

**DANIELE XAVIER ASSAD**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DOS INIBIDORES DO MTOR  
ASSOCIADOS OU NÃO À RADIOTERAPIA EM LINHAGEM CELULAR  
DE CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO**

**BRASÍLIA, 2015**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DANIELE XAVIER ASSAD**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DOS INIBIDORES DO MTOR  
ASSOCIADOS OU NÃO À RADIOTERAPIA EM LINHAGEM CELULAR  
DE CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Eliete Neves da Silva Guerra

Brasília, 2015

**DANIELE XAVIER ASSAD**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DOS INIBIDORES DO MTOR  
ASSOCIADOS OU NÃO À RADIOTERAPIA EM LINHAGEM CELULAR  
DE CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 03 de dezembro de 2015

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra (presidente)  
Universidade de Brasília (UNB)

Prof. Dra. Angélica Amorim Amato  
Universidade de Brasília (UNB)

Prof. Dra. Andréia Cristina de Melo  
Instituto Nacional do Câncer (INCA)

*Ao meu amado e saudoso pai, Luiz Antonio Xavier Assad.*

*Ao meu amado e saudoso sogro, Kunio Suzuki.*

*Aos dois homens mais brilhantes que conheci.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à Nossa Senhora pelas graças recebidas.

Ao meu esposo Mauro, agradeço pela compreensão nas minhas ausências, pelo amor e apoio irrestritos, não conseguiria sem você.

À minha família, pela vibração e entusiasmo em todas as etapas da minha formação e meus grandes incentivadores.

Aos meus grandes amigos que estão ao meu lado em todos os momentos.

Ao Centro de Oncologia do Hospital Sírio-Libanês, em especial ao Dr. Gustavo Fernandes, por nos estimular a sair da zona de conforto na busca por novos desafios.

Aos colegas da Gerência de Câncer da Secretaria de Saúde, em especial à Dr<sup>a</sup> Maria Cristina Scandiuzzi. Agradeço pelo companheirismo e amizade.

Aos colegas do laboratório de Histopatologia Bucal que se tornaram grandes parceiros e amigos. À Dr<sup>a</sup> Silvia e à Dr<sup>a</sup> Bruna que tiveram total disponibilidade de me socorrer em muitos momentos.

Ao Gabriel, meu colega nos experimentos, por toda a paciência e gentileza nesses dois anos. Certamente serei eternamente grata a você.

Aos membros da banca, agradeço por aceitarem contribuir com o trabalho. Prof Dr<sup>a</sup> Angélica e Dr<sup>a</sup> Andréia vocês sempre foram grandes exemplos de brilhantismo e competência para mim.

À minha orientadora Prof Dr<sup>a</sup> Eliete, agradeço por me aceitar como aluna e por me ensinar a não usar muletas como desculpa para fugir dos desafios e dos sonhos. Pela incansável energia e dedicação à pós graduação e aos seus alunos.

*“Mesmo quando tudo parece desabar,  
cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir  
ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri,  
no caminho incerto da vida, que o mais  
importante é o decidir”*

*Cora Coralina*

## RESUMO

A via de sinalização PI3K/AKT/mTOR está frequentemente ativada nos carcinomas de células escamosas HPV-positivos, nos quais se inclui o câncer escamoso do colo do útero. Assim, esse trabalho propõe-se avaliar os efeitos biológicos dos inibidores do mTOR associados ou não à radioterapia em células de câncer do colo do útero HPV positiva. Foram utilizadas linhagens de células de câncer do colo do útero (HeLa) e queratinócito humano (HaCaT), usada como controle. Os inibidores de mTOR utilizados foram o temsirolimus, o everolimo, o resveratrol, a curcumina e o EGCG. O ensaio de viabilidade celular com o MTT foi realizado para obter a curva dose-resposta e determinação do IC<sub>50</sub> para cada inibidor do mTOR. Para efeito de comparação entre os medicamentos, realizou-se análise da viabilidade celular em concentrações fixas de 50µM para os inibidores derivados da dieta e de 10µM para o everolimo e o temsirolimus. O pré-tratamento das células com os inibidores do mTOR no IC<sub>50</sub> seguido por radioterapia foi realizado para avaliar efeito de radiosensibilização. O teste de lesão em monocamada foi realizado pós-tratamento com a curcumina e o everolimo. O perfil de morte celular induzido pelo tratamento com o temsirolimus, o resveratrol e a curcumina na linhagem HeLa foi avaliado pelo ensaio de citometria de fluxo. Os resultados mostraram que os inibidores do mTOR rapanálogos na concentração de 10µM e os derivados da dieta na concentração de 50µM induziram citotoxicidade leve ou moderada nas 2 linhagens. Quando associados à radioterapia, os inibidores do mTOR apresentaram maior citotoxicidade em relação à radioterapia isolada. A curcumina interferiu no fechamento das feridas com as 2 linhagens de forma mais intensa que o everolimo. Observou-se ainda que o temsirolimus pode levar à apoptose tardia ou necrose após 24h de tratamento na linhagem HeLa. Dessa forma, podemos inferir que os inibidores do mTOR são ativos no tratamento do câncer do colo do útero e em especial associados à radioterapia.

**PALAVRAS-CHAVE:** Inibidores do mTOR, câncer do colo do útero, viabilidade celular, radioterapia.

## ABSTRACT

The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway is frequently activated in HPV-positive, squamous cell cancers, such as cervical cancer. This study aims to investigate the biological effects of mTOR inhibitors associated or not with radiotherapy in a HPV-positive cervical cancer cell (Hela). A human keratinocytes cells (HaCaT) was used as control. Temsirolimus, everolimus, resveratrol, curcumin and EGCG were the mTOR inhibitors evaluated. The MTT cell viability assay was performed in order to obtain the dose response curves and the IC<sub>50</sub> for each mTOR inhibitor. As comparison among the mTOR inhibitors, a cell viability analysis was done in a fixed concentration of 50µM for the diet derived mTOR inhibitors and 10µM for everolimus and temsirolimus. The cells were also pre-treated with the mTOR inhibitors at IC<sub>50</sub> followed by radiotherapy to evaluate the radiosensitization. The scratchy assay was performed with curcumin and everolimus. The cell death profile after treatment of HeLa cells with temsirolimus, resveratrol and curcumin was assessed with flow cytometry. The results showed that the rapanalogues in a fixed concentration of 10µM and the diet derived mTOR inhibitors in a fixed concentration of 50µM caused mild and moderate cytotoxicity in both cell lines. The association of mTOR inhibitors with radiotherapy resulted in more intense cytotoxicity than radiotherapy alone. Curcumin interferes more with wound closure than everolimus in both cell lines. After 24h, temsirolimus treatment can cause late apoptosis or necrosis in HeLa cells. Based on these data, mTOR inhibitors are active in the treatment of cervical cancer, specially in association with radiotherapy.

KEYWORDS: mTOR inhibitors, cervical cancer, cell viability, radiotherapy.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação esquemática da estrutura do HPV .....	16
Figura 2:	A cascata de sinalização PI3K/AKT/mTOR. ....	17
Figura 3:	Efeitos das oncoproteínas do HPV nas proteínas p53, Rb e na via do mTOR. ....	20
Figura 4:	Curva dose-resposta dos inibidores do mTOR na linhagem HeLa em 24 horas e 48 horas .....	31
Figura 5:	Curva dose-resposta dos inibidores do mTOR na linhagem HaCaT em 24 horas e 48 horas .....	32
Figura 6:	Efeito dos inibidores do mTOR derivados da dieta na viabilidade celular nas linhagens HeLa e HaCaT na concentração de 50 $\mu$ M .....	35
Figura 7:	Efeito dos rapanálogos na concentração de 10 $\mu$ M na viabilidade celular nas linhagens HeLa e HaCaT. ....	36
Figura 8:	Viabilidade celular (%) na linhagem HeLa com e sem radioterapia (RT) associada aos inibidores do mTOR no IC50. ....	37
Figura 9:	Viabilidade celular (%) na linhagem HaCaT com e sem Radioterapia (RT) associada aos inibidores do mTOR no IC50 .....	38
Figura 10:	Cálculo do tamanho da área da ferida expresso em porcentagem para a linhagem HeLa após tratamento com controle, curcumina e everolimo .....	39
Figura 11:	Avaliação do fechamento de lesão em monocamada da linhagem HeLa após tratamento com controle, curcumina e everolimo .....	40
Figura 12:	Cálculo do tamanho da área da ferida expresso em porcentagem para a linhagem HaCaT após tratamento com controle, curcumina e everolimo .....	41
Figura 13:	Avaliação do fechamento de lesão em monocamada da linhagem HaCaT após fechamento com controle, curcumina e everolimo .....	42
Figura 14:	Distribuição das células HeLa após tratamento com temsirolimus .....	43
Figura 15:	Distribuição das células HeLa após tratamento com curcumina .....	44
Figura 16:	Distribuição das células HeLa após tratamento com resveratrol .....	44
Figura 17:	Avaliação do perfil de morte celular induzido pelos inibidores do mTOR curcumina, temsirolimus e resveratrol no IC50 na linhagem HeLa. ....	46

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Valores de IC <sub>50</sub> em 24h e 48h para os inibidores do mTOR nas linhagens HeLa e HaCaT .....	30
Tabela 2 – Índice de seletividade dos inibidores do mTOR com 24h e 48h de tratamento .....	33
Tabela 3 – Porcentagem de células viáveis (%) após o tratamento com os inibidores do mTOR derivados da dieta nas linhagens HeLa e HaCaT na concentração de 50µM. (* p<0,05 tratamento versus controle negativo) .....	34
Tabela 4 – Porcentagem de células viáveis (%) após o tratamento com os rapanálogos nas linhagens HeLa e HaCaT na concentração de 10µM (*p<0,05 tratamento versus controle negativo) .....	35
Tabela 5 – Porcentagem de células viáveis (%) após o tratamento com os inibidores do mTOR associados ou não à radioterapia. (*p < 0,05 radioterapia versus sem radioterapia) .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA - Ácido desoxirribonucleico

HPV - Papiloma Vírus Humano

mTOR - alvo da rapamicina em mamíferos

EGCG - *epigallocatechin gallate*

EGFR - receptor do fator de crescimento epidérmico

pRb - proteína supressora tumoral do retinoblastoma

TSC1 - complexo 1 da esclerose tuberosa

TSC2 - complexo 2 da esclerose tuberosa

PI3KCA - Gene que codifica PI3K

mTORC1 - Complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos

mTORC2 - Complexo 2 do alvo da rapamicina em mamíferos

ATP- adenosina trifosfato

AMP- adenosina monofosfato ativada

GPCR- receptores acoplados a proteína G

PI3K- Fosfatidilinositol -3 -quinase

PIP3- fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato

PTEN- fosfatase e homólogo de tensina

AKT- proteína serina/treonina cinase

PDK1- proteína cinase-1 dependente de 3- fosfoinositide

RAPTOR - proteína regulatória associada ao mTOR

mLST8 - alvo da subunidade do complexo da rapamicina LST8

PRAS40 - proteína ligante do RAPTOR

Rheb - proteína homóloga a Ras enriquecida no cérebro

GTP - Guanosina-5'-trifosfato

S6K1- Proteína cinase S6 ribossômica

4E-BP1 - Proteína de ligação do fator 4E de alongamento eucariótico

eIF4E - fator 4E de alongamento eucariótico

mRNA - RNA mensageiro

RICTOR - proteína ligante do mTOR insensível à rapamicina

HeLa - linhagem de câncer do colo do útero HeLa

MAPK - proteína quinase ativada por mitógenos  
PDZ - proteínas PSD95, Dlg1, ZO-1  
pAKT - AKT fosforilada  
FKBP12 - proteína ligante de FK506  
AMPK - proteína quinase ativada por AMP  
HIF - proteína induzida por hipóxia  
EGF - fator de crescimento epidérmico  
PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas  
RP - resposta parcial  
IC<sub>50</sub> - concentração que induz 50% de citotoxicidade celular  
HaCaT - linhagem de queratinócitos humanos  
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium  
SFB - soro fetal bovino  
PBS - solução tampão de fosfato  
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético  
RPM - rotações por minuto  
DMSO - dimetilsulfóxido  
MTT - *brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol*  
HCl - ácido clorídrico  
IST - índice de seletividade tumoral  
CACON-HUB - Centro de Alta Complexidade em Oncologia do Hospital Universitário de Brasília  
Gy/min - Gray/minuto  
FTIC - Isotiocianato de fluoresceína  
7-ADD - marcador nuclear fluorescente, 7-aminoactinomicina D  
FS-fosfatidilserina  
MTS - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)*  
PCNA - antígeno nuclear de proliferação celular  
BAX - proteína reguladora da apoptose BAX  
BCL-2- proteína reguladora da apoptose BCL-2  
BCL-xl- proteína anti-apoptótica BCL-xl

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	14
2.1	EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO .....	14
2.2	HPV E CARCINOGENESE DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO .....	15
2.3	A VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT/MTOR .....	17
2.4	A ATIVAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT/MTOR NO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO .....	19
2.5	OS INIBIDORES DO MTOR .....	20
2.6	ESTUDOS CLÍNICOS COM INIBIDORES DO MTOR EM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO .....	22
3	OBJETIVOS .....	23
3.1	OBJETIVO GERAL .....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
4	MÉTODOS .....	24
4.1	CULTURA DE CÉLULAS .....	24
4.2	INIBIDORES DO MTOR .....	25
4.3	TESTE DE VIABILIDADE CELULAR – CURVA DOSE-RESPOSTA .....	25
4.4	TESTE DE VIABILIDADE CELULAR DOS INIBIDORES DO MTOR ASSOCIADOS À RADIOTERAPIA .....	27
4.5	TESTE DE LESÃO EM MONOCAMADA – SCRATCH ASSAY .....	27
4.6	CITOMETRIA FLUXO-MORTE CELULAR .....	28
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	29
5	RESULTADOS .....	30
5.1	TESTE DE VIABILIDADE CELULAR – CURVA DOSE-RESPOSTA .....	30
5.2	ÍNDICE DE SELETIVIDADE TUMORAL (IST) .....	33
5.3	TESTE DE VIABILIDADE CELULAR EM CONCENTRAÇÕES FIXAS .....	33
5.4	VIABILIDADE CELULAR COM OS INIBIDORES DO MTOR ASSOCIADOS À RADIOTERAPIA .....	37
5.5	TESTE DE LESÃO EM MONOCAMADA – SCRATCH ASSAY .....	39
5.6	AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR .....	44
6	DISCUSSÃO .....	48
	REFERÊNCIAS .....	59

## 1 INTRODUÇÃO

Os países em desenvolvimento como os do continente africano, da América Central, América do Sul e Ásia contribuem com 76% a 85% dos casos do câncer do colo do útero (1). O tratamento da doença metastática tem finalidade paliativa e a vasta maioria das pacientes com doença recidivada evolui para óbito, embora o tratamento sistêmico tenha evoluído para drogas-alvo como o erlotinibe e o bevacizumabe (2, 3). Os efeitos antitumorais das terapias atuais são limitados, provavelmente devido à alta heterogeneidade clonal e complexidade das vias de sinalização intracelular (4).

Mais de 95% dos tumores das pacientes com câncer do colo do útero são positivos para o ácido desoxirribonucleico (DNA) oncogênico do Papiloma Vírus Humano (HPV), sendo este vírus causa necessária para o desenvolvimento do tumor (5, 6) A infecção pelo HPV tem múltiplos efeitos intracelulares em diferentes vias de sinalização, como a via PI3K/AKT/mTOR, a qual está comumente desregulada nos tumores ginecológicos e em particular nos tumores relacionados ao HPV (7). Foi descrita em linhagens tumorais de câncer do colo do útero maior sensibilidade ao tratamento com inibidores do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) em comparação às células normais (8).

A rapamicina foi o primeiro inibidor do mTOR descrito, porém outros rapanálogos, com propriedades farmacocinéticas mais favoráveis, foram desenvolvidos como o temsirolimus e o everolimo (9). Alguns compostos naturais também possuem propriedades de inibidores do mTOR, como a curcumina, o resveratrol e o *epigallocatechin gallate* (EGCG). O temsirolimus e o everolimo já foram incorporados ao tratamento do câncer de rim, tumores pancreáticos neuroendócrinos, e mama (10-12).

Nesse contexto, esse trabalho foi desenvolvido para avaliar os efeitos biológicos dos inibidores do mTOR associados ou não à radioterapia em células de câncer do colo do útero.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

Foram estimados, mundialmente, 528 mil novos casos de câncer do colo do útero e 266 mil óbitos por esta neoplasia no ano de 2012. A grande maioria dos casos ocorre em países menos desenvolvidos, sendo estes responsáveis por até 12% dos casos desses tumores, devido possivelmente ao rastreamento inadequado (1).

No Brasil, segundo estimativa de 2016 do Instituto Nacional do Câncer, o câncer do colo do útero, excetuando as neoplasias de pele, foi o terceiro tumor mais frequente em mulheres, responsável por 5,7% dos tumores malignos no sexo feminino. Foram estimados 16.340 novos diagnósticos, com um risco de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres brasileiras (13). Em 2013, ocorreram 5.430 óbitos por esse tipo de câncer (14).

Os principais tipos histológicos do câncer do colo do útero são o escamoso e o adenocarcinoma (15). Ambos possuem os mesmos fatores de risco e estão associados à infecção pelo HPV ou à resposta deficiente do sistema imune à infecção pelo HPV (16). A infecção persistente pelos subtipos de alto risco do HPV é causa necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento do câncer do colo do útero (17). Para cada 1 milhão de mulheres infectadas, cerca de 10% desenvolverão alterações potencialmente malignas no colo do útero. Dessas, 8% apresentarão câncer limitado à camada epitelial do colo do útero (carcinoma *in situ*) e um número menor apresentará doença invasiva (18). Mais de 95% dos casos podem ser atribuídos a algum subtipo de HPV, especialmente os subtipos 16 e 18 (19).

O câncer do colo do útero representa 53,4% do total de tumores associados ao HPV nas mulheres (20). Cerca de 5% do total de tumores em humanos estão relacionados ao HPV (21). O Dr. Harald Zur Hausen formulou a hipótese em 1975 segundo a qual o fator causal das lesões cervicais pré-malignas e câncer eram causadas pelo HPV e, por essa descoberta, recebeu o prêmio Nobel em Medicina em 2008 (22). A transmissão do HPV se dá por via sexual, tendo perfil das doenças sexualmente transmissíveis (6). Cerca de 75% das mulheres com vida sexual ativa adquirem infecção pelo HPV em algum momento da vida (17).

Mulheres do grupo de alto risco para esse tipo de câncer são as com risco de infecção persistente pelo HPV (23). Fatores-chave para a aquisição e persistência da

infecção pelo HPV estão relacionados à idade precoce do início da atividade sexual, múltiplos parceiros sexuais, multiparidade, baixo nível socioeconômico, tabagismo, uso de contraceptivos, história de doenças sexualmente transmissíveis ou uma combinação desses fatores (24-26)

Em termos de saúde pública, a associação entre infecção pelo HPV e o desenvolvimento tumoral permite que sejam tomadas importantes medidas efetivas para redução da incidência da doença e para sua prevenção (27). Dessa forma, a vacinação em meninas antes do início da atividade sexual oferece potencial prevenção primária contra os tumores relacionados às infecções do HPV-16 ou HPV-18 (28). O rastreamento com citologia cervical, associado ou não aos testes moleculares de detecção do DNA-HPV oncogênico, permite a detecção de lesões precursoras (29, 30).

## 2.2 HPV E CARCINOGENESE DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

A maioria das infecções pelo HPV de alto risco é transitória e assintomática e mesmo lesões sintomáticas podem ter resolução espontânea dentro de 6 a 18 meses após a infecção, através da eliminação pela resposta imune do hospedeiro (27). Em uma minoria dos casos não há resolução da infecção, sendo que mulheres acometidas pelo HPV 16 têm 40% de risco de desenvolver lesões pré-malignas após 3 a 5 anos da infecção (31). O pico de incidência da doença é entre 30 a 35 anos (16).

Foram descritos, até o momento, mais de 200 subtipos de HPV (32). As oncoproteínas virais E6 e E7, as quais estão consistentemente expressas nos tumores, são necessárias tanto para indução quanto para manutenção do fenótipo tumoral (33, 34). De forma geral, para os tumores anogenitais, os subtipos de HPV de maior risco e maior prevalência são 16, 18, 31 e 45. Outros subtipos de HPV de alto risco são: 33, 35, 39, 51, 54, 56, 58, 59, 68. (32)

Os vírus HPV são da família *Papillomaviridae* e gênero *Papilomavírus* e têm tropismo por células epiteliais escamosas (35). São vírus não envelopados com genoma circular em fita dupla de DNA contendo 8000 pares de bases (8Kb) (32). Apesar do pequeno tamanho, sua biologia molecular é complexa. As sequências do DNA dos subtipos de HPV, como o 16 e 18 – que são os mais relacionados às neoplasias –, codificam dois genes de leitura tardia L1 e L2 e seis genes de leitura precoces E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (36). Três oncogenes E5, E6 e E7 modulam os



processos de transformação. Duas proteínas reguladoras E1 e E2 modulam a transcrição e replicação. Duas proteínas estruturais L1 e L2 compõem o capsídeo viral. (35) Uma representação da organização do genoma do HPV 16 está ilustrada na Figura 1.

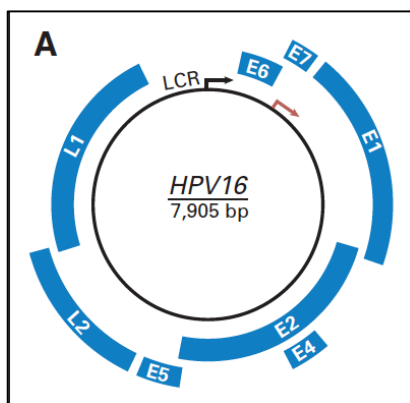


Figura 1: Representação esquemática da estrutura do HPV. Retirada de Hellner et al. (32)

Nas lesões pré-neoplásicas e no câncer há integração física dos genes E6 e E7 do genoma viral ao genoma do hospedeiro. Dessa forma, o vírus reprograma o DNA das células infectadas e desencadeia a produção das oncoproteínas virais (19, 34, 36, 37). As oncoproteínas E5, E6 e especialmente a E7 possuem atividade imortalizadora, com interações diretas e indiretas com o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e com as proteínas supressoras tumorais do retinoblastoma (pRb) e p53 (32).

A oncoproteína E5 tem papel na ativação do EGFR, ocasionando atraso da sua degradação, promovendo a proliferação celular e também inibindo a via de apoptose de forma direta (36, 38). A oncoproteína E6 interage com os complexos 1 e 2 da esclerose tuberosa (TSC1 e TSC2) e os degrada, levando ao aumento da atividade do mTOR (39). A degradação de p53, estimulada pela E6, desregula o controle da progressão do ciclo celular, levando ao crescimento da célula tumoral (5, 18, 36, 37). A oncoproteína E7 interfere com a interação entre pRb e os fatores de transcrição E2F, resultando na liberação dos fatores E2F1-3 nas suas formas ativas, aumentando a entrada no ciclo celular com progressão da fase G1 para S, diminuindo a apoptose e aumentando a instabilidade genômica (18).

Além da inibição do p53 e do pRb, o HPV também interage com quatro vias de sinalização principais: os fatores de crescimento, o notch receptor, o Ras e o gene que codifica PI3K (PI3KCA), para estimular a sobrevivência e proliferação da célula

do hospedeiro, levando à carcinogênese pela ativação e alteração dos componente da via PI3K/AKT/mTOR (21).

A via de sinalização PI3K/AKT/mTOR em células infectadas pelo HPV está ativa tanto por mutação de componentes da via quanto por ativação das moléculas de sinalização. A ativação desta via contribui para a instabilidade genética, desregulação da proliferação, resistência à apoptose e mudanças nas características do metabolismo, eventualmente levando à transformação maligna das células infectadas (8).

### 2.3 A VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT/MTOR

A via de sinalização PI3K/AKT/mTOR regula a proliferação e sobrevivência celular e angiogênese (40). Outro papel importante da via foi identificado na resposta das células à hipóxia e depleção de energia (41). As células não tumorais como linfócitos, células endoteliais e fibroblastos, bem como as células tumorais, dependem dessa via de sinalização. A ativação aberrante dessa via está ligada à carcinogênese (42). A Figura 2 ilustra a cascata de sinalização da via PI3K/AKT/mTOR.

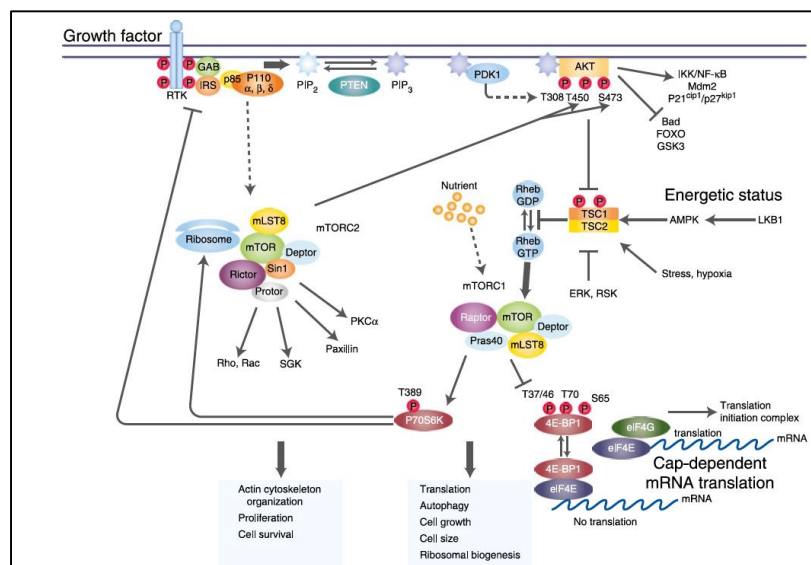


Figura 2: A cascata de sinalização PI3K/AKT/mTOR. Retirada de Willems et al. (41)

O mTOR é uma serina-treonina quinase e é a subunidade catalítica de dois complexos: complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC1) e complexo 2 do alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC2) (43). Os estímulos positivos para

o mTORC1 são os fatores de crescimento, as citocinas, os nutrientes e o *status* de energia celular (alta taxa de adenosina trifosfato em relação à adenosina monofosfato ativada (ATP/AMP) (44).

A ligação de fatores de crescimento aos receptores de tirosina quinase ou aos receptores acoplados à proteína G (GPCR) estimula a fosforilação e ativação da fosfatidilinositol -3 -cinase (PI3K) (45). A ativação da PI3K resulta na produção do segundo mensageiro fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3), enquanto o fosfatase e homólogo de tensina (PTEN) reverte essa reação. A proteína serina/treonina cinase (AKT) migra para a membrana celular, interage com PIP3 que é fosforilada pela proteína cinase-1 dependente de 3- fosfoinositide (PDK1) (46). Uma vez ativa, a AKT se transloca para o citoplasma e núcleo e fosforila vários substratos efetores envolvidos na regulação de diversas funções celulares, incluindo mTORC1 (47).

O mTORC1 é composto por mTOR, proteína regulatória associada ao mTOR (RAPTOR), alvo da subunidade do complexo da rapamicina LST8 (mLST8) e proteína ligante do RAPTOR (PRAS40) (46). A AKT pode ativar e fosforilar diretamente o mTOR ou pode ativá-lo indiretamente através de TSC2 (45, 48). O TSC2 forma complexo inibitório com o TSC1 para inativar a proteína homóloga a Ras enriquecida no cérebro (Rheb). Quando o TSC2 é fosforilada pela AKT, a atividade do complexo TSC1/TSC2 é inibida, permitindo acúmulo de Rheb ligado a Guanosina-5'-trifosfato (GTP) (49). A ativação de Rheb causa fosforilação de PRAS40 e sua dissociação do raptor com resultante ativação do mTORC1 (45). Os efetores do mTORC1 ativado são a proteína quinase S6 ribossômica (S6K1) e a proteína de ligação do fator 4E de alongamento eucariótico (4E-BP1)/ fator 4E de alongamento eucariótico (eIF4E) envolvidos na translação de RNA mensageiros (mRNA) e síntese proteica (48). O mTORC2 é composto pelo mTOR e mLST8 associado à proteína ligante do mTOR insensível à rapamicina (RICTOR). O mTORC2 fosforila e ativa diretamente a AKT e outras quinases, estando envolvido na organização do citoesqueleto e sobrevivência celular (50).

Diversos mecanismos levam à ativação constitutiva da via PI3K/AKT/mTOR nas neoplasias como: perda ou inativação do PTEN ou do p53, mutação ou amplificação de PIK3CA ou do AKT, mutação das proteínas reguladoras TSC1 ou TSC2 e superexpressão ou mutação dos receptores de tirosina quinase ou dos efetores do mTOR como S6K1 ou eIF4E (45, 51).

## 2.4 A ATIVAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT/MTOR NO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

Recentemente foi descrito que a ativação da via AKT/mTOR pode ser detectada após alguns minutos da exposição dos queratinócitos humanos ao HPV-16 (52). A ativação do mTOR é frequentemente observada em carcinoma de células escamosas HPV positivos, como os do colo do útero, da cabeça e pescoço e da orofaringe (21). O gene PI3K modula diferentes sinais para prevenir apoptose e promover a sobrevivência e proliferação celular em uma variedade de células, incluindo as linhagens celulares tumorais relacionadas ao HPV (53).

Estudos *ex vivo* em linhagens de câncer do colo do útero, como a HeLa (HeLa) mostraram que a proteína PI3K está superexpressa nessa linhagem e o tratamento com inibidores de PI3K inibiu o crescimento celular (53). A inibição da atividade do mTOR com rapamicina nas linhagens HeLa, Siha, Caski e C33A do câncer de colo do útero resultou em diminuição da proliferação das mesmas (54). Análises morfoproteômicas revelaram ativação constitutiva e superexpressão do mTOR fosforilado em lesões *in situ* de alto grau e no câncer escamoso do colo do útero, bem como ativação de outros locais da via de transdução como o EGFR (54, 55). A amplificação do cromossomo 3q26 que contém o gene PIK3CA, o qual codifica a subunidade catalítica da PI3K, ocorre em 50% dos tumores do colo do útero. (56).

A oncoproteína E5 é capaz de aumentar a sensibilidade do EGFR ao estímulo do EGF de forma a aumentar a ativação das vias PI3K/AKT/mTOR e da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (36, 50). A oncoproteína E6 inativa PTEN, através das proteínas PSD95, Dlg1, ZO-1 (PDZ), leva ao aumento de AKT fosforilada (pAKT) e à proliferação celular. A oncoproteína E6 pode ativar a PI3K através de receptores de tirosina quinase ou interação direta com a PI3K. A E6 bloqueia TSC1 e TSC2 através do aumento da atividade do mTORC1, levando ao crescimento celular (36). A oncoproteína E7 ativa a via PI3K/AKT/mTOR através da sua ligação à pRb com subsequente inibição da pRb, levando ao aumento da atividade de AKT (36). A Figura 3 ilustra os efeitos das oncoproteínas do HPV nas proteínas p53 e Rb e na via do mTOR.

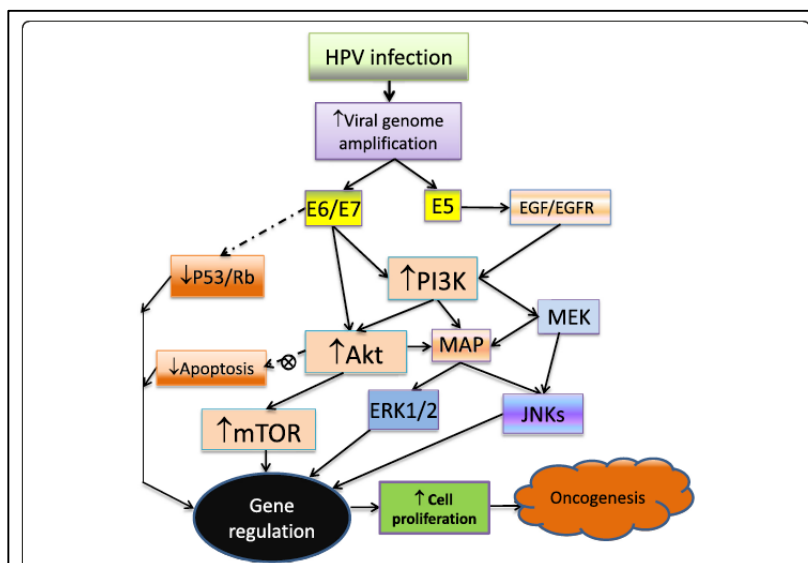


Figura 3: Efeitos das oncoproteínas do HPV nas proteínas p53, Rb e na via do mTOR. Retirada de Zhang et al. (21)

## 2.5 OS INIBIDORES DO MTOR

A rapamicina (sirolimus) é o protótipo do inibidor do mTOR. É produzida pelo fungo *Streptomyces hygroscopicus* e foi primeiramente encontrada em amostras do solo na Ilha de Páscoa em 1975 (56). A pobre solubilidade aquosa e estabilidade química da rapamicina restringiram sua aplicação na terapia do câncer, apesar da atividade antiproliferativa contra diversos tipos de neoplasia em estudos pré-clínicos. Dessa forma, diversos análogos da rapamicina (rapanálogos), com propriedades farmacológicas mais favoráveis foram desenvolvidos, incluindo o CCI-779 (Temsirolimus, Wyeth) e o RAD001 (Everolimo, Novartis) (57).

A rapamicina e seus rapanálogos agem como inibidores alostéricos específicos do mTORC1 (45). O temsirolimus e o everolimo são pró-drogas semi-sintéticas, cujo metabólito ativo é a rapamicina. Esses fármacos formam complexo inibitório com seu receptor intracelular: a proteína ligante de FK506 (FKBP12). Esse complexo se liga ao domínio FRB do mTOR, levando à inibição da função catalítica do complexo mTORC1, interferindo na transdução de proteínas fundamentais que codificam mRNAs, os quais estão envolvidos na regulação do ciclo celular, glicólise e adaptação às condições com baixo teor de oxigênio (hipóxia) (51). Dessa forma, ocorre inibição do crescimento tumoral e da expressão de fatores induzidos por hipóxia, resultando na expressão reduzida de fatores envolvidos na angiogênese tumoral (46).

Os rapanólogos são diferentes no metabolismo, estrutura e esquema de administração (45). O temsirolimus, um éster de rapamicina, pode ser administrado por via oral ou endovenosa (57). Esse fármaco demonstrou atividade antitumoral em uma variedade de células neoplásicas, em particular tumores com deleção do PTEN (45). O temsirolimus está aprovado para o tratamento do câncer de rim (44). Da mesma forma, o everolimo é um análogo da rapamicina disponível na forma oral. Ele está aprovado para uso no câncer de rim, no tumor neuroendócrino de pâncreas e no câncer de mama (44).

Os produtos naturais derivados da dieta incluindo a curcumina, o resveratrol, o EGCG, a genisteína e a cafeína também podem interferir na via PI3K/AKT/mTOR direta ou indiretamente (57). O EGCG, componente do chá verde, é um potente antioxidante com potencial terapêutico (58). Em células de hepatocarcinoma, o EGCG ativou a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), resultando em supressão dos efetores da sinalização, incluindo o mTOR e o 4E-BP1 (59). O resveratrol, um flavonoide derivado das uvas e vinho tinto, apresenta potenciais antioxidante e antitumoral (60). Em linhagem de células de glioma U521, o resveratrol diminuiu a sinalização da via PI3K/AKT/mTOR e a combinação com a rapamicina aumentou a morte celular induzida pelo resveratrol (61). O resveratrol pode suprimir o potencial de invasão das células tumorais por inibir a hipóxia mediada por ativação da AKT, levando a redução da proteína induzida por hipóxia (HIF) (62). A curcumina é um polifenol natural isolado da planta *Curcuma longa* que demonstrou inibição da proliferação de linhagens de leucemia pela inibição da via AKT/mTOR (63). Um dos mecanismos de ação da curcumina na inibição da proliferação decorre da inibição da sinalização das vias do fator de crescimento epidérmico (EGF) e do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e da indução da apoptose através da redução da fosforilação da PI3K e AKT (64). A curcumina induziu diminuição do mTOR fosforilado (p-mTOR), assim como das proteínas RAPTOR e RICTOR, integrantes de mTORC1, e p70S6K e 4E-BP1, efetores do final da via PI3K/AKT/mTOR, em células de câncer colorretal (65).

## 2.6 ESTUDOS CLÍNICOS COM INIBIDORES DO MTOR EM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

Os inibidores do mTOR já foram avaliados em estudos clínicos de fase 1 e fase 2 em pacientes com câncer de colo do útero.

O estudo de fase 1 não randomizado de Moroney et al. avaliou 74 pacientes com tumores ginecológicos e de mama, submetidas a 4 linhas de tratamento prévias, tratadas com doxorrubicina lipossomal, bevacizumab e temsirolimus. Foram incluídas 13 pacientes com câncer do colo do útero, sendo 10 com câncer escamoso. Houve duas respostas parciais (RP) nas pacientes envolvidas no estudo (66).

O estudo de fase 1 não randomizado de Piha-Paul et al. avaliou 41 pacientes com tumores ginecológicos avançados submetidas a 4 linhas de tratamento prévias, para tratamento com bevacizumab e temsirolimus. Seis pacientes com câncer do colo do útero foram incluídas, sendo 4 com câncer do tipo escamoso. Entre as pacientes adicionadas, 20% apresentou doença estável com duração maior que 6 meses (67).

O estudo de fase 2 não randomizado de Tinker et al. avaliou 38 pacientes com câncer do colo do útero, sendo 22 do tipo escamoso para o tratamento com temsirolimus como agente único. As pacientes só haviam recebido até uma linha prévia de quimioterapia. Uma resposta parcial (RP) foi descrita em paciente com adenocarcinoma (68).

Em pacientes com câncer escamoso de colo do útero tratadas com agentes para a via PI3K/AKT/mTOR, a presença de mutações no gene PI3KCA foi associada ao aumento significativo da sobrevida global (mediana de 9,4 meses) em comparação a pacientes sem mutação no PIK3CA (mediana de 4,2 meses;  $p=0,019$ ) (69-71).

Devido à ativação da via do mTOR no câncer de colo do útero decorrente principalmente dos efeitos das oncoproteínas do HPV, esse trabalho foi desenvolvido para avaliar os efeitos biológicos dos inibidores do mTOR associados ou não à radioterapia em linhagem celular de câncer do colo do útero.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos biológicos dos inibidores do mTOR associados ou não à radioterapia em linhagem celular de câncer do colo do útero.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Avaliar a viabilidade celular em células de câncer do colo do útero HPV positivas após o tratamento com inibidores do mTOR;

2) Identificar a concentração necessária dos inibidores do mTOR para induzir 50% de citotoxicidade celular ( $IC_{50}$ ) nas células de câncer do colo do útero;

3) Definir se há seletividade citotóxica dos inibidores do mTOR em células de câncer do colo do útero, quando comparadas aos queratinócitos;

4) Avaliar a citotoxicidade dos inibidores do mTOR associados à radioterapia em linhagem celular de câncer do colo do útero;

5) Analisar o efeito dos inibidores do mTOR na migração das células de câncer do colo do útero;

6) Avaliar o perfil de morte celular das células de câncer do colo do útero tratadas com os inibidores do mTOR.



## 4 MÉTODOS

### 4.1 CULTURA DE CÉLULAS

Foram utilizadas linhagens de células imortalizadas provenientes de culturas celulares humanas de câncer do colo do útero, bem como de uma linhagem de queratinócito humano, usada como controle para os experimentos. Dentre as linhagens de câncer de colo do útero, selecionamos a linhagem HeLa. Como controle, foi utilizada a linhagem de queratinócito humano HaCaT (HaCaT). As linhagens utilizadas nesse projeto estão descritas na ATCC, The Global Bioresource Center.

A linhagem HeLa é proveniente de uma paciente negra de 31 anos portadora de câncer do colo do útero. A célula HeLa contém sequências de HPV-18 (72). A linhagem HaCaT é proveniente de pele histologicamente normal, de um homem branco de 62 anos (73).

Para o cultivo das linhagens HeLa e HaCaT, foi utilizado o meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) complementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% e penicilina e estreptomicina a 1%. O meio de cultura foi esterilizado por filtração em membrana de 0,2 $\mu$ m e mantido a 4°C, sendo aquecido em banho-maria à temperatura de 37°C por aproximadamente 10 minutos, antes do uso. Todos os reagentes utilizados foram comprados da empresa Sigma Aldrich®. As células foram mantidas em condições ideais, em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C e em média a cada três dias era realizada a troca do meio de cultura e a cada sete dias era realizado o repique celular.

Para o repique, o meio de cultivo era descartado e as células lavadas uma vez com solução tampão de fosfato (PBS) pré-aquecido, sendo em seguida tratadas com solução de tripsina 0,25% acrescida de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 5%, por 5 minutos, à temperatura de 37°C. Após o desprendimento das células da placa de cultivo por digestão enzimática, a tripsina era inativada por adição de 5 mL de meio de cultura completo. As células eram coletadas por centrifugação a 2.000 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado, e o *pellet* de células ressuspendido em meio de cultivo completo. Dessa solução, foram utilizados 10 $\mu$ L para a contagem de células em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico invertido. O número total de células era calculado por meio da razão entre o número

total das células contadas nos quatro quadrantes x fator de diluição da suspensão de células x  $10^4$ , por quatro, conforme a fórmula:

$$\frac{\text{Numero total de células x fator de diluição x } 10^4}{4}$$

4

A partir do número obtido por essa fórmula, determinamos a quantidade necessária de solução celular a ser plaqueada para obter a densidade desejada em cada experimento.

## 4.2 INIBIDORES DO MTOR

Os quimioterápicos inibidores do mTOR utilizados foram os rapanálogos temsirolimus e everolimo e os produtos naturais derivados da dieta foram o resveratrol, a curcumina e o EGCG. Todos os inibidores do mTOR foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich®, em forma liofilizada, com grau de pureza analítica e mantidos estocados conforme instruções do fabricante. Para os experimentos, uma solução mãe de cada substância foi preparada. O EGCG (peso molecular 458,370u) foi diluído em água miliq em uma concentração de 21816 $\mu$ M, o resveratrol (peso molecular 228,240u), a curcumina (peso molecular 368,380u), o temsirolimus (peso molecular 1030,290u) e o everolimo (peso molecular 958,220u) foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 43813, 9,953, 10436, 9706  $\mu$ M respectivamente. Essas soluções mãe foram armazenadas a -80°C até a sua utilização nos experimentos.

## 4.3 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR - CURVA DOSE-RESPOSTA

A viabilidade celular resultante do tratamento com os inibidores do mTOR foi aferida pelo teste de avaliação da atividade mitocondrial das células. Esse teste avalia a capacidade das enzimas mitocondriais das células tratadas em reduzir o MTT (*brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol*) a cristais de formazam. O produto de formazam apresenta uma coloração arroxeada que após ser diluído em solvente alcoólico pode ter sua absorvância aferida em uma leitora de microplaca (Thermo Plate TP reader) a 570 nm e comparada à absorvância dos devidos controles.

As células metabolicamente ativas reduzem o MTT a cristais de formazam insolúveis em água e solúveis em etanol. Dessa forma, quanto mais células viáveis, mais cristais são formados e maior será a absorbância da amostra (74).

Para a realização desse experimento, as linhagens foram plaqueadas em placas de 96 poços (TPP) na densidade de 5.000 células por poço e mantidas em incubadora em condições ideais por 24 horas. Após esse período, as células foram tratadas com os inibidores do mTOR. Os inibidores do mTOR foram diluídos em meio de cultura para obter as concentrações desejadas para a curva dose-resposta específicas para cada inibidor.

Para o EGCG, as concentrações utilizadas foram de 100, 50, 25, 10, 5, 2,5, 1,25  $\mu\text{M}$ . Para o resveratrol, as concentrações utilizadas foram de 150, 100, 50, 25, 10, 2,5, 1,25  $\mu\text{M}$ . Já para a curcumina, as concentrações utilizadas foram de 50, 25, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,75  $\mu\text{M}$ . Para o temsirolimus e o everolimo as concentrações utilizadas foram de 10, 7,5, 5, 2,5, 1,25, 0,75, 0,375  $\mu\text{M}$ . As células também foram tratadas com os devidos controles negativos (água milliQ para o EGCG e DMSO para Resveratrol, curcumina, temsirolimus e everolimo) em concentração semelhante à maior utilizada com cada inibidor de mTOR. Os valores de concentrações utilizadas foram utilizadas em outros estudos com linhagens tumorais.

Após 24 e 48 horas de tratamento, as células eram retiradas da incubadora e para cada 100 $\mu\text{L}$  de meio com inibidor do mTOR foram adicionados 10 $\mu\text{L}$  de solução a 5mg/mL de MTT (Sigma – Aldrich, EUA). As placas foram recobertas com papel alumínio e retornavam à incubadora. Após 4 horas, era aspirado o meio de cultura com a solução de MTT e acrescentado 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol acidificado (25mL de isopropanol + 104 $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico (HCl) 100%). As placas eram agitadas por 10 minutos à velocidade média. Finalmente, a absorbância das células foi verificada em uma leitora de microplaca a 570 nm. Para obter a viabilidade resultante do tratamento a absorbância das células tratadas, foi comparada à absorbância de seu devido controle negativo, estabilizado como 100% de células viáveis.

A concentração necessária de inibidor de mTOR capaz de induzir 50% de citotoxicidade celular ( $\text{IC}_{50}$ ) foi calculada e os dados obtidos permitiram estimar o índice de seletividade tumoral (IST) para o qual foi realizada a razão entre o  $\text{IC}_{50}$  obtido para a célula controle (HaCaT) e as células neoplásicas, HeLa. Esse índice foi calculado conforme publicado anteriormente (75) segundo a fórmula:

$$IST = \frac{IC_{50} \text{ células controle}}{IC_{50} \text{ células tumorais}}$$

#### 4.4 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR DOS INIBIDORES DO MTOR ASSOCIADOS À RADIOTERAPIA

As células das linhagens HeLa e HaCaT foram plaqueadas em 02 placas distintas de 96 poços na densidade de 5.000 células/poço e mantidas nas condições ideais de crescimento em incubadora. Após 24 horas do plaqueamento, foi realizado o tratamento com os inibidores do mTOR no IC<sub>50</sub> e seus respectivos controles negativos. Após 24h do tratamento, o meio de cultura foi removido e foram acrescidos 100 µL de PBS em cada um dos poços conforme descrito por Elias et al (76). As placas foram transportadas para o Centro de Alta Complexidade em Oncologia do Hospital Universitário de Brasília (CACON-HUB), sendo, uma das placas irradiada a 2 Gray/minuto (Gy/min) com o equipamento acelerador linear Siemens Primus linear com 6MV photon beams. A outra placa foi armazenada em meio ambiente sem irradiação. Após a radioterapia as placas retornaram ao laboratório. O PBS era aspirado e as células mantidas em 100 µL de meio de cultura em condições ideais por 24 horas. Decorrido esse tempo, as células foram submetidas ao teste MTT e a absorbância das células submetidas a radioterapia foi aferida e comparada à absorbância das células que não sofreram radiação.

#### 4.5 TESTE DE LESÃO EM MONOCAMADA- SCRATCH ASSAY

Para realizar o ensaio de fechamento da ferida, foram utilizadas placas de 6 poços. Para o preparo das placas, foram adicionados 2 mL de solução de fibronectina a 10µg/mL em cada poço e a placa foi incubada à 4°C overnight. Após incubação, a solução de fibronectina foi aspirada e a placa permaneceu em fluxo laminar até secar completamente. As placas foram armazenadas à 4°C até seu uso. Para o plaqueamento, as células foram usadas em concentração de 1x10<sup>6</sup> células/poço.

Após 24h, a monocamada de células foi riscada manualmente com uma ponta de pipeta de plástico de 200 $\mu$ L, lavada com PBS e tratada com uma solução de inibidores do mTOR na concentração referente ao IC<sub>50</sub> e controle negativo. Os poços foram fotografados nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 e 72 horas em um microscópio invertido (Zeiss Primo Vert, Göttingen, Alemanha), equipado com câmera digital (Zeiss ERC 5s, Göttingen, Alemanha) em objetiva de 10x, com Software ZEN Blue Edition. (Zeiss, Göttingen, Alemanha). O fechamento da ferida foi medido através da área da ferida em cada período de tempo, expresso como porcentagem da área inicial no tempo 0, com os inibidores do mTOR comparados aos seus respectivos controles. Para essa medida, foram utilizadas áreas de 2 poços independentes para cada tratamento.

#### 4.6 CITOMETRIA DE FLUXO-MORTE CELULAR

Com o objetivo de identificar o perfil de morte celular induzido pela ação dos inibidores do mTOR na concentração referente ao IC<sub>50</sub>, a linhagem HeLa foi plaqueada na concentração de 2x10<sup>5</sup> células/poço em placa de 6 poços e mantida em condições ideais por 24 horas. Após 24 horas de exposição das células ao tratamento com os inibidores do mTOR, o meio de cultura em que as células estavam foi armazenado em tubos falcon de 15 mL. Posteriormente, as células foram tripsinizadas e armazenadas no mesmo tubo que continha o meio de tratamento e centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado, as células lavadas com 1 mL de PBS 1x gelado e novamente centrifugadas (2000 rpm, 5 minutos). O pellet foi ressuspensionado em 100  $\mu$ L de tampão de ligação 1x.

Para cada linhagem foi realizada uma leitura sem nenhuma marcação, a fim de determinar a fluorescência natural das células. As amostras foram coradas com Anexina V- Isotiocianato de fluoresceína (FITC) e marcador nuclear fluorescente, 7-aminoactinomicina D (7-AAD), utilizando-se do kit PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, EUA), conforme instruções do fabricante e posteriormente foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCALIBUR (BD Biosciences, EUA).

A marcação das células com anexina permite detectar a presença de apoptose pela dosagem de fosfatidilserina (PS), que predominantemente é observada na superfície interna da bicamada lipídica celular, voltada para o citosol. Nas células em

processo inicial de apoptose, quando a membrana celular ainda permanece intacta mas sofre uma desorganização, a PS é translocada para a superfície exterior da bicamada. A anexina V é uma proteína que se liga aos fosfolipídios e possui alta afinidade pela PS na presença de íons de cálcio. Ao conjugar a Anexina V ao FITC é possível identificar e quantificar as células apoptóticas em citometria de fluxo. O 7-AAD é utilizado para distinguir células apoptóticas de células necróticas visto que ele tem forte afinidade por DNA, desde que a membrana celular esteja permeável. Desse modo, corar células simultaneamente com Anexina V-FITC e 7-AAD permite a discriminação de células intactas, viáveis (FITC- 7-AAD-), no início de apoptose (FITC+ 7-AAD-), células tardiamente apoptóticas e/ou necróticas (FITC+ 7-AAD+) ou necróticas (FITC- 7-AAD+) (77).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com pelo menos três triplicatas independentes para os testes de viabilidade celular e em triplicatas independentes para os demais experimentos. As curvas dose-resposta foram realizadas por regressão não linear, com variável slope da dose de inibição *versus* resposta e cálculo do IC<sub>50</sub>. Para a avaliação da viabilidade celular com concentrações fixas, foram utilizados o teste de Kruskal-Wallis, com teste de comparação múltipla de Dunn em amostras sem distribuição normal, e o OneWay ANOVA, com teste de comparação múltipla de Tukey para amostras com distribuição normal. Para a análise do tipo de morte celular foi utilizado o teste Mann Whitney. Para a análise das áreas das feridas no ensaio de lesão em monocamada, foi utilizado o teste de comparação para grupos TwoWay ANOVA, seguida pela análise de Bonferroni. Para todas as análises foi utilizado o programa GraphPadPrism versão 5.0. Os valores com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR- CURVA DOSE-RESPOSTA

As linhagens foram tratadas com os inibidores do mTOR em distintas concentrações, levando a valores de viabilidade celular também distintos. Para o estabelecimento da curva dose-resposta de cada inibidor, foram utilizados valores de citotoxicidade, calculados a partir da viabilidade celular observada em cada concentração.

O objetivo da curva dose-resposta foi determinar a concentração necessária dos inibidores do mTOR para causar 50% de morte celular nas linhagens estudadas. Tal valor de IC<sub>50</sub> foi calculado individualmente para cada inibidor do mTOR e em cada linhagem celular.

Os valores de IC<sub>50</sub> para 24h e 48h nas duas linhagens estão listados na tabela 1. Os menores IC<sub>50</sub> em 24h e em 48h foram apresentados pelas células HeLa tratadas com o inibidor everolimo e HaCaT tratadas com temsirolimus respectivamente. Os maiores IC<sub>50</sub> em 24h e em 48h foram apresentados com o inibidor resveratrol nas células HaCaT.

Tabela 1 – Valores de IC<sub>50</sub> em 24h e 48h para os inibidores do mTOR nas linhagens HeLa e HaCaT

Linhagem Celular	Inibidor mTOR	IC <sub>50</sub> 24h	IC <sub>50</sub> 48h
HeLa	EGCG	91,1 µM	65,98 µM
	Resveratrol	325,8 µM	144,6 µM
	Curcumina	50,15 µM	43,36 µM
	Temsirolimus	31,28 µM	21,78 µM.
	Everolimo	28,31 µM	22,0 µM
HaCaT	EGCG	128,5 µM	66,29 µM
	Resveratrol	355,3 µM	260,3 µM
	Curcumina	47,25 µM	141,0 µM.
	Temsirolimus	26,54 µM	12,85 µM
	Everolimo	28,5µM	83,12 µM.

As curvas dose-resposta de 24h e 48h dos inibidores do mTOR nas linhagens HeLa e HaCaT podem ser analisadas nas Figuras 4 e 5.

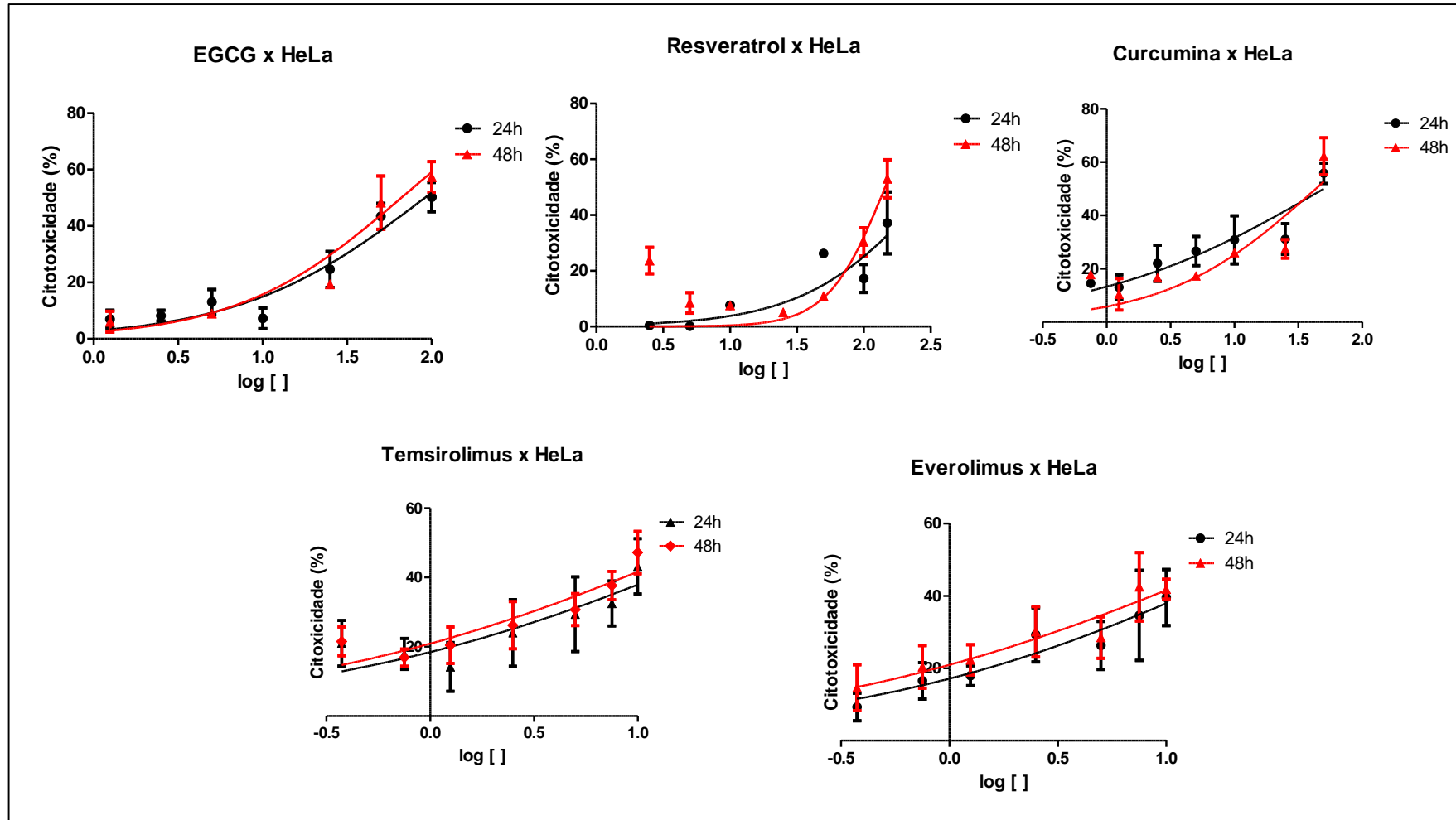


Figura 4: Curva dose-resposta dos inibidores do mTOR na linhagem HeLa em 24 horas e 48 horas



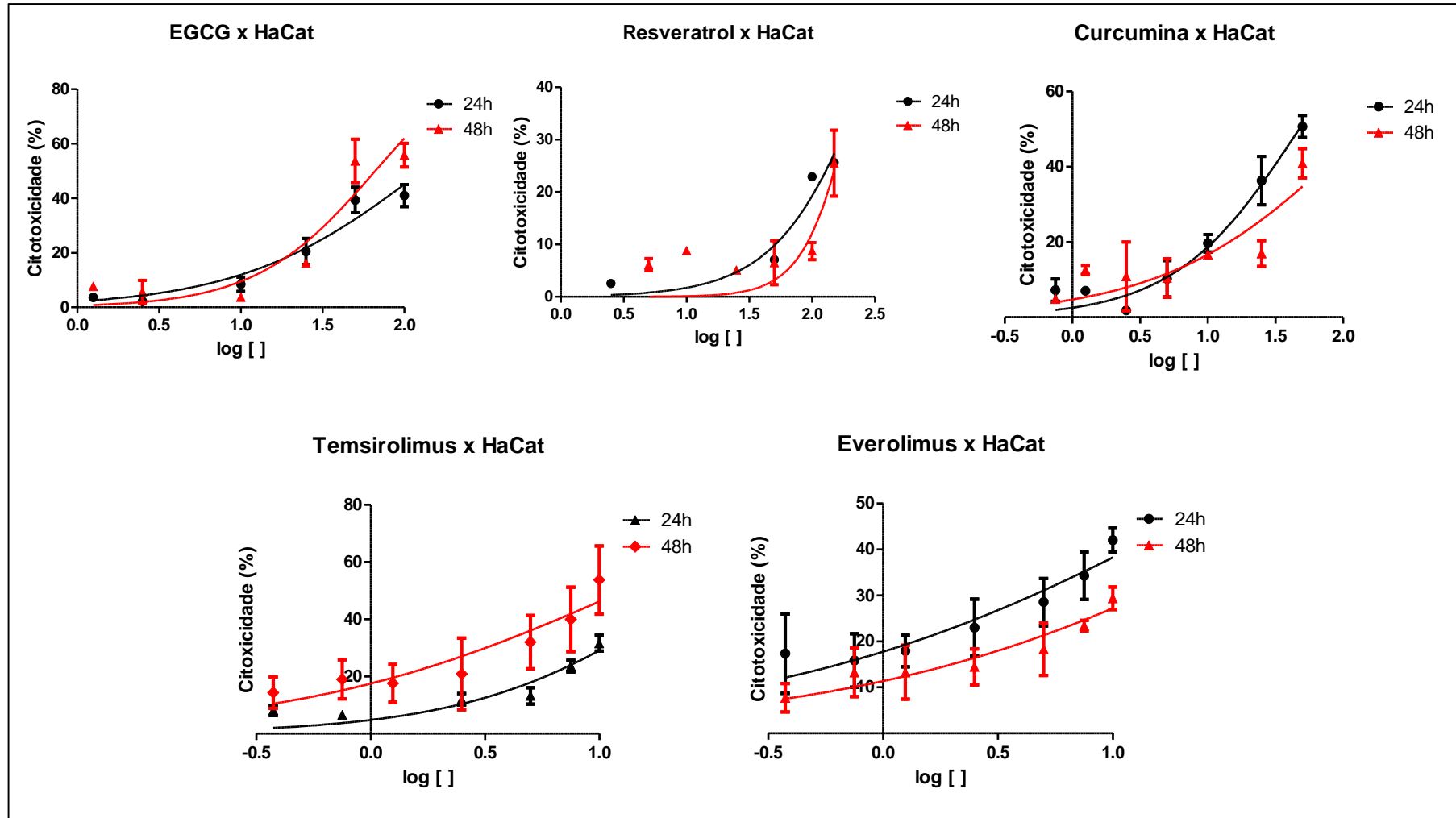


Figura 5: Curva dose-resposta dos inibidores do mTOR na linhagem HaCaT em 24 horas e 48 horas

## 5.2 ÍNDICE DE SELETIVIDADE TUMORAL (IST)

Os valores de  $IC_{50}$  permitiram calcular o índice de seletividade tumoral (IST) de 24h e de 48h para o qual foi feita a razão entre  $IC_{50}$  da célula controle (HaCaT) e as células neoplásicas (HeLa) (75). Os valores obtidos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Índice de seletividade dos inibidores do mTOR com 24h e 48h de tratamento

Linhagem	Inibidor mTOR	$IC_{50}$ 24h	IST 24h	$IC_{50}$ 48h	IST 48h
HeLa	EGCG	91,1 $\mu$ M	1,41	65,98 $\mu$ M	1,00
	Resveratrol	325,8 $\mu$ M	1,09	144,6 $\mu$ M	1,8
	Curcumina	50,15 $\mu$ M	0,94	43,36 $\mu$ M	3,25
	Temsirolimus	31,28 $\mu$ M	0,84	21,78 $\mu$ M	0,58
	Everolimo	28,31 $\mu$ M	1,00	22,0 $\mu$ M	3,77

O índice de seletividade igual a 1 significa que não há seletividade entre as linhagens estudadas; menor que 1 significa que o tratamento é mais seletivo para a linhagem de queratinócitos do que para a linhagem neoplásica e maior que 1 significa que há seletividade para a linhagem tumoral estudada.

Dessa forma, concluímos que em 24h o EGCG e o resveratrol foram mais seletivos para HeLa em relação aos queratinócitos. O everolimo, a curcumina e o temsirolimus foram seletivos para a linhagem de queratinócitos em relação à linhagem tumoral HeLa. Em 48h, o resveratrol, a curcumina e o everolimo foram seletivos para a linhagem neoplásica. Já o EGCG não foi seletivo e temsirolimus foi mais tóxico para a linhagem de queratinócito do que para a linhagem tumoral.

### 5.3 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR EM CONCENTRAÇÕES FIXAS

Para efeito comparativo entre os inibidores do mTOR estudados nas linhagens HeLa e HaCaT, foi estabelecida uma concentração fixa da qual os resultados de viabilidade celular em 24 horas e 48 horas de tratamento foram especificamente avaliados. Para os inibidores do mTOR derivados da dieta, usamos a concentração fixa de 50  $\mu\text{M}$ , pois esta concentração foi testada nas curvas dose-resposta do EGCG, resveratrol e curcumina e era um valor próximo do  $\text{IC}_{50}$  da curcumina em 24h nas linhagens HeLa e HaCaT. Os valores de viabilidade celular para os inibidores do mTOR derivados da dieta na concentração fixa de 50  $\mu\text{M}$  estão listados na tabela 3. Para os rapanálogos everolimo e temsirolimus usamos a concentração fixa de 10  $\mu\text{M}$ , pois esta concentração foi testada nas curvas dose-resposta do temsirolimus e do everolimo, com os seguintes resultados de viabilidade celular listados na Tabela 4.

Consideramos de toxicidade leve as substâncias que resultaram em viabilidade celular entre 50 a 75%, toxicidade moderada as substâncias que resultaram em viabilidade celular entre 25 e 50% e toxicidade intensa as substâncias que resultaram em viabilidade celular abaixo de 25%.

Tabela 3 – Porcentagem de células viáveis (%) após o tratamento com os inibidores do mTOR derivados da dieta nas linhagens HeLa e HaCaT na concentração de 50 $\mu\text{M}$ . (\*  $p < 0,05$  tratamento versus controle negativo)

Inibidores do mTOR 50 $\mu\text{M}$	Células Viáveis (%)			
	HeLa		HaCaT	
	24h	48h	24h	48h
<b>EGCG</b>	56,5	51,7	60,6	46,2*
<b>Resveratrol</b>	73,7	89,0	92,9	93,4
<b>Curcumina</b>	44,1*	37,7	49,3*	59,0

Tabela 4 – Porcentagem de células viáveis (%) após o tratamento com os rapanálogos nas linhagens HeLa e HaCaT na concentração de 10 $\mu$ M.  
(\* p<0,05 tratamento versus controle negativo)

Inibidores do mTOR 10 $\mu$ M	Células Viáveis (%)			
	HeLa		HaCaT	
	24h	48h	24h	48h
<b>Temsirolimus</b>	56,7	52,7	68,3	46,2*
<b>Everolimo</b>	60,4	58,1*	57,9	70,6*

A Figura 6 mostra o efeito dos inibidores do mTOR derivados da dieta na concentração de 50 $\mu$ M nas linhagens HeLa e HaCaT. Houve diferença estatística para os inibidores naturais EGCG em 48h na linhagem HaCaT com 46,2% de viabilidade celular, e curcumina 24h nas linhagens HeLa com 44,1% de viabilidade celular e HaCaT com 49,3% de viabilidade celular.

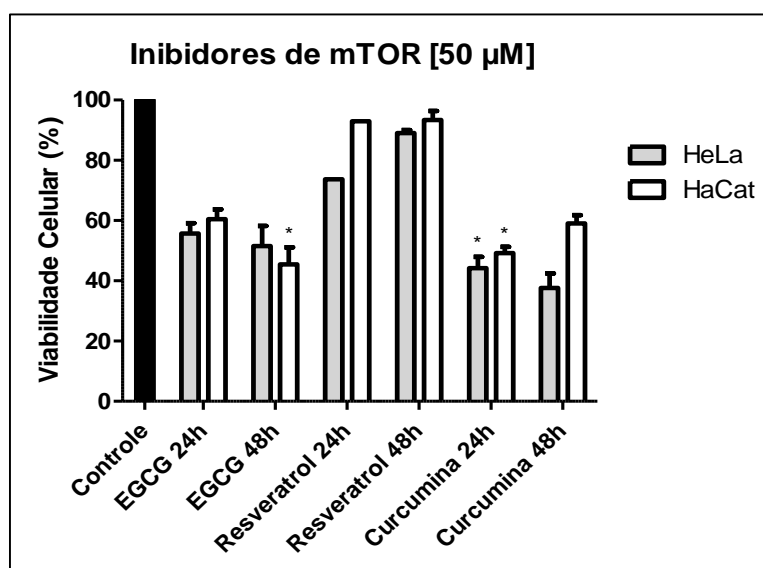


Figura 6: Efeito dos inibidores do mTOR derivados da dieta na viabilidade celular nas linhagens HeLa e HaCaT na concentração de 50 $\mu$ M. (\* p<0,05 tratamento versus controle negativo).

A Figura 7 mostra os efeitos dos rapanálogos na concentração de 10 $\mu$ M nas linhagens HeLa e HaCaT. Houve diferença estatística para temsirolimus 48h na linhagem HaCaT com 46,2% de viabilidade celular, everolimo 24h na linhagem HaCaT com 57,9% de viabilidade celular e everolimo 48h nas linhagens HeLa com 58,1% de viabilidade celular e HaCaT com viabilidade celular de 70,6%.

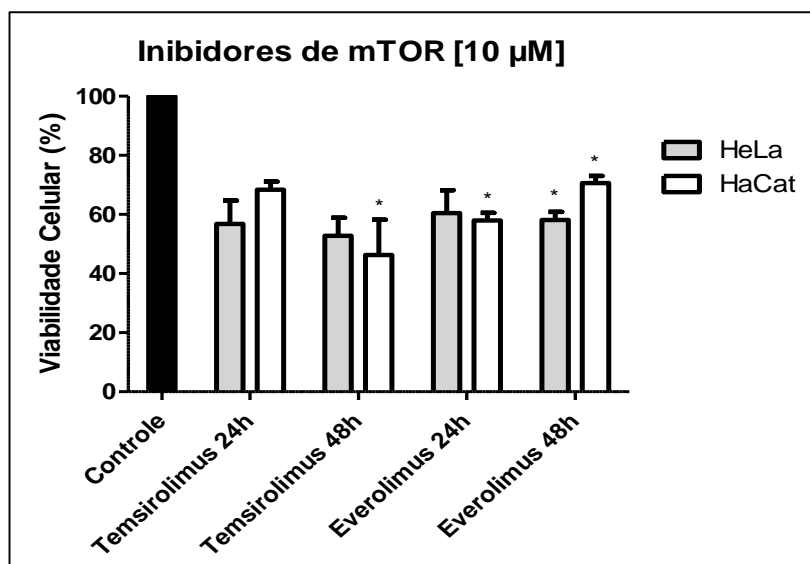


Figura 7 – Efeito dos rapanálogos na concentração de 10 $\mu$ M na viabilidade celular nas linhagens HeLa e HaCaT. (\*  $p < 0,05$  tratamento versus controle negativo).

Entre os inibidores do mTOR testados, a curcumina na linhagem HeLa em 24 horas e 48 horas, a curcumina na linhagem HaCaT em 24h, EGCG na linhagem HaCaT em 48h e temsirolimus na linhagem HaCaT em 48h foram capazes de induzir toxicidade moderada com viabilidade celular entre 25 e 50%. O EGCG na linhagem HaCaT em 24 horas, o EGCG na linhagem HeLa em 24h e 48h, o resveratrol na linhagem HeLa em 24h, a curcumina na linhagem HaCaT em 48h, o everolimo nas duas linhagens em 24h e 48h, o temsirolimus em 24h e 48h na linhagem HeLa e temsirolimus em 24h na linhagem HaCaT foram capazes de induzir toxicidade leve com viabilidade celular entre 50 e 75%. O resveratrol na linhagem HeLa em 48h, na linhagem HaCaT em 24h e 48h não atingiu valores de toxicidade leve. Nenhum dos inibidores avaliados levou à toxicidade intensa, com viabilidade menor que 25%.

#### 5.4 VIABILIDADE CELULAR COM OS INIBIDORES DO MTOR ASSOCIADOS À RADIOTERAPIA

A Tabela 5 mostra a viabilidade celular resultante do tratamento com radioterapia em dose única de 2Gy/min associada ao tratamento com os inibidores do mTOR no IC<sub>50</sub>, para avaliar eventual efeito aditivo sinérgico dos inibidores do mTOR em associação à radioterapia.

Tabela 5 – Porcentagem de células viáveis (%) após o tratamento com os inibidores do mTOR associados ou não à radioterapia. (\* $p < 0,05$  radioterapia versus sem radioterapia).

Inibidor de mTOR IC <sub>50</sub>	Viabilidade celular %			
	Sem RT		Com RT	
	HeLa	HaCaT	HeLa	HaCaT
<b>EGCG</b>	64,44	49,49	33,88	41,65
<b>Resveratrol</b>	63,28	59,16	33,41	36,40
<b>Curcumina</b>	52,62	42,38	36,55	31,68
<b>Temsirolimus</b>	54,06	54,42	35,04	35,89
<b>Everolimo</b>	50,96	51,40	37,37	31,54

A Figura 8 mostra os valores de viabilidade celular da linhagem HeLa em gráfico, no qual é possível observar que a viabilidade celular resultante do tratamento com todos os inibidores do mTOR associados à radioterapia é significativamente menor que a viabilidade celular observada após tratamento com os inibidores do mTOR exclusivos.

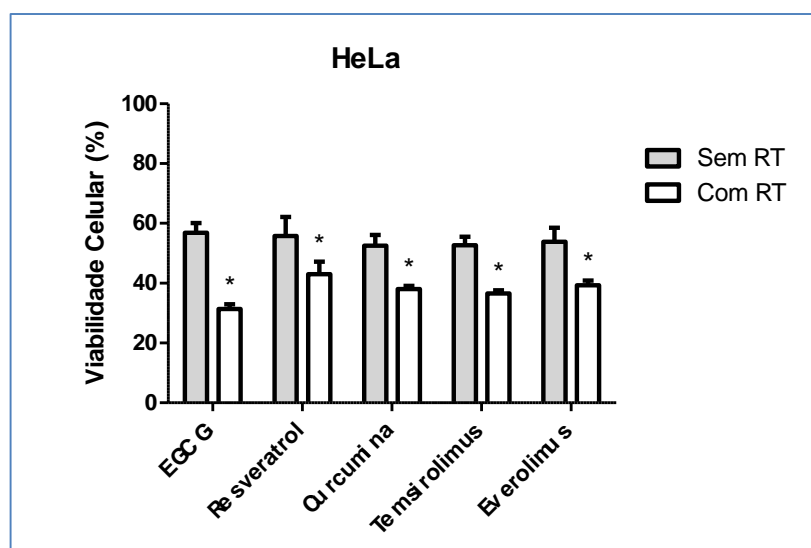


Figura 8: Viabilidade celular (%) na linhagem HeLa com e sem radioterapia (RT) associada aos inibidores do mTOR no IC<sub>50</sub>. (\* $p < 0,05$  radioterapia versus sem radioterapia).

A Figura 9 mostra os valores de viabilidade celular da linhagem HaCaT em gráfico, no qual é possível observar que a viabilidade celular resultante do tratamento com o EGCG associado à radioterapia é significativamente menor

que a viabilidade celular observada após tratamento com EGCG exclusivo. Para os demais inibidores do mTOR avaliados, não houve diferença estatística.

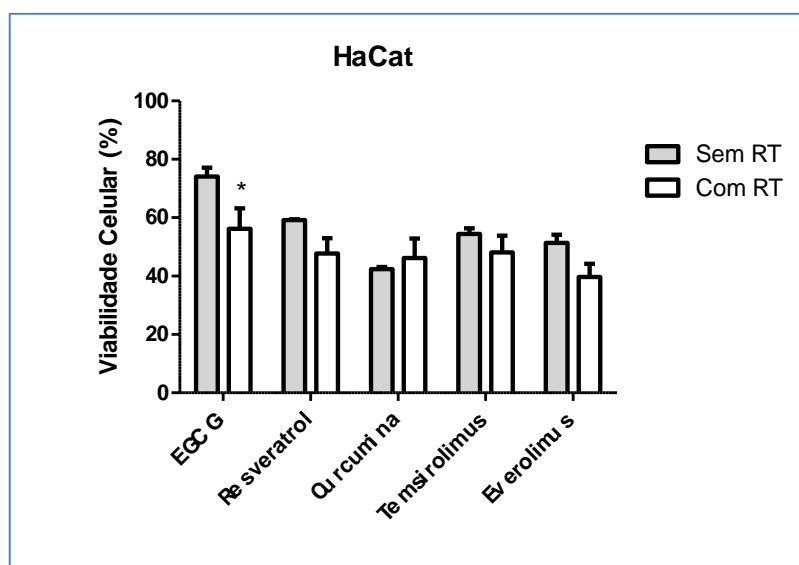


Figura 9: Viabilidade celular (%) na linhagem HaCaT com e sem Radioterapia (RT) associada aos inibidores do mTOR no IC<sub>50</sub>. (\*p<0,05 radioterapia versus sem radioterapia).

## 5.5 TESTE DE LESÃO EM MONOCAMADA – SCRATCH ASSAY

O teste de lesão em monocamada foi conduzido com as linhagens HeLa e HaCaT tratadas com a curcumina e o everolimo em seus respectivos IC<sub>50</sub> para cada linhagem. O objetivo desse ensaio era avaliar o efeito dos tratamentos na migração celular.

Observou-se, entretanto, que o tratamento com os inibidores do mTOR no IC<sub>50</sub> gerou morte celular, mais evidente na linhagem HeLa e com a curcumina a partir de 12h após tratamento. A avaliação da migração celular pode ter sofrido interferência de tal morte celular, visto que como consequência, as margens da ferida não poderiam mais ser claramente identificadas. Para esse ensaio, uma concentração inferior ao IC<sub>50</sub> seria mais adequada.

Para a linhagem HeLa, a área da ferida do controle nos tempos de observação em relação à área da ferida na hora zero variou de aproximadamente 14% a 98%. Com 72 horas, não era mais possível a determinação clara das margens da ferida no controle, pois a ferida havia

fechado. Até 12h, nos poços tratados com a curcumina e o everolimo, as margens da ferida foram mantidas. A área da ferida nos poços tratados com a curcumina manteve-se nas 12 primeiras horas de tratamento entre 96% e 100% da área da ferida na hora 0. Por outro lado, a área da ferida no controle nessas mesmas 12 primeiras horas variou entre 78% e 98%. Para as horas 6, 8 e 12, essa diferença foi considerada estatisticamente significativa, conforme mostra a Figura 10. Como pode ser observado na Figura 11, com 24 horas de tratamento com a curcumina, a célula HeLa já estava completamente inviável, não sendo mais possível determinar as margens da ferida. Nos poços tratados com o everolimo, observou-se uma tendência ao fechamento da ferida tempo-dependente da mesma forma que os poços com controle, diferentemente do observado com a curcumina. Com 24h de tratamento com o everolimo, foi observada diferença estatística da área da ferida em relação ao controle, nesse tempo já é observada morte celular, mas as margens da ferida ainda estão visíveis.

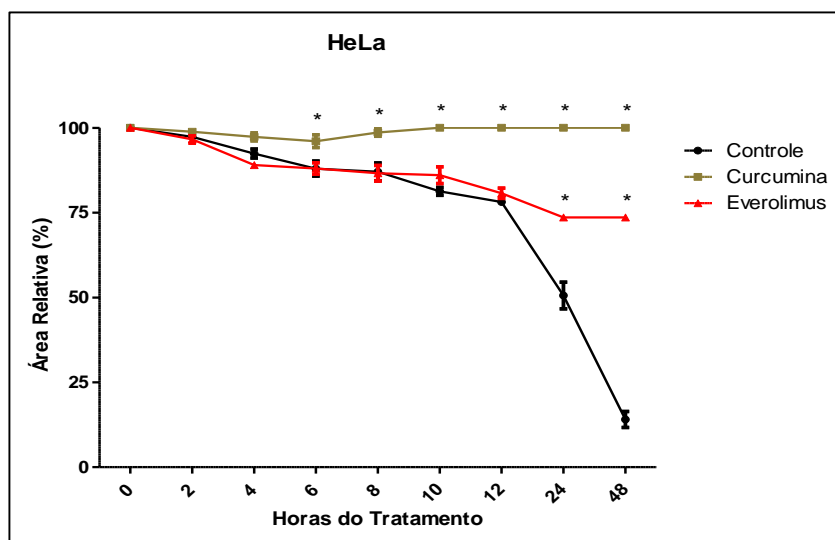


Figura 10: Cálculo do tamanho da área da ferida expresso em porcentagem para a linhagem HeLa após tratamento com controle, curcumina e everolimo (\* $p < 0,05$  tratamento versus controle)



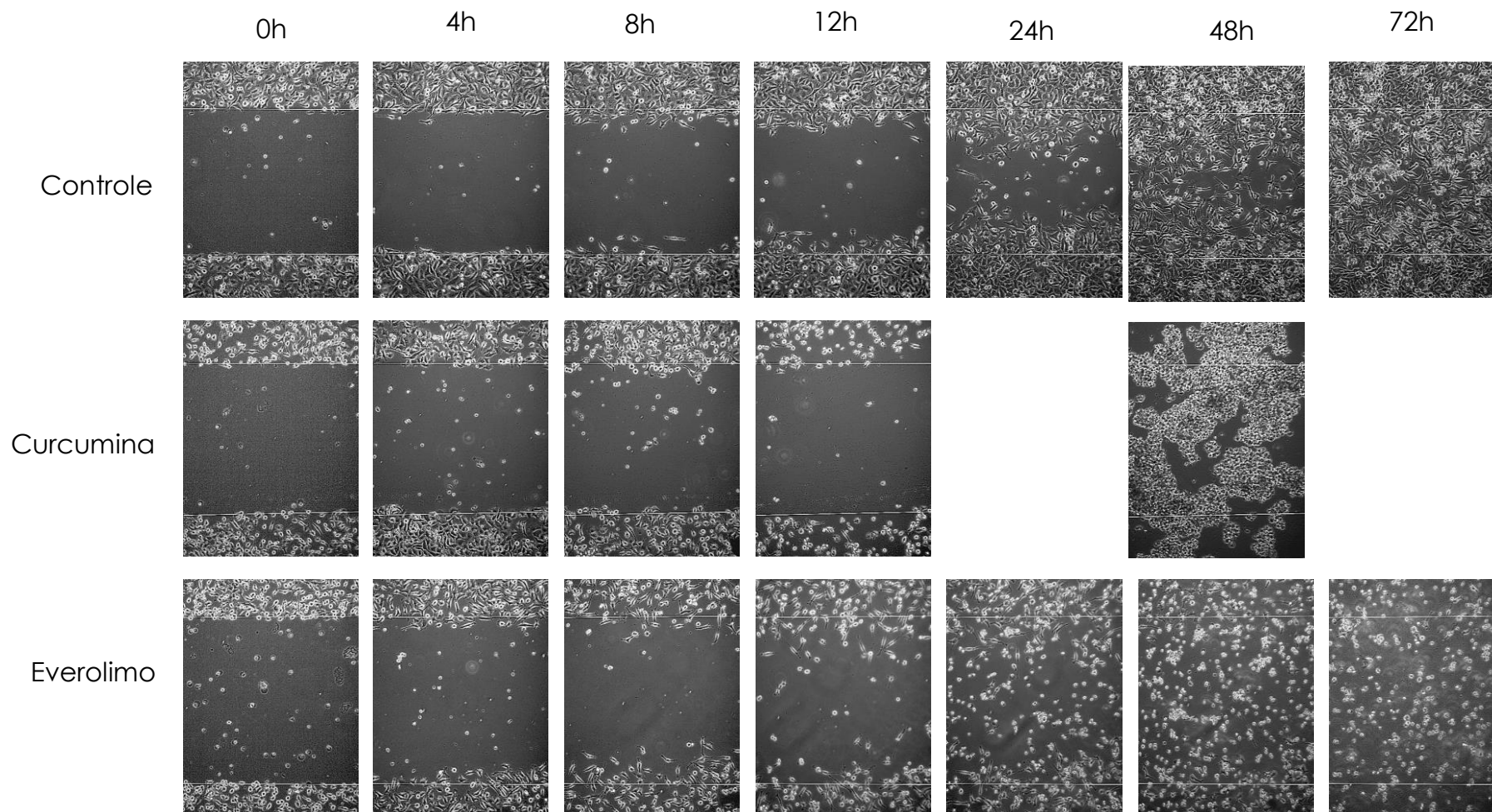


Figura 11: Avaliação do fechamento de lesão em monocamada da linhagem HeLa após tratamento com controle, curcumina e everolimo.

Para a linhagem HaCaT, a área da ferida do controle em relação à área da ferida na hora zero variou de 64% a 99% até 72 horas de observação. As margens da ferida nos poços tratados com curcumina e everolimo foram mantidas até 12 horas. A área da ferida nos poços tratados com a curcumina manteve-se nas 12 primeiras horas de tratamento entre 98,9% e 99,7% da área da ferida na hora 0. Por outro lado, área da ferida no controle nessas mesmas 12 primeiras horas variou entre 94,4% e 99,3%. Para as horas 6 e 12, essa diferença foi considerada estatisticamente significativa, conforme mostra a Figura 12. Como pode ser observado na Figura 13, com 24 horas de tratamento com a curcumina, as células HaCaT já se apresentavam bastante inviáveis, não sendo mais possível determinar claramente as margens da ferida. Nos poços tratados com o everolimo, observou-se uma tendência ao fechamento da ferida tempo-dependente da mesma forma que os poços tratados com o controle, com área da ferida em relação à área da hora 0 variando entre 86,9% e 97,4%, durante as 72 horas de observação. A diferença das áreas dos poços com everolimo em relação ao controle foi estatisticamente significativa com 2, 4, 12, 24, 48 e 72 horas. Como pode ser observado na Figura 13, as células HaCaT mantiveram-se consideravelmente viáveis até 72 horas de tratamento com everolimo.

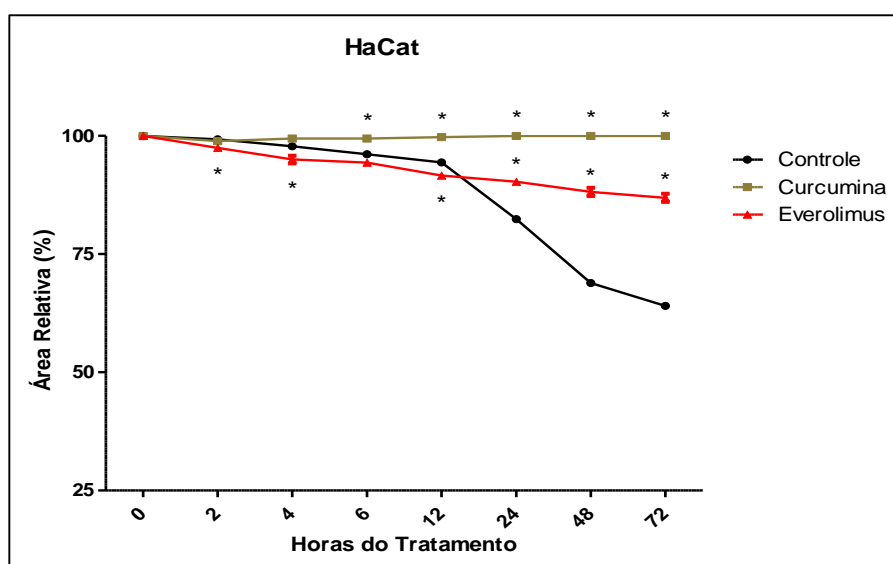


Figura 12: Cálculo do tamanho da área da ferida expresso em porcentagem para a linhagem HaCaT após tratamento com controle, curcumina e everolimo (\* $p < 0,05$  tratamento versus controle)

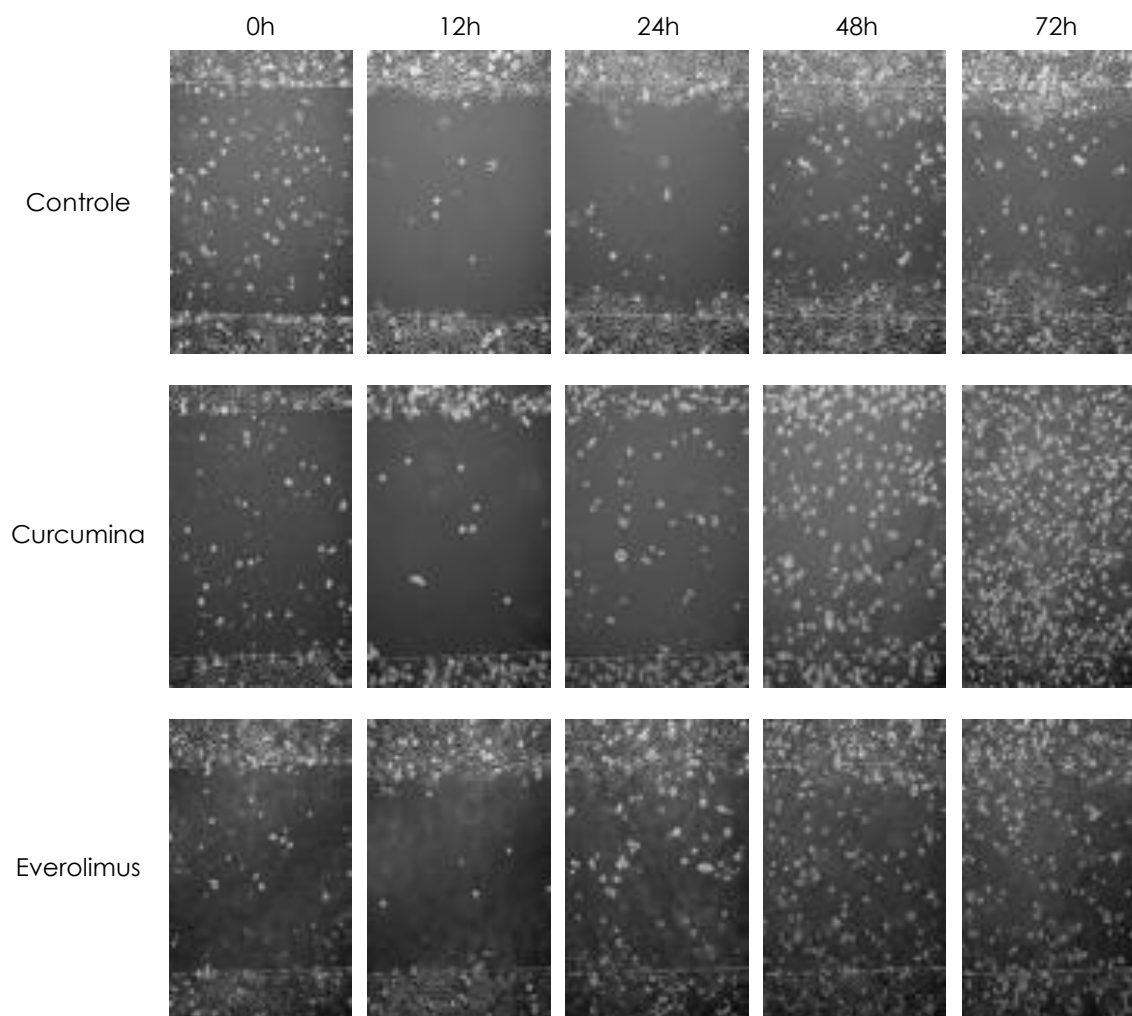


Figura 13: Avaliação do fechamento de lesão em monocamada da linhagem HaCaT após tratamento com controle, curcumina e everolimo

## 5.6 AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR

O perfil de morte celular induzido pelo tratamento com os inibidores do mTOR na linhagem HeLa foi identificado pelo ensaio de citometria de fluxo com marcação por Anexina V-FITC e 7-AAD. As células foram tratadas por 24h com o temsirolimus, a curcumina e o resveratrol no IC<sub>50</sub> obtidos no ensaio de viabilidade.

As células, ao serem analisadas no citômetro, ficam distribuídas nos quadrantes R1, R2, R3 e R4. O quadrante R1 refere-se a células intactas, viáveis (A- 7-AAD-). O quadrante R2 refere-se a células em necrose (A- 7-AAD+). O quadrante R3 refere-se a células em apoptose inicial (A+ 7-AAD-). O quadrante R4 refere-se a células necróticas ou em apoptose tardia (A- 7-AAD+).

A Figura 14 mostra a distribuição dos eventos com o temsirolimus. Para as triplicatas, a mediana de eventos em R1 foi de 90,59% (variando de 89,56 a 92,86%) em R2 foi de 1,37% (variando de 1,1 a 1,41%), em R3 foi de 0,92% (variando de 0,86 a 0,92) e em R4 foi de 4,45% (variando de 3,69 a 4,77%).

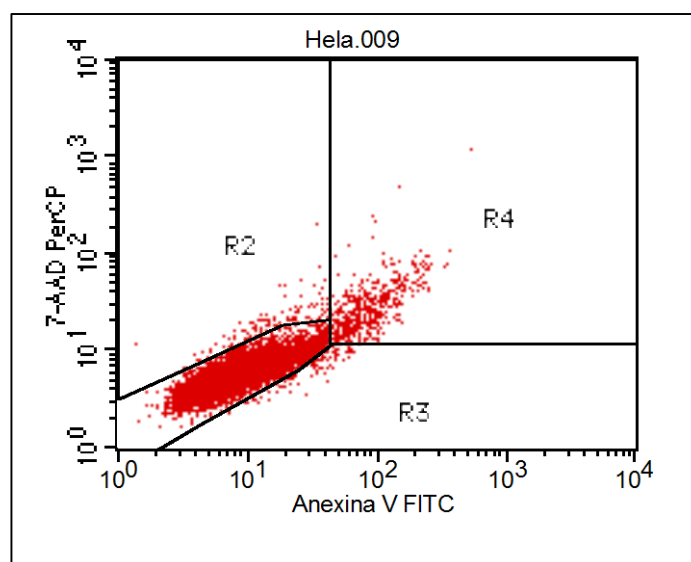


Figura 14: Distribuição das células HeLa após tratamento com temsirolimus

A Figura 15 mostra a distribuição dos eventos com a curcumina. Para as triplicatas, a mediana de eventos em R1 foi 91,14% (variando de 88,27 a 92,18%), em R2 foi 0,35% (variando de 0,21 a 0,36%), em R3 foi de 1,53% (variando de 1,41 a 2,46%) e em R4 foi de 0% (variando de 0 a 0,01%).

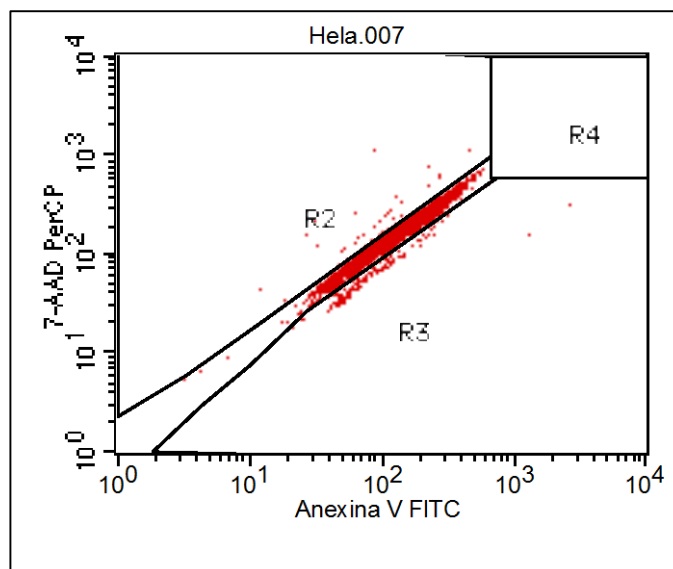


Figura 15: Distribuição das células HeLa após tratamento com curcumina

A Figura 16 mostra a distribuição dos eventos com o resveratrol. Para as triplicatas, a mediana de eventos em R1 foi 92,92% (variando de 92,84 a 96,45%), em R2 foi 79,2% (variando de 61,88 a 80,74%), em R3 foi de 0,22% (variando de 0,18 a 0,81%) e em R4 foi de 0,48% (variando de 0,25 a 0,51%).

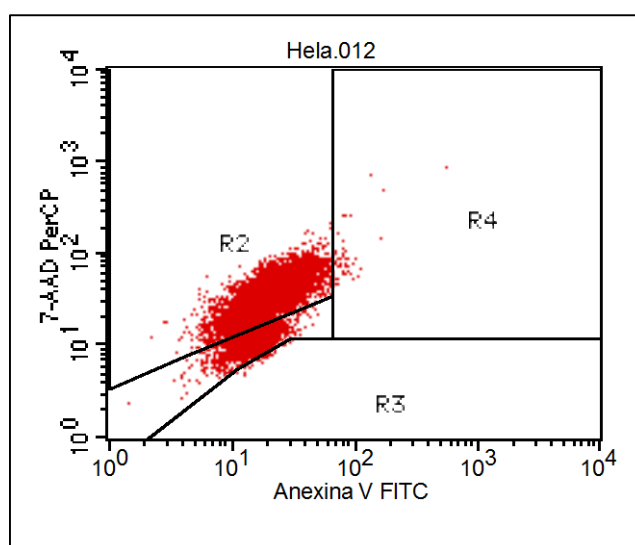


Figura 16: Distribuição das células HeLa após tratamento com resveratrol

A Figura 17 mostra a avaliação do perfil de morte celular induzido pela curcumina e pelos temsirolimus e resveratrol na linhagem HeLa. Após 24 horas, as células tratadas com temsirolimus apresentaram aumento de eventos positivos (1,61 vezes) para anexina e 7ADD (A+ 7ADD+) que corresponde a apoptose tardia ou necrose comparado às células controle. Não houve aumento do número de eventos positivos para apoptose inicial (A+ 7ADD-) e para necrose (A- 7ADD+) com o tratamento com temsirolimus.

Após 24 horas, a linhagem HeLa tratada com a curcumina não apresentou aumento de eventos positivos para apoptose inicial (A+ 7ADD-), apoptose tardia/necrose (A+ 7ADD+) ou necrose (A- 7ADD+). A curcumina apresenta padrão de fluorescência semelhante à anexina. Dessa forma, o método apresenta limitações para avaliação dessa substância (78). Outros ensaios para avaliar apoptose como tunel ou western blot podem ser mais adequados para a curcumina.

Apesar do tratamento com o resveratrol levar a aparente aumento de 66,55 vezes dos eventos positivos com marcação para 7ADD (A- 7ADD+), que corresponderia a necrose comparado às células controle, essa análise fica prejudicada. A porcentagem de células em R2 foi muita alta (73,94%,) quando comparada à porcentagem de células em R1 (94,07%). Dessa forma a análise citométrica não conseguiu diferenciar de forma clara os eventos R1 e R2 para células tratadas com o resveratrol.

Não foi identificada apoptose inicial com nenhum dos tratamentos. Apesar do temsirolimus ter identificado maior número de eventos marcados com anexina e 7ADD (apoptose tardia ou necrose) na linhagem HeLa, a falta de marcação com apenas anexina, indicativo de apoptose inicial, não permite a afirmação categórica de que o medicamento causa apoptose de fato, pois pode ter ocorrido necrose (79, 80).

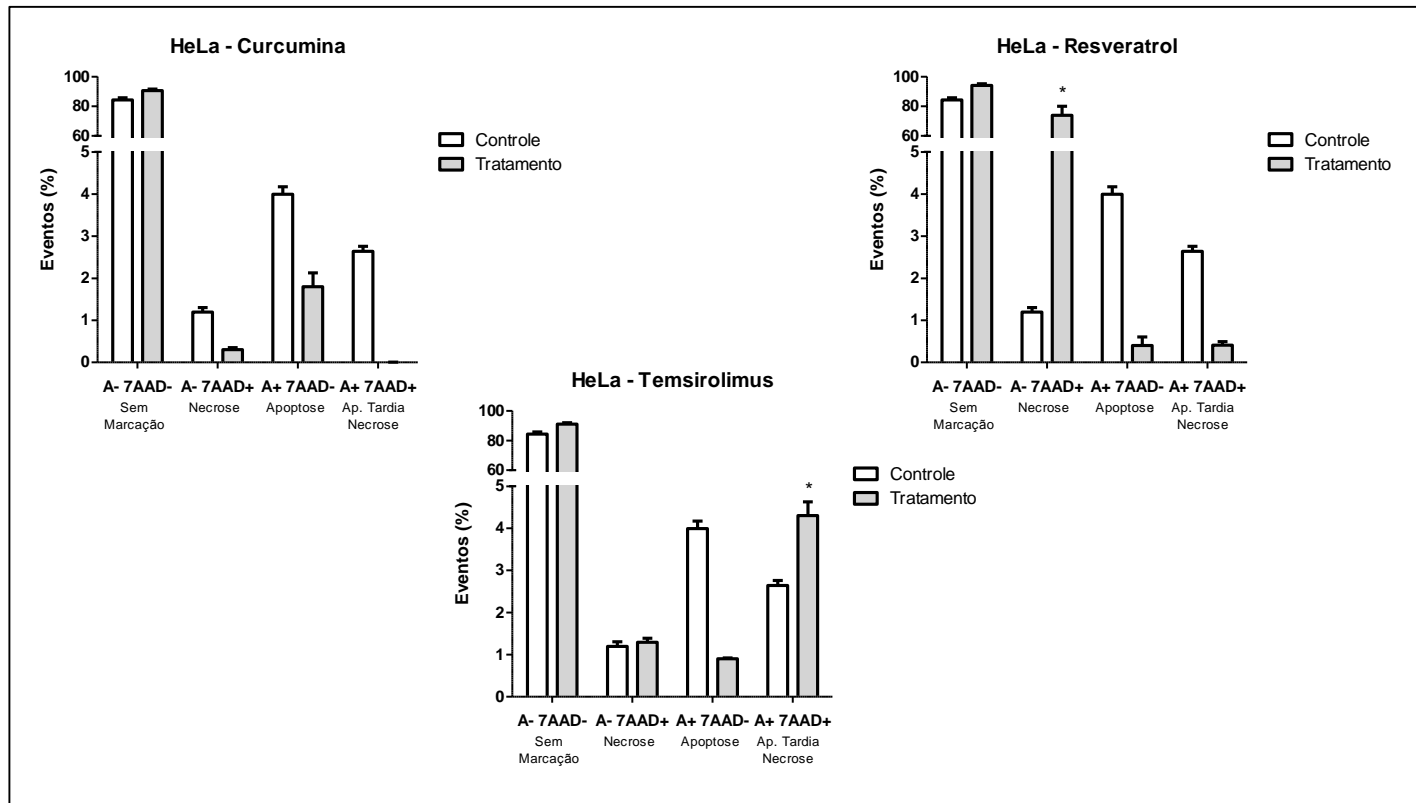


Figura 17: Avaliação do perfil de morte celular induzido pelos inibidores do mTOR curcumina, temsirolimus e resveratrol no IC50 na linhagem HeLa. Marcação de eventos com anexina e/ou 7AAD após 24 horas de tratamento com os inibidores. \*  $p < 0,05$  tratamento versus controle (A= Anexina V-FITC).

## 6 DISCUSSÃO

A quimioterapia paliativa com cisplatina e taxanes permanece como tratamento padrão do câncer do colo do útero metastático (81). Poucos avanços ocorreram nos últimos anos para o tratamento dos tumores ginecológicos avançados, os quais permanecem com prognóstico ruim. Nesse sentido, a terapia baseada em alvo molecular se torna uma opção importante (9).

O mTOR é uma proteína quinase da via de sinalização PI3K/AKT com papel crítico no controle do crescimento celular, metabolismo e progressão do ciclo celular (82). A sinalização aberrante por PI3K ocorre frequentemente em muitos tipos de tumores, incluindo as neoplasias ovarianas, endometriais e do colo do útero (7). A infecção do colo do útero pelo HPV está ligada à patogênese da doença e suas oncoproteínas têm efeitos importantes na via PI3K/AKT/mTOR, sendo que estudos pré-clínicos *in vitro* usando linhagens de câncer do colo do útero positivas para HPV já mostraram que a rapamicina pode reduzir o crescimento tumoral (36, 83, 84). Por tudo isso, o mTOR é um alvo terapêutico bastante atraente no câncer do colo do útero (85).

Os efeitos da rapamicina e dos inibidores do mTOR derivados da dieta têm sido descritos em estudos *in vitro*. As células HeLa, quando expostas à rapamicina em diferentes concentrações, mostraram marcação para anexina, indicando apoptose concentração dependente (54). Estudos *in vitro* demonstraram que a curcumina é um indutor eficiente de apoptose e apresenta seletividade para as células tumorais (86). O resveratrol também induziu apoptose em linhagens de câncer do colo do útero, como a C33A, HeLa, CaSki e SiHa (87). O EGCG demonstrou induzir apoptose e inibição da atividade da telomerase, enzima transcriptase reversa que adiciona sequências específicas e repetitivas de DNA aos cromossomos, em linhagens de câncer do colo do útero (88).

O mecanismo pelo qual a curcumina inibe a via do mTOR é reportado ser pela interferência no complexo mTOR/RAPTOR (89). O resveratrol e o EGCG por sua vez, inibem o mTOR direta ou indiretamente pela alteração na sinalização da via PI3K/AKT/mTOR.(61, 90) Por tudo isso, a curcumina, o resveratrol e o EGCG também foram avaliados como inibidores do mTOR no presente estudo.



O ensaio de viabilidade celular com o MTT foi realizado para obter a curva dose-resposta e determinação do IC<sub>50</sub> para cada inibidor do mTOR em 24h e 48h. Com exceção de everolimo em 48h para linhagem HeLa, os resultados mostraram menores valores de IC<sub>50</sub> para os rapanálogos temsirolimus e everolimo em relação aos inibidores derivados da dieta nas duas linhagens avaliadas em 24h e 48h.

Em estudo de Thangapazham et al. realizado com linhagens de câncer de mama, o IC<sub>50</sub> em 48h para o EGCG foi de 50 µg/ml (91). Em linhagens de adenocarcinoma do colo do útero, a apoptose e a atividade de telomerase foram avaliadas com o EGCG na concentração de 100µM (92). Foi observado em outro estudo que a inibição da taxa de crescimento celular com o EGCG nas concentrações entre 50 a 100µM também pode estar relacionada ao tipo histológico, pois em estudo com linhagens de câncer escamoso do colo do útero SiHa e ME180, o EGCG inibiu o crescimento em 70-85%, enquanto na linhagem de adenocarcinoma do colo do útero TMCC-1, a inibição foi de 30-38%, após 72h de tratamento com o EGCG na dose de 50µM (88). Dessa forma, os valores de IC<sub>50</sub> para o EGCG definidos no presente estudo para linhagem HeLa foram maiores que os definidos na literatura em 24h (91,1µM) e em 48h (65,98µM) (92). Na linhagem HaCaT, os IC<sub>50</sub> definidos em 24h e em 48h foram de 128,5 µM e 66,29µM, respectivamente, ambos maiores que os apresentados na linhagem Hela. Nas duas linhagens o IC<sub>50</sub> em 24h foi maior que em 48h, mostrando tendência a efeito tempo-dependente e a curva dose resposta do EGCG mostra tendência a efeito dose-dependente. O EGCG foi seletivo para Hela em 24h.

Os valores de IC<sub>50</sub> definidos para o EGCG em diversos estudos são variados. Foi feito estudo para comparação de diferentes métodos para avaliação da viabilidade celular em diferentes linhagens tumorais com o EGCG, utilizando corantes diferentes para quantificar ATP e DNA. O uso do MTT e MTS (*(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl))*) como indicadores de mitocôndrias metabolicamente ativas superestimou o número de células viáveis em comparação às determinações com ATP, DNA ou azul tripan. Como resultado, os IC<sub>50</sub> para o EGCG determinado pelos ensaios do MTT e MTS foram duas vezes maior quando comparados com corantes para quantificar ATP e DNA. Por isso, os ensaios baseados em MTT e MTS podem subestimar o efeito antiproliferativo do EGCG. Isso pode ter ocorrido no presente

estudo. Ainda observamos que na linhagem HeLa os valores de IC<sub>50</sub> para o EGCG só não foram mais altos que para o resveratrol (93).

Para o resveratrol na linhagem HeLa, o IC<sub>50</sub> estimado em 24h foi de 325,8µM e em 48h foi de 144,6µM. Em estudo com linhagens de câncer colorretal (HCT116 e CaCo2), o IC<sub>50</sub> em 48h para o resveratrol foi de 50µM para a linhagem HCT 116 e de 131µM para a linhagem Caco2, valores menores que os determinados no presente estudo (94). A avaliação do resveratrol e seus derivados em linhagens HeLa também mostrou em outro trabalho um valor menor de IC<sub>50</sub> em 24h de 112µM (95). Para a linhagem HaCaT, os IC<sub>50</sub> em 24h e em 48h foram de 355,3µM e 260,3µM respectivamente, sendo os dois valores maiores para a linhagem de queratinócitos que para a linhagem tumoral. Nas duas linhagens, o IC<sub>50</sub> em 24h foi maior que em 48h, mostrando tendência a efeito tempo-dependente e a curva dose resposta do resveratrol mostra tendência a efeito dose-dependente. Apesar de ter o maior IC<sub>50</sub> dentre os inibidores avaliados em 24h e em 48h nas duas linhagens, o resveratrol foi o único inibidor seletivo para HeLa nessas duas avaliações.

Para a curcumina na linhagem HeLa, o IC<sub>50</sub> em 24h foi de 50,15µM e em 48h foi de 43,36µM. Em estudo com a linhagem Caski de câncer do colo do útero, foi realizado tratamento com 10, 25 e 50 µM em 24h, 48h e 72h, sendo a proliferação das células Caski inibida de forma tempo e dose-dependente e os ensaios de western blot e de invasão realizados com concentração de 50µM em 72h (96). Outro trabalho avaliou o tratamento com a curcumina nas concentrações de 5, 10, 25 e 50µM na linhagem HeLa, sendo que a curcumina inibiu a proliferação de forma dose-dependente, com resultados mais expressivos na maior concentração de 50µM (97). De certa forma, o valor de concentração de curcumina de 50,15µM utilizado no presente estudo está alinhado com a literatura. Para a linhagem de queratinócitos, os IC<sub>50</sub> em 24h e em 48h foram de 47,25µM e 141µM respectivamente. Nas duas linhagens, a curva dose-resposta da curcumina mostra tendência a efeito dose-dependente. A curcumina foi seletiva para HeLa em 48 horas.

Os mecanismos pelos quais a curcumina é seletiva para as células tumorais ainda não são totalmente elucidados. O influxo de curcumina é maior nas células tumorais que nas células normais, como foi demonstrado por métodos de espectroscopia de fluorescência e absorção, podendo ser uma explicação (98). Além

disso, os níveis do antioxidante glutationa nas células tumorais tendem a ser menores que nas células normais. Dessa forma, a sensibilidade das células tumorais fica exacerbada (99). A seletividade da curcumina também foi avaliada em estudo com linhagem de epitélio mamário humano e linhagem de câncer de mama MCF-7/TH, sendo que a linhagem tumoral foi 3,5 vezes mais sensível à curcumina que a linhagem do epitélio de mama. Apesar das duas linhagens acumularem curcumina, a porcentagem de células apoptóticas foi maior na linhagem tumoral. O tratamento com curcumina levou à redução da expressão de mRNA de Ki67 (proteína marcadora de proliferação celular), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e p53 na linhagem tumoral enquanto na linhagem de célula epitelial de mama houve diminuição de mRNA de p21 e aumento do mRNA da proteína reguladora da apoptose BAX (BAX).(100)

Para a linhagem HeLa, o IC<sub>50</sub> para temsirolimus em 24h foi de 31,28 $\mu$ M e em 48h de 21,78 $\mu$ M, no presente trabalho. O temsirolimus foi avaliado na linhagem de hepatocarcinoma Bel-7402 nas concentrações de 0,25 $\mu$ M a 28,0 $\mu$ M por 48h, sendo que a partir da concentração de 0,312 $\mu$ M houve diferença estatística na viabilidade celular (101). Em estudo com linhagens de câncer de mama BT474, SKBr3, T47D, MCF7, MCF7-ADR, MAB27, CG5, ZR 75-1 e MDA-MB-231, o IC<sub>50</sub> foi calculado para cada linhagem após exposição ao temsirolimus em concentrações entre 0,05 nmol/L a 50  $\mu$ M. O IC<sub>50</sub> variou entre 1,6nmol/L a 4,3 nmol/L nas linhagens com amplificação do gene HER2 a IC<sub>50</sub> de 15 $\mu$ M em linhagem HER2 negativa (102). Os resultados no presente estudo com temsirolimus na linhagem HeLa mostraram, dessa forma, maiores valores para o IC<sub>50</sub> com esse inibidor do que os descritos na literatura. Para HaCaT, os IC<sub>50</sub> estimados em 24h e em 48h foram de 26,54 $\mu$ M e 12,85 $\mu$ M, respectivamente, ambos menores do que os IC<sub>50</sub> da linhagem tumoral HeLa. Nas duas linhagens, o IC<sub>50</sub> em 24h é maior que em 48h, mostrando tendência ao efeito tempo-dependente e a curva dose-resposta de temsirolimus mostra tendência a efeito dose-dependente. Apesar do temsirolimus ter um dos menores IC<sub>50</sub> no presente estudo, ele não foi seletivo para a linhagem tumoral em 24h e em 48h. Dessa forma, infere-se que, mesmo sendo eficaz na redução da viabilidade celular, isso ocorre na presença de toxicidade às células saudáveis.

Para a linhagem HeLa, o IC<sub>50</sub> para o everolimo em 24h foi de 28,31µM e 22,0µM em 48h. Em estudos em linhagens de carcinoma nasofaríngeo HONE-1, CNE-2, C666-1, HK1 e CNE-1, tratadas com everolimo, o IC<sub>50</sub> foi de 0,63nM (0,00067µM) na linhagem indiferenciada (HONE-1) (103). Em linhagem de tumor pancreático neuroendócrino BON tratada com everolimo, o IC<sub>50</sub> foi de 35nM (0,035µM) (104). Dessa forma, os valores de IC<sub>50</sub> estimados no presente estudo foram superiores aos descritos para outras linhagens na literatura. Para HaCaT, os IC<sub>50</sub> estimados em 24h e em 48h foram 28,5µM e 83,12µM respectivamente. A curva dose resposta do everolimo mostra tendência ao efeito dose-dependente. O everolimo foi seletivo para a célula HeLa em 48 horas, com um dos menores IC<sub>50</sub>.

O MTT é um ensaio que possui limitações na avaliação da viabilidade celular. A viabilidade celular pode ser sub ou superestimada devido às adaptações metabólicas e reprogramação das mitocôndrias que sofrem influência dos efeitos inibitórios e stress mediado pelos tratamentos. Alguns medicamentos como o imatinibe, o resveratrol e a genisteína mostraram interferência com a taxa de redução do MTT levando a resultados inconsistentes entre os ensaios de MTT e outros testes de viabilidade celular (105). Foi reportado que o tratamento com resveratrol aumenta a formação de formazan em linhagens de leucemia, mas não nas de câncer de próstata. Tanto ativação quanto inibição do complexo mitocondrial I após tratamento com resveratrol já foram descritas (106).

Para efeito de comparação entre os inibidores do mTOR, foi feita análise da viabilidade celular em concentração fixa de 50µM para os inibidores derivados da dieta e em concentração fixa de 10µM para o everolimo e o temsirolimus. Definiu-se toxicidade leve as substâncias que resultaram em viabilidade celular entre 50 a 75%, toxicidade moderada as substâncias que resultaram em viabilidade celular entre 25 e 50% e toxicidade intensa as substâncias que resultaram em viabilidade celular abaixo de 25%. Na linhagem tumoral, apenas a curcumina levou à toxicidade moderada em 24h e 48h, mas também ocasionou toxicidade moderada na linhagem de queratinócitos em 24h. Além disso, houve toxicidade moderada para a linhagem de queratinócitos com EGCG e temsirolimus em 48h. Os inibidores do mTOR rapanálogos na concentração 10µM e os derivados da dieta na concentração de 50µM mostraram potencial de toxicidade leve ou moderada nas duas linhagens, apesar de nenhuma toxicidade ser intensa.

A radioterapia tem papel crucial no manejo do câncer do colo do útero. Muitos tumores de estágio IB1, menores que 4 cm, são tratados com a mesma eficácia com cirurgia ou radioterapia, sendo que lesões mais avançadas são melhor tratadas com radioterapia (107). Por outro lado, o tratamento concomitante com quimio-radioterapia se mostrou superior à radioterapia isolada, por levar à radiosensibilização do tumor (108).

Além de apresentarem atividade citotóxica na linhagem HeLa, os inibidores do mTOR testados também demonstraram ter efeito radiosensibilizante no presente estudo. O pré-tratamento das células com os inibidores do mTOR no IC<sub>50</sub>, seguido por tratamento radioterápico (2Gy), apresentou melhores resultados de citotoxicidade celular que a radioterapia isolada, demonstrando ter efeito aditivo com significância estatística. Os efeitos aditivos dos inibidores do mTOR associados à radioterapia já foram descritos na literatura. O temsirolimus, associado à radioterapia, foi avaliado em linhagens de câncer de cabeça e pescoço (FaDu e SCC40) e modelos xenográficos, apesar de não ter sido radiosensibilizante para as linhagens FaDu e SCC40. No modelo xenográfico, a combinação com a radioterapia suprimiu o crescimento tumoral de forma mais eficiente (109). Nas células HaCaT, o tratamento com os inibidores do mTOR mostrou efeito radiosensibilizante com diferença estatística apenas com o EGCG, apesar da tendência à menor viabilidade com associação à radioterapia aos outros inibidores do mTOR. O ensaio de radioterapia permitiu avaliar a viabilidade celular das linhagens após tratamento com os inibidores do mTOR no IC<sub>50</sub> sem radioterapia, mostrando que o tratamento exclusivo com os inibidores do mTOR resulta em viabilidade celular ao redor de 50% para todas as linhagens.

Uma explicação para o efeito sinérgico dos inibidores do mTOR e radioterapia nas linhagens tumorais vem de um estudo em linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7. Análise do western blot mostrou que a expressão de p-mTOR está superexpressa nas linhagens tumorais após a radioterapia. O tratamento com everolimo (20 nmol/L) associado à radioterapia reduziu a viabilidade celular, com aumento da apoptose dependente de caspase e bloqueio do aumento da fosforilação da S6K1, efetora da via do mTOR (110).

O teste de lesão em monocamada- scratch assay foi realizado pós-tratamento com a curcumina e o everolimo. Nas linhagem HeLa e HaCaT, as áreas das feridas nos poços tratados com a curcumina no IC<sub>50</sub> apresentaram estabilidade nas 12 horas

iniciais, sem tendência de fechamento, sendo estatisticamente diferentes do controle nas horas 6 e 12 nas duas linhagens. Em linhagens tumorais de glioblastoma multiforme, a curcumina, nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu$ M, também reduziu a migração celular de forma dose-dependente após tratamento de 2 horas (111). Com 24 horas de tratamento com a curcumina, as células HeLa e HaCaT, no presente estudo, já estavam inviáveis, não sendo mais possível determinar as margens da ferida para a linhagem HeLa. Dessa forma, um ensaio com concentração menor que a utilizada (no caso o IC<sub>50</sub> de 50,15 $\mu$ M) poderia resultar em outras conclusões.

Nos poços tratados com o everolimo, observou-se uma tendência ao fechamento da ferida tempo-dependente com as linhagens HeLa e HaCaT, assim como o controle. Com 24h houve diferença estatisticamente significativa da área da ferida em relação ao controle para HeLa. Para a HaCaT houve diferença estatística das áreas dos poços com o everolimo em relação ao controle com 2, 4, 12, 24, 48 e 72 horas. O teste de lesão em monocamada também foi realizado com controle e o everolimo em 7 linhagens de câncer escamoso de orofaringe nas concentrações 1nM, 10nM e 100nM, com diminuição significativa do fechamento da ferida em 12h (112). Outro estudo mostrou que a superexpressão do mTOR e dos efetores da sinalização aumentam o potencial de invasão e migração, enquanto a inibição da sinalização da via do mTOR com inibidores do mTOR diminui invasão e migração em linhagens de câncer de esôfago após tratamento com o everolimo na concentração de 20 nM (113). Dessa forma, o presente estudo apresentou menor interferência do everolimo na migração celular, ao contrário do descrito na literatura, mesmo o ensaio tendo sido realizado com concentração maior de everolimo (28,31  $\mu$ M).

O perfil de morte celular induzido pelo tratamento com os inibidores do mTOR na linhagem HeLa foi identificado pelo ensaio de citometria de fluxo com marcação por Anexina V-FITC e 7-AAD. As células foram tratadas por 24h com o temsirolimus, a curcumina e o resveratrol no IC<sub>50</sub>.

O resveratrol resultou em aparente aumento dos eventos positivos para necrose. Contudo, a análise citométrica não conseguiu diferenciar de forma clara os eventos R1 (células viáveis/não marcadas) e R2 (necrose) para células tratadas com resveratrol, por isso a análise ficou prejudicada. O presente estudo fez a análise da citometria após 24h do tratamento, apenas na concentração do IC<sub>50</sub>. O ensaio com tratamento em menor concentração ou leitura mais precoce antes de 24h podem

resultar em outros achados. O estudo de Fouad et al. com linhagens de câncer de cólon avaliou o efeito do tratamento com resveratrol, apresentando ativação dos marcadores de apoptose caspase 3, caspase 6 e aumento da taxa de BAX/ proteína reguladora da apoptose BCL-2 (BCL-2).(94) No presente estudo, não se observou apoptose com o tratamento com o resveratrol após 24h. Esse resultado se deu, provavelmente em decorrência do experimento ter sido realizado 24h após o tratamento. Possivelmente a apoptose poderia ter sido observada caso o tratamento e análise fossem realizados em menor tempo (76).

Após o tratamento com o temsirolimus, houve maior número de eventos marcados para R4 (apoptose tardia/necrose) no presente estudo. A falta de marcação com apenas anexina, indicativo de apoptose inicial, não permite a afirmação categórica de que o temsirolimus causasse apoptose de fato, pois pode ter ocorrido necrose. O tratamento com o everolimo 20nM, durante 48h em linhagens de câncer escamoso de esôfago, ocasionou apoptose inicial (anexina+/iodeto de propídeo-) (113). Por outro lado, dois estudos não reportaram apoptose após tratamento com o temsirolimus. Estudo em linhagens de câncer de mama tratadas com o temsirolimus nas concentrações de 0,05nmol/L a 50 $\mu$ M não evidenciou apoptose, sugerindo que a inibição do crescimento celular seja resultado de efeitos anti-proliferativos (102). Um estudo com linhagens de câncer de pulmão tratadas com o temsirolimus, na concentração 10nM/L, também não demonstrou a presença de apoptose, sugerindo que o temsirolimus suprime a proliferação celular por efeito citostático (114).

A curcumina, no presente estudo, não resultou em marcação para apoptose ou necrose. Da mesma forma, estudo com linhagem tumoral de glioblastoma multiforme, tratada com a curcumina 10 $\mu$ M por 24h, também não revelou apoptose no ensaio das caspases, apesar dos efeitos anti-proliferativos determinados na avaliação com MTT (111). Entretanto, três estudos com células HeLa e a curcumina chegaram a conclusões distintas do presente estudo. Estudo com células HeLa tratadas com a curcumina, na dose de 25 $\mu$ M por 48h, evidenciou aumento da expressão de caspase 3, efetora direta da apoptose e redução da expressão das proteínas anti-apoptóticas BCL-2 e BCL-xL (115). Outro estudo avaliou a apoptose com o ensaio de citometria de fluxo de forma semelhante ao presente trabalho, sendo que o tratamento com a curcumina por 48h, na linhagem HeLa nas concentrações de 5 a 50 $\mu$ M, mostrou aumento da apoptose inicial em até 12,37%, com relevância estatística (97). O estudo

de Singh et al., com linhagens de câncer do colo do útero HeLa, SiHa e CaSki com o tratamento com a curcumina entre 50 e 100 $\mu$ M, evidenciou apoptose com os ensaios de citometria de fluxo e teste TUNEL (116).

Algumas limitações do presente estudo merecem ser consideradas. O ensaio do MTT pode apresentar resultados inconsistentes para o resveratrol e o EGCG devido a interferências com a taxa de redução do MTT pelos medicamentos. No teste de monocamada, após 24h de tratamento com a curcumina, as células estavam inviáveis. Dessa forma, um ensaio com concentração menor que a utilizada poderia resultar em outras conclusões para a migração celular. A citometria de fluxo com marcação por Anexina V-FITC e 7-AAD não parece ser o método mais adequado para avaliação de apoptose com a curcumina, devido à interferência do medicamento na fluorescência. O ensaio de morte celular foi inconclusivo para apoptose, após o tratamento com os inibidores do mTOR no IC<sub>50</sub> por 24h. Dessa forma, os tratamentos por menor intervalo de tempo e/ou menor concentração poderiam resultar em outros achados.

O everolimo, o temsirolimus, o EGCG, o resveratrol e a curcumina têm interferência na viabilidade celular na linhagem de câncer do colo do útero. Eles também têm efeito sinérgico em associação à radioterapia. Um resultado importante foi que, dentre os inibidores avaliados, o único inibidor que foi seletivo para a linhagem tumoral tanto em 24h quanto em 48h foi o resveratrol, muito embora tenha apresentado os maiores resultados de IC<sub>50</sub>. O everolimo e o temsirolimus, que já estão incorporados no tratamento de câncer de rim e câncer de mama e já foram avaliados em estudos de fase 1 e fase 2 para o câncer do colo do útero, tiveram os menores valores de IC<sub>50</sub> no presente estudo. O everolimo e o temsirolimus não foram seletivos para a linhagem tumoral e isso é compatível com o perfil de toxicidade apresentados nos estudos clínicos.

Baseado nos resultados apresentados, novos estudos certamente merecem ser feitos com os inibidores do mTOR no tratamento do câncer do colo do útero e, em especial, associados à radioterapia. Os inibidores derivados da dieta podem ser aliados poderosos no tratamento do câncer do colo do útero, especialmente se confirmada a seletividade para a célula tumoral. Considerando que a carcinogênese do câncer do colo do útero, pela interação das oncoproteínas do HPV com o genoma humano, leva à interferência na via da PI3K/AKT/mTOR e as vias de sinalização



intracelular têm vários pontos de convergência, sendo o mTOR um importante efetor de várias vias, os inibidores do mTOR como alvo terapêutico no câncer do colo do útero têm importante racional biológico.

## 7 CONCLUSÃO

Frente aos objetivos propostos podemos concluir que:

Os inibidores do mTOR rapanálogos na concentração 10 $\mu$ M e os derivados da dieta na concentração de 50 $\mu$ M mostraram potencial de toxicidade leve ou moderada nas linhagens HeLa e HaCaT. Porém, nenhuma citotoxicidade demonstrou ser intensa;

O resveratrol foi o inibidor do mTOR mais seletivo para a linhagem tumoral de câncer do colo do útero, muito embora tenha apresentado os maiores valores de IC<sub>50</sub>;

O pré-tratamento das células com os inibidores do mTOR no IC<sub>50</sub>, seguido por tratamento radioterápico (2Gy), apresentou maiores resultados de citotoxicidade que a radioterapia isolada, demonstrando ter efeito aditivo com significância estatística;

A curcumina interferiu no fechamento das feridas nos experimentos com as linhagens de HeLa e HaCaT de forma mais intensa que o everolimo;

O temsirolimus pode levar à apoptose tardia ou necrose após 24h de tratamento da HeLa e os resultados de apoptose com a curcumina e o resveratrol para HeLa foram inconclusivos.

## REFERÊNCIAS

1. Forman D BF, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M, Steliarova-Foucher E, Swaminathan R and Ferlay J eds GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 2012 [acesso em 20/10/2015]. Available from: [globocan.iarc.fr](http://globocan.iarc.fr).
2. Nogueira-Rodrigues A, Morales G, Grazziotin R, Carmo CC, Small IA, Alves FV, et al. Phase 2 trial of erlotinib combined with cisplatin and radiotherapy in patients with locally advanced cervical cancer. *Cancer*. 2014;120(8):1187-93.
3. Tewari KS, Sill MW, Long HJ, 3rd, Penson RT, Huang H, Ramondetta LM, et al. Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer. *The New England journal of medicine*. 2014;370(8):734-43.
4. Movva S, Rodriguez L, Arias-Pulido H, Verschraegen C. Novel chemotherapy approaches for cervical cancer. *Cancer*. 2009;115(14):3166-80.
5. Oh KJ, Kalinina A, Park NH, Bagchi S. Deregulation of eIF4E: 4E-BP1 in differentiated human papillomavirus-containing cells leads to high levels of expression of the E7 oncoprotein. *J Virol*. 2006;80(14):7079-88.
6. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 2002;55(4):244-65.
7. Husseinzadeh N, Husseinzadeh HD. mTOR inhibitors and their clinical application in cervical, endometrial and ovarian cancers: a critical review. *Gynecologic oncology*. 2014;133(2):375-81.
8. Advani SH. Targeting mTOR pathway: A new concept in cancer therapy. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*. 2010;31(4):132-6.
9. Diaz-Padilla I, Duran I, Clarke BA, Oza AM. Biologic rationale and clinical activity of mTOR inhibitors in gynecological cancer. *Cancer treatment reviews*. 2012;38(6):767-75.
10. Hutson TE, Escudier B, Esteban E, Bjarnason GA, Lim HY, Pittman KB, et al. Randomized phase III trial of temsirolimus versus sorafenib as second-line therapy after sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(8):760-7.
11. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*. 2008;372(9637):449-56.
12. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, Rugo HS, Sahnoud T, et al. Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(6):520-9.
13. INCA. Estimativa 2014: Instituto Nacional do Câncer; 2014 [cited 2015 20/10/2015]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>.
14. INCA. Atlas de Mortalidade Brasil: Ministério da Saúde; 2014 [cited 2015 20/10/2015]. Available from: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>.
15. Colombo N, Carinelli S, Colombo A, Marini C, Rollo D, Sessa C. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23 Suppl 7:vii27-32.
16. Schiffman M, Castle Pe Fau - Jeronimo J, Jeronimo J Fau - Rodriguez AC, Rodriguez Ac Fau - Wacholder S, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. 2007(1474-547X (Electronic)).

17. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*. 1999;189(1):12-9.
18. Yim EK, Park JS. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer Res Treat*. 2005;37(6):319-24.
19. Nogueira-Rodrigues A, Melo A. Perspectivas no Tratamento do Câncer do Colo do Útero: Explorando o Bloqueio da Sinalização Celular. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2012;58(3):529-32.
20. Jemal A, Simard EP, Dorell C, Noone AM, Markowitz LE, Kohler B, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus(HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013;105(3):175-201.
21. Zhang L, Wu J, Ling MT, Zhao L, Zhao KN. The role of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway in human cancers induced by infection with human papillomaviruses. *Mol Cancer*. 2015;14:87.
22. zur Hausen H, Gissmann L, Steiner W, Dippold W, Dreger I. Human papilloma viruses and cancer. *Bibl Haematol*. 1975(43):569-71.
23. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. (0264-410X (Print)).
24. Castle PE, Wacholder S, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, et al. A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002;94(18):1406-14.
25. Van Krieking G, Castellsague X, Cibula D, Demarteau N. Estimation of the potential overall impact of human papillomavirus vaccination on cervical cancer cases and deaths. *Vaccine*. 2014;32(6):733-9.
26. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2006;119(5):1108-24.
27. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 1:S16-22.
28. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *The New England journal of medicine*. 2007;356(19):1915-27.
29. Schlichte MJ, Guidry J. Current Cervical Carcinoma Screening Guidelines. *J Clin Med*. 2015;4(5):918-32.
30. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *The New England journal of medicine*. 2007;357(16):1579-88.
31. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis*. 2007;195(11):1582-9.
32. Hellner K, Munger K. Human Papillomaviruses As Therapeutic Targets in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(13):1785-94.
33. Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *Journal of Virology*. 1989;63(10):4417-21.

34. McLaughlin-Drubin ME, Munger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*. 2009;384(2):335-44.
35. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27.
36. Chen J. Signaling pathways in HPV-associated cancers and therapeutic implications. *Rev Med Virol*. 2015;25 Suppl 1:24-53.
37. Munger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*. 2001;20(54):7888-98.
38. Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ, McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol*. 1993;67(8):4521-32.
39. Lu Z, Hu X, Li Y, Zheng L, Zhou Y, Jiang H, et al. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein interferences with insulin signaling pathway by binding to tuberin. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(34):35664-70.
40. Chiang GG, Abraham RT. Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends in molecular medicine*. 2007;13(10):433-42.
41. Willems L, Tamburini J, Chapuis N, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D. PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies. *Curr Oncol Rep*. 2012;14(2):129-38.
42. Dienstmann R, Rodon J, Serra V, Tabernero J. Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Molecular cancer therapeutics*. 2014;13(5):1021-31.
43. Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17(6):596-603.
44. Chiarini F, Evangelisti C, McCubrey JA, Martelli AM. Current treatment strategies for inhibiting mTOR in cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(2):124-35.
45. Fasolo A, Sessa C. Targeting mTOR pathways in human malignancies. *Curr Pharm Des*. 2012;18(19):2766-77.
46. Dancey J. mTOR signaling and drug development in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(4):209-19.
47. Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8(4):393-412.
48. LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2008;11(1-2):32-50.
49. Moschetta M, Reale A, Marasco C, Vacca A, Carratu MR. Therapeutic targeting of the mTOR-signalling pathway in cancer: benefits and limitations. *Br J Pharmacol*. 2014;171(16):3801-13.
50. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K Pathway As Drug Target in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(6):1075-83.
51. Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD, Sonenberg N. Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804(3):433-9.
52. Surviladze Z, Sterk RT, DeHaro SA, Ozbun MA. Cellular entry of human papillomavirus type 16 involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway and inhibition of autophagy. *J Virol*. 2013;87(5):2508-17.

53. Zhang XY, Zhang HY, Zhang PN, Lu X, Sun H. Elevated phosphatidylinositol 3-kinase activation and its clinicopathological significance in cervical cancer. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2008;139(2):237-44.
54. Ji J, Zheng PS. Activation of mTOR signaling pathway contributes to survival of cervical cancer cells. *Gynecologic oncology*. 2010;117(1):103-8.
55. Feng W, Duan X, Liu J, Xiao J, Brown RE. Morphoproteomic evidence of constitutively activated and overexpressed mTOR pathway in cervical squamous carcinoma and high grade squamous intraepithelial lesions. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2009;2(3):249-60.
56. Ma YY, Wei SJ, Lin YC, Lung JC, Chang TC, Whang-Peng J, et al. PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene*. 2000;19(23):2739-44.
57. Zhou H, Luo Y, Huang S. Updates of mTOR inhibitors. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2010;10(7):571-81.
58. Afzal M, Safer AM, Menon M. Green tea polyphenols and their potential role in health and disease. *Inflammopharmacology*. 2015;23(4):151-61.
59. Li W, Nie S, Yu Q, Xie M. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis of human hepatoma cells by mitochondrial pathways related to reactive oxygen species. *J Agric Food Chem*. 2009;57(15):6685-91.
60. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997;275(5297):218-20.
61. Jiang H, Shang X, Wu H, Gautam SC, Al-Holou S, Li C, et al. Resveratrol downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in human U251 glioma cells. *J Exp Ther Oncol*. 2009;8(1):25-33.
62. Athar M, Back JH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL. Multiple molecular Targets of Resveratrol: Anti-carcinogenic Mechanisms. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2009;486(2):95-102.
63. Guo Y, Shan Q, Gong Y, Lin J, Shi F, Shi R, et al. Curcumin induces apoptosis via simultaneously targeting AKT/mTOR and RAF/MEK/ERK survival signaling pathways in human leukemia THP-1 cells. *Pharmazie*. 2014;69(3):229-33.
64. Shehzad A, Lee YS. Molecular mechanisms of curcumin action: signal transduction. *Biofactors*. 2013;39(1):27-36.
65. Johnson SM, Gulhati P, Arrieta I, Wang X, Uchida T, Gao T, et al. Curcumin inhibits proliferation of colorectal carcinoma by modulating Akt/mTOR signaling. *Anticancer Res*. 2009;29(8):3185-90.
66. Moroney JW, Schlumbrecht MP, Helgason T, Coleman RL, Moulder S, Naing A, et al. A Phase I Trial of Liposomal Doxorubicin, Bevacizumab, and Temsirolimus in Patients with Advanced Gynecologic and Breast Malignancies. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(21):6840-6.
67. Piha-Paul SA, Wheler JJ, Fu S, Levenback C, Lu K, Falchook GS, et al. Advanced gynecologic malignancies treated with a combination of the VEGF inhibitor bevacizumab and the mTOR inhibitor temsirolimus. *Oncotarget*. 2014;5(7):1846-55.
68. Tinker AV, Ellard S, Welch S, Moens F, Allo G, Tsao MS, et al. Phase II study of temsirolimus (CCI-779) in women with recurrent, unresectable, locally advanced or metastatic carcinoma of the cervix. A trial of the NCIC Clinical Trials Group (NCIC CTG IND 199). *Gynecologic oncology*. 2013;130(2):269-74.
69. Hou MM, Liu X, Wheler J, Naing A, Hong D, Coleman RL, et al. Targeted PI3K/AKT/mTOR therapy for metastatic carcinomas of the cervix: A phase I clinical experience. *Oncotarget*. 2014;5(22):11168-79.

70. Moroney J, Wheler J, Hong D, Naing A, Falchook G, Bodurka D, et al. Phase I Clinical Trials in 85 Patients with Gynecologic Cancer: The M. D. Anderson Cancer Center Experience. *Gynecologic oncology*. 2010;117(3):467-72.
71. Janku F, Wheler JJ, Naing A, Stepanek VM, Falchook GS, Fu S, et al. PIK3CA mutations in advanced cancers: characteristics and outcomes. *Oncotarget*. 2012;3(12):1566-75.
72. ATCC. HeLa (ATCC® CCL-2™) USA2015 [cited 2015 02/11/2015]. Available from: <http://www.atcc.org/Products/All/CCL-2.aspx - characteristics>.
73. AddexBio. HaCaT cells 2015 [cited 2015 5/11/2015]. Available from: <http://www.addexbio.com/productdetail?pid=117>.
74. Peng L, Wang B, Ren P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2005;45(2):108-11.
75. Horii H, Suzuki R, Sakagami H, Umemura N, Ueda JY, Shirataki Y. Induction of non-apoptotic cell death in human oral squamous cell carcinoma cell lines by *Rhinacanthus nasutus* extract. *In Vivo*. 2012;26(2):305-9.
76. Elias; ST, Guerra EN. Avaliação in vitro do potencial antineoplásico de plantas do cerrado em carcinoma de cabeça e pescoço. *Respositório Institucional Universidade de Brasília: Universidade de Brasília*; 2015 [cited 2015 17/11/2015]. Available from: <http://repositorio.unb.br>.
77. Gahan PB. *Methods in molecular biology volume 263 flow cytometry protocols* T. H. Hawley and R. G. Hawley (eds), Humana Press, 434 pp., ISBN 1-588-29-234-7 (hardback); ISBN 1-588-29-235-5 (paperback) (2004). *Cell Biochemistry and Function*. 2005;23(4):291-.
78. Aggarwal S, Takada Y, Singh S, Myers JN, Aggarwal BB. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2004;111(5):679-92.
79. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184(1):39-51.
80. Allen RT, Hunter WJ, 3rd, Agrawal DK. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1997;37(4):215-28.
81. Serrano-Olvera A, Cetina L, Coronel J, Duenas-Gonzalez A. Emerging drugs for the treatment of cervical cancer. *Expert opinion on emerging drugs*. 2015;20(2):165-82.
82. Wu P, Hu YZ. PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in cancer: a perspective on clinical progress. *Curr Med Chem*. 2010;17(35):4326-41.
83. Faried LS, Faried A, Kanuma T, Nakazato T, Tamura T, Kuwano H, et al. Inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) by rapamycin increases chemosensitivity of CaSki cells to paclitaxel. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2006;42(7):934-47.
84. Chang F. Role of papillomaviruses. *J Clin Pathol*. 1990;43(4):269-76.
85. Populo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(2):1886-918.
86. Karunakaran D, Rashmi R, Kumar TR. Induction of apoptosis by curcumin and its implications for cancer therapy. *Current cancer drug targets*. 2005;5(2):117-29.

87. Garcia-Zepeda SP, Garcia-Villa E, Diaz-Chavez J, Hernandez-Pando R, Gariglio P. Resveratrol induces cell death in cervical cancer cells through apoptosis and autophagy. *Eur J Cancer Prev.* 2013;22(6):577-84.
88. Yokoyama M, Noguchi M, Nakao Y, Pater A, Iwasaka T. The tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate effects on growth, apoptosis, and telomerase activity in cervical cell lines. *Gynecologic oncology.* 2004;92(1):197-204.
89. Beevers CS, Chen L, Liu L, Luo Y, Webster NJ, Huang S. Curcumin disrupts the Mammalian target of rapamycin-raptor complex. *Cancer research.* 2009;69(3):1000-8.
90. Zhang Q, Kelly AP, Wang L, French SW, Tang X, Duong HS, et al. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibit mast cell-stimulated type I collagen expression in keloid fibroblasts via blocking PI-3K/AkT signaling pathways. *J Invest Dermatol.* 2006;126(12):2607-13.
91. Thangapazham RL, Singh AK, Sharma A, Warren J, Gaddipati JP, Maheshwari RK. Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* 2007;245(1-2):232-41.
92. Noguchi M, Yokoyama M, Watanabe S, Uchiyama M, Nakao Y, Hara K, et al. Inhibitory effect of the tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate, on growth of cervical adenocarcinoma cell lines. *Cancer Lett.* 2006;234(2):135-42.
93. Wang P, Henning SM, Heber D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PloS one.* 2010;5(4):e10202.
94. Fouad MA, Agha AM, Merzabani MM, Shouman SA. Resveratrol inhibits proliferation, angiogenesis and induces apoptosis in colon cancer cells: calorie restriction is the force to the cytotoxicity. *Hum Exp Toxicol.* 2013;32(10):1067-80.
95. Jin L, Ren Y-J, Du C. Synthesis and Antitumor Activities of Resveratrol Derivatives on Cervical Cancer Hela Cells. *Chem Nat Compd.* 2015;51(4):652-5.
96. Xu F, Mu X, Zhao J. Effects of curcumin on invasion and metastasis in the human cervical cancer cells Caski. *Chin J Cancer Res.* 2009;21(2):159-62.
97. Zhao J, Zhao Y, Zhang Y, Chen W. Anti-tumor effect of curcumin on human cervical carcinoma HeLa cells in vitro and in vivo. *Chin J Cancer Res.* 2007;19(1):32-6.
98. Kunwar A, Barik A, Mishra B, Rathinasamy K, Pandey R, Priyadarsini KI. Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1780(4):673-9.
99. Syng-Ai C, Kumari AL, Khar A. Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. *Molecular cancer therapeutics.* 2004;3(9):1101-8.
100. Ramachandran C, You W. Differential sensitivity of human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin. *Breast cancer research and treatment.* 1999;54(3):269-78.
101. Li S, Liang Y, Wu M, Wang X, Fu H, Chen Y, et al. The novel mTOR inhibitor CCI-779 (temsirolimus) induces antiproliferative effects through inhibition of mTOR in Bel-7402 liver cancer cells. *Cancer Cell International.* 2013;13:30-.
102. Del Bufalo D, Ciuffreda L, Triscioglio D, Desideri M, Cognetti F, Zupi G, et al. Antiangiogenic potential of the Mammalian target of rapamycin inhibitor temsirolimus. *Cancer research.* 2006;66(11):5549-54.
103. Ma BB, Lui VW, Hui EP, Lau CP, Ho K, Ng MH, et al. The activity of mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) in nasopharyngeal carcinoma and cisplatin-resistant cell lines. *Investigational new drugs.* 2010;28(4):413-20.



104. Zitzmann K, De Toni EN, Brand S, Goke B, Meinecke J, Spottl G, et al. The novel mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) induces antiproliferative effects in human pancreatic neuroendocrine tumor cells. *Neuroendocrinology*. 2007;85(1):54-60.
105. Stepanenko AA, Dmitrenko VV. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*. 2015;574(2):193-203.
106. Bitterman J, Chung J. Metabolic effects of resveratrol: addressing the controversies. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(8):1473-88.
107. Peters WA, Liu PY, Barrett RJ, Stock RJ, Monk BJ, Berek JS, et al. Concurrent Chemotherapy and Pelvic Radiation Therapy Compared With Pelvic Radiation Therapy Alone as Adjuvant Therapy After Radical Surgery in High-Risk Early-Stage Cancer of the Cervix. *Journal of Clinical Oncology*. 2000;18(8):1606-13.
108. Morris M, Eifel PJ, Lu J, Grigsby PW, Levenback C, Stevens RE, et al. Pelvic Radiation with Concurrent Chemotherapy Compared with Pelvic and Para-Aortic Radiation for High-Risk Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine*. 1999;340(15):1137-43.
109. Murphy JD, Spalding AC, Somnay YR, Markwart S, Ray ME, Hamstra DA. Inhibition of mTOR radiosensitizes soft tissue sarcoma and tumor vasculature. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(2):589-96.
110. Albert JM, Kim KW, Cao C, Lu B. Targeting the Akt/mammalian target of rapamycin pathway for radiosensitization of breast cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2006;5(5):1183-9.
111. Senft C, Polacin M, Priester M, Seifert V, Kogel D, Weissenberger J. The nontoxic natural compound Curcumin exerts anti-proliferative, anti-migratory, and anti-invasive properties against malignant gliomas. *BMC cancer*. 2010;10:491.
112. Naruse T, Yanamoto S, Yamada S, Rokutanda S, Kawakita A, Kawasaki G, et al. Anti-tumor effect of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in oral squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2015;21(3):765-73.
113. Hirashima K, Baba Y, Watanabe M, Karashima RI, Sato N, Imamura Y, et al. Aberrant activation of the mTOR pathway and anti-tumour effect of everolimus on oesophageal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*. 2012;106(5):876-82.
114. Ohara T, Takaoka M, Toyooka S, Tomono Y, Nishikawa T, Shirakawa Y, et al. Inhibition of mTOR by temsirolimus contributes to prolonged survival of mice with pleural dissemination of non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci*. 2011;102(7):1344-9.
115. Zhao J, Zhao Y. Effects of curcumin on proliferation and apoptosis of human cervical carcinoma HeLa cells in vitro. *Chin J Cancer Res*. 2004;16(3):225-8.
116. Singh M, Singh N. Molecular mechanism of curcumin induced cytotoxicity in human cervical carcinoma cells. *Mol Cell Biochem*. 2009;325(1-2):107-19.