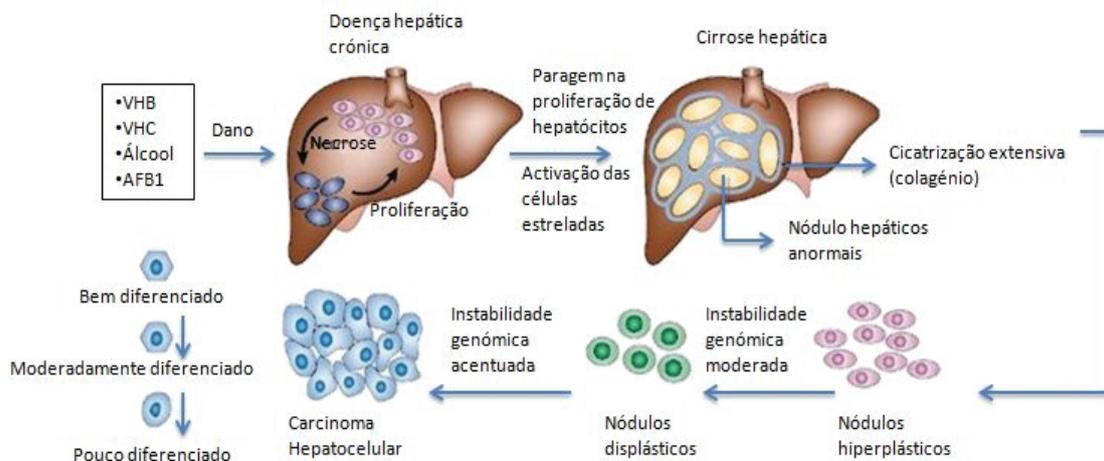
A ingestão da toxina fúngica, aflatoxina B1 (AFB1), também representa um aumento do risco de desenvolvimento do CHC. A AFB1 parece funcionar como um agente mutagénico estando associada a mutações específicas da p53, nomeadamente à mutação transversal de G:C para T:A no codão 249 do gene *p53* (Feitelson, M. et al., 2002). Além disso, coopera na activação mutacional de oncogenes.

Ao contrário da hepatocarcinogénese induzida por HCV ou pelo álcool, não existe uma conexão clara entre a exposição a aflatoxina B1 e o desenvolvimento de cirrose, indicando que as acções mutacionais desta toxina podem ser o principal motor

de desenvolvimento de CHC. É interessante notar que a exposição à aflatoxina B1 geralmente convive com a hepatite B, sendo que esses indivíduos possuem um risco 5 a 10 vezes superior para desenvolver CHC em comparação com a exposição a apenas um desses factores (Kew, M. 2003). O mecanismo base desta sinergia não é conhecido, embora pareça plausível que a cooperação seja derivada da mutagênese induzida pela aflatoxina B1 e pelo contínuo *turnover* e regeneração durante a infecção crónica por HBV.

## 1.4 Progressão Histopatológica do Carcinoma Hepatocelular

A evolução neoplásica do CHC (Figura 2) é um processo complexo que envolve vários mecanismos como alterações genéticas e/ou epigenéticas, aberrações cromossómicas e alterações em várias vias de sinalização moleculares (Lachemayer, A., *et al.*, 2010), no entanto, não está tão bem caracterizada como em outras neoplasias.



**Figura 2- Progressão das alterações histopatológicas e características moleculares do CHC.** Após lesão hepática por agentes hepatocarcinogénicos, como o álcool, a aflatoxina B1 e os vírus da hepatite B e C, ocorrem ciclos contínuos de necrose e proliferação hepática, que culminam em cirrose, com a formação de nódulos hiperplásticos, que podem evoluir para nódulos displásticos e posteriormente para carcinoma hepatocelular (CHC), devido a alterações moleculares. AFB1, aflatoxina B1; VHB, vírus da hepatite B; VHC, vírus da hepatite C (Adaptado de Farazi, P. & DePinho, R., 2006).

Os vários factores de risco ou etiológicos já mencionados podem causar uma lesão inicial no fígado e, posteriormente, ciclos contínuos de lesão-regeneração dos hepatócitos, típico de doença hepática crónica (Farazi, P. & DePinho, R., 2006), que pode evoluir para cirrose. Os nódulos hiperplásicos de hepatócitos em regeneração têm características citológicas normais e representam um potencial primeiro passo para o CHC. Estas lesões podem progredir para nódulos displásicos pré-malignos, que apresentam características citológicas anormais, incluindo claras alterações celulares e aglomeração nuclear, sendo que estas lesões estão associadas com um espessamento da trabécula, o que indica uma arquitectura hepática anormal. Estes nódulos displásicos podem evoluir para CHC, que para além de todas as características anormais descritas anteriormente, é dotado da capacidade de invadir o estroma fibroso circundante e os vasos sanguíneos, podendo apresentar capacidade metastática (Okuda, K. *et al.*, 2000).

## 1.5 Vias de sinalização intracelular

Existe uma série de vias de sinalização intracelular que estão envolvidas na iniciação, progressão e manutenção do CHC, tais como a via de sinalização WNT/ $\beta$ -catenina, *epidermal growth factor/ epidermal growth factor receptor* (EGF/EGFR), *insulin growth factor/ insulin growth factor receptor* (IGF/IGFR), *rat sarcoma/ mitogen activated protein kinase* (RAS/MAPK), *fosfatidilinositol-3-cinase /Protein kinase B/mammalian target of rapamycin* (PI3K/AKT/mTOR), *vascular endothelial growth factor / vascular endothelial growth factor receptor* (VEGF/VEGFR), *fibroblast growth factor/ fibroblast growth factor* (FGF/FGFR), *platelet derived growth factor/ platelet derived growth factor receptor* (PDGF/PDGF), proteína supressora tumoral p53 e do nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B).

### 1.5.1- Via de sinalização WNT/ $\beta$ -catenina

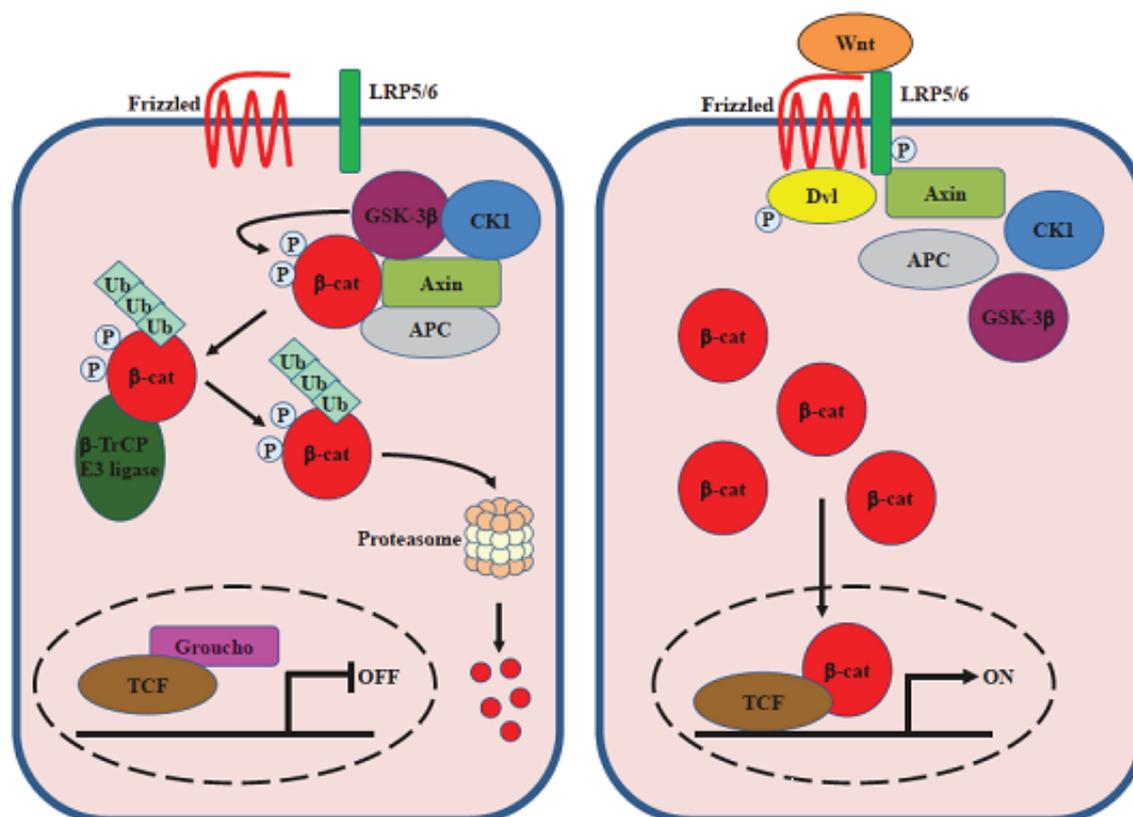
A via de sinalização WNT/ $\beta$ -catenina está frequentemente activada no CHC (Villanueva A *et al.*, 2007). A activação desta via foi descrita num terço dos casos de

CHC, apesar das mutações ocorrerem apenas em 17% dos casos (Laurent-Puig P *et al.*, 2001). É interessante notar, que a activação da cascata de sinalização WNT tem uma expressão muito mais acentuada nos casos de CHC positivos para VHC (Cervello, M. *et al.*, 2012).

A família de genes *WNT* codifica glicoproteínas envolvidas no crescimento celular, diferenciação, organogénese/embriogénese e oncogénese. Esta via de sinalização é activada extracelularmente pelos ligandos WNT que estimulam os receptores *Frizzled* (FZD), de forma a activar a via canónica da  $\beta$ -catenina (Figura 3) ou a não canónica da cinase c-JUN N-terminal (JNK) e da proteína cinase C (PKC) (Lachenmayer, A. *et al.*, 2010)

Num estado estacionário (ausência de proteína WNT), a  $\beta$ -catenina, o principal interveniente na via canónica do WNT, é fosforilada nos resíduos terminais de um aminoácido de serina e treonina pela cinase de caseína 1 (CK1) e pela cinase da sintetase do glicogénio  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ). As proteínas, axina e *adenomatous polyposis coli* (APC), facilitam a fosforilação da  $\beta$ -catenina, o que causa a sua ubiquitinação e, conseqüente, degradação pelo proteasoma (Figura 3) (Cervello, M. *et al.*, 2012)

Na presença de WNT, a sinalização é iniciada pela ligação da proteína WNT ao seu receptor transmembranar, a proteína Frizzled e ao co-receptor *low-density lipoprotein-related protein* (LRP) 5/6. Segue-se o recrutamento da proteína Dishevelled (Dvl) pelo receptor FZD, formando-se o complexo Dvl/FZD, que trasloca a axina para LRP5/6, levando à inactivação da cinase sintetase de glicogénio  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ). Na ausência de fosforilação da  $\beta$ -catenina, esta é libertada do complexo de degradação ubiquitina-proteasoma, acumulando-se no citoplasma. Como conseqüência, a  $\beta$ -catenina é translocada para o núcleo, deslocando o inibidor transcripcional Groucho, e liga-se ao complexo lymphoid enhancer factor (LEF)/T cell receptor (TCF), activando a expressão de diferentes genes que regulam a proliferação celular e apoptose (Figura 3) (Cervello, M *et al.*, 2012).



**Figura 3- Esquema simplificado da via de sinalização canônica da WNT/ $\beta$ -catenina.** Na ausência de ligação de WNT aos receptores *Frizzled* (imagem à esquerda), *dishevelled* continua inativa e a  $\beta$ -catenina é marcada pela via *adenomatous polyposis coli/axin/glycogen-synthase-kinase 3 $\beta$*  para degradação. Por outro lado, quando a WNT se liga aos receptores *Frizzled* (imagem à direita), activa a *dishevelled* que desliga a  $\beta$ -catenina do *adenomatous polyposis coli complex*, permitindo a sua associação com factores de transcrição e, subsequente, transcrição dos genes alvo. APC, *adenomatous polyposis coli*; Dsh, *dishevelled*; GSK-3 $\beta$ , cinase sintetase de glicogénio 3 $\beta$ ; LEF, *lymphoid enhancer-binding factor*; LRP, *low-density lipoprotein-related protein*; LDL-receptor-related protein; TCF, T-cell factor; P, fosforilação; CK1, cinase de caseína 1;  $\beta$ -cat,  $\beta$ -catenina (adaptado de Cervello, M. *et al.*, 2012).

Apesar da expressão robusta desta via no CHC, existem poucos estudos de aplicabilidade clínica, pois tem sido extremamente difícil dirigir uma terapêutica para esta via. No entanto, existe um estudo pré-clínico no qual se suprimiu a  $\beta$ -catenina através da utilização de um pequenos ARN de interferência (siARN), o qual mostrou que a  $\beta$ -catenina é essencial para a sobrevivência e progressão das células cancerígenas, independentemente da existência de mutação na  $\beta$ -catenina, abrindo portas ao significado terapêutico da inibição da  $\beta$ -catenina no CHC (Zeng, G. *et al.*, 2007).

### 1.5.2- Via de sinalização EGF/EGFR

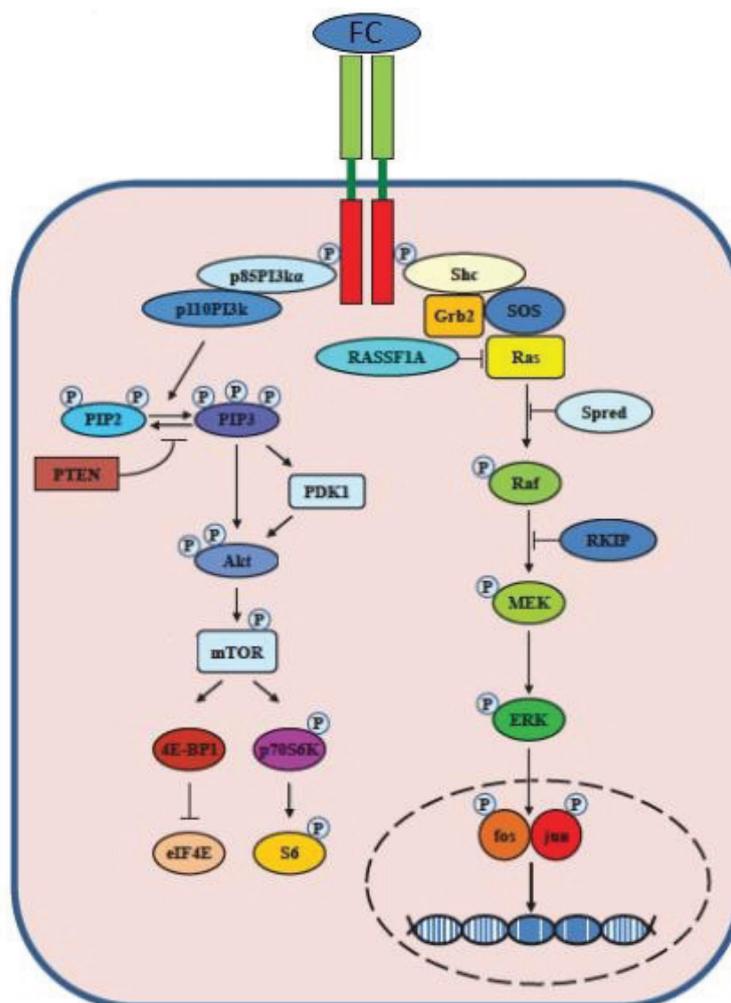
O EGRF tem actividade de tirosina cinase e apresenta um domínio extracelular de ligação dos ligandos, um domínio transmembranar e um domínio intracelular, onde reside a sua actividade de tirosina cinase. O EGRF pode formar um homo- ou heterodímero, quando o ligando se liga, sendo que a dimerização resulta na auto-fosforilação do receptor e subsequente activação de uma série de vias de sinalização, que incluem a via PI3K/AKT/mTOR e a via Ras/MAPK (Figura 4). Quase Todos os receptores desta família, se podem ligar à família de factores de crescimento (FC), sendo que para o EGFR os, principais, ligandos são o EGF, o TGF- $\alpha$  e a heparina. (Cervello, M. *et al.*, 2012)

Em alguns tipos de CHC existe uma sobre-expressão de EGF ou EGRF (Villanueva A *et al.*, 2008), que tem vindo a ser associada com doença em estágio avançado, aumento da proliferação celular e grau de diferenciação tumoral (Kannangai, R. *et al.*, 2006). Para além disto, o EGF é um marcador de recidiva tardia de CHC após ressecção cirúrgica (*de novo* CHC) (Hoshida, Y. *et al.*, 2004).

### 1.5.3- Via de sinalização IGF/IGFR

A família do *insulin growth factor* (IGF) tem um papel essencial no desenvolvimento fetal, proliferação, diferenciação e crescimento celular, bem como na apoptose, estando envolvida em várias neoplasias (Pollak, M. *et al.*, 2004)

O sistema de sinalização IGF-I receptor (IGFR) é mediado pelos ligandos circulantes, IGF-I e IGF-II, que interagem com o receptor membranar, tal como o receptor IGF do tipo I (IGF-1R), resultando na activação do domínio intrínseco de tirosina cinase, iniciando várias cascatas de sinalização, incluindo a PI3k/AKT/mTOR e RAS/MAPK (Figura 4) (Lachmeyer, A. *et al.*, 2010).



**Figura 4- Representação esquemática das vias de sinalização PI3K/PTEN/AKT/mTOR e RAS/MAPK após estimulação do receptor de tirosina cinase por um factor de crescimento.** A cascata RAS/MAPK traduz vários sinais extracelulares, sendo iniciada pela activação de receptores de factores de crescimento, que por sua vez activam as proteínas RAF, MEK e ERK, resultando numa sinalização proliferativa e antiapoptótica. FC, Factor de crescimento; P, fosforilação; SH2, *Src-homology 2*; RASSF1A, *RAS-association domain family 1*; RAS, *rat sarcoma*; RAF, *RAS function*; MEK, *MAP kinase extracellular signal-regulated kinases*; ERK, *extracellular signal-regulated kinases*; FOS, proto-oncogene; SPRED, *Sprouty-related protein with EVH-1 domain*; p85PI3KA, subunidade reguladora de 85 kDa do PI3K; p110PI3KA, subunidade catalítica com 110 kDa do PI3K; PIP2,...; PIP3,...; PTEN, gene supressor tumoral; PKD, cinase dependente de fosfotidilinosídeos; AKT, *protein kinase B*; mTOR, *mammalian target of rapamycin*; p70<sup>S6</sup>, *40S ribosomal protein kinase*; 4E-BP1, *eukaryotic initiation factor 4E-binding protein-1* (adaptado de Cervello, M. *et al.*, 2012; Zender, L. *et al.*, 2010).

A sobre-expressão de IGF-II e IGF-1R contribuem para a proliferação celular, inibição da apoptose e aumento do comportamento invasivo do CHC (Breuhahn, K. &

Schirmacher, P., 2008), sendo que o aumento de expressão de IGF-II foi observado em 16% a 40% dos casos de CHC e a sobre-expressão de IGF-1R em 30% dos doentes de CHC (Cervello, M. *et al.*, 2012)

#### **1.5.4- Via de sinalização RAS/MAPK**

A via Ras/MAPK é activada pela ligação de factores de crescimento, tal como o EGF, *hepatocyte growth factor* (HGF), *platelet derived growth factor* (PDGF) e *vascular endothelial growth factor* (VEGF), a receptores com actividade de tirosina cinase (TRK) (Figura 4). Após activação, a proteína RAS assume a sua forma ligada a trifosfato de guanosina (GTP), que leva ao recrutamento da proteína RAF do citosol para a membrana celular, onde fica activa, provavelmente por via da família de tirosina cinases SRC (McCubrey, J. *et al.*, 2009 e McCubrey, J. *et al.*, 2010). Por seu lado, a RAF activa leva à fosforilação e activação das *MAP kinase extracellular signal-regulated kinases 1 e 2* (MEK1/MEK2), que por sua vez fosforilam e activam a *extracellular signal-regulated kinases 1 and 2* (ERK1/ ERK2) em resíduos específicos de treonina e tirosina (Xu, S *et al.*, 1995). A ERK activada consegue translocar-se para o núcleo e fosforilar factores de transcrição nuclear, tais como, o *ELK-1*, *CREB*, *FOS* e *globin transcription factor 1* (*GATA-1*), bem como outros factores, que se ligam a promotores de muitos genes, incluindo factores de crescimento e citocinas, que são importantes para promover o crescimento celular e prevenir apoptose de vários tipos de células (Davis, R. *et al.*, 1995)

A desregulação da via RAS/MAPK tem um papel importante na carcinogénese, incluindo o CHC, apesar de mutações nos genes que codificam as proteínas RAS ou RAF serem pouco frequentes neste carcinoma. Tal não impede que haja sobre-expressão de RAS, estando este aumento relacionado com a diminuição da expressão dos genes reguladores da RAS, por hipermetilação dos seus promotores, tais como o *RAS-association domain family 1A* (*RASSF1A*) e o seu homólogo *RAS-effector 1A* (*NORE1A*) (Calvisi, D. *et al.*, 2006).

### 1.5.5- Via de sinalização PI3K/AKT/mTOR

A via de sinalização PI3K/AKT/mTOR está envolvida em numerosos processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, apoptose, progressão do ciclo celular, entre outros, para além disso, quando desregulada tem uma enorme capacidade tumorigénica e angiogénica (Lachmeyer, A. *et al.*, 2010), sendo que, em 50% dos doentes com CHC, se verifica uma sobre-activação da via mTOR (Villanueva, A. *et al.*, ver ano).

A AKT pode ser activada através da ligação de um factor de crescimento (tal como, EGF ou IGF) a um receptor tirosina cinase, por activação constitutiva de PI3K ou perda de função do gene supressor tumoral *PTEN* (Figura 4), por silenciamento epigenético ou mutações somáticas (Llovet, J. & Bruix, J., 2008 e Zender, L. *et al.*, 2010).

A PI3K é uma proteína heterodimérica, com uma subunidade reguladora de 85 kDa (p85PI3KA) e uma subunidade catalítica com 110 kDa (p110PI3KA), sendo que esta proteína fosforila uma série de fosfolípidos membranares, levando à formação do 4,5-bifosfato-fosfatidil de inositol (PIP2) e 3,4,4-trifosfato-fosfatidil de inositol (PIP3), que, por sua vez, activam a cinase dependente de fosfotidilinosídeos (PDK), responsável pela activação da *serine-threonine kinase AKT/protein kinase B* (PKB) (Figura 4).

O mTOR é regulado positivamente pela AKT, e fosforila componentes da maquinaria celular que sintetiza proteínas tal como a cinase de serina-treonina *40S ribosomal protein kinase* (p70<sup>S6</sup>) e a tradução do repressor *eukaryotic initiation factor 4E-binding protein-1* (4E-BP1) (Figura 4), ambas reguladoras por importantes factores envolvidos na proliferação celular, tais como, o *c-MYC*, a ciclina D1, o *pRb*, e na angiogénese, como o *HIF1- $\alpha$* .

### 1.5.6- Vias de sinalização VEGF/VEGFR, FGF/FGFR e PDGF/PDFGR

A elevada vascularização é uma característica do CHC, pois as células tumorais libertam factores angiogénicos, tais como, o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF), o factor de crescimento de fibroblastos (FGF) e o factor de crescimento

derivado da plaqueta (PDGF), em resposta a condições de hipóxia e privação de nutrientes, activando, assim, as células endoteliais (Zender, L. *et al.*, 2012).

O VEGF é considerado o factor angiogénico mais potente no CHC, o qual está normalmente sobre-expresso nestes tumores, bem como os seus receptores, VEGFR-1 e VEGFR-2. Para além disto, os níveis de expressão de VEGF estão relacionados com a agressividade da doença (Zender, L. *et al.*, 2012) e com pior prognóstico após ressecção (Poon R. *et al.*, 2004).

A família de receptores FGF inclui 4 receptores transmembranares (FGFR1-4) e um receptor solúvel (FGF5) e, pelo menos 23 ligandos conhecidos. Esta via está sobre-expressa no CHC, o que provoca um aumento da angiogénese tumoral (Imura S. *et al.*, 2004). Para além disso, as vias de sinalização FGF e VEGF, parecem ter um efeito sinérgico na promoção da angiogénese (Yoshiji H. *et al.*, 2002)

A via de sinalização do PDGF parece também estar envolvida no desenvolvimento da angiogénese no CHC, (Campbell J. *et al.*, 2005), sendo um dos alvos do sorafenib, um inibidor multi-cinase, que será discutido posteriormente.

### **1.5.7- Proteína supressora tumoral p53**

A proteína supressora tumoral p53 encontra-se mutada em mais de 50% de todos os tumores humanos. O seu principal papel é preservar a estabilidade genética sendo considerada a guardiã do genoma. Quando o ADN sofre danos, havendo indução de stresse celular, a p53 assume a sua forma activa, e previne danos posteriores e a transformação oncogénica, por activação da apoptose ou por bloqueio do ciclo celular permitindo a reparação do ADN (Zender, L. *et al.*, 2010).

Geralmente, 30 a 60% dos casos de CHC transportam mutações do gene da p53, no entanto, o espectro de mutações pontuais no CHC varia de acordo com a etiologia da patogénese molecular subjacente (Nashida, N. & Goel, A., 2011).

### 1.5.8 - Via do NF- $\kappa$ B

A via do *nuclear factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B) é reconhecida como uma ligação subjacente entre inflamação e transformação maligna, em muitos tipos de cancro, incluindo o CHC. O NF- $\kappa$ B tem uma expressão aberrante no CHC e regula uma série de genes relacionados com a tumorigénese, tais como, os que medeiam a inflamação, sobrevivência e proliferação celular, invasão, angiogénese e metastização (Arsura, A & Cavin, L., 2005 e Cervello, M. *et al.*, 2012)

O NF- $\kappa$ B é um factor de transcrição ubíquo presente em todos os tipos celulares, constituído por duas sub-unidades, p50 e p65. Na ausência de estimulação, o NF- $\kappa$ B reside inactivo no citoplasma complexado com o seu inibidor, o I $\kappa$ B $\alpha$  formando um heterodímero de p50, p65 e I $\kappa$ B $\alpha$ . A ligação de ligandos, tais como citocinas ou lipopolisacárideos (LPS), vai provocar o recrutamento e activação da cinase I $\kappa$ B (IKK). A posterior fosforilação de resíduos de serina do I $\kappa$ B pela IKK, leva à ubiquitinação de I $\kappa$ B e subsequente degradação proteossomal. O NF- $\kappa$ B (as subunidades p50 e p65) fica então livre, migra para o núcleo onde activa a expressão de vários genes envolvidos na carcinogénese (Arsura, A & Cavin, L., 2005 e Cervello, M. *et al.*, 2012).

## 1.6 Estadiamento do Carcinoma Hepatocelular

A classificação e o estadiamento do cancro pretende estabelecer um prognóstico e permitir adequar o tratamento para cada doente. Nos tumores sólidos, o seu prognóstico está, geralmente, relacionado com o estágio em que o tumor se apresenta no momento do diagnóstico. No entanto, no CHC, a determinação do prognóstico é mais complexa, pois, geralmente, existem duas condições patológicas subjacentes, o cancro e a cirrose, que também vai afectar o prognóstico (Bruix, J. & Sherman, M., 2010).

Existem vários sistemas de estadiamento do CHC, no entanto o mais utilizado, tanto pela *American Association for study of liver diseases* (AASLD) como pela *European Association for study of liver* (EASL), é a classificação BCLC (Barcelona-Clínica Liver Cancer) (Figura 5), pois inclui variáveis de prognóstico que estão relacionadas com o estado do tumor (sistema TNM – tamanho, número, invasão vascular, N1, M1),

## 20 | Terapêutica dirigida a vias moleculares no Carcinoma Hepatocelular – Importância do inibidor do mTOR, da farnesiltransferase e do proteasoma

função hepática e estado de saúde com variáveis de tratamento, obtidas de estudos de *cohort* e estudos randomizados. A classificação BCLC, divide os doentes de CHC em cinco estádios (0, A, B, C e D) de acordo com as variáveis pré-estabelecidas de prognóstico e direcciona a terapêutica a ser usada conforme o estádio da doença. A previsão do prognóstico é definida por variáveis relacionadas com o estado do tumor, a função hepática (*Child-Pugh's*) e o estado da saúde (ECOG). A terapêutica a utilizar depende de várias variáveis que têm um impacto na terapêutica a utilizar, tais como a bilirrubina, a hipertensão portal e a presença de sintomas (*AASLD practice guidelines* e *EASL-EORTC practice guideline*).

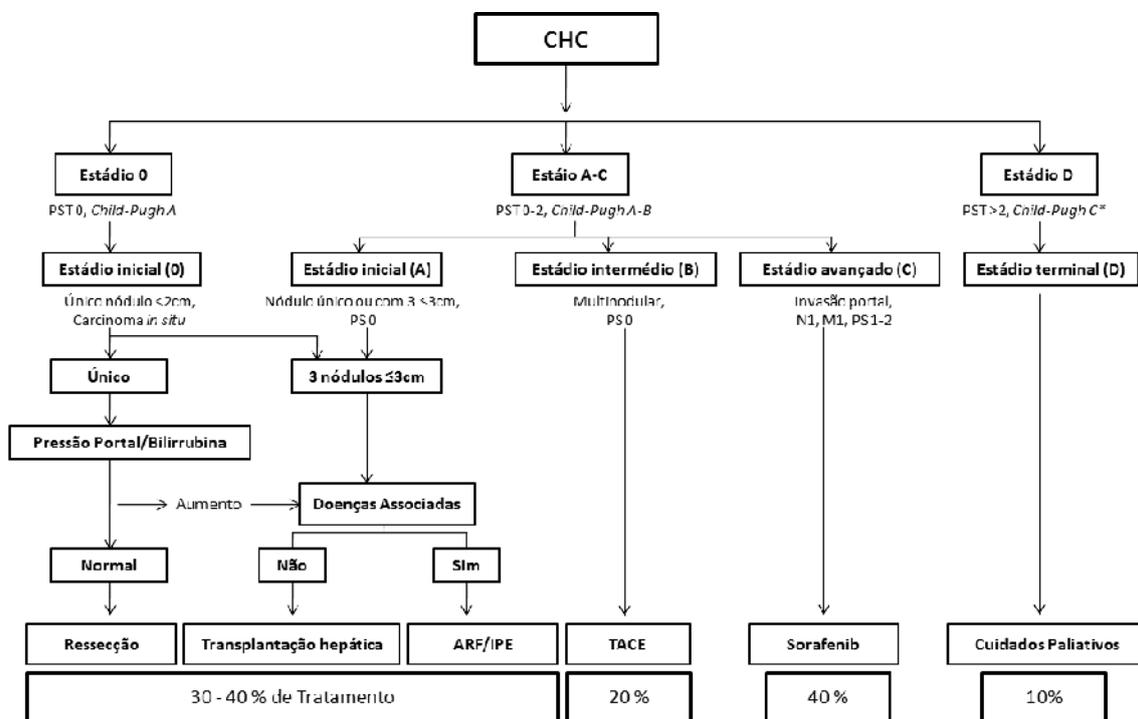


Figura 5- Sistema de estadiamento BCLC e estratégia terapêutica do CHC (adaptado de EASL-EORTC *practice guideline*, 2012).

Recentemente, tem havido um esforço significativo para estabelecer uma classificação molecular do CHC, no entanto é um objectivo difícil de atingir, devido à extrema complexidade genómica do CHC (Severi *et al.*, 2010). Além disso, nas *guidelines* do tratamento do CHC (EASL) não existe a recomendação de nenhuma terapêutica específica para determinadas sub-classes moleculares.

## 1.7 Tratamento do Carcinoma Hepatocelular

O tratamento do CHC é regido, na maior parte dos centros clínicos, pelos parâmetros do BCLC (Figura 5) tal como referido anteriormente, sendo que doentes com CHC inicial (estádio 0 e A) podem beneficiar de tratamentos curativos (ressecção, transplante de fígado ou ablação percutânea), enquanto que os que se encontram em estádios intermédios e avançados (estádio B e C) apenas podem beneficiar de alguns tratamentos, tais como, quimio-embolização ou radio-embolização transarterial, e para doentes terminais (estádio D) a única opção são os cuidados paliativos (Severi, T. *et al.*, 2010).

### 1.7.1- Tratamentos Curativos

#### 1.7.1.1.- Ressecção hepática

A ressecção é o transplante hepático que apresenta os melhores resultados no tratamento do CHC (com cerca de 60-80% de sobrevivência a 5 anos), sendo a primeira linha de tratamento para doentes com tumores iniciais, e o único considerado curativo.

A ressecção hepática é o tratamento preferencial para doentes sem cirrose, nos quais se pode realizar uma ressecção massiva sem taxas de complicações com mortalidade baixa e um resultado razoável (sobrevivência a 5 anos de 30-50%). (Llovet, J. *et al.*, 2005)

#### 1.7.1.2- Transplante hepático

De uma perspectiva oncológica, o transplante hepático é preferível a ressecção cirúrgica, pois pode remover todos os *foci* tumorais intra-hepáticos, bem como o fígado cirrótico que apresenta um grande potencial oncogénico (Lope, C. *et al.*, 2012).

O transplante de fígado é a primeira linha de tratamento para doentes com vários nódulos tumorais, 3 ou menos nódulos com 3 ou menos centímetros, ou um único tumor com menos de 5cm (critérios de Milan) e disfunção hepática avançada. Se estes critérios foram aplicados, consegue-se uma taxa de sobrevivência a 5 anos

superior a 70% e recidivas que variam de 5% a 15% (EASL-EORTC *practice guideline*, 2012).

O transplante de fígado apresenta como maior limitação a falta de doadores de fígado, pois existe sempre um período de espera entre o doente ser colocado nas listas de transplantação e a cirurgia, o que pode levar ao crescimento e aparecimento de complicações graves (invasão vascular e expansão extra-hepática) para a transplantação (Bruix, J. & Sherman, M., 2010).

### **1.7.1.3- Ablação local**

A ablação percutânea é a melhor opção terapêutica para doentes com CHC inicial, mas que não são candidatos a terapêuticas cirúrgicas. As células cancerígenas hepáticas podem ser destruídas por substâncias químicas, tais como, etanol ou ácido acético, ou através de variações térmicas (através de radiofrequência, laser, micro-ondas ou crioterapia) (Meza-Junco, J. *et al.*, 2012).

A primeira técnica de ablação local foi a injeção percutânea de etanol (IPE), que induz necrose do tecido tumoral, como resultado de desidratação celular, desnaturação proteica e oclusão química de pequenos vasos tumorais (Lencioni, R., 2010). Doentes com tumores inferiores a 5cm ou com três lesões inferiores a 3cm, podem atingir uma taxa de sobrevivência a cinco anos de 50%, no entanto para tumores mais pequenos, até 3cm, o resultado é mais promissor ocorrendo uma necrose de 80%. No entanto, a IPE tem uma limitação importante, que reside no facto de ter uma taxa de recidiva local alta, que pode atingir 33 a 43% em três anos (Salhab, M. & Canelo, R., 2011).

A ablação por radiofrequência (ARF) induz necrose por coagulação do tumor, através da energia gerada, produzindo um “perímetro de segurança” no tecido peritumoral, podendo eliminar pequenos satélites tumorais que não tivessem sido detectados (Meza-Junco, J. *et al.*, 2012). A ARF tem um maior efeito anti-cancerígeno, necessitando de menos sessões do que IPE para alcançar os mesmos efeitos, tendo uma menor taxa de recidiva em dois anos (2 a 18%, em relação a 11 a 45%) (Salhab, M. & Canelo, R., 2011).

Actualmente, a ARF é o melhor tratamento por ablação, no entanto a IPE continua a ter um papel importante, quando o tumor se situa perto de órgãos importantes ou grandes vasos, pois pode haver destruição destes induzida pelo calor (Lope, C. *et al.*, 2012)

## **1.7.2- Tratamentos Não-Curativos**

### **1.7.2.1.- Quimioembolização Transarterial**

A quimioembolização transarterial (TACE) é a primeira linha de tratamento para CHC não-resecável e doentes com CHC em estágio intermédio (Meza-Junco, J. *et al.*, 2012). A quimioembolização transarterial (TACE) tira partido da dupla vascularização hepática, arterial (25%) e portal (75%), e da vascularização preferencialmente arterial (80%) do CHC, bem como da sua intensa actividade neo-angiogénica durante a sua progressão. A infusão intra-arterial do agente citotóxico, seguida da embolização dos vasos sanguíneos que “alimentam” o tumor, vai provocar um forte efeito citotóxico e isquémico. Adicionalmente a hipóxia aumenta a permeabilidade celular e dessa forma a concentração local do agente quimioterápico (Kalva, S. *et al.*, 2008).

Os agentes terapêuticos convencionais mais utilizados são a quimioembolização com doxorrubicina ou cisplatina (misturados com lipiodol), atingindo-se uma taxa de sobrevivência média para casos de CHC em estágio intermédio de cerca de 16 meses e com a quimioembolização transarterial de cerca de 20 meses (Salhab, M. & Canelo, R., 2011).

Existem algumas estratégias para maximizar a actividade anti-tumoral e os benefícios clínicos da quimioembolização, como por exemplo a utilização de microesferas carregadas com o fármaco anticancerígeno que permite maximizar e prolongar a concentração intratumoral do fármaco, que é libertado ao longo de uma semana, bem como obstruir os vasos tumorais. Esta estratégia aumenta a concentração local do fármaco e apresenta toxicidade sistémica negligenciável (Varel, M. *et al.*, 2007)

### **1.7.2.1.- Sorafenib**

O carcinoma hepatocelular está entre os tumores mais resistentes à quimioterapia e, até recentemente, não eram recomendadas terapêuticas sistêmicas para doentes com CHC avançado. No entanto, o maior conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na hepatocarcinogénese, permitiu que, em 2007, o sorafenib emergisse como a primeira terapia sistémica, prolongando a sobrevivência dos doentes com CHC e, conseqüentemente, tornando-se numa referência do tratamento de doentes com CHC avançado (Llovet, M. & Bruix, J. 2008 e Llovet, M. *et al.*, 2008).

O Sorafenib é um inibidor multikinase oral que diminui a proliferação celular sendo acompanhado por uma redução da angiogénese tumoral. O sorafenib inibe a actividade de vários alvos presentes nas células tumorais (CRAF, BRAF, V600E BRAF, c-KIT e FLT-3) e na vasculatura tumoral (CRAF, VEGFR-2, VEGFR-3 e PDGFR- $\beta$ ). As RAF cinases são cinases de serina/treonina, enquanto que c-KIT, FLT-3, VEGFR-2, VEGFR-3 e PDGFR- $\beta$  são recetores de tirosina cinase (Villanueva, A. *et al.*, 2007 e Llovet, M. *et al.*, 2008). Este fármaco permite aos doentes com CHC avançado um ganho médio de 3 meses de vida (Llovet, M. *et al.*, 2008), que apesar de parecer modesto, é um avanço significativo e importante para estes doentes e para a investigação de novas terapêuticas dirigidas a alvos moleculares.

## **1.8 - Outras terapias dirigidas a alvos moleculares**

O sorafenib (inibidor de multi-cinases) representa uma importante descoberta no conhecimento do comportamento do CHC, para além de um avanço essencial no tratamento e melhoria da sobrevivência para doentes, que até este fármaco, não tinham nenhum tipo de terapêutica disponível. Além disso, também demonstra que a terapia dirigida pode superar a resistência ao tratamento desta neoplasia (baseado em Llovet, J. & Bruix, J., 2008).

A acção específica dos fármacos dirigidos a alvos terapêuticos minimiza a toxicidade típica da quimioterapia sistémica. Para além disso, a sua eficácia pode ser maximizada, utilizando-os em terapia combinada, quer seja com a quimioterapia convencional ou com outros fármacos dirigidos a alvos moleculares em diferentes vias

de sinalização (Cervello, M. *et al.*, 2012, Lachenmayer, A. *et al.*, 2010 e Llovet, J. & Bruix, J., 2008) ou na mesma via em níveis diferentes.

Apesar da complexidade molecular do CHC, existe um vasto espectro de fármacos em estudos clínicos, quer em monoterapia, quer em terapia combinada (Tabela 1 e 2, respectivamente), sendo que a maioria dos fármacos é dirigido à sinalização do EGRF (Erlotinib, Gefitinib, Lapatinib e Cetuximab), do mTOR (Everolimus, Sirolimus), angiogénese (Bevacizumab, Sorafenib, Sunitib) e do IGF (OSI-906, Cixutumumab e AVE-1642) (Lachenmayer, A. *et al.*, 2010), entre outros.

A investigação realizada em torno das vias de sinalização celular envolvidas na hepatocarcinogénese levou ao desenvolvimento de novos alvos moleculares, nomeadamente os envolvidos nas vias mTOR, proteasoma e farnesil-transferase.

### **1.8.1-Inibidores do mTOR**

Os inibidores do *mammalian target of rapamycin* (mTOR) apresentam uma boa estratégia terapêutica, pois são capazes de modular a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, que é um ponto de convergência de muitos estímulos de crescimento e que controla vários processos celulares correlacionados com a tumorigénese (LoPiccolo, J. *et al.*, 2008). Para além disto, esta via está sobre-expressa em cerca de 50% dos casos de CHC, como referido anteriormente.

O *mammalian target of rapamycin* (mTOR) é uma proteína cinase essencial na regulação da sinalização da transdução de vários factores de crescimento e proteínas ao nível do ARN mensageiro (mARN) e ribossoma, com um efeito regulador na progressão do ciclo celular, proliferação e crescimento celular (Strimpakos, A. *et al.*, 2009). Funciona ainda como um regulador central no crescimento e proliferação celular, permitindo a progressão da fase G1 para fase S (Sabatini, D., 2006).

### **1.8.2- Inibidores da farnesiltransferase**

Tal como referido anteriormente, uma das vias mais sobre-expressas no CHC, é a via de sinalização RAS/MAPK. A proteína RAS tem que sofrer várias modificações pós-

tradução para ficar activa e desencadear a cascata de sinalização, sendo um dos processos essenciais a isoprenilação, catalisada pela enzima farnesiltransferase (Apples, N. *et al.*, 2005). Esta enzima catalisa a transferência de um grupo farnesil para o resíduo terminal de cisteína dos seus substratos, entre os quais as proteínas RAS, RhoB e laminas (Bishop, W. *et al.*, 2003). Desta forma, os inibidores da farnesiltransferase (IFT) poderão constituir uma abordagem terapêutica promissora no CHC. Os IFT, ao bloquearem a acção da farnesiltransferase, alteram o conteúdo de RAS na forma activa, bloqueando a via de sinalização RAS/MAPK envolvida na proliferação celular. Contudo, a acção dos IFT, como o L-744,832, não é específica da proteína RAS e pode alterar outras proteínas que sejam substrato da enzima farnesiltransferase (Appels, N. *et al.* 2005).

### **1.8.3- Inibidores do proteasoma**

A degradação intracelular de proteínas em células eucariotas ocorre principalmente pelo sistema ubiquitina-proteasoma (SUP) (Orlowski, R. *et al.*, 2008). Neste sistema, as proteínas sinalizadas para degradação são previamente ubiquitinadas (inserção de um polipéptido de ubiquitina com 76 aminoácidos), e posteriormente degradadas no proteasoma 26S, uma protease multicatalítica (Inoue, T. *et al.*, 2006). O SUP é essencial para a renovação de proteínas, mas também para a proliferação, sobrevivência e activação do NF- $\kappa$ B (D'Alessandro, A. *et al.*, 2009).

Uma vez que, o SUP é responsável pela degradação de proteínas do ciclo celular, moléculas supressoras tumorais, oncogenes, factores de transcrição e proteínas apoptóticas (Inoue, T. *et al.*, 2006), é possível que os inibidores do proteasoma (IP) possam afectar os processos biológicos, incluindo o desenvolvimento de cancro. Estes inibidores vão provocar, como principal mecanismo, a acumulação de substratos do proteasoma, tais como proteína anómalas, levando à morte celular (D'Alessandro, A. *et al.*, 2009). De facto, já está aprovado para tratamento de alguns tumores hematológicos um inibidor do proteasoma, o Bortezomib. Contudo, a utilização destes novos fármacos no CHC não está ainda totalmente clarificada.

## 1.9 - Objectivos

O CHC é um tumor altamente agressivo com baixa ou nenhuma resposta às terapias comuns, sendo que o único tratamento que pode ser curativo é o transplante ou ressecção hepática. Para doentes com CHC avançado não existe nenhuma opção terapêutica com elevada eficácia, sendo que todos os doentes nesta fase não sobrevivem. Assim, é essencial o desenvolvimento de novas terapêuticas mais eficazes e seguras, quer em monoterapia quer em terapia combinada com outros agentes terapêuticos anti-cancerígenos.

A terapia dirigida tem um papel importante no tratamento de CHC, particularmente em estádios avançados, sendo que a utilização de agentes que actuam sobre moléculas específicas da carcinogénese é uma estratégia promissora.

Os inibidores do *mammalian target of rapamycin* (mTOR) apresentam uma estratégia promissora, devido à sua capacidade de inibirem a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, a qual controla vários processos celulares relacionados com a tumorigénese, estando sobre-expressa em cerca de 50% dos casos de CHC.

Uma vez que, o sistema ubiquitina-proteasoma é responsável pela degradação de proteínas do ciclo celular, moléculas supressoras tumorais, oncogenes, factores de transcrição (como o NF- $\kappa$ B) e proteínas apoptóticas, é possível que os inibidores do proteasoma possam afectar os processos biológicos, incluindo o desenvolvimento de cancro. De facto a proteína RAS tem que sofrer várias modificações pós-tradução para ficar activa e desencadear a cascata de sinalização, sendo um dos processos essenciais a isoprenilação, catalisada pela enzima farnesiltransferase. Assim, os IFT ao bloquearem a acção da farnesiltransferase, alteram o conteúdo de RAS na forma activa, bloqueando a via de sinalização RAS/MAPK envolvida na proliferação celular.

Dentro deste contexto, os objectivos alargados deste trabalho são avaliar a importância da via mTOR, da farnesiltransferase e do proteasoma como potenciais alvos terapêuticos no Carcinoma Hepatocelular. Em particular pretendemos:

- Avaliar a eficácia terapêutica do inibidor do mTOR (Everolimus), da farnesiltransferase (L-744,832) e do proteasoma (MG-262), em monoterapia e

## **28 | Terapêutica dirigida a vias moleculares no Carcinoma Hepatocelular – Importância do inibidor do mTOR, da farnesiltransferase e do proteasoma**

---

em associação entre si ou com fármacos convencionais, Doxorrubicina e 5-Fluorouracilo, em células de Carcinoma Hepatocelular, HepG2.

- Estudar alguns mecanismos envolvidos na citotoxicidade e/ou inibição da proliferação mediada pelo Everolimus, L-744,832 e MG-262 quer em monoterapia quer em associação entre si, ou com Doxorrubicina ou 5-Fluorouracilo, em células de Carcinoma Hepatocelular, HepG2.

## **Capítulo 2. Materiais e Métodos**



## 2.1 Linha celulares

A linha celular HepG2 é uma linha celular derivada de células de Carcinoma Hepatocelular humano. Foram oferecidas pela Professora Doutora Filomena Botelho, do laboratório de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal.

A linha celular humana HepG2 foi inicialmente isolada a partir de tecido hepático (biópsia) de um indivíduo do sexo masculino americano e caucasiano com 15 anos de idade, apresentando uma expressão normal de p53, tendo sido estabelecida por Aden *et al*, (1979). As características morfológicas e a forma das células são do tipo epitelial compatíveis com as células parenquimais do fígado. A análise histológica biópsia do fígado revelou um carcinoma celular bem diferenciado com um padrão trabecular.

### 2.2.1- Propagação e Manutenção das linhas celulares

A linha celular, HepG2, utilizada neste estudo cresce em monocamada (células aderentes) em meio *Dulbecco's Minimal Essential Medium* (DMEM), com L-glutamina 2mM, NaHCO<sub>3</sub>, penicilina (100U/mL,) estreptomina (100µg/mL) e canamicina (100µg/mL), enriquecido com soro bovino fetal com a concentração final de 10% (v/v). Assim, as células foram propagadas e mantidas em cultura no meio apropriado à temperatura de 37°C, numa atmosfera humedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Para que haja a manutenção das linhas celulares em estudo, é necessário que, quando ocorra uma confluência de células superior a 60%, estas sejam removidas do frasco de cultura e sejam colocadas num novo frasco a uma densidade inferior (cerca de 1x10<sup>4</sup> células/cm), sendo viável a sua proliferação até nova sub-cultura, processo este que se repete a cada três ou quatro dias.

## 2.3 - Análise da viabilidade e proliferação celular

Nos ensaios de viabilidade celular, as células foram colocadas em meio de cultura 24h antes da adição do fármaco, a uma concentração de 75.000 células por cm<sup>2</sup>.

Para avaliar a viabilidade celular utilizou-se o teste do *Alamar Blue*. Para o efeito, as células foram mantidas na ausência (controlo) e presença dos fármacos MG-262 (concentração de 10nM a 250nM), L-744,832 (1µM a 100µM), Everolimus (10nM a 50 µM), 5-Fluorouracilo (25µM to 1mM) e Doxorrubicina (10ng/mL a 500ng/mL) durante 72h.

Para avaliar os possíveis efeitos sinérgicos da utilização dos novos fármacos (Everolimus, L-777,832 e MG-262) em combinação entre si e/ou com a terapia convencional (Doxorrubicina e 5-Fluorouracilo), em comparação ao efeito do fármaco isolado utilizou-se concentrações inferiores ao IC50 de cada fármaco.

O *Alamar Blue* é um método colorimétrico/fluorimétrico para a análise da proliferação celular, baseado num ensaio metabólico que envolve a adição de um indicador redox fluorogénico à cultura celular (resazurina) (Perrot *et al*, 2003). A resazurina, que é um composto azul não fluorescente (forma oxidada), vai ser incorporada pelas células, actuando como um aceitador intermediário de electrões da cadeia respiratória mitocondrial ao nível do complexo IV (Perrot *et al*, 2003). Esta reacção redox é acompanhada de alteração de cor do composto, passando de azul índigo, não fluorescente, para rosa fluorescente (resorufina).

Esta alteração de cor pode ser facilmente medida por espectrofotometria ou espectrofluorimetria (Al-Nasiry *et al*, 2007; O'Brien *et al.*, 2000). Em particular, neste estudo, analisou-se a absorvância nos comprimentos de onda de 570nm (forma oxidada) e 600nm (forma reduzida), sendo a diferença proporcional às células viáveis. Podendo a viabilidade ser calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{[(A570\text{nm} - A600\text{nm})\text{Amostra}] - [(A570\text{nm} - A600\text{nm}) \text{Branco}]}{[(A570\text{nm} - A600\text{nm})\text{Controlo}] - [(A570\text{nm} - A600\text{nm}) \text{Branco}]} \times 100$$

Estes testes são utilizados para avaliar a viabilidade/proliferação das linhas celulares durante o seu crescimento e manutenção e para avaliar os efeitos citotóxicos dos fármacos em teste.

## 2.4 - Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite a contagem e análise multiparamétrica de partículas biológicas em suspensão, baseada nas propriedades ópticas (dispersão de luz e emissão de fluorescência) apresentadas pelas mesmas. Assim, esta técnica baseia-se na dispersão de luz, frontal (*forward scatter* – FSC) e lateral (*side scatter* – SSC), emitida por uma fonte de luz (laser de árgon), e pela fluorescência emitida por fluorocromos ligados a anticorpos monoclonais ou outros compostos (Bernas, T., 2006).

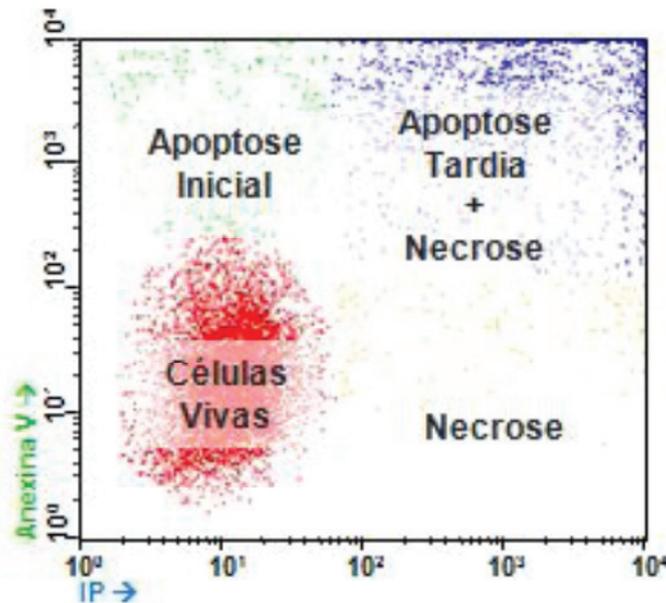
Para a citometria de fluxo, as células foram, também mantidas em cultura durante 24h antes da adição de fármaco, numa concentração de 75.000 células/cm<sup>2</sup>.

As células foram incubadas durante 48h com cada fármaco em estudo, quer no seu IC50, quer na concentração que foi utilizada na terapia combinada. Para além disso, também se incubou as células com a combinação dos vários fármacos.

### 2.4.1 - Análise da morte celular por dupla marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo

Para avaliar o tipo de morte celular induzida pela acção dos fármacos nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular, utilizou-se a citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação das células com Anexina V, conjugada com uma sonda fluorescente de isotiocianato de fluoresceína (Anexina V-FITC), e iodeto de propídeo. Esta técnica permite-nos distinguir as células viáveis das não viáveis, e dentro destas as que estão em apoptose inicial, em apoptose tardia/necrose e necrose (Darzynkiewicz *et al.*, 1997). O iodeto de propídeo (IP) entra nas células que têm alteração da permeabilidade membranar, intercala-se no ADN e emite fluorescência, permitindo a sua identificação. Assim, este intercalante do ADN marca as células que se encontram em apoptose tardia e necrose. Por sua vez, a Anexina V liga-se ao fosfolípido membranar fosfatidilserina, normalmente presente no folheto interno da membrana, mas que é exteriorizado numa fase inicial da apoptose, quando ainda há a integridade membranar. Deste modo, quando as células são incubadas com estes dois fluorocromos, as células em apoptose inicial, e por conseguinte com a membrana

íntegra, coram com a Anexina V (positivas) e não pelo IP (negativas). Pelo contrário, as células em apoptose tardia e/ou necrose ficam marcadas por ambos os fluorocromos (Anexina V e IP positivas) enquanto que a marcação só com iodeto de propídeo identifica as células em necrose (Anexina V negativas e IP positivas) (Figura 6).



**Figura 6 – Dot plot representativo da análise da viabilidade e morte celular por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação das células com Anexina V e Iodeto de propídeo (IP).** A vermelho está representado a distribuição das células viáveis (Anexina V-/IP-), a verde as células em apoptose inicial (Anexina V+/IP-) e em azul as células em apoptose tardia/necrose (Anexina V+/IP+). A amarelo estão as células em necrose (Anexina V-/IP+).

Para este estudo, o meio de cultura das células, nas respectivas condições a analisar, foi recuperado para um falcon e as células são lavadas com PBS, que também é recuperado para o mesmo falcon. Seguidamente, as células foram tripsinizadas e recuperadas para o mesmo falcon e centrifugadas a 750xg durante 5 minutos. Após esta centrifugação, aspirou-se o meio e adicionou-se 1 mL de PBS, sendo este passo repetido. Seguidamente ressuspendeu-se as células em 100µL de tampão de ligação da anexina V (*Annexin V-binding buffer*) e adicionou-se 5 µL de anexina V-FITC e 1 µL de PI, e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente no escuro, após os quais se adicionou mais 400 µL de tampão de ligação da anexina V (*Annexin V-binding buffer*). Após este procedimento as células foram analisadas num citómetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany), que está equipado com um laser

de árgon, utilizando um comprimento de onda de 525nm para a anexina V e 610nm para PI.

Os resultados são apresentados em percentagem de células viáveis, em apoptose inicial, apoptose tardia/necrose e necrose.

## **2.4.2-Análise de mecanismos envolvidos na citotoxicidade induzida pelos fármacos**

Para tentarmos perceber o mecanismo envolvido no efeito antiproliferativo ou citotóxico dos fármacos, analisou-se por citometria de fluxo a expressão do regulador apoptótico *BCL-2-associated X protein* (BAX), dos conjugados de ubiquitina, das laminas A/C, dos níveis de ciclina D1 e do NF- $\kappa$ B

### **2.4.2.1- Análise da expressão de BAX**

A família de proteínas *B cell lymphoma-2* (BCL-2) são as proteínas mais proeminentes na via intrínseca da apoptose, sendo que algumas destas proteínas tem uma actividade pró-apoptótica, tal como BAX, *BCL-2 antagonist/killer 1* (BAK), *BH3-interacting domain death agonist* (BID), e outras anti-apoptóticas, BCL-2, *B-cell lymphoma extra large* (BCL-XL) e *myeloid cell leukaemia differentiation protein 1* (MCL-1) (Ghobrial, I. *et al.*, 2005).

Assim, para se proceder ao estudo da expressão da proteína BAX por citometria de fluxo, que é uma proteína intracelular, aspirou-se o meio das células, lavadas de seguida com PBS e tripsinizou-se as células, que, posteriormente, foram centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos e lavadas com PBS duas vezes. Seguidamente, as células foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de Solução A (reagente de fixação da Immunotech) e incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente no escuro. Após a incubação, as células foram novamente centrifugadas a 300xg durante 5 minutos, aspirou-se o meio, e ressuspendeu-se as células com 100  $\mu$ L de Solução B (reagente de permeabilização da Immunotech) e 10  $\mu$ L do anticorpo monoclonal anti-BAX marcado com Ficoeritrina (PE). Incubou-se durante 15 minutos, à temperatura ambiente no escuro, após os quais, se adicionou 1mL de PBS e se centrifugou a 300xg durante 5

minutos. Após esta última centrifugação, adicionou-se 500 µL de PBS. Seguidamente as células foram analisadas no citómetro FACScalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany), que está equipado com um laser de árgon, utilizando um comprimento de onda de 610 nm para anti-BAX.

Utilizou-se o mesmo protocolo para avaliar a expressão de níveis de ciclina D1 (anti-ciclina D1-PE), lamina A/C (anti-lamina A/C-PE), conjugados de ubiquitina (anti-ubiquitina-FITC), e NF-kB fosforilado (anti-NF-kB f-PE).

Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF), que é proporcional aos níveis de expressão de cada molécula ligada ao respectivo anticorpo.

#### **2.4.2.2- Análise da expressão de Ciclina D1**

A ciclina D1 é uma proteína envolvida na passagem da fase G1 para a fase S, assim é possível averiguarmos se os fármacos utilizados são capazes de interferir com o ciclo celular, através do bloqueio de uma das vias de sinalização envolvidas na proliferação e progressão do ciclo celular.

O mesmo protocolo de 4.2.1 foi seguido para a avaliação da expressão de ciclina D1, utilizando-se neste ensaio um anticorpo anti-ciclina D1 marcado com PE.

#### **2.4.2.3- Análise da expressão de laminas**

As laminas são moléculas que para serem activadas requerem a acção da enzima farnesiltransferase. Esta enzima transforma as prelaminas em laminas, sendo esta acção bloqueada pela presença dos inibidores farnesil-transferase. A análise da expressão das laminas na ausência e na presença do inibidor L-744,832 por citometria de fluxo permite inferir relativamente à actuação do composto sobre os seus alvos moleculares.

O mesmo protocolo de 4.2.1 foi seguido para a avaliação da expressão de laminas, utilizando-se aqui um anticorpo anti-laminas marcado com PE.

#### **2.4.2.4- Análise da expressão conjugados de ubiquitina**

Os conjugados de ubiquitina referem-se às proteínas marcadas para degradação no proteasoma, ou seja proteínas que sofreram ubiquitinação. Se existir inibição da actividade do proteasoma, pelo MG-262, estas proteínas ubiquitinadas acumular-se-ão no citoplasma celular, o que pode ser detectado por citometria.

O mesmo protocolo de 4.2.1 foi seguido para a avaliação da expressão de conjugados de ubiquitina, utilizando-se aqui um anticorpo anti-ubiquitina marcado com FITC.

#### **2.4.2.5- Expressão de NF-kB**

A expressão do NF-kB é regulada pelo proteasoma, uma vez que o inibidor do NF-KB, o Ikb, que sequestra no NF-kB no citoplasma, é degradado neste complexo enzimático. Avaliou-se, em particular, a expressão do NF-kB fosforilado, pois esta fosforilação só ocorre após a degradação do Ikb e é essencial para a sua translocação para o núcleo.

Assim, determinou-se a expressão do NF-kB fosforilado, por citometria de fluxo, com recurso a um anticorpo anti-NF-kBf, marcado com PE, seguindo o mesmo protocolo de 4.2.1.

#### **2.4.3- Análise do Ciclo Celular**

O efeito antiproliferativo dos fármacos foi avaliado pela análise do ciclo celular, uma vez que a quantificação do conteúdo de ADN nos permite conhecer a distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular:  $G_0/G_1$ , S e  $G_2/M$  (Sarmiento-Ribeiro, A., 2000).

Tal é conseguido pelo uso de iodeto de propídeo (IP), o qual se intercala no ADN e emite fluorescência. Esta fluorescência, detectada por citometria de fluxo, é proporcional à quantidade de IP que se intercalou no material genético das células e, portanto, proporcional à quantidade de ADN presente em cada uma. Deste modo, é possível distinguir células em fase  $G_0/G_1$  e em  $G_2/M$ , pois estas últimas têm o dobro de quantidade de ADN, que se replicou em fase S, com quantidade intermédia de ADN

(Sarmiento-Ribeiro, A., 2000 e Krishan, A., 1975). Além disso, é ainda possível distinguir células que se encontram em apoptose, nas quais ocorreu fragmentação do material genético e que apresentam, por isso, menor conteúdo de ADN (pico pré-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) (Sarmiento-Ribeiro, A., 2000).

Deste modo, findo um período de incubação de 48h recolheram-se as células, para cada condição experimental, e lavou-se com PBS por centrifugação durante 5min a 1000 xg. Seguidamente, as células foram incubadas, durante 30 minutos, a 4°C, com 200 µl de etanol a 70%, que foi adicionado por pipetagem lenta e em agitação. Findo o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 300 xg, durante 5 minutos. Após a lavagem, as células foram ressuspensas e incubadas em 500 µl da solução de iodeto de propídeo e RNASE (PI/RNASE) (Immunostep), durante 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Seguidamente, os resultados relativos ao conteúdo de ADN foram analisados recorrendo a um citómetro de fluxo, FACSCalibur (BD Bioscience), e ao programa ModFit LTTM.

Os resultados são expressos em percentagens de células em cada fase do ciclo celular.

## **2.5 - Análise Morfológica das células**

A análise das características morfológicas das células HepG2, incubadas na ausência e na presença dos fármacos anticancerígenos, foi efectuada por microscopia óptica após a realização de esfregaços de células e coloração dos mesmos com corante de *May- Grünwald-Giemsa*. Esta técnica permitiu-nos confirmar o tipo de morte celular induzida pelos fármacos com base nas características morfológicas típicas de necrose e apoptose. Para o efeito os esfregaços efectuados foram visualizados utilizando o microscópio óptico Leitz Dialux 20 com uma câmara digital Moticam 2300, para obtenção das imagens. Segundo esta metodologia, os esfregaços de células são preparados a partir da recolha de células previamente incubadas, num período de 48h, na ausência e na presença de fármacos, nas condições experimentais determinadas.

Assim, foram recolhidas 500 mil células lavadas por centrifugação com tampão fosfato (PBS) por um período de 5min a 1000 xg. Findo o tempo de centrifugação o

sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 10 $\mu$ L de soro bovino fetal (FBS), para a realização dos esfregaços. Posteriormente, os esfregaços obtidos anteriormente foram corados com solução de *May-Grünwald* (preparada em 0.3% de metanol e diluída de 1:1 com água destilada, na altura da sua utilização). De seguida foi adicionada solução de *Giemsa* (1gr de corante *Giemsa*, 66mL de glicerol e 66mL de metanol, diluída numa razão de 1 para 8 com água destilada, na altura da utilização) por um período de 15 minutos. Por fim, os esfregaços foram lavados com água destilada e secos ao ar, sendo a morfologia celular analisada por microscopia óptica e posteriormente fotografada.

## 2.6 - Análise estatística

O tratamento estatístico dos resultados obtidos nas diferentes condições em estudo foi realizada recorrendo à análise de variância estatística de dois ou mais grupos em simultâneo pelo teste ANOVA, tendo-se utilizado o teste de Turkey para a comparação entre todas as condições em estudo.

Os resultados foram analisados utilizando os programas GraphPad 5.0, sendo que em todas as análises efectuadas se considerou um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ), apresentando-se os dados sobre a forma de média  $\pm$  desvio padrão.



## Capítulo 3. Resultados



### **3.1- Avaliação do potencial terapêutico dos fármacos: curvas dose-resposta**

Para avaliar o potencial terapêutico do inibidor do mTOR (Everolimus), da farnesiltransferase (L-744,832) e do proteasoma (MG262) na linha celular de Carcinoma Hepatocelular, as células HepG2, procedeu-se à aferição da viabilidade celular, através do teste do *Alamar Blue*, na ausência (controlo) e presença do fármaco, em várias concentrações durante 72h, quer em monoterapia quer em combinação com terapia convencional (Doxorrubicina e 5-FU) ou entre eles.

#### **3.1.1 - Avaliação do potencial terapêutico dos fármacos utilizados em monoterapia.**

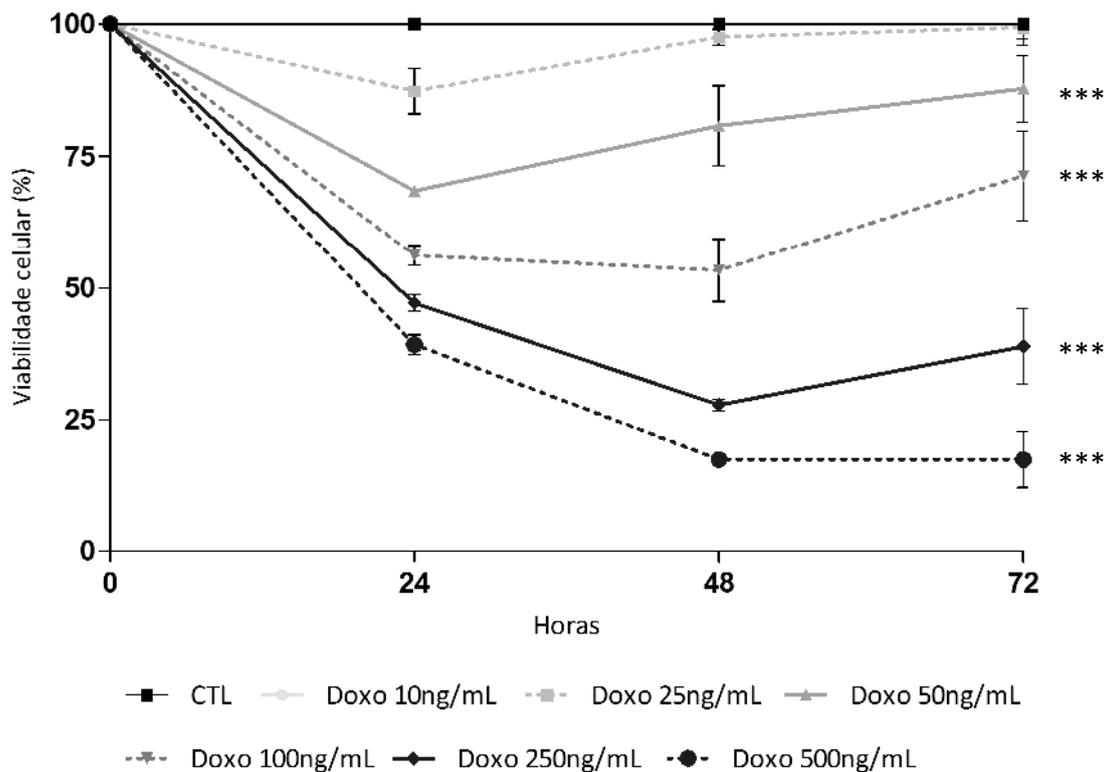
Inicialmente, avaliou-se o potencial terapêutico dos fármacos utilizados, através do seu efeito na viabilidade das células HepG2, recorrendo a curvas dose-resposta. Estas curvas permitem-nos obter o IC50 de um determinado fármaco para a linha celular utilizada neste estudo, ou seja, saber a concentração de fármaco capaz de reduzir a viabilidade das células em 50%. A partir da determinação do IC50, podemos avançar para uma estratégia de terapêutica combinada, utilizando cada um dos fármacos em doses inferiores ao respectivo IC50.

##### **3.1.1.1 - Curvas dose-resposta da Doxorrubicina e 5-Fluoruracilo em monoterapia em células HepG2.**

Numa primeira fase, foi avaliado o efeito citotóxico dos fármacos anticancerígenos convencionais, doxorrubicina e 5-Fluorouracilo nas células HepG2 (Figura 7) e determinado o IC50 nestas células para posterior aplicabilidade em terapia combinada.

Na Figura 7, pode observar-se que há diminuição da viabilidade celular de forma dependente da dose e do tempo de exposição à Doxorrubicina. De facto, o IC50, às 24h, é de 250ng/mL, e às 48h, de 100ng/mL.

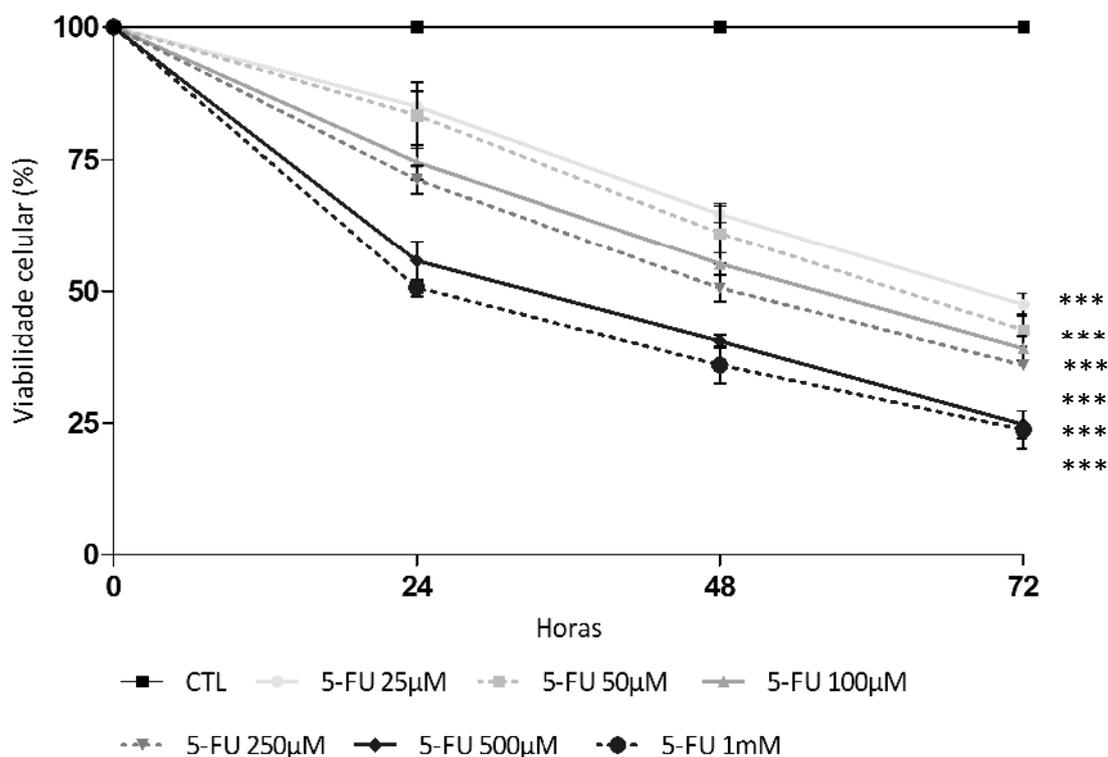
No entanto, nas células tratadas com o fármaco Doxorrubicina nas concentrações mais baixas (10 e 25 ng/mL) ocorre recuperação da viabilidade celular após as 24h de tratamento, apesar da concentração de 10ng/mL não ser estatisticamente significativa. No entanto, para concentrações mais elevadas, com excepção da concentração mais elevada de 500ng/mL, esta recuperação é menos acentuada e ocorre mais tardiamente (às 48h).



**Figura 7 - Efeito da Doxorrubicina na viabilidade das células HepG2.** As células HepG2 foram incubadas a uma densidade inicial de 75.000 células/cm<sup>2</sup>, durante 72 horas, com diferentes concentrações de fármaco, como indica o gráfico. Após cada 24 horas de incubação, realizou-se o ensaio do *Alamar Blue*, como descrito nos materiais e métodos. Os resultados são apresentados em percentagem de viabilidade celular em relação ao controlo (células sem fármaco) e representam a média ± desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. Observou-se algumas diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições em relação ao controlo (\*\*\*, p<0.001, teste ANOVA).

Na figura 8, podemos observar que o 5-FU também induz diminuição da viabilidade celular de forma dependente da dose e do tempo de exposição. O IC50,

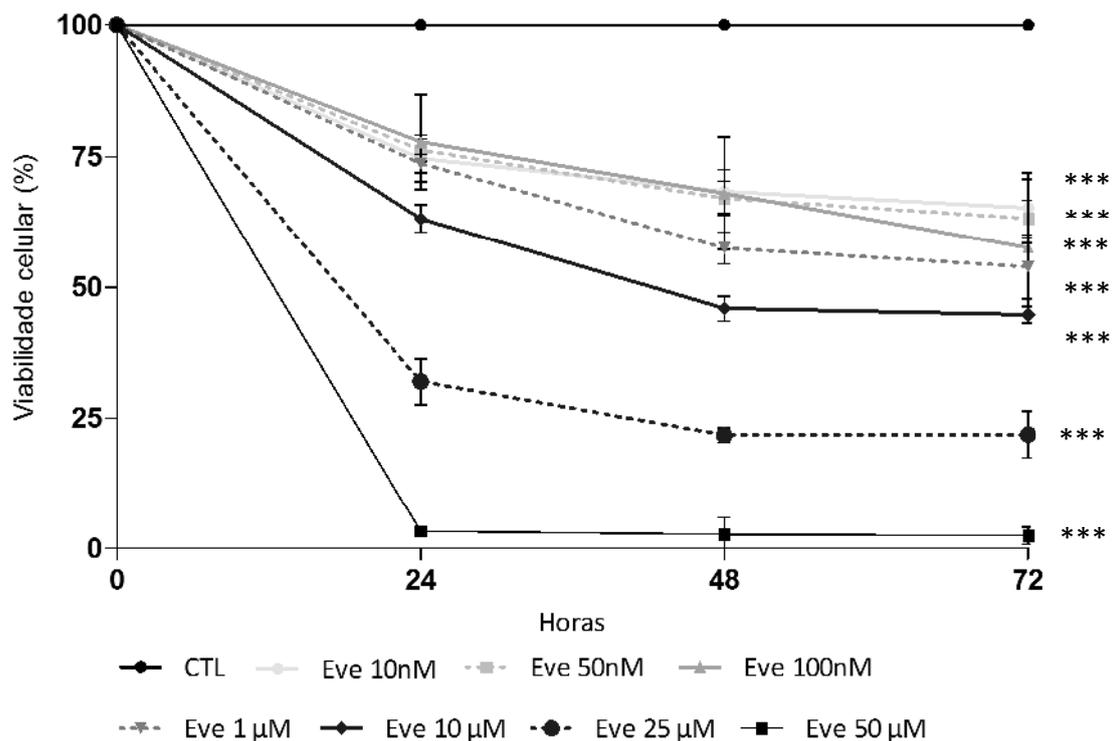
apenas obtido após 48h de incubação, é de cerca de 500  $\mu\text{M}$ , enquanto que às 72h este é de aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ .



**Figura 8- Efeito do 5- FU na viabilidade das células HepG2.** As células HepG2 foram incubadas a uma densidade inicial de 75.000 células/cm<sup>2</sup>, durante 72 horas, com diferentes concentrações de fármaco, como indica o gráfico. Após cada 24 horas de incubação, recolheram-se as células e efectuou-se o ensaio do *Alamar Blue*, como descrito nos materiais e métodos. Os resultados são apresentados em percentagem de viabilidade celular em relação ao controlo (células sem fármaco) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. Observou-se algumas diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições em relação ao controlo (\*\*\*,  $p < 0.001$ , teste ANOVA).

### 3.1.1.2 - Curvas dose-resposta do Everolimus, L-744,832 e MG-262, em monoterapia.

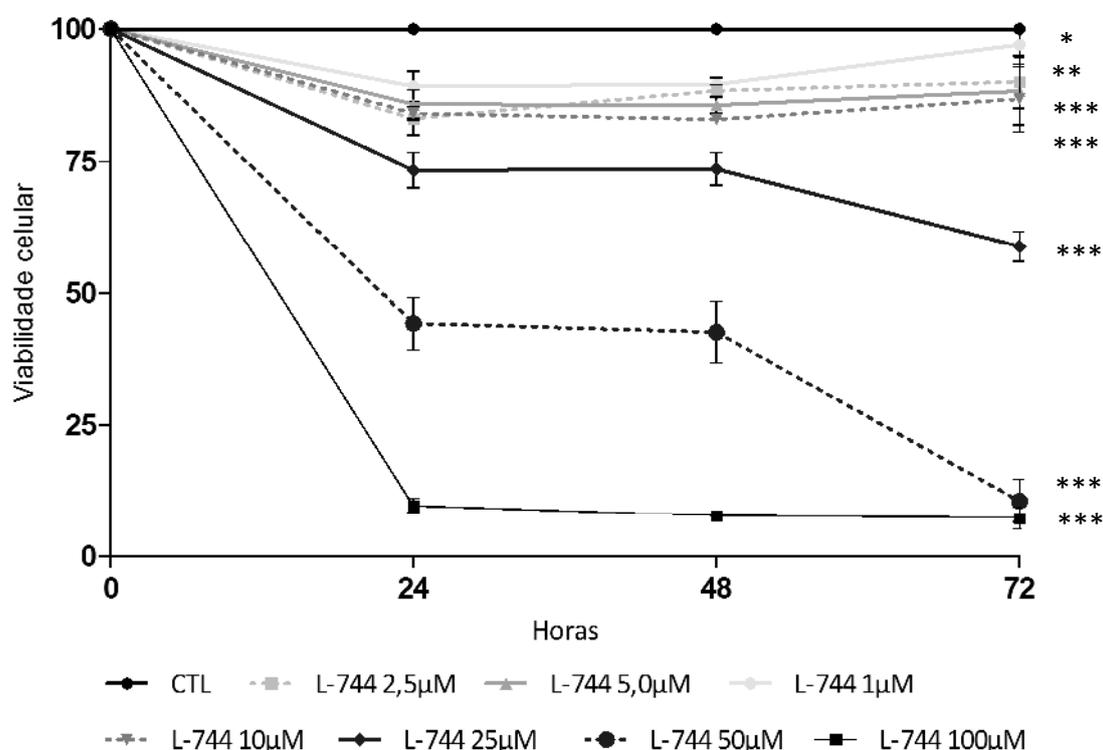
Como se pode observar na Figura 9, verifica-se diminuição da viabilidade celular de forma dependente da dose e do tempo de exposição ao Everolimus, sendo o IC50 às 24h de 25  $\mu\text{M}$  e às 48h de 10  $\mu\text{M}$ . Nas células tratadas com 50 $\mu\text{M}$  observa-se redução acentuada da viabilidade celular de cerca de 100%, após 24h de incubação, que se mantém até às 72h.



**Figura 9- Avaliação da viabilidade celular após incubação das células HepG2 com Everolimus.** As células HepG2 foram incubadas a uma densidade inicial de 75.000 células/cm<sup>2</sup>, durante 72 horas, com diferentes concentrações de fármaco, como indica o gráfico. Após cada 24 horas de incubação, realizou-se o ensaio do Alamar Blue, como descrito nos materiais e métodos. Os resultados são apresentados em porcentagem de viabilidade celular em relação ao controlo (células sem fármaco) e representam a média ± desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. Observou-se diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições em relação ao controlo (\*\*\*, p<0.001, teste ANOVA).

Na Figura 10, está representado o efeito do inibidor da farnesiltransferase, L-744,832, na viabilidade das células HepG2. Como podemos verificar o L-744,832 utilizado induz diminuição da viabilidade celular de forma dependente da dose e do tempo de exposição, sendo o IC50 às 24h e 48h de 50 µM, enquanto às 72h este é alcançado com uma concentração de fármaco próxima de 25 µM. Na concentração de 100µM observa-se redução acentuada da viabilidade celular, aproximadamente de 100%, logo às 24h, que se mantém até às 72h. Em baixas concentrações (1, 2.5, 5 e 10µM), a partir das 48h, ocorre uma certa recuperação na viabilidade celular, chegando a haver recuperação total da viabilidade com a concentração 1µM às 72h.

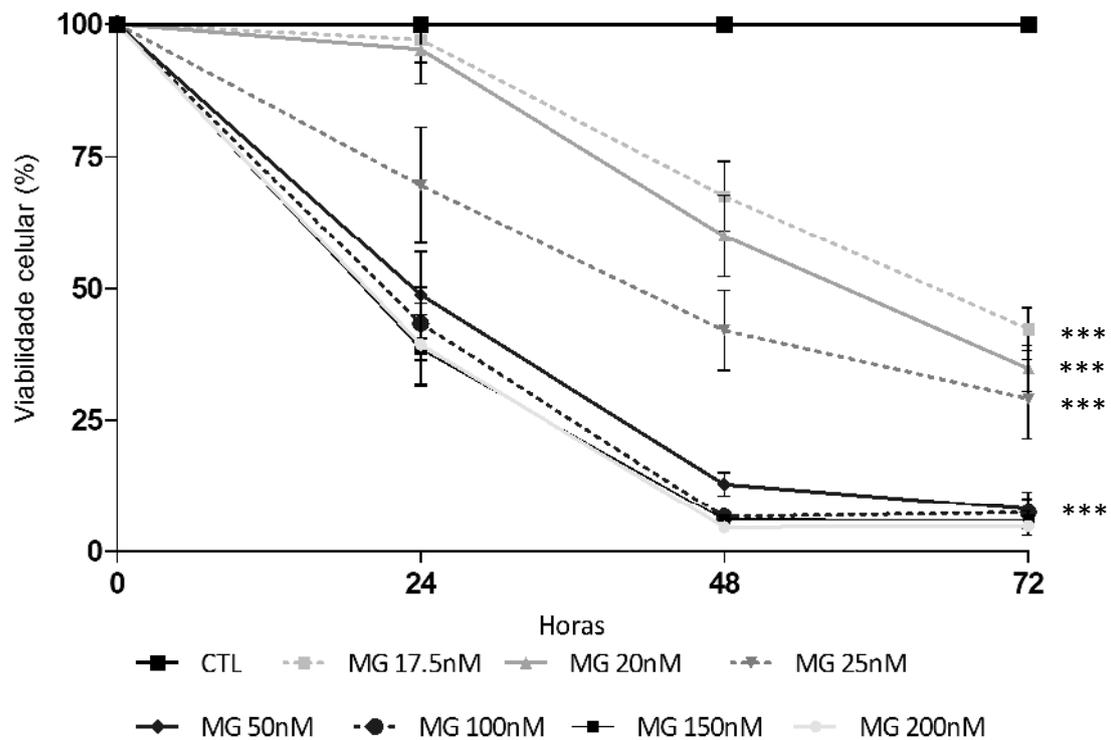
Isto poderá sugerir que, em baixas concentrações o efeito do L-744,832 é reversível ao longo do tempo.



**Figura 10- Efeito do L-744,832 na viabilidade das células HepG2.** As células HepG2 foram incubadas a uma densidade inicial de 75.000 células/cm<sup>2</sup>, durante 72 horas, com diferentes concentrações de fármaco, como indica o gráfico. Após cada 24 horas de incubação, realizou-se o ensaio do *Alamar Blue*, como descrito nos materiais e métodos. Os resultados são apresentados em percentagem de viabilidade celular em relação ao controlo (células sem fármaco) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. Observou-se algumas diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições em relação ao controlo (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , teste ANOVA).

Quando as células são expostas ao inibidor de proteasoma, MG-262, verifica-se igualmente diminuição da viabilidade celular de forma dependente da dose e do tempo de exposição, como se pode observar na Figura 11. Assim, e apesar da diminuição da viabilidade, ocorrer logo às 24h, atingindo-se o IC50 quando as células são tratadas com MG-262 na concentração de 100 nM, às 48h, 25 nM deste fármaco são suficientes para atingir o IC50. Além disso, após 48h de incubação, para concentrações superiores a 100 nM de MG-262, este tem um efeito semelhante,

reduzindo a viabilidade das células para próximo dos 5%, independentemente da concentração utilizada.

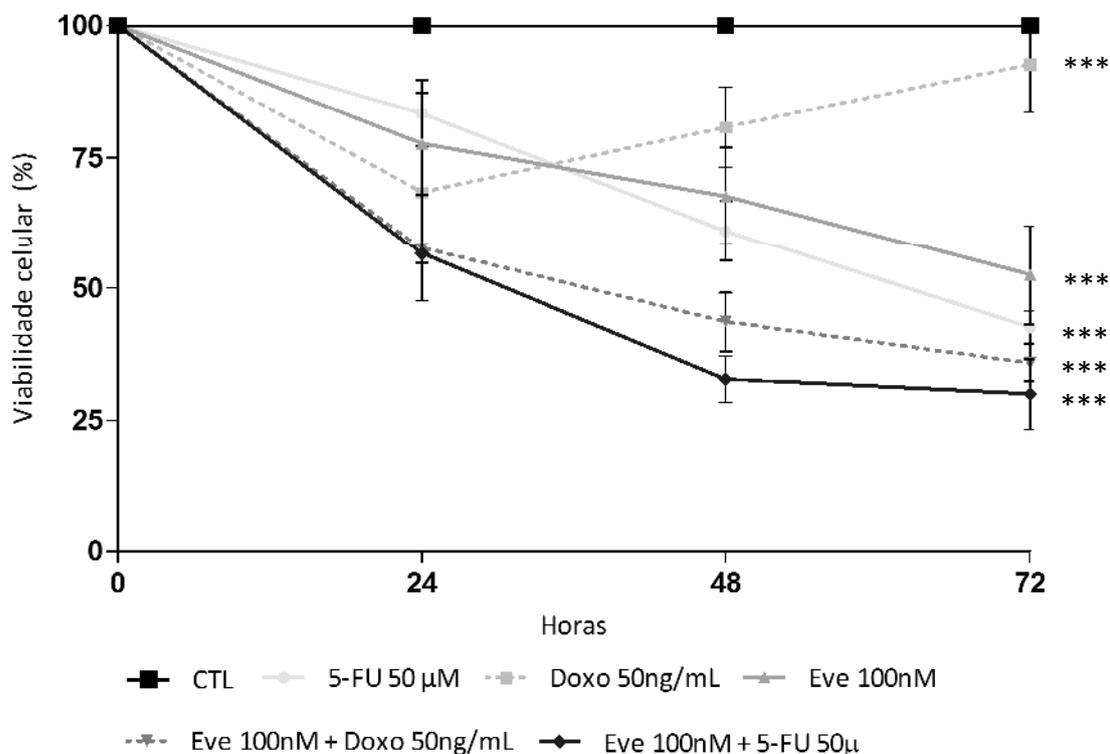


**Figura 11- Efeito do MG-262 na viabilidade das células HepG2.** As células HepG2 foram incubadas a uma densidade inicial de 75.000 células/cm<sup>2</sup>, durante 72 horas, com diferentes concentrações de fármaco, como indica o gráfico. Após cada 24 horas de incubação, realizou-se o ensaio do *Alamar Blue*, como descrito nos materiais e métodos. Os resultados são apresentados em percentagem de viabilidade celular em relação ao controlo (células sem fármaco) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. Observou-se diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições em relação ao controlo (\*\*\*,  $p < 0.001$ , teste ANOVA).

### 3.1.2 - Avaliação do potencial terapêutico dos fármacos dirigidos a alvos moleculares em combinação com fármacos convencionais ou entre si.

Após a determinação do IC<sub>50</sub> para os fármacos utilizados neste estudo, Everolimus, L-744,832, MG-262, Doxorubicina e 5-Fluorouracilo, em monoterapia, avaliou-se ainda o efeito da combinação destes compostos na viabilidade celular de forma a diminuir a concentração dos mesmos e verificar uma possível potenciação dos seus efeitos.

Para o Everolimus as combinações consistiram na combinação do Everolimus com Doxorrubicina, ou 5-FU, ou L-744,832 e/ou MG-262, sendo que este tipo de esquema foi repetido para o L-744,832 e MG-262.

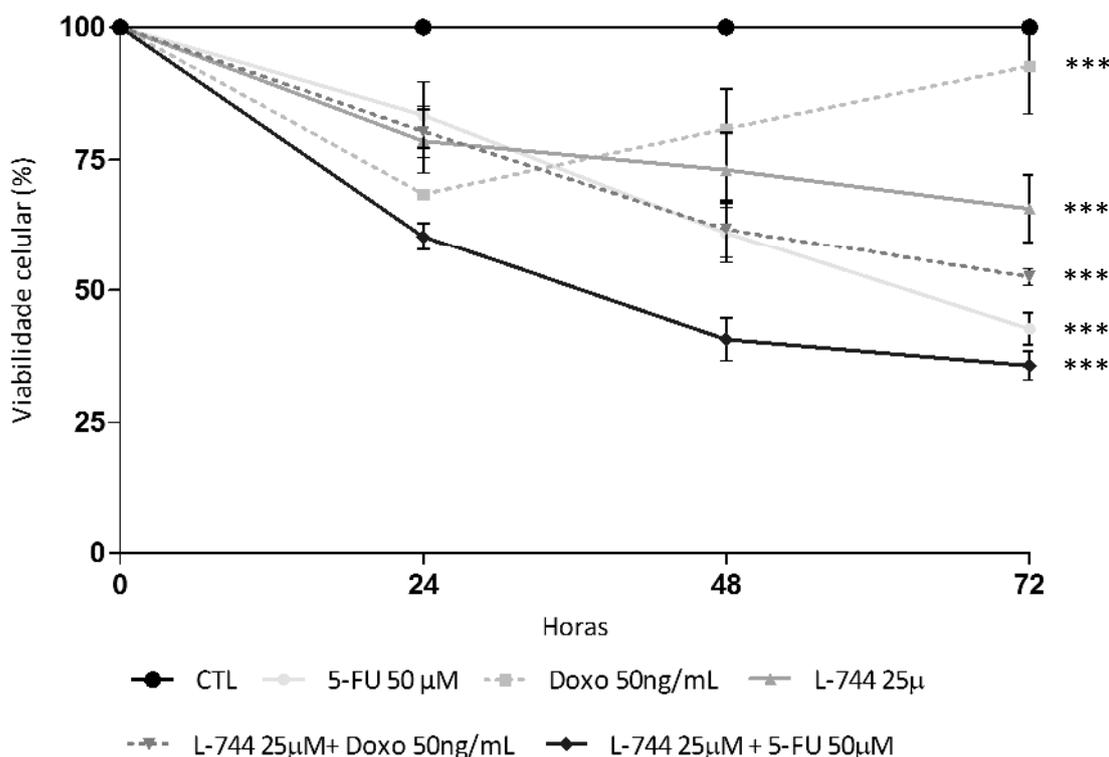


**Figura 12- Efeito da combinação de Everolimus com Doxorrubicina e 5-FU na viabilidade celular das células HepG2.** As células HepG2 foram incubadas a uma densidade inicial de 75.000 células/cm<sup>2</sup>, durante 72 horas, com diferentes concentrações de fármacos, como indica o gráfico. Após cada 24 horas de incubação, realizou-se o ensaio do *Alamar Blue*, como descrito nos materiais e métodos. Os resultados são apresentados em percentagem de viabilidade celular em relação ao controlo (células sem fármaco) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. Observou-se diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições em relação ao controlo (\*\*\*,  $p < 0.001$ , teste ANOVA).

Como podemos observar na figura 12, a combinação do Everolimus com os fármacos anticancerígenos convencionais (Doxorrubicina e 5-FU) induz uma diminuição da proliferação celular. De salientar a combinação de Everolimus com Doxorrubicina, que além de ultrapassar a recuperação de viabilidade nas células tratadas com Doxorrubicina, potencia de forma clara o efeito deste fármaco relativamente ao efeito obtido em monoterapia, pois às 72h, a Doxorrubicina reduz apenas 5% da viabilidade celular e o Everolimus 45%, enquanto que em combinação há

uma redução de 65%, ocorrendo um efeito sinérgico. Por seu lado, a combinação de Everolimus com 5-FU produz uma redução de viabilidade de 75%, no entanto o 5-FU isolado causa uma redução de 55%, o que indica não ocorrer um efeito sinérgico.

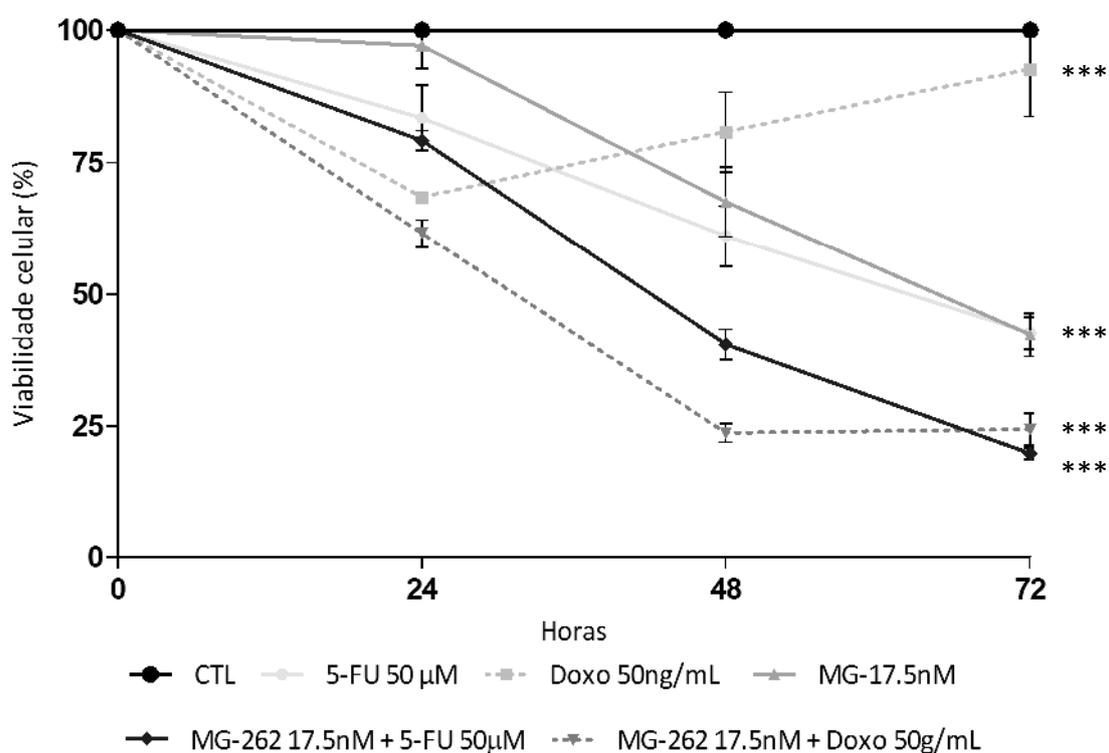
A combinação do inibidor da farnesiltransferase com as terapêuticas convencionais induziu uma diminuição da viabilidade dependente do tempo e dos fármacos utilizados na associação terapêutica, como se pode observar na figura 13.



**Figura 13- Efeito da combinação de L-744,832 com Doxorrubicina e 5-FU na viabilidade das células HepG2.** As células HepG2 foram incubadas a uma densidade inicial de 75.000 células/cm<sup>2</sup>, durante 72 horas, com diferentes concentrações de fármacos, como indica o gráfico. Após cada 24 horas de incubação, realizou-se o ensaio do *Alamar Blue*, como descrito nos materiais e métodos. Os resultados são apresentados em percentagem de viabilidade celular em relação ao controlo (células sem fármaco) e representam a média ± desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. Observou-se diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições em relação ao controlo (\*\*\*, p<0.001, teste ANOVA).

Apesar da combinação do L-744,832 com o 5-FU parecer ser mais eficaz do que quando em associação com a Doxorrubicina, pelo menos após 24h de incubação, tal não se verifica no final das 72 horas de incubação. De facto, após 72h, nas células

tratadas com a associação do IFT com 5-FU o efeito é próximo do observado nas células tratadas com o 5-FU isolado, pois observa-se uma redução de 65% e 55%, respectivamente, sendo que esta associação não revelou um efeito sinérgico. Por outro lado, nas células tratadas com a combinação do IFT com a Doxorrubicina, observa-se redução da viabilidade celular de aproximadamente 45%, enquanto nas células tratadas com os fármacos em monoterapia esta redução é apenas de 5% para a Doxorrubicina e de aproximadamente 25% para o IFT, o que corresponde a um efeito sinérgico (figura 13).



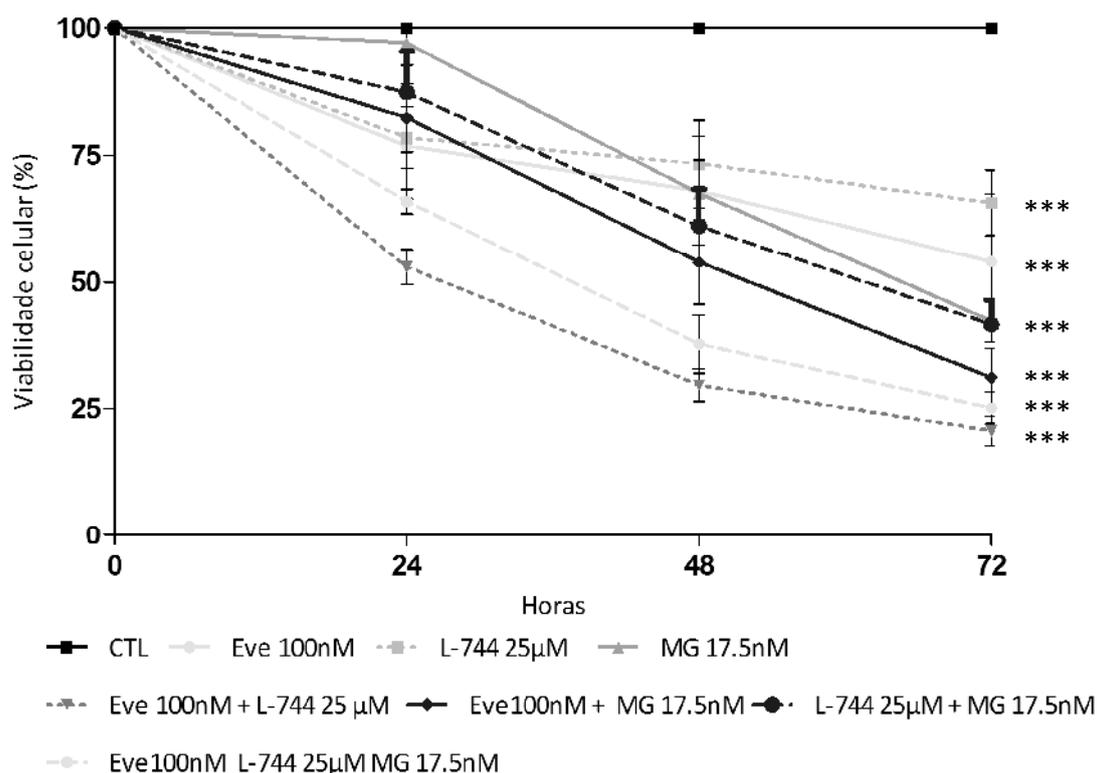
**Figura 14- Efeito da combinação de MG-262 com Doxorrubicina e 5-FU na viabilidade das células HepG2.** As células HepG2 foram incubadas a uma densidade inicial de 75.000 células/cm<sup>2</sup>, durante 72 horas, com diferentes concentrações de fármacos, como indica o gráfico. Após cada 24 horas de incubação, recolheram-se as células e efectuou-se o ensaio do *Alamar Blue*, como descrito nos materiais e métodos. Os resultados são apresentados em percentagem de viabilidade celular em relação ao controlo (células sem fármaco) e representam a média ± desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. Observou-se diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições em relação ao controlo (\*\*\*, p<0.001, teste ANOVA).

Na figura 14 está representado o efeito da associação do inibidor do proteasoma, MG-262, com os fármacos Doxorrubicina e 5-FU na viabilidade das células

HepG2. Tal como se verificou nas associações anteriores, observa-se uma diminuição da viabilidade que depende dos fármacos utilizados e do tempo de incubação. Como se pode verificar, após 72h de incubação, para ambas as combinações, existe uma redução da viabilidade celular muito semelhante (para valores próximos dos 20%). Além disso observa-se uma redução da viabilidade de 80%, aproximadamente, relativamente ao obtido com os fármacos administrados isoladamente (redução de 5% com Doxorrubicina e de 55% com 5-FU e MG-262). Contudo, este efeito é mais significativo na combinação de MG-262 com a Doxorrubicina, pois houve um efeito sinérgico.

Realizou-se ainda a combinação entre os vários fármacos dirigidos a novos alvos moleculares, inibidores do mTOR (Everolimus), da farnesiltransferase (L-744,832) e do proteasoma (MG-262). Na figura 15, podemos observar que nas combinações entre os novos fármacos, existe uma diminuição da viabilidade para todas as combinações, sendo que o esquema terapêutico que causa maior redução de viabilidade é a combinação de Everolimus com L-744,832, embora os valores da redução de viabilidade da combinação dos três fármacos apresentem uma curva muito parecida, tanto em forma como em valores.

Como podemos observar na figura 15, ocorre uma redução de viabilidade celular de 45%, 25% e 55% para o Everolimus, L-744,832 e MG-262, respectivamente. A combinação de Everolimus com L-744,832 causa uma redução de 80% na viabilidade celular, ocorrendo efeito sinérgico. Para a combinação do Everolimus com o MG-262, observa-se uma redução de 65% na viabilidade, não apresentando efeito sinérgico. A associação do L-744,832 com o MG-262 não parece trazer nenhum tipo de vantagem terapêutica, pois a redução de viabilidade celular é de 55%, que é a mesma que a do MG-262 em monoterapia. A associação dos três fármacos, Everolimus, L-744,832 e MG-262, causa uma redução de viabilidade celular de 75%, não apresentando, também, efeito sinérgico.



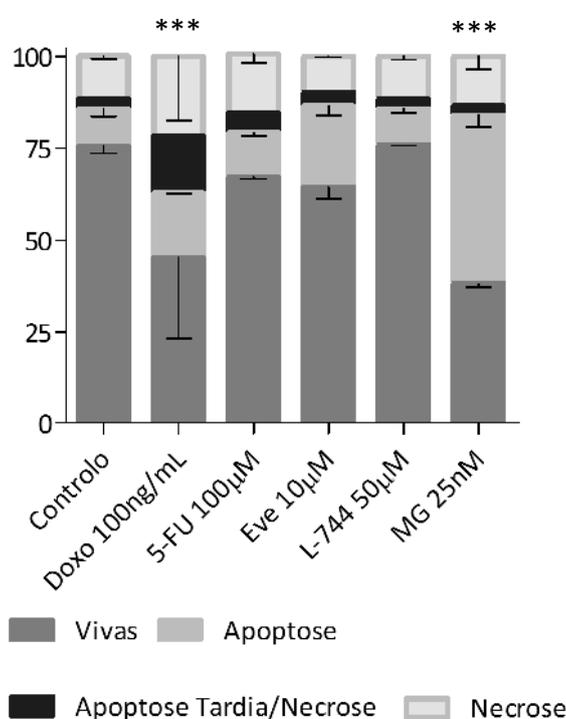
**Figura 15- Efeito da combinação dos três fármacos em estudo, na viabilidade das células HepG2.** As células HepG2 foram incubadas a uma densidade inicial de 75.000 células/cm<sup>2</sup>, durante 72 horas, com diferentes concentrações de fármacos, como indica o gráfico. Após cada 24 horas de incubação, realizou-se o ensaio do *Alamar Blue*, como descrito nos materiais e métodos. Os resultados são apresentados em percentagem de viabilidade celular em relação ao controlo (células sem fármaco) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. Observou-se diferenças estatisticamente significativas entre diferentes as condições em relação ao controlo (\*\*\*,  $p < 0.001$ , teste ANOVA).

### 3.2- Avaliação dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade

A avaliação dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade mediada pelos diferentes fármacos em estudo, englobou o tipo de morte celular, recorrendo à citometria de fluxo, pela dupla marcação de Anexina V/Iodeto de Propídeo, e à microscopia óptica, e análise da expressão da proteína pró-apoptótica, BAX.

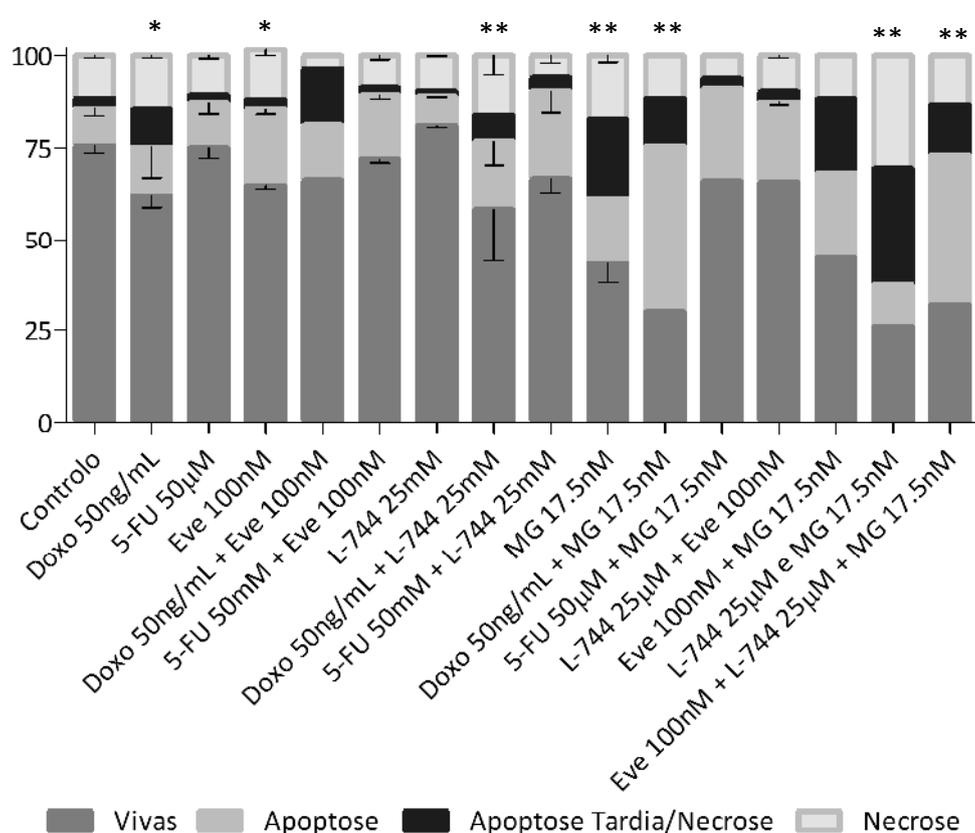
### 3.2.1- Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação de Anexina V/Iodeto de propídeo.

Os efeitos citotóxicos dos fármacos Everolimus, L-744,832 e MG-262, quer em monoterapia, quer em combinação com Doxorubicina e 5-FU, na linha celular HepG2, foram analisados por citometria de fluxo com recurso à dupla-marcação anexina V (AV)/Iodeto de Propídeo (IP). Esta técnica permite discriminar entre células viáveis e não viáveis através da alteração da permeabilidade e composição da membrana distinguindo-se se a morte celular ocorreu maioritariamente por apoptose ou necrose.



**Figura 16- Avaliação do tipo de morte celular induzida pelos fármacos Everolimus, L-744,832, MG-262, Doxorubicina e 5-FU em monoterapia, por citometria de fluxo.** As células HepG2 foram incubadas na ausência de fármacos (Controlo) e na presença dos fármacos nas concentrações referidas na figura (IC50). Após 48 horas de incubação as células foram marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídeo, de acordo como descrito na secção material e métodos, sendo possível distinguir células vivas, em apoptose inicial, em apoptose tardia/necrose e em necrose. Os resultados são expressos em percentagem e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 ensaios independentes. Observou-se algumas diferenças estatisticamente significativas entre as condições em relação ao controlo (\*\*\*,  $p < 0.001$ , teste ANOVA).

Na figura 16, apresenta-se os resultados relativos à viabilidade e do tipo de morte induzida pelos fármacos convencionais, Doxorrubicina e 5-FU, e da terapia dirigida a alvos moleculares, Everolimus, L-744,832 e MG-262, em concentrações sensivelmente iguais ao IC50, nas células HepG2. Como se pode observar o Everolimus e MG-262 induzem morte celular predominantemente por apoptose, à excepção do Doxorrubicina e do 5-FU, que é por necrose. No entanto, o L-744,832 não induz um aumento do efeito citotóxico. Sendo que, a percentagem de células que se encontram em apoptose e/ou necrose depende de cada fármaco.



**Figura 17- Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo recorrendo á dupla marcação AV/PI.** As células HepG2 foram incubadas na ausência de fármacos (Controlo) e na presença dos fármacos Everolimus, L-744,832 e MG-262, Doxorrubicina e 5-FU em monoterapia e em associação nas concentrações referidas na figura. Após 48 horas de incubação as células foram marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídeo, de acordo com o descrito na secção material e métodos, sendo possível células vivas, em apoptose inicial, em apoptose tardia/necrose e/ou necrose. Os resultados estão apresentados em percentagem (%) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 ensaios independentes. Observou-se algumas diferenças estatisticamente significativas entre as condições em relação ao controlo (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , teste ANOVA).

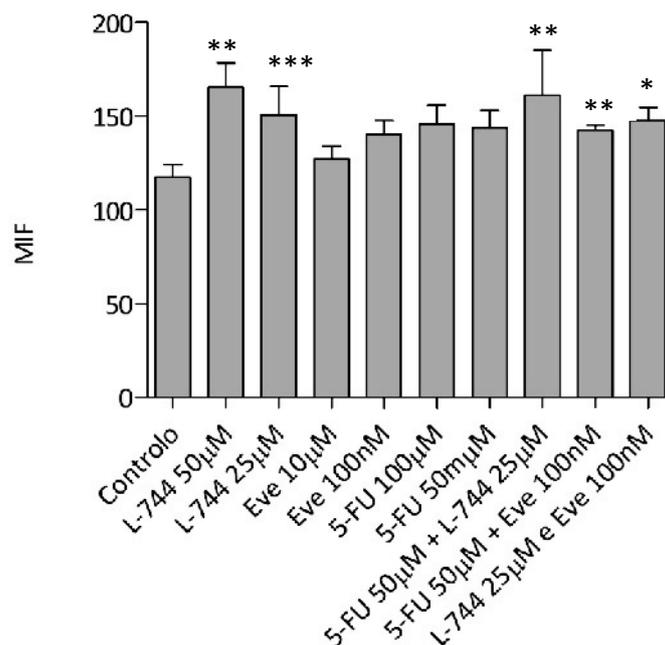
O efeito citotóxico das associações terapêuticas foi também avaliado por citometria de fluxo (Figura 17). Deste modo, os resultados obtidos mostram que o efeito citotóxico induzido pelos diferentes fármacos, Everolimus, L-744,832 e MG-262, bem como, Doxorrubicina e 5-FU, nas células HepG2, nas concentrações indicadas na legenda da figura 17, em monoterapia corresponde a uma percentagem inferior a 30% relativamente ao controlo, sendo que o tipo de morte celular é predominantemente por apoptose.

Quando se associou o Everolimus com a terapêutica convencional, Doxorrubicina e 5-FU, não se verificou a potenciação do efeito citotóxico, uma vez que a percentagem de células não-viáveis foi semelhante à observada com os diferentes fármacos em monoterapia, cerca de 10%. A combinação terapêutica do L-744,832 com 5-FU, revela um aumento de 15% na percentagem de células não viáveis, comparativamente à acção dos mesmos em monoterapia, apesar de não ser estatisticamente significativo. No entanto este resultado não se verifica para a combinação do L-744,832 com a Doxorrubicina (estatisticamente significativo). Por outro lado, o MG-262 combinado com a Doxorrubicina reduz a percentagem de células viáveis em 50%, o que não se verifica com o 5-FU.

Ao analisar-se as combinações das novas terapêuticas entre si, Everolimus, L-744,832 e MG-262, observa-se que a associação que tem um maior efeito citotóxico é a do L-744,832 com o MG-262, apresentando uma redução de 55% de células viáveis, maioritariamente por apoptose. As combinações do Everolimus com o L-744,832 e/ou MG-262 não apresentam um aumento do efeito citotóxico, em relação à acção destes fármacos em monoterapia.

### **3.2.2- Avaliação da expressão de BAX por citometria de fluxo.**

De forma a compreender os mecanismos envolvidos na morte celular por apoptose induzida pelos fármacos, avaliou-se a expressão de BAX, uma proteína pró-apoptótica envolvida na via intrínseca ou mitocondrial da apoptose. Os níveis de expressão da proteína BAX foram avaliados por citometria de fluxo recorrendo a um anticorpo anti-BAX conjugado com o fluorocromo PE (Figura 18).

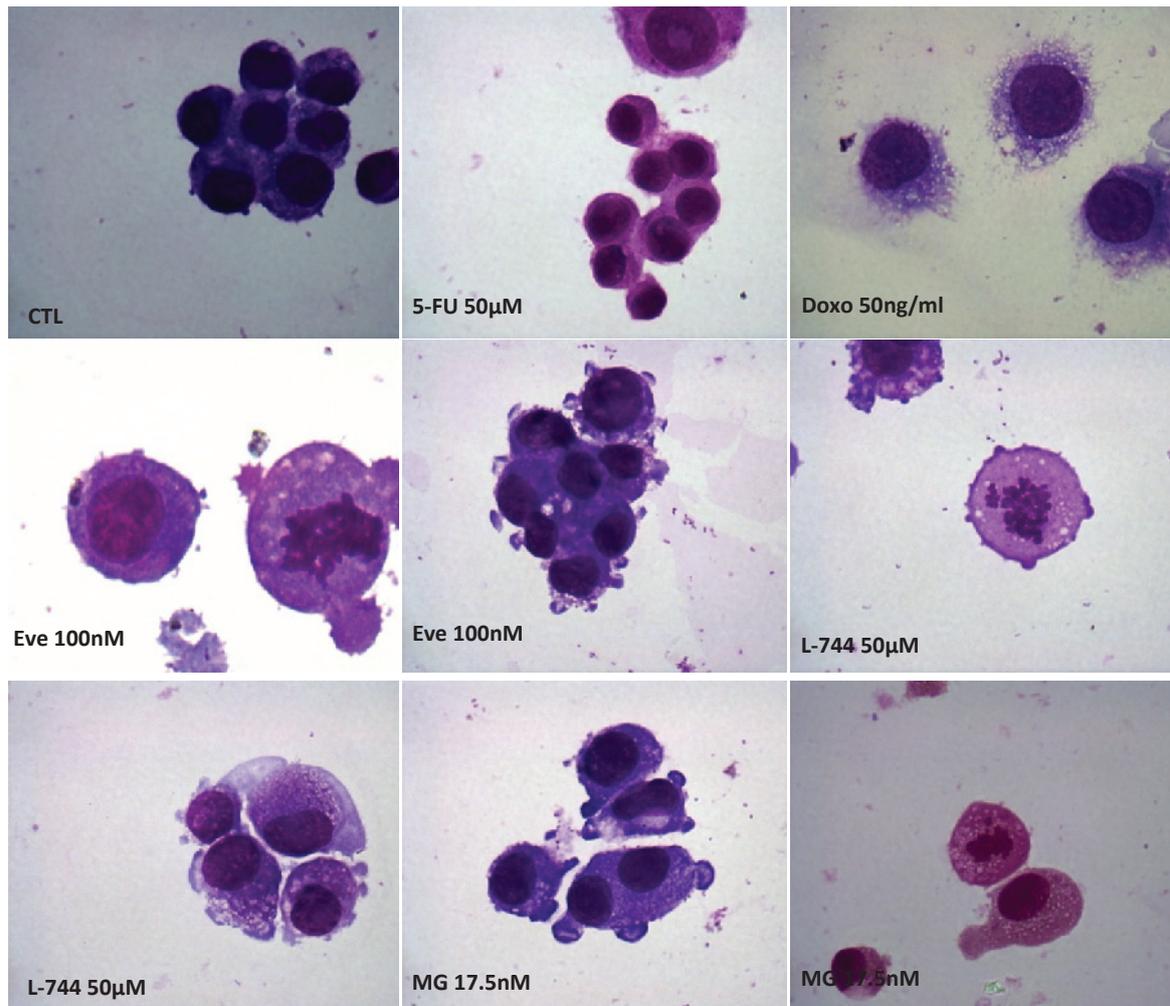


**Figura 18- Avaliação da expressão de BAX por citometria de fluxo.** As células HepG2 foram incubadas na ausência (Controlo) e na presença dos fármacos em estudo, Everolimus e L-744,832, quer em monoterapia, quer em combinação com o 5-FU, nas concentrações referidas na figura. A expressão intracelular de BAX, encontra-se expressa em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representa a média  $\pm$  desvio padrão de 2 ensaios independentes. Observou-se algumas diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições em relação ao controlo (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , teste ANOVA).

Tal como se pode observar, na figura 18, em todas as condições analisadas, ocorre um aumento da expressão de BAX, quer quando se utiliza os fármacos em monoterapia (sobretudo com o L-744,832) quer em terapêutica combinada (o L-744,832 com o 5-FU).

### 3.2.3- Avaliação da morte celular por microscopia óptica

Para confirmarmos o tipo de morte celular induzida pelos fármacos em estudo analisámos as características morfológicas das células por microscopia óptica, como representado na Figura 19.



**Figura 19- Análise do tipo de morte celular por microscopia óptica.** Foram efectuados esfregaços de células HepG2 tratadas na ausência (Controlo) e presença de Doxorubicina, 5-FU, Everolimus, L-744,832 e MG-262 nas condições da figura. As características morfológicas foram visualizadas ao microscópio óptico após coloração com *May-Grünwald-Giemsa* (Ampliação de 500x).

O efeito citotóxico induzido pelos diferentes fármacos em estudo, a Doxorubicina, 5-FU, Everolimus, L-744,832 e MG-262, foram também caracterizados pela análise da morfologia celular por microscopia óptica na ausência e na presença destes compostos.

Como podemos observar na figura 13, as células na presença de Doxorubicina e 5-FU, nas concentrações de 50ng/mL e 50µM, respectivamente, apresentam características morfológicas típicas de células em necrose, com a perda de integridade membranar.

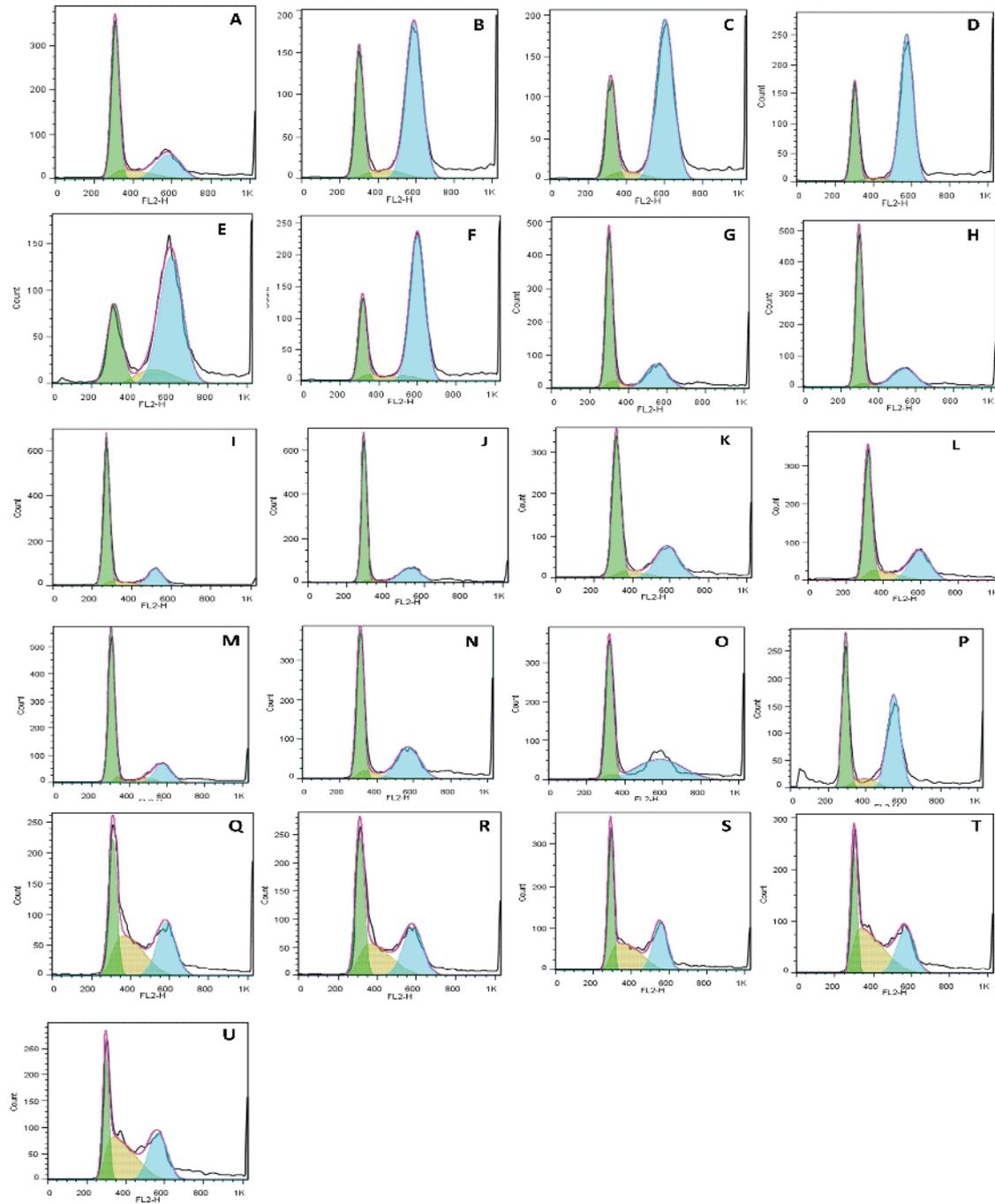
Por outro lado nos fármacos Everolimus, L-744,832 e MG-262, nas concentrações de 100nM, 50  $\mu$ M e 17.5nM, respectivamente, as células apresentam as características típicas de apoptose celular, tais como, várias projecções citoplasmáticas (blebs), contracção fragmentação nuclear.

### **3.3- Avaliação do efeito antiproliferativo dos fármacos.**

A maioria dos fármacos anticancerígenos, induz diminuição na proliferação celular, apresentando um efeito citostático. Para confirmar o efeito antiproliferativo dos fármacos em estudo avaliou-se por citometria de fluxo, o ciclo celular e a expressão de ciclina D1, uma proteína reguladora da passagem do ciclo celular da fase G1 para a fase S do ciclo celular.

#### **3.3.1- Análise do ciclo celular**

Como referido, para além do efeito citotóxico, analisou-se o efeito antiproliferativo dos fármacos em estudo, através da análise do ciclo celular por citometria de fluxo, recorrendo à incorporação de Iodeto de Propídeo no ADN das células HepG2, uma vez que a quantificação do ADN nos permite conhecer a distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular- G0/G1, S e G2/M (Figura 20 e Tabela 1).



**Figura 20-** Imagens obtidas para a análise do ciclo celular por citometria de fluxo. As células HepG2 foram incubadas na ausência (Controlo) e na presença dos fármacos em estudo, Everolimus e L-744,832, quer em monoterapia, quer em combinação com a Doxorubicina e o 5-FU. Sendo que, A-CTL; B- Doxo 50ng/mL; C- Doxo 100ng/mL; D- Doxo 50ng/mL + Eve 100nM; E- Doxo 50ng/mL + L-744 25 $\mu$ M; F- Doxo 50ng/mL + MG 17.5 nM; G- Eve 10 $\mu$ M; H- Eve 100nM; I- Eve 100nM + L-744 25 $\mu$ M; J- Eve 100nM + MG 17.5nM; K- L-744 25 $\mu$ M; L- L-744 50 $\mu$ M; M- Eve 100nM + L-744 25 $\mu$ M + MG 17.5nM; N- L-744 25 $\mu$ M + MG-262; O- MG 17.5nM; P- MG 25nM; Q- 5-FU 50 $\mu$ M; R- 5-FU 100 $\mu$ M; S- 5-FU50 $\mu$ M + Eve 100nM; T- 5-FU50 $\mu$ M+ L-744 25 $\mu$ M; U, 5-FU50 $\mu$ M+ MG 17.5nM.

**Tabela 1- Influência dos fármacos em estudo na distribuição das células HepG2 pelas diferentes fases do ciclo celular.**

Condições	G1	S	G2
Contolo	48,2 ± 1,5	15,9 ± 4,3	23,3 ± 1,1
Doxo 100ng/mL ***	20,1 ± 1,0	6,7 ± 2,8	53,7 ± 2,6
Doxo 50ng/mL ***	20,8 ± 2,4	6,4 ± 0,9	51,0 ± 0,0
5-FU 100µM	33,5 ± 0,6	27,4 ± 0,2	27,2 ± 0,2
5-FU 50µM *	27,1 ± 2,2	18,3 ± 17,5	43,9 ± 24,6
Everolimus 10µM ***	52,4 ± 0,9	7,3 ± 3,4	24,5 ± 3,5
Everolimus 100nM ***	54,8 ± 7,1	5,1 ± 2,4	24,7 ± 2,5
L-744,832 50µM ***	49,1 ± 4,0	11,5 ± 1,9	23,9 ± 4,2
L-744,832 25µM	46,6 ± 3,4	0,5 ± 11,6	41,2 ± 16,5
MG-262 25nM	31,4 ± 0,5	4,5 ± 2,0	40,0 ± 1,8
MG-262 17,5nM	44,4 ± 0,2	0,4 ± 6,2	43,6 ± 5,1
Doxo 50 + Eve 100 ***	21,5 ± 1,1	2,2 ± 0,7	53,8 ± 1,5
Doxo 50 + L 25 ***	19,5 ± 2,3	8,2 ± 1,1	56,0 ± 2,8
Doxo 50 + MG 17,5 ***	16,0 ± 1,6	7,5 ± 0,2	57,3 ± 1,8
5-FU 50 + Eve 100	28,2 ± 2,2	32,6 ± 3,3	23,9 ± 4,6
5-FU 50 + L 25	22,6 ± 0,3	38,0 ± 1,3	25,9 ± 1,4
5-FU 50 + MG 17,5	22,9 ± 0,6	37,6 ± 2,7	25,6 ± 1,6
Eve 100 + L 25 ***	62,6 ± 5,4	6,7 ± 2,4	21,5 ± 4,7
Eve 100 + MG 17,5 ***	57,8 ± 2,4	5,7 ± 2,1	24,1 ± 0,4
L 25 + MG 17,5	46,0 ± 1,5	7,5 ± 0,4	30,4 ± 0,7
Eve 100 + L 25 + MG 17,5 ***	63,4 ± 3,4	9,1 ± 1,8	17,6 ± 3,2

As células foram incubadas por um período de 48h, com os fármacos em estudo ou sem fármaco (controlo) nas concentrações referidas na tabela. Posteriormente, foram avaliadas a percentagem de células nas várias fases do ciclo celular, de acordo com o descrito nos materiais e métodos. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 2 ensaios independentes, que se encontram expressos em percentagem (%) de células em cada fase do ciclo celular. Observou-se algumas diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições em relação ao controlo (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , teste ANOVA).

Ao analisarmos os resultados obtidos, podemos verificar que a Doxorubicina, em monoterapia, causa um bloqueio do ciclo celular em G2/M, de forma independente da dose, aumentando em cerca de 20% as células em G2/M. Enquanto o 5-FU depende da dose, pois para doses mais elevadas, causa uma paragem em fase S (100µM), com um aumento de cerca de 10% (apesar, de não ser estatisticamente significativo), e para concentrações inferiores (50µM) origina uma paragem em G2/M, com um aumento de 30%.

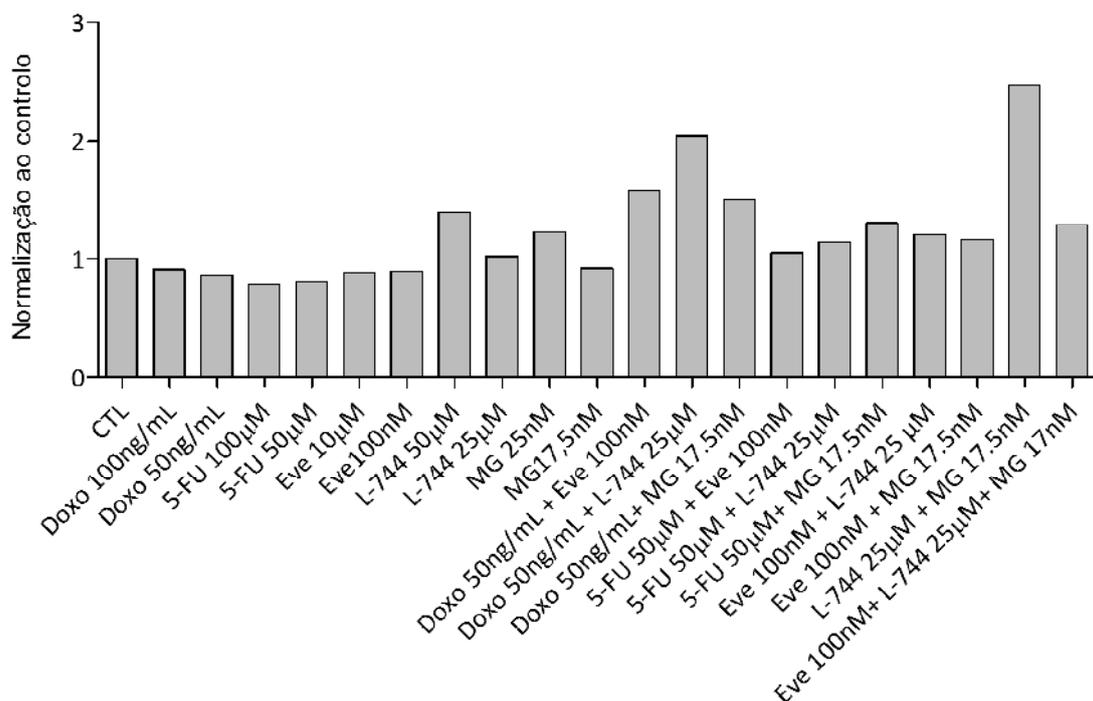
Para os fármacos dirigidos a alvos moleculares, podemos observar um ligeiro bloqueio em G1 para o Everolimus, aumentando em cerca de 5% a percentagem de células em G1, em relação ao controlo, enquanto no MG-262, em monoterapia, o bloqueio ocorre em G2/M, com um aumento de, sensivelmente, 20%, embora este efeito não seja estatisticamente expressivo. Por outro lado, o L-744,832 numa concentração mais elevada (50 $\mu$ M) não altera significativamente a distribuição das células nas várias fases do ciclo celular, mas para uma concentração mais baixa, observa-se um aumento ligeiramente inferior a 20% de células em G2/M, apesar de não se verificar o seu significado estatístico.

Nas combinações de qualquer um dos fármacos com a Doxorrubicina, observa-se um aumento de aproximadamente 30% na percentagem de células em G2/M. Quando se realizaram combinações com 5-FU e novos fármacos em estudo, observa-se um aumento na fase S, correspondente a cerca de 20%, apesar de não ser estatisticamente relevante.

Quando se analisa a combinação dos três fármacos em estudo, percebe-se que a combinação de Everolimus com L-744,832 e/ou MG-262, há um aumento de aproximadamente 15% de células em G1, por outro lado, a combinação de L-744,832 com MG-262 causa um bloqueio em G2/M, com um aumento de 5%, em relação ao controlo, embora não seja significativo estatisticamente.

### **3.3.2- Avaliação da expressão de Ciclina D1**

A ciclina D1 é um regulador positivo da passagem de G1 para S, cuja expressão pode resultar da activação de vias de proliferação celular mediadas por factores de crescimento. Deste modo, e visto a sua importância no ciclo celular, o efeito antiproliferativo dos fármacos pode refletir-se na alteração da sua expressão. Para o efeito analisámos por citometria de fluxo a expressão de ciclina D1, recorrendo a um anticorpo anti-ciclina D1-PE (Figura 21).



**Figura 21- Avaliação da expressão de ciclina D1 nas células HepG2 por citometria de fluxo.** As células foram incubadas na ausência (Controlo) e na presença dos fármacos, quer em monoterapia, quer em terapia combinada, nas concentrações referidas na figura. A ciclina encontra-se expressa em média de intensidade de fluorescência (MIF) normalizada ao controlo, e representa a média de 2 ensaios independentes. Não se observou diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo ( $p > 0.05$ , teste ANOVA).

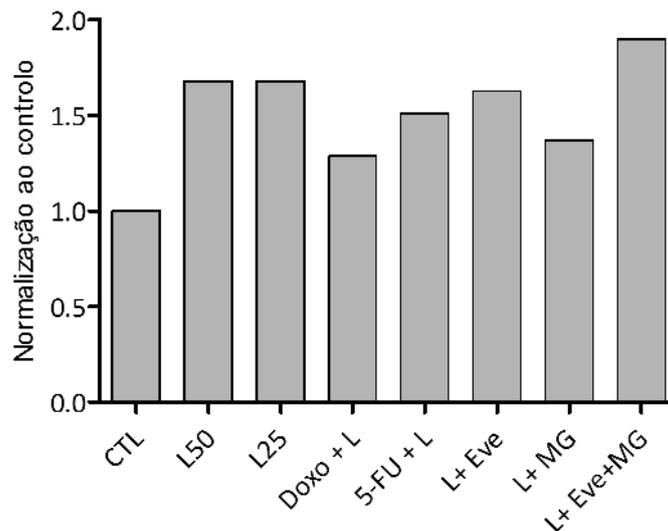
Na figura 21, podemos verificar um aumento da expressão de ciclina D1 em quase todas as condições, à excepção das células tratadas com Everolimus e com os fármacos convencionais, Doxorubicina e 5-FU em monoterapia. Contudo, os resultados não têm significado estatístico.

### 3.4- Avaliação da expressão de laminas, conjugados de ubiquitina e de NF- $\kappa$ B por citometria de fluxo

De forma a se compreender melhor os mecanismos subjacentes ao efeito antiproliferativo do L-744,832 e MG262, avaliou-se a expressão das laminas, e de conjugados de ubiquitina e de NF- $\kappa$ B fosforilado, respectivamente (Figura 22 a 24).

### 3.4.1- Avaliação da expressão de laminas

Uma vez que a inibição da farnesilação pelo IFT utilizado não é específica da proteína RAS, pode-se inferir sobre a actividade deste composto pelas diferenças verificadas noutras proteínas que requerem farnesilação, como as laminas. Assim, avaliou-se a sua expressão, por citometria de fluxo, recorrendo à marcação por anticorpo anti-lamina A/C acoplado ao fluorocromo PE (Figura 22).



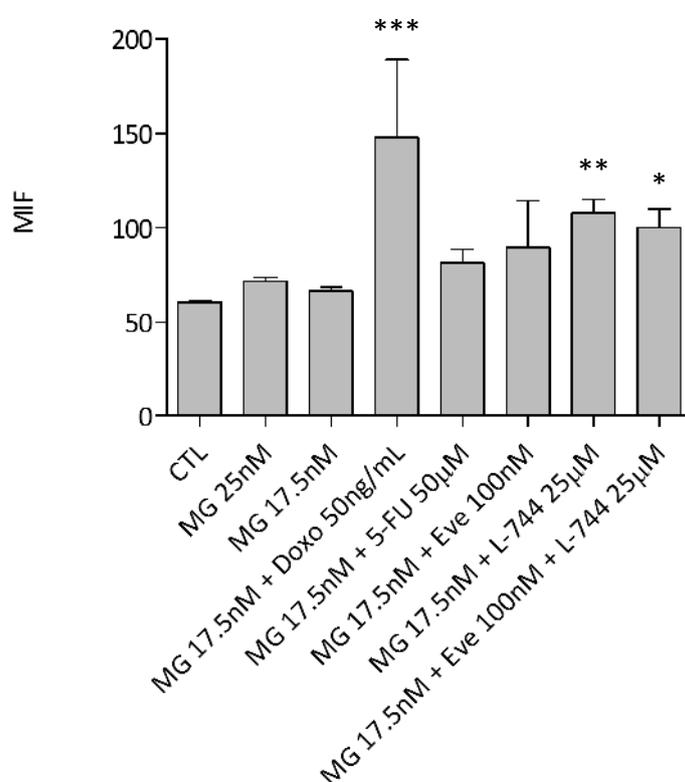
**Figura 22- Avaliação da expressão de laminas, nas células HepG2, incubadas com o inibidor da farnesiltransferase (L-744,832), em monoterapia, e em combinação com Doxorrubicina e 5-FU.** As células HepG2 foram incubadas na ausência (Controlo) e na presença dos fármacos nas concentrações referidas na figura. A expressão intracelular de laminas encontra-se expressa em média de intensidade de fluorescência (MIF), com normalização ao controlo, e representam a média de 2 ensaios independentes. Não se observou diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo ( $p > 0.05$ , teste ANOVA).

Como se pode observar na figura 22, ocorreu um aumento da expressão de laminas, em todas as condições, quer seja em monoterapia com L-744,832, quer em combinação. No entanto, o efeito é mais acentuado nas células tratadas com o fármaco isolado, embora sem significado estatístico.

### 3.4.2- Avaliação de marcadores de inibição do proteasoma.

#### 3.4.2.2-Avaliação da expressão de conjugados de ubiquitina

O efeito do MG-262 (inibidor do proteasoma) na inibição do complexo SUP, foi avaliado pela expressão de conjugados de ubiquitina, por anticorpos anti-conjugados de ubiquitina acoplados ao fluorocromo FITC, por citometria de fluxo. Uma vez que, as proteínas que sofreram ubiquitinação e que devido à inibição do proteasoma não são degradadas pelo sistema ubiquitina-proteasoma, permanecendo assim na sua forma conjugada à ubiquitina, e acumulando-se no citoplasma (Figura 23).



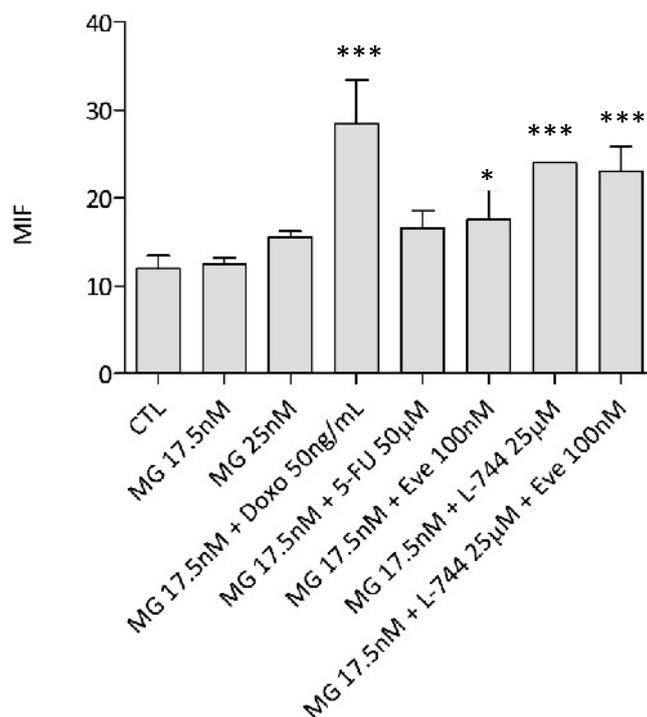
**Figura 23- Avaliação da expressão dos conjugados de ubiquitina por citometria de fluxo, nas células HepG2, incubadas com o fármaco MG-262, em monoterapia e em terapia combinada.** As células foram incubadas na ausência (Controlo) e na presença de fármaco nas concentrações referidas na figura, sendo que, a formação de conjugados de ubiquitina, se encontra expressa em média de intensidade de fluorescência (MIF), e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 ensaios independentes. Observou-se algumas diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições em relação ao controlo (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , teste ANOVA).

Como se pode observar na Figura 23, nas células tratadas com MG-262, apresenta uma ligeira tendência de aumento na quantidade de conjugados de

ubiquitina, particularmente para a concentração de 25nM de MG-262. No entanto, em combinação com outros agentes anticancerígenos, ocorre um aumento muito mais significativo dos níveis de ubiquitina, particularmente em combinação com a Doxorrubicina, que se revelou estatisticamente relevante, tal como a combinação do MG-262 17,5nM com Everolimus 100nM e/ou L-744,832 (25µM)

### 3.4.2.3-Avaliação da expressão do NF-kB

A activação do NF-kB está dependente da ubiquitinação e degradação da sua proteína reguladora (IκB), sendo o NF-kB fosforilado e translocando-se para o núcleo. Assim, a inibição do proteossoma pode estar relacionada com a expressão do NF-kB. A sua expressão foi avaliada, por citometria de fluxo, recorrendo à marcação por anticorpo anti-NF-kB na sua forma fosforilada (PE) (Figura 24).



**Figura 24- Avaliação da expressão de NF-kB fosforilado, nas células HepG2, incubadas com o fármaco MG-262, em monoterapia e em terapia combinada,** As células foram incubadas na ausência (Controlo) e na presença de fármaco nas concentrações referidas na figura, sendo que, a formação de conjugados de ubiquitina, se encontra expressa em média de intensidade de fluorescência (MIF), e representam a média ± desvio padrão de 2 ensaios independentes. Observou-se algumas diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições em relação ao controlo (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , teste ANOVA).

Ao analisar-se a figura 24, observa-se um ligeiro aumento na expressão de NF-kB nas células tratadas com o MG-262, particularmente, na concentração de 25nM. Em terapia combinada há um aumento na quantidade de NF-kB fosforilado, sendo este aumento mais exposto para a combinação da Doxorrubicina com o MG-262, estatisticamente relevante.



## Capítulo 4. Discussão



O Carcinoma Hepatocelular (CHC) é um dos tumores com maior incidência global, apesar do seu tratamento em estádios iniciais ter melhorado significativamente, o seu prognóstico ainda é extremamente reservado (Maluccio, M & Covey, A, 2012). O CHC é uma doença complexa, que pode ter diferentes origens etiológicas, e, normalmente, necessita de várias mutações genéticas e/ou epigenéticas que se desenvolvem ao longo de muitos anos, o que leva a um diagnóstico em estádios mais avançados (Severi, T. *et al.*, 2010)

O CHC avançado é um tumor altamente agressivo com baixa ou nenhuma resposta às terapias comuns (Cervello, M. *et al.*, 2012). Assim, o desenvolvimento de terapias sistémicas tem sido difícil, devido à sua baixa quimiosensibilidade que está muitas vezes associada com a expressão de genes de resistência a fármacos. Entre estes salientamos a sobre-expressão de bombas de efluxo de fármacos, como a glicoproteína-P e a proteína relacionada com a multi-resistência a fármacos (MRP), que aumentam o efluxo celular de agentes citotóxicos, diminuindo a sua concentração intracelular e, portanto a sua eficácia.

Para além disso, a disfunção hepática, que contribui para o desenvolvimento da maior parte dos casos de CHC, diminui a eficácia da terapêutica. A cirrose afecta não só o metabolismo hepático, como a produção de proteínas que se ligam ao plasma, que influenciam a proporção de fármaco activo no soro. Além disso, a acumulação de fluídos que ocorre na cirrose, pode alterar a distribuição de volumes (Giglia, J. *et al.*, 2010)

Infelizmente, todos os doentes com CHC avançado continuam a morrer devido a esta doença e existe uma necessidade, sem paralelo, de se desenvolver novos fármacos, que se apresentem como uma terapêutica eficaz e bem tolerada, isoladamente ou em combinação com outros agentes terapêuticos (Marra, M. *et al.*, 2011 e Severi, T. *et al.*, 2010).

A terapia dirigida tem um papel importante no tratamento de CHC, particularmente em estádios avançados, como é o caso do Sorafenib, um inibidor de multi-cinases, aprovado para o tratamento de CHC avançado (Llovet, J. *et al.*, 2008). Vários agentes que actuam sobre moléculas específicas envolvidas na carcinogénese têm vindo a ser desenvolvidos nos últimos anos, sendo que o maior esforço se centra nos factores de crescimento, bem como nos seus receptores (Spangenberg, H. *et al.*,

2008). De facto, a maior parte dos fármacos é dirigida às interações tumor-estroma, através da inibição dos seus receptores ou componentes das suas vias de sinalização (Yang, J., *et al.*, 2011)

Assim, o objectivo deste trabalho, foi avaliar o efeito *in vitro*, numa linha de CHC, de três terapêuticas dirigidas a alvos moleculares, um inibidor do mTOR (Everolimus), da farnesiltransferase (L-744,832) e do proteasoma (MG-262), quer em monoterapia, quer em combinação com fármacos utilizados na terapia convencional (Doxorrubicina e 5-FU).

Os inibidores da via mTOR, como o Everolimus ou o Temsirolimus, estão a ser avaliados em estudos clínicos, tanto em neoplasias hematológicas, como em tumores sólidos (Strimpakos, A. *et al.*, 2009 e Garcia, J. *et al.*, 2008). O Temsirolimus está aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de cancro do rim avançado. O AZD8055 e o Sirolimus estão em estudos clínicos de fase I/II e III, respectivamente, em doentes com CHC. Em 2008 um estudo clínico de fase II/III estava a recrutar doentes com CHC avançado (Spangenberg, H. *et al.*, 2008).

O Tipifarnib e Lonafarnib, inibidores da farnesiltransferase, demonstraram a capacidade de inibir da proliferação numa série de células tumorais, *in vitro* e *in vivo*. Os inibidores da farnesiltransferase estão em estudos clínicos em várias neoplasias hematológicas e tumores sólidos, tais como o pâncreas, pulmão, próstata e bexiga (Costa, C. *et al.*, 2012, Harousseau, J., 2006, Perabo, F. & Müller, S., 2007 e Li, T. *et al.*, 2009). O Lonafarnib está em fase IB de estudos clínicos para neoplasia primária do fígado ressecável.

A inibição do proteasoma, com Bortezomib, foi avaliada em alguns estudos publicados e em estudos clínicos decorrentes, em cancros sólidos e hematológicos, tendo sido aprovado, em 2004, para o tratamento do Mieloma Múltiplo. Para além do seu papel proeminente no mieloma múltiplo, o Bortezomib está aprovado pela FDA para o tratamento do linfoma de células manto. Este fármaco também apresenta uma actividade considerável no cancro do pulmão de células não-pequenas (Armeanu, S. *et al.*, 2008) e em linhas celulares do CHC (Baiz, D. *et al.*, 2009).

Existem poucos estudos sobre os efeitos das novas moléculas no CHC, sendo que na maioria dos estudos *in vitro*, *in vivo* e em ensaios clínicos, os autores referem

que existe uma necessidade de testar as terapêuticas dirigidas a alvos moleculares em associação com citostáticos relevantes no CHC, como a Doxorrubicina, ou outros fármacos convencionais. Assim, neste estudo pretende-se avaliar a eficácia terapêutica do inibidor do mTOR, Everolimus, de um inibidor da farnesiltransferase, L-744,832, e do proteasoma, MG-262, bem como um possível efeito sinérgico entre eles ou em combinação com Doxorrubicina ou 5-Fluorouracilo, numa linha celular de Carcinoma Hepatocelular, as células HepG2, como mencionado. Além disso, pretendemos elucidar alguns dos mecanismos subjacentes à acção de cada fármaco, quer em monoterapia quer em terapia combinada.

Os resultados obtidos neste estudo, demonstram que o Everolimus, o L-744,832 e o MG-262 têm a capacidade de reduzir a viabilidade celular, nas células HepG2 (linha celular de CHC) de uma forma dependente da concentração e do tempo, quer em monoterapia quer em combinação com a terapia convencional, nomeadamente, Doxorrubicina e 5-Fluorouracilo, ou entre eles.

Em terapia combinada, o efeito anti-proliferativo é obtido com concentrações mais baixas dos três fármacos dirigidos a alvos moleculares, do que em monoterapia, sendo que a associação do inibidor do mTOR, da farnesiltransferase e do proteasoma com Doxorrubicina, demonstrou um efeito sinérgico. No entanto, com o 5-FU este efeito foi evidente para a sua combinação com o MG-262 (inibidor do proteasoma). A redução das concentrações de fármacos novos ou convencionais, é bastante benéfica, pois diminui os potenciais efeitos secundários destes fármacos anticancerígenos.

Para além disso, a combinação do inibidor do mTOR com inibidor da farnesiltransferase que demonstrou a existência de efeito sinérgico, sendo que, o mesmo não aconteceu para as combinações dos dois inibidores ou da associação do inibidor do proteasoma com o do mTOR ou da farnesiltransferase.

Os resultados obtidos por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação AV/IP, para o Everolimus, mostram que induz morte celular, principalmente, por apoptose. Sendo que, estes resultados foram confirmados por análise morfológica, demonstrando características morfológicas típicas de apoptose, numa fase mais inicial, entre as quais, projecções citoplasmáticas (*blebs*) e vacuolização, bem como contração e fragmentação nuclear, características típicas de estádios mais avançados de morte

celular por apoptose. No entanto a sua combinação com Doxorrubicina ou 5-FU, não demonstrou um aumento no efeito citotóxico. O aumento do efeito citotóxico está de acordo com o aumento da expressão de BAX, o que pode contribuir para a sensibilidade das células HepG2 ao Everolimus. Estes resultados estão em conformidade com a literatura, como mostram os estudos de Wangpaichitr, M. *et al.*, (2008), cujos autores descreveram um aumento da expressão de moléculas pró-apoptóticas, nas quais se incluíam a proteína BAX, e diminuição de moléculas anti-apoptóticas. Assim, seria interessante, avaliar-se também a expressão de BCL-2, uma proteína anti-apoptótica, de forma a tentarmos compreender se o aumento da expressão de BAX é seguido com uma diminuição de BCL-2, tal como reportado em Araújo, A. (2010), para as células HUH-7.

Este aumento de expressão de BAX, sugere que a via de apoptose activada é a mitocondrial, que está relacionada com a permeabilização da mitocôndria e é estritamente regulada pela família de proteínas BCL-2, em particular por proteínas pró-apoptóticas, como a BAX, BAK, BID, e por proteínas anti-apoptóticas, como a BCL-2, a BCL-XL e a MCL1, através da indução ou inibição da heterodimerização dos seus membros. Após permeabilização da membrana mitocondrial (com abertura do chamado poro de permeabilidade transitório) ocorre libertação de proteínas apoptogénicas ou pró-apoptóticas, do espaço intermembranar mitocondrial para o citosol, como é o caso do citocromo *c* e das proteínas *second mitochondria-derived activator of caspase (SMAC)* e *direct IAP binding protein with low pI (DIABLO)*. Uma vez no citosol, o citocromo *c* funciona como co-factor para a formação, dependente de ATP, de um complexo proteico circular constituído pelas proteínas *apoptosis protease activating factor-1 (APAF-1)* e pró-caspase 9, o apoptossoma, que conduz à activação da caspase 9, que subseqüentemente activa a caspase 3. Desta forma ocorre uma rápida amplificação do sinal de morte, através da activação massiva de outras caspases. Por outro lado, a SMAC promove a activação das caspases, por se ligar e inibir múltiplas proteínas inibidoras da apoptose, as *inhibitor of apoptosis proteins (IAP)* (Fulda, S. & Vucic, D., 2012).

Assim, na continuação deste estudo, seria interessante analisar a expressão de citocromo *c* e da caspase 3, de forma a perceber se o sinal de apoptose, mediado pelo

aumento de BAX é efectivo nestas células ou se existe outra via apoptótica activada, como por exemplo da via extrínseca ou membranar.

Vários estudos para outros cancros, tanto tumores sólidos (Gorshtein, A. *et al.*, 2009), como neoplasias hematológicas (Athar, U. & A. Gajra, 2008), demonstram que inibidores de mTOR, tal como o Everolimus, produzem um bloqueio do ciclo celular em G1, produzindo um efeito citostático. Assim, os nossos resultados estão de acordo com o verificado por estes autores noutros tumores. De facto, a análise do ciclo celular, mostra que o efeito anti-proliferativo (citostático) do Everolimus pode estar relacionado com o bloqueio do ciclo celular em fase G1 em células de CHC. Estes resultados podem estar relacionados com a diminuição dos níveis de ciclina D1, como descrito em vários artigos (Hashemolhosseini, S. *et al.*, 1995, Grewe, M. *et al.*, 1999) e Law, B. *et al.*, 2000) que mostram, em diferentes linhas celulares, que a Rapamicina (da qual o Everolimus é um análogo) diminui os níveis de ciclina D1 (, S. *et al.*, 1995, Grewe, M. *et al.*, 1999), sugerindo que esta molécula pode ser um dos principais alvos da acção da Rapamicina. Estas observações foram confirmadas por Nelsen, C. *et al.* (2003), ao evidenciarem que a sobreexpressão de ciclina D1 anula os efeitos anti-proliferativos da Rapamicina.

A ciclina D1 é uma das moléculas reguladoras do ciclo celular essencialmente envolvida na passagem entre a fase G1 para a fase S e apresenta níveis de expressão variáveis de acordo com a fase do ciclo celular em que se encontram as células. Após a fase G2/M verifica-se, quando necessária a proliferação, um estímulo na produção de ciclina D1, que aumenta durante a toda a fase G1 até uma redução abrupta concordante com a passagem para a fase de síntese do ciclo. Contudo, esta mesma molécula pode funcionar como oncogene, gerando proliferação desregulada, e estar envolvida no processo carcinogénico de alguns tumores, como descrito por Tashiro *et al.* (2007).

Os nossos resultados obtidos após o tratamento das células HepG2 com Everolimus também evidenciam tendência para diminuição da expressão de ciclina D1, o que está de acordo com o efeito citostático do Everolimus, também evidente na análise do ciclo celular com um bloqueio do ciclo celular em G1. Ao analisarmos o ciclo celular, para as combinações do Everolimus com Doxorrubicina e 5-FU, observou-se

um bloqueio em G2/M e S, respectivamente, o que está de acordo com os resultados da expressão da ciclina D1, em que se observou um aumento.

Os resultados obtidos por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação AV/IP, mostraram que não há um aumento da morte celular para o tratamento com L-744,832. No entanto, o L-744,832, em combinação com 5-FU, é capaz de induzir morte celular por apoptose, comprovada por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação AV/IP, bem como por microscopia óptica.

Existem algumas publicações, até relativamente antigas (1999), que demonstraram que a apoptose de células em tumores sólidos (astrocitomas) mediada pelo L-744,832 está relacionada com um aumento de BAX, tal como se verificou neste estudo. A morte induzida pela via mitocondrial ou intrínseca também está descrita para a acção dos inibidores da farnesiltransferase em neoplasias hematológicas (Reuter C. et al., 2000; Costa C *et al.*, 2012).

A maioria dos estudos em tumores sólidos, revelam que o efeito dos IFT's não é citotóxico mas citostático (Méglin-Chanet, F. *et al.*, 2002), acompanhado por uma acumulação de células na fase G2/M. Este efeito foi descrito pela primeira vez por Miquel K. *et al.*, (1997), para células de cancro do pulmão (A549) tratado com um inibidor da farnesiltransferase de tipo peptidomimético, sendo que este efeito também já foi descrito para o L-744,832 em células humanas de tumor pancreático (Song, S. *et al.*, 2000). A acumulação de células na fase G2/M também foi observada neste estudo, o que vai ao encontro do descrito na literatura. A prenilação da proteína RAS pode ocorrer através da acção da farnesiltransferase (FT) ou da geranylgeranyl transferase, conforme a isoforma da RAS. Assim, em certas isoformas desta proteína, pode ocorrer a geranylgeranilação, mas as linhas celulares continuam sensíveis à acção dos IFT's, o que sugere a existência de outras proteínas farnesiladas, que também vão ser alvos terapêuticos dos IFT's (Haluska, P. *et al.*, 2002). Existem várias proteínas que são potenciais substratos da farnesiltransferase, devido à presença de um motivo CAAX no terminal carboxílico e que têm um papel na transdução de sinais, proliferação e divisão celular. Estas proteínas incluem a proteína RHOB e proteínas nucleares, tais como a *centromere associated proteins E* (CENP-E) e F (CENP-F), que estão associadas

com o processo mitótico, sendo que a CENP-F está implicada na progressão do ciclo celular em G2/M (Bishop, W. *et al.*, 2003).

Nas células tratadas com L-744,832 (50 e 25 $\mu$ M) isoladamente e em combinação com a Doxorrubicina e 5-FU ou MG-262, verificou-se ainda um aumento da ciclina D1. Estes resultados estão em concordância com os resultados obtidos para o ciclo celular, uma vez que há progressão do ciclo em G1, onde a ciclina D1 actua, tal como referido anteriormente. No entanto, existe uma discrepância clara nos níveis de expressão da ciclina D1 para as combinações do IFT com Everolimus ou com MG-262, em que se verifica um aumento nos níveis de ciclina D1 onde ocorre uma paragem no ciclo celular em G1. Será necessário portanto repetir este ensaio de forma a confirmar este resultado ou realizar novos estudos de forma a explicar um possível mecanismo alternativo subjacente a este efeito.

Nestes estudos, as laminas foram utilizadas como marcador da actividade de FTase, pois os autores Adjei *et al.* (2000), demonstraram que o processamento de prelamina A para lamina madura necessita da acção da FT. No entanto, os nossos resultados não demonstraram uma diminuição de laminas nucleares, tal como observou Araújo A. (2010), em células HUH-7 (outra linha celular de CHC) tratadas com L-744,832. Estes resultados podem parecer discordantes da diminuição da proliferação celular observada neste estudo com as células HepG2 tratadas com L-744,832. Provavelmente, este facto poderá estar relacionado com a dose do IFT utilizada, pois a inibição da farnesiltransferase não é imediatamente correlacionada com a diminuição da viabilidade celular, sendo que, alguns estudos demonstram que a dose necessária para obter um efeito biológico são consistentemente superiores às necessárias para inibir a farnesilação (Apples, N. *et al.*, 2005; Costa C *et al.*, 2012). Assim, seria interessante, analisar os níveis de expressão de laminas A para concentrações mais baixas de L-744,832.

Os resultados obtidos revelaram que o inibidor de proteasoma MG-262, quando em associação com a Doxorrubicina ou 5-FU, não induz um aumento da morte celular, no entanto, em monoterapia, induz morte celular principalmente por apoptose, demonstrado por citometria de fluxo com a dupla marcação com AV/PI e por análise morfológica. A capacidade citotóxica demonstrada pelo MG-262 neste

estudo, vai ao encontro do que está descrito para o efeito dos inibidores do proteasoma quer em tumores sólidos, quer em neoplasias hematológicas, sendo que a maior parte dos estudos são realizados em neoplasias hematológicas. Nestes estudos foi demonstrado que o inibidor de proteasoma, PS-341, tem a capacidade de induzir directamente a apoptose em linhas celulares e células isoladas de doentes com mieloma múltiplo, bem como superar a resistência de células à terapia convencional conduzindo à sua apoptose (D'Alessandro, A. *et al.*, 2009) tendo sido aprovado para o tratamento de mieloma múltiplo e linfoma do manto, como referido. Da mesma forma, existem estudos que demonstram a actividade anti-tumoral destes compostos no carcinoma da mama, pulmão, colón, bexiga, ovário, próstata, pâncreas e neuroblastoma infantil. Para além disso, as células transformadas são mais sensíveis à apoptose induzida por inibidores do proteasoma do que as que não sofreram transformação maligna (Dolcet, X. *et al.*, 2006).

Uma característica interessante destes fármacos é o facto de parecerem sensibilizar as células de CHC à apoptose induzida por TRAIL, um membro da família do factor de necrose tumoral (TNF), provocando toxicidade selectiva nas células de cancro, pois a maioria das células normais são resistentes à apoptose mediada pelo TRAIL (Inoue, T. *et al.*, 2005). Assim, consideramos interessante avaliar se a expressão dos receptores de TRAIL nesta linha celular antes e após o tratamento com MG-262, de forma a compreender se este poderá ser um mecanismo envolvido na morte celular das células HepG2 mediada por este inibidor do proteasoma. Outros autores também referem que o mecanismo de apoptose mediado por estes fármacos poderá estar relacionado com a activação da via intrínseca da apoptose, através da acumulação de proteínas pró-apoptóticas, da família BCL-2, como a proteína BAX, e redução dos níveis de proteínas anti-apoptóticas, como a proteína BCL-2 (Chen, K. *et al.*, 2008 e Orlowski, R. & Kuhn, J., 2008). Assim, também poderíamos avaliar a expressão de algumas proteínas da família BCL-2 e do citocromo c, bem como a caspase 9 (que está relacionada com a via intrínseca da apoptose) e caspase 8 (que está relacionada com a via extrínseca da apoptose), ou mesmo dos receptores de morte da família do TNF.

Uma vez que alguns inibidores do proteasoma podem regular o ciclo celular (Orlowski, R. & Kuhn, J., 2008) avaliou-se, também, a percentagem de células em cada

fase do ciclo celular. Os resultados demonstraram um aumento de células na fase G2, o que pode estar associado à fosforilação e clivagem da proteína BCL-2 levando a um bloqueio do ciclo celular (Chen, K. *et al.*, 2008). Para além disso, pode estar relacionado com a degradação de proteínas reguladoras do ciclo celular (D'Alessandro, A. *et al.*, 2009).

Ao fazer uma análise comparativa entre o ciclo celular e a expressão de ciclina D1, pelos motivos expressos anteriormente, verificamos que ocorre aumento da expressão desta ciclina, tal como se esperava, quer nas células tratadas com este fármaco isoladamente quer em combinação com a Doxorrubicina, 5-FU ou mesmo o L-744,832, o que está de acordo com o bloqueio do ciclo celular na fase G2, uma vez que a ciclina D1 regula a passagem de fase G1 para S. Os únicos resultados em que não observamos esta correlação, envolvem a combinação do MG-262 com o Everolimus e/ou L-744,832, uma vez que se observa nestas condições um aumento da percentagem de células em G1 e de ciclina D1. Assim, seria interessante repetir-se estes resultados pelos mesmos motivos explicitados para os outros fármacos.

O sistema ubiquitina-proteasoma é a principal via de degradação catabólica de proteínas de curta duração e proteínas *misfolded*. As proteínas que são degradadas por esta via, sofrem um processo de poli-ubiquitinação, seguida de reconhecimento e degradação pelo proteasoma (Wu *et al.*, 2010), um complexo enzimático constituído por duas subunidades, 20 e 19S. Deste modo, um dos mecanismos propostos para a acção anti-cancerígena dos inibidores do proteasoma é a acumulação de proteínas ubiquitinadas. Os resultados deste estudo demonstraram um aumento de conjugados de ubiquitina, particularmente para a terapia combinada, sendo que esse aumento pode estar relacionado com o aumento da morte celular, pois além do aumento verificado na expressão de BAX (uma proteína degradada nesta via), poderá ocorrer acumulação de proteínas anómalas que podem induzir a expressão de proteínas de choque térmico, proteínas de stresse do retículo endoplasmático, conduzindo as células à apoptose (D'Alessandro, A. *et al.*, 2009).

Paralelamente, o NF- $\kappa$ B, um factor de transcrição pleiotrópico, com múltiplas funções celulares, constituído por duas sub-unidades, p65 e p50, está descrito como um dos principais alvos dos inibidores do proteasoma em quase todos os tipos de cancro, uma vez que o I $\kappa$ B, o inibidor do NF- $\kappa$ B é degradado na via da ubiquitina-

proteasoma (D'Alessandro, A. *et al.*, 2009, Chen, K. *et al.*, 2008). No nosso estudo não verificámos diminuição significativa da fosforilação e, conseqüente activação do NF- $\kappa$ B, nas células tratadas com o inibidor do proteasoma, quer em monoterapia, quer em terapia combinada (tendo-se verificado nesta modalidade terapêutica uma tendência para o aumento da sua expressão). No entanto, houve morte celular por apoptose, na combinação do MG-262 com Doxorrubicina, comprovada quer por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação com AV e IP, quer por análise morfológica. Esta aparente contradição poderá ser explicada pelo mecanismo proposto por Dulcet, X. *et al* (2006), em linhas celulares do carcinoma do endométrio tratadas com quatro inibidores de proteasoma diferentes, em que verificaram activação da expressão de NF- $\kappa$ B. Assim, estes autores propõem que a fosforilação da subunidade p65 poderá estar relacionada com a activação do NF- $\kappa$ B induzida pelo inibidor do proteasoma, uma vez que estes induzem a fosforilação do IKK $\alpha/\beta$ , fosforilação e degradação do I $\kappa$ B $\alpha$  e fosforilação da sub-unidade p65 do NF- $\kappa$ B na serina 536, levando ao aumento da expressão do NF- $\kappa$ B. Assim, seria interessante, utilizar uma estratégia de silenciamento da p65, como por exemplo a utilização de siARN's, de forma a avaliar se a activação do NF- $\kappa$ B pelos inibidores do proteasoma está efectivamente relacionada com este processo, em linha celulares de CHC.

Assim, o conceito de que os inibidores do proteasoma são bloqueadores da activação do NF- $\kappa$ B terá de ser cuidadosamente avaliado e estudado para cada tipo de células.

A terapêutica combinada de vários agentes tem vindo a ser utilizada na maioria dos tratamentos do cancro. Até recentemente, para o CHC não havia nenhum agente dirigido a um alvo molecular, no entanto o Sorafenib veio abrir o caminho para o desenvolvimento desse tipo de agentes anticancerígenos, pois foi a *proof-of-concept* necessária. Ao analisar-se o mecanismo de acção do Sorafenib, consegue-se compreender que embora seja um único fármaco, actua em vários alvos, principalmente em receptores de factores angiogénicos. Assim, a combinação de terapias dirigidas a vários alvos moleculares faz todo o sentido no CHC, assim como com a terapia convencional. Neste trabalho houve a avaliação dos dois tipos de

estratégias e algumas das combinações tiveram sucesso na redução de viabilidade e aumento da morte celular por apoptose, tais como a associação do inibidor da farnesiltransferase (L-744,832) com o 5-FU e do inibidor do proteasoma (MG-262) com a Doxorubicina. Sendo que, normalmente, há preferência por fármacos que provoquem morte por apoptose, uma vez que a necrose causa uma inflamação severa nos tecidos próximos.

A associação dos três fármacos, Everolimus, L-744,832 e MG-262 não revelou um aumento do efeito citotóxico, em relação aos fármacos em monoterapia, como se pode ver na análise por citometria de fluxo com AV/PI. As combinações do Everolimus com MG-262 ou L-744,832, também não demonstraram um aumento de morte celular, em relação aos fármacos em monoterapia. Assim, a única combinação que efectivamente, tem a capacidade de aumentar o efeito citotóxico, em relação os fármacos em monoterapia, é a do L-744,832 com o MG-262.

Tal como referido anteriormente, o Everolimus tem a capacidade de inibir a via PI3K/AKT/mTOR, o L-744,832 a via RAS/MAPK e o MG-262 uma série de processos biológicos e vias moleculares. Assim, a utilização dos três faz com que haja a inibição de vários processos essenciais na progressão da célula maligna. Para além, disso existem vários estudos que demonstram um possível *cross-talk* entre a acção destes fármacos, que se pode materializar num sinal apoptótico mais eficaz.

De facto, existem algumas evidências de que ocorre um *cross-talk* entre a via RAS/MAPK e PI3K/AKT/mTOR (Aksamitiene, E. *et al.*, 2012), sendo que é possível que os inibidores da farnesiltransferase, que têm como principal alvo terapêutico a proteína RAS, também actuem também directamente na via PI3K/AKT/mTOR, pela inibição do mTOR, através da alteração da fosforilação da p70s6k, sendo que esta possibilidade foi sugerida e confirmada para uma linha de queratinócitos por Law, B. *et al.* (2000), para o efeito do L-744,832.

Para além disso, a via PI3K/AKT/mTOR, que é essencial para o balanço entre a sobrevivência da célula e a apoptose, como referido anteriormente, também pode ser regulada pelos inibidores do proteasoma, pela inibição da fosforilação da AKT, processo necessário para a activação da via, e de factores anti-apoptóticos (Inoue, T. *et al.*, 2006 e Chen, K. *et al.*, 2008). Para além disso, como possivelmente causam um

aumento na apoptose induzida pelo TRAIL, para além da via mitocondrial, podem causar um aumento do sinal apoptótico pela via membranar.

Uma forma de tentarmos perceber se efectivamente há um *cross-talk* entre a acção dos fármacos, seria testar a fosforilação da AKT, bem como da p70s6k e a expressão do mTOR.

Embora se tente analisar e esquematizar as vias moleculares, é importante não nos esquecermos que os mecanismos subjacentes à acção dos fármacos não são isolados, pois nas células ocorre uma *network* de interacções, que raramente tem uma via *per se*. Este efeito associativo ainda aumenta mais em tecidos ou organismos, pois o grau de complexidade aumenta.

Em suma, os fármacos dirigidos a alvos moleculares utilizados neste estudo, o inibidor do mTOR (Everolimus), o inibidor da farnesiltransferase (L-744,832) e inibidor do proteossoma (MG-262), podem constituir uma abordagem terapêutica promissora no Carcinoma Hepatocelular, quer em monoterapia para o Everolimus e MG-262, quer em terapêutica combinada. Do mesmo modo, verificou-se que o Everolimus, L-744,832 e MG-262, apresentam um efeito sinérgico com a Doxorrubicina, que é o fármaco anticancerígeno mais utilizado no tratamento de Cacinoma Hepatocelular, o que pode contribuir para melhorar a eficácia terapêutica com diminuição da toxicidade e dos efeitos secundários.

## **Capítulo 5. Conclusão**



A definição de novas estratégias terapêuticas para o tratamento do cancro constitui o ponto central na Oncobiologia Clínica.

Assim, os resultados obtidos com este trabalho revelam, de uma forma geral, que os fármacos Everolimus, L-744,832 e MG-262 podem constituir uma abordagem terapêutica promissora no tratamento de Carcinoma Hepatocelular quer em monoterapia quer em associação entre si ou com a quimioterapia convencional, nomeadamente, doxorrubicina e 5-Fluorouracilo.

Desta forma, este estudo permite-nos retirar as seguintes conclusões:

- Os efeitos citotóxicos e/ou citostáticos do Everolimus, L-744,832 e MG-262 nas células HepG2, são dependentes do tempo e dose administrada do fármaco.
- Estes fármacos induzem morte celular preferencialmente por apoptose. O Everolimus e o L-744,832 induzem apoptose pela via mitocondrial intrínseca uma vez que se verifica um aumento na expressão de BAX, uma proteína pró-apoptótica envolvida nesta via.
- Estes fármacos apresentam um efeito citostático, uma vez que induzem uma paragem no ciclo celular, tendo-se verificado um bloqueio do ciclo celular em G2/M após incubação com L-744,832 e MG-262, e em G1 quando utilizado o Everolimus.
- As combinações terapêuticas do Everolimus, L-744,832 e MG-262 com a terapia convencional, nomeadamente como a Doxorrubicina, bem como a associação dos novos fármacos Everolimus e L-744,832, em baixas doses (inferiores ao IC50), nas células HepG2, revelou efeito sinérgico, o que permite uma redução da toxicidade e dos efeitos secundários. Assim, verifica-se que a aplicação de uma estratégia combinada de vários fármacos dirigidos a alvos moleculares pode ser uma estratégia promissora como opção terapêutica do tratamento de Carcinoma Hepatocelular, podendo constituir uma alternativa para ultrapassar a falência da terapêutica convencional.



## **Capítulo 6. Referências Bibliográficas**



---

Aksamitiene, E., Kiyatkin, A., Kholodenko, B. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem. Soc. Trans.* 40: 139–146 (2012).

Apples, N., Beijnen, J., Schellens, J. Development of Farnesyl Transferase Inhibitors: A Review. *The Oncologist*, 10: 565–578 (2005).

Araújo, A. New targeted therapies in Hepatocellular Carcinoma- a study in cell lines in culture. Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal (2010).

Armeanu, S., Krusch, M., Baltz, K., Weiss, T., Smirnow, I. Direct and Natural killer cell-mediated antitumor effects of low-dose Bortezomib in Hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research* 14(11): 3520-3528 (2008).

Arsura, A & Cavin, L., Nuclear factor-kappa B and liver carcinogenesis. *Cancer Letter.* 229: 157-169 (2005).

Asnaghi, L, et al., mTOR: a protein kinase switching between life and death. *Pharmacological Research* 50: 545–549 (2004).

Athar, U. & A. Gajra. Role of mTOR in Hematological Malignancies. *Current Cancer Therapy Reviews* 4(3): 211-218 (2008).

Badvie, S. Hepatocellular Carcinoma. *Postgrad. Med. J.*, 76:4-11 (2000).

Baiz, D., Pozzato, G., Dapas, B., et al. Bortezomib arrests the proliferation of hepatocellular carcinoma cells HepG2 and JHH6 by differentially affecting E2F1, p21 and p27 levels. *Biochimie* 91 :373-382 (2009).

Bernas, T., Grégori, G., Asem, E. *et al.* Integrating cytomics and proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*, 5: 2-13 (2006).

Bishop, W., Kirschmeier, P., Baum, C. Farnesyl Transferase Inhibitors: Mechanism of action, translational studies and clinical evaluation. *Cancer Biology & Therapy*. 2:4: Supple 1: S96-S104 (2003).

Bouchard, M. & Navas-Martin, S. Hepatitis B and C virus hepatocarcinogenesis: Lessons learned and future challenges. *Cancer Letters* 305: 123–143 (2011).

Breuhahn K, Schirmacher P. Reactivation of the insulin-like growth factor-II signaling pathway in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.*, 14: 1690-1698 (2008).

Bruix, J. & Sherman, M., Management of Hepatocellular Carcinoma: an update. *Hepatology*, AASLD Practice guidelines, 2010.

Calvisi, D., Ladu, S., Gorden, A., *et al.* Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology*. 2006; 130: 1117-1128

Campbell, J., Hughes, S., Gilbertson D., *et al.* Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *PNAS*, 102: 3389–3394 (2005).

Cervello, M., McCubrey, J., Cusimano, A., *et al.* Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: novel agents on the horizon. *Oncotarget*, 3: 236-260 (2012).

Chemin, I. & Zoumim, F., Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* 286: 52–59 (2009).

Chen, K., Chen, H., Tai, W. *et al.* Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther.*, 337: 155-161 (2011).

---

Chen, K., Yeh, P., Yeh, K., et al. Down-regulation of Phospho-Akt Is a Major Molecular Determinant of Bortezomib-Induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Cancer Res*, 68 (16): 6698-6707 (2008).

Costa CB, Casalta-Lopes J, Andrade C, Moreira D, Oliveira A, Gonçalves AC, Alves V, Silva T, Dourado M, Nascimento-Costa JM, Sarmiento-Ribeiro AB. Farnesyltransferase inhibitors: molecular evidence of therapeutic efficacy in acute lymphoblastic leukemia through cyclin D1 inhibition. *Anticancer Res* 2012 Mar; 32 (3): 831-838.

Cougot, D., Neuveut, C., Buendia, M. HBV-induced carcinogenesis. *Journal of Clinical Virology* , 34, Suppl. 1: S75 S78 (2005).

D'Alessandro, A., Pieroni, L., Ronci, M., et al., Proteasome Inhibitors Therapeutic Strategies for Cancer. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 4: 73-82 (2009).

Davis, R. Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev*. 1995; 42: 459-467.

Dolcet, X., Llobet, D., Encinas, M., et al. Proteasome Inhibitors induce death but activate NF- $\kappa$ B on endometrial carcinoma cell line and primary culture explants. *J Biol Chem.*, 281(31):22118-30 (2006).

EASL–EORTC Clinical Practice Guidelines 2012: Management of hepatocellular carcinoma.

El-Serag, H & Rudolph, L. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132: 2557–2576 (2007).

El-Serag, H., Tran, T., Everhart, J. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 126: 460-468 (2004).

Farazi P & DePinho R. Hepatocellular Carcinoma Pathogenesis: from genes to environment. *Nature Reviews Cancer*, 6 (9): 674-87 (2006).

Farrel, G & Larter, C. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis, 43: S99-S112 (2004).

Feitelson, M. et al. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 21: 2593–2604 (2002).

Ferrara, N. VEGF as a Therapeutic Target in Cancer. *Oncology*, 69 (suppl 3):11–16 (2005).

Fulda, S. & Vucic, D. (2012) Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in First Decade. *Clin Cancer Res*. 14: 1649-1657 (2008).

Garcia, J. & Danielpour, D. Mammalian target of rapamycin inhibition as a therapeutic strategy in the management of urologic malignancies. *Molecular Cancer Therapeutics* 7 (6): 1347-1354 (2008).

Ghobrial, I., Witzig, T. e Adjei, A. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA Cancer J Clin*. 55: 178-194 (2005).

Giglia, J, Antonia, S., Berk, L. *et al.* Systemic Therapy for Advanced Hepatocellular Carcinoma: Past, Present, and Future. *Cancer Control*, Vol. 17, No 2: 120-129 (2010).

Gorshtein, A., Rubinfeld, H., Kendler, E., *et al.* Mammalian target of rapamycin inhibitors rapamycin and RAD001 (everolimus) induce anti-proliferative effects in GH-secreting pituitary tumor cells in vitro. *Endocrine-Related Cancer*, 16: 1017–1027 (2009).

---

Grewe, M., Gansauge, F., Schmid, R., et al. Regulation of cell growth and cyclin D1 expression by the constitutively active FRAP-p70s6K pathway in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, 59: 3581–7 (1999).

Gruenwald, V., Wilkens, L., Gebel, M. A phase II open-label study of cetuximab in unresectable hepatocellular carcinoma: final results. *J Clin Oncol*, 25: A4594 (2007).

Harousseau, J. Farnesyltransferase inhibitors in hematologic malignancies. *Blood reviews* 21: 173-182 (2007).

Hashemolhosseini, S., Nagamine, Y., Morley, S., et al. Rapamycin inhibition of the G1 to S transition is mediated by effects on cyclin D1 mRNA and protein stability. *J Biol Chem*, 273: 14424–9 (1995).

Forner, A., Llovet, J., Bruix, J. Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, Volume 379, Issue 9822, Pages 1245 – 1255 (2012).

Hoshida, Y., Villanueva, A., Kobayashi, M., et al. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 359: 1995–2004 (2008).

Imura, S., Miyake, H., Izumi, K., et al. Correlation of vascular endothelial cell proliferation with microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in hepatocellular carcinoma. *J Med Invest*, 51: 202–209 (2004).

Inoue, T., Shiraki, K., Fuke, H., et al. Proteasome inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL by suppressing caspases inhibitors and AKT pathway. *Anti-Cancer Drugs*. Vol 17, No 3: 262-268 (2006).

Kalva, S., Thabet, A., Wicky, S. Recent advances in transarterial therapy of primary and secondary liver malignancies. *Radiographics*, 28: 101-117 (2008).

Kannangai, R., Sahin, F., Torbenson, M. EGFR is phosphorylated at Ty845 in hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol.*, 19: 1456-1461 (2006).

Kew, M. Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *Liver Int.* 23: 405–409 (2003).

Krishan, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *The Journal of Cell Biology.* 9(66): 188-193 (1975).

Lachemayer, A., Alsinet, C., Chang, C. *et al.*, Molecular approaches to treatment of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*, 42, 3: 267-272.

Laurent-Puig, P., Legoix, P., Bluteau, O., *et al.* Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, 120: 1763–73 (2001).

Law, B., Waltner-Law M., Entingh A., *et al.* Salicylate-induced growth arrest is associated with inhibition of p70s6k and down-regulation of c-Myc, cyclin D1, cyclin A, and proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem*, 275: 38261–7 (2000).

Law, M., Forrester, E., Chyltil, A., *et al.* Rapamycin Disrupts Cyclin/Cyclin- Dependent These Complexes and Cyclin D1 Reverses Rapamycin Action by Stabilizing Kinase/p21/Proliferating Cell Nuclear Antigen Complexes. *Cancer Res*, 66: 1070-1080 (2006).

Lencioni, R. Loco-Regional Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, 52: 762-773 (2010).

Li, T., Christos, P., Sparano, J., *et al.* Phase II trial of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib plus fulvestrant in hormone receptor-positive metastatic breast cancer: New York Cancer Consortium Trial P6205. *Annals of Oncology*, 20: 642-647 (2009).

---

Llovet, J., Schwartz, M., Mazzaferro, V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*, 25: 181–200 (2005).

Llovet, M & Bruix, J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *Journal of Hepatology*, 48: S20–S37 (2008).

Llovet, M., Ricci, S., Mazzaferro, V. *et al.*, Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 359: 4 (2008).

Lope, C., Tremosini, S., Forneri, A., *et al.* Management of HCC. *Journal of Hepatology*, Volume 56, Supplement 1: S57-S87 (2012).

LoPiccolo, J., Blumenthal, G., Bernstein, W. *et al.*, Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations. *Drug Resistance Updates* 11: 32–50 (2008).

Maluccio, M & Covey, A. Recent Progress in Understanding, Diagnosis, and Treating Hepatocellular Carcinoma. *CA Cancer J Clin.*, 62(6): 394-399 (2012).

Marra, M. *et al.*, Molecular Targets and oxidative stress biomarkers in hepatocellular carcinoma: an overview. *Journal of Translational medicine*, 9, 171: 1-14 (2011).

McCubrey, J., Steelman, L., Abrams, S., *et al.* Emerging MEK inhibitors. *Expert Opin Emerg Drugs*, 15: 203-223 (2010).

McCubrey, J., Steelman, L., Abrams, S., *et al.* Emerging Raf inhibitors. *Exp Opin Emerging Drugs*, 14: 633-648 (2009).

Meza-Junco, J., *et al.* Locoregional radiological treatment for hepatocellular carcinoma; Which, when and how? *Cancer Treatment Reviews*, 38: 54–62 (2012).

Nelsen, C., Rickheim, D., Tucker, M., *et al.* Evidence that cyclin D1 mediates both growth and proliferation downstream of TOR in hepatocytes. *J Biol Chem*, 278: 3656–3563 (2003).

Neuveut, C., Yu, E., Buendia, M., Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *Journal of Hepatology*, Vol. 52: 594–604 (2010).

Nishidi, N. & Goel, A. Genetic and Epigenetic Signatures in Human Hepatocellular Carcinoma: A Systemic Review. *Current Genomics*, 12: 130-137 (2011).

O'Dwyer, P., Giantonio, B., Levy, D., *et al.* Gefitinib in advanced unresectable hepatocellular carcinoma: results from the Eastern Cooperative Oncology Groups' study E1203. *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S (20 Supplement): 4143 (2006).

Okuda, K. *et al.* Hepatocellular Carcinoma. *J. Hepatol.* 32: 225-237 (2000).

Orlowski, R. & Kuhn, D. Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy: Lessons from the First Decade. *Clin Cancer Res*, 14: 6: 1649-1657 (2008).

Park, J., Finn, R., Kim, J., *et al.* Phase II, open-label study of brivanib as first-line therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.*, 17: 1973-1983 (2011).

Perabo, F. & Müller, S. New agents for treatment of advanced transitional cell carcinoma. *Annals of Oncology*, 18: 835-843 (2006).

Philip, P., Mahoney, M., Allmer, C., *et al.* Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J Clin Oncol*, 23: 6657–6663 (2005).

---

Pollak, M., Schernhammer, E., Hankinson, S. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer*, 4: 505-518 (2004).

Poon, R., Ho, J., Tong, C., *et al.* Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg*, 91: 1354–1360 (2004).

Ramanathan, R., Belani, C., Singh, D. Phase II study of lapatinib, a dual inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase 1 and 2 (Her2/Neu) in patients with advanced biliary tree cancer or hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S (20 Supplement): 4010 (2006).

Sabatini D. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer*, 6: 729-734. (2006).

Salhab M. & Canelo R. An overview of evidence-based management of hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *J Can Res Ther*, 7: 463-75 (2011).

Sarmiento-Ribeiro, A. B. Alterações fenotípicas da célula tumoral e a sua relação com a resistência à quimioterapia. Tese de Doutoramento, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal (2000).

Severi, T., Malenstein, H., Verslype, C. *et al.*, Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets. *Acta Pharmacologica Sinica* 31: 1409–1420 (2010).

Spangenberg, H., Thimme, R., Blum, H. Evolving therapies in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Biologics: Targets & Therapy*, 2 (3): 453-462 (2008).

Strimpakos, A., Karapanagiotou, E., Saif, M., *et al.* The role of mTOR in the management of solid tumors: an overview. *Cancer Treatment Reviews* 35: 148-159 (2009).

Szabó, E., Páska, C., Novák, P., *et al.* Similarities and Differences in Hepatitis B and C Virus Induced Hepatocarcinogenesis. *Pathology Oncology Research* Vol. 10, No 1: 1-7 (2004).

Tashiro, E., Tsuchiy, A., Imoto, M. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer science*, 98(5): 629-635 (2007).

Thomas, M., Chadha, R., Glover, K., *et al.* Phase 2 study of erlotinib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 110: 1059–67 (2007).

Toh, H., Chen, P., Carr, B., Knox, *et al.* Linifanib phase II trial in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *J Clin Oncol.*, 28: 15s (suppl; Abstract 4038) (2010).

Varela, M., Real, M., Burrel, *et al.* Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *J Hepatol*, 46: 474–481 (2007).

Venook, A., Papandreou, C., Furuse, J. *et al.* The Incidence and Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: A Global and Regional Perspective. *The Oncologist*, 15, 4: 5-13 (2010).

Villanueva, A., Chiang, D., Newell, P. *et al.* Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 135: 1972–1983 (2008).

Villanueva, A., Newell, P., Chiang, D. *et al.* Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*, 27: 55–76 (2007).

---

Wangpaichitr, M., Wu, C., You, M., *et al.* Inhibition of mTOR restores cisplatin sensitivity through downregulation of growth and anti-apoptotic proteins. *Eur J Pharmacol.* September 4; 591(1-3): 124–127 (2008).

Wu, W., Cho, C., Lee, C., *et al.* Proteasome inhibition: A new therapeutic strategy to cancer treatment. *Cancer Letters.* 293(1): 15-22 (2010).

Xu, S., Robbins, D., Frost, J., *et al.* MEKK1 phosphorylates MEK1 and MEK2 but does not cause activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA,* 92: 6808-6812 (1995).

Yang, J., Nakamura, I., Roberts, L., The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: Current status and therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology* 21: 35–43 (2011).

Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., *et al.* Synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in murine hepatocellular carcinoma. *Hepatology,* 35: 834–842 (2002).

Zender, L., Villanueva, A., Tovar, V., *et al.* Cancer gene discovery in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology,* 52: 921-929 (2010).

Zeng, G., Apte, U., Cieply, B., *et al.* siRNA-mediated beta-catenin knockdown in human hepatoma cells results in decreased growth and survival. *Neoplasia,* 9: 951-959 (2007).

Zhu, A., Stuart, K., Blazskowsky, L., *et al.* Phase 2 study of cetuximab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer,* 110: 581–9 (2007).