

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

DIANDRA ZIPINOTTI DOS SANTOS

**ESTUDO DOS EFEITOS ANTINEOPLÁSICOS DA ATORVASTATINA EM
MONOTERAPIA E EM TERAPIA COMBINADA COM QUIMIOTERÁPICOS
CONVENCIONAIS EM MODELOS *IN VITRO* DE CÂNCER DE MAMA**

VITÓRIA

2017

DIANDRA ZIPINOTTI DOS SANTOS

**ESTUDO DOS EFEITOS ANTINEOPLÁSICOS DA ATORVASTATINA EM
MONOTERAPIA E EM TERAPIA COMBINADA COM QUIMIOTERÁPICOS
CONVENCIONAIS EM MODELOS *IN VITRO* DE CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Farmacologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Bioquímica.

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

VITÓRIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)
Bibliotecário: Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O

S237e Santos, Diandra Zipinotti dos, 1990 -
Estudo dos efeitos antineoplásicos da atorvastatina em monoterapia e em
terapia combinada com quimioterápicos convencionais em modelos in vitro
de câncer de mama / Diandra Zipinotti dos Santos – 2017.
73 f. : il.

Orientador: Leticia Batista Azevedo Rangel.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Neoplasias da Mama. 2. Metabolismo. I. Rangel, Leticia Batista
Azevedo. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. III. Título.

CDU: 61

Diandra Zipinotti dos Santos

“Estudo dos efeitos antineoplásicos da atorvastatina em monoterapia e em terapia combinada com quimioterápicos convencionais em modelos *in vitro* de câncer de mama”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovada em 10 de outubro de 2017.

BANCA EXAMINADORA:



Prof.^a. Dr.^a. Leticia Batista Azevedo Rangel - Orientadora, UFES



Prof.^a. Dr.^a. Daniela Amorim Melgaço G. do Bem - Membro Interno, UFES



Prof.^a. Dr.^a. Renata Dalmaschio Daltoé - Membro Externo, UFES

Vitória

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me proporcionar mais uma conquista e sonho realizado.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Leticia Rangel, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela confiança em minha ambição acadêmica e pelas diretrizes sábias durante todos esses anos. Você estabeleceu um exemplo de excelência como pesquisadora e mentora que certamente seguirei e levarei para a vida.

À minha família, especialmente aos meus pais, pelo amor incondicional, constante apoio e encorajamento que obtive ao longo dos anos. Nunca mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Sem dúvida, não poderia dar esse passo sem vocês.

Aos amigos do laboratório pela cooperação, conhecimentos repassados e auxílios fundamentais nos experimentos. Vocês contribuíram de maneira decisiva para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento como estudante. Sou muito grata a vocês.

Ao Bruno, pessoa com quem amo partilhar a vida e conquistas. Obrigada pelo amor, paciência, compreensão e incentivo inefável.

Ao Criobanco e toda equipe técnica pela estrutura concedida para trabalho.

Ao Dr. Paulo Palácio por fornecer a Atorvastatina para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa e à Profa. Dra. Rita De Cassia Ribeiro Goncalves do Laboratório de Triagem biológica de produtos naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, pelo uso do leitor de Elisa.

À Sylvania dos Santos Meyrelles, pelo uso do citômetro e à Bianca Prandi Campagnaro pelas análises de Citometria de fluxo.

Às Agências de Fomento CAPES, FAPES e CNPq

À Universidade Federal do Espírito Santo, local da minha formação.

“Qualquer pessoa que tenha experiência com o trabalho científico sabe que aqueles que se recusam a ir além dos fatos raramente chegam aos fatos em si.”

Thomas Huxley

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo mais frequente no mundo e mais comum entre as mulheres, e sua taxa de ocorrência vem se tornando alarmante, configurando, desta maneira, um grande desafio à saúde mundial. É uma doença complexa e heterogênea, composta por múltiplos subgrupos com características biológicas e morfológicas distintas e apresenta diferentes manifestações clínicas e padrões de resposta às terapias vigentes. A alteração do metabolismo lipídico tem sido cada vez mais reconhecida como uma característica das células cancerosas. Estas alterações podem afetar a disponibilidade de lipídios estruturais para a síntese de membrana, síntese e degradação de lipídios que contribuem para a homeostase energética e para as funções de sinalização celular. Em consonância ao exposto, e em virtude da reduzida eficácia da quimioterapia atualmente em uso para determinados subgrupos de câncer, substâncias que interferem com o metabolismo lipídico, como é caso das estatinas, surgem como estratégias auxiliares promissoras no combate ao câncer. Neste estudo foi avaliado, em linhagens de câncer de mama, o efeito citotóxico da atorvastatina em monoterapia e em terapia combinada com medicamentos utilizados na clínica convencional. Os resultados mostraram que a droga testada tem atividade antitumoral em todas as linhagens de câncer de mama, sendo mais potente e eficaz para a linhagem MDA-MB-231. Adicionalmente, o efeito antineoplásico da atorvastatina parece estar associado à parada do ciclo celular na fase G1, bem como indução de autofagia. Ademais, a atorvastatina alterou a eficácia dos fármacos utilizados na clínica convencional, mas geralmente em concentrações mais elevadas do que as consideradas seguras e utilizadas na clínica.

Palavras chaves: Câncer de mama; metabolismo; atorvastatina;

ABSTRACT

Breast cancer is the second most common kind of cancer in the world and the most common among women. Its frequency rate is becoming alarming, being this way a major challenge to global health. It is a complex and heterogeneous disease, composed of multiple subgroups with different biological and morphological characteristics and it shows different clinical manifestations and patterns of response to existing therapies. The metabolic reprogramming has been increasingly recognized as a characteristic of cancer cells. These changes may affect the availability of structural lipids for membrane synthesis, lipid synthesis and degradation that contribute to energetic homeostasis and cellular signaling functions. According to what has been mentioned above and due to the reduced effectiveness of chemotherapy currently in use for certain subgroups of cancer, substances that interfere with lipid metabolism, such as statins, appear as promising auxiliary strategies in the fight against cancer. In this study, atorvastatin alone and in combination with other chemotherapeutics had been evaluated in breast cancer cell lines. The results have shown that the tested drug have antitumor activity on all lineages of breast cancer, being the most effective inhibitor of MDA-MB-231 breast cancer cell growth. In addition, the antineoplastic effect of atorvastatin appears to be associated with G1 phase cell cycle arrest, as well as autophagy induction. Moreover, atorvastatin altered the effectiveness of drugs used in conventional clinic, but most often at higher concentrations than those considered safe and used in the clinic.

Key words: Breast cancer; metabolism; atorvastatin

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Casos de câncer estimados para 2016-2017, para o sexo feminino.....	12
FIGURA 2: Esquema geral da classificação histológica de câncer de mama.....	15
FIGURA 3: Mecanismo de ação das estatinas.....	20
FIGURA 4: Estrutura química das principais estatinas.....	21
FIGURA 5: Estudo da VCM das linhagens de CAM após o tratamento com atorvastatina.....	32
FIGURA 6: Fotos do tratamento com atorvastatina na linhagem MCF-7.....	34
FIGURA 7: Fotos do tratamento com atorvastatina na linhagem MDA-MB-231.....	35
FIGURA 8: Efeitos do paclitaxel em monoterapia e em combinação com atorvastatina na linhagem MCF-7, pelo método de MTT.....	37
FIGURA 9: Efeitos do paclitaxel em monoterapia e em combinação com atorvastatina na linhagem MDA-MB-231, pelo método de MTT.....	39
FIGURA 10: Efeitos da cisplatina em monoterapia e em combinação com atorvastatina na linhagem MCF-7, pelo método de MTT.....	40
FIGURA 11: Efeitos da cisplatina em monoterapia e em combinação com atorvastatina na linhagem MDA-MD-231, pelo método de MTT.....	42
FIGURA 12: Efeitos do olaparib em monoterapia e em combinação com atorvastatina na linhagem MCF-7, pelo método de MTT.....	43
FIGURA 13: Efeitos do olaparib em monoterapia e em combinação com atorvastatina na linhagem MDA-MD-231, pelo método de MTT.....	44
FIGURA 14: Efeitos do olaparib em monoterapia e em combinação com atorvastatina na linhagem HCC-1937, pelo método de MTT.....	45
FIGURA 15: Efeito do pré-tratamento com atorvastatina e do tratamento combinado com paclitaxel.....	47
FIGURA 16: Efeito do pré-tratamento com atorvastatina e do tratamento combinado com cisplatina.....	48
FIGURA 17: Efeito do pré-tratamento com atorvastatina e do tratamento combinado com olaparib.....	48

FIGURA 18: Ensaio clonogênico linhagem MCF-7.....	49
FIGURA 19: Ensaio clonogênico linhagem MDA-MB-231.....	50
FIGURA 20: Análise do ciclo celular.....	51
FIGURA 21: Análise da expressão de p62 na linhagem MCF-7 tratada com cisplatina e atorvastatina.....	52
FIGURA 22: Análise da expressão de p62 na linhagem MCF-7 tratada com paclitaxel e atorvastatina.....	53
FIGURA 23: Análise da expressão de LC3B na linhagem MCF-7 tratada com paclitaxel e atorvastatina.....	54
FIGURA 24: Análise da expressão de BAX na linhagem MCF-7 tratada com cisplatina e atorvastatina.....	55
FIGURA 25: Análise da expressão de BAX na linhagem MCF-7 tratada com paclitaxel e atorvastatina.....	56

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Subtipos de câncer de mama definidos pelo método imuno-histoquímico.....	16
QUADRO 2: Faixa de concentração das drogas utilizadas para os ensaio de VCM	27
QUADRO 3: Descrição dos anticorpos primários utilizados nos experimentos de análise de expressão proteica.....	30
QUADRO 4: Concentração das IC ₅₀ estimadas de atorvastatina para as linhagens de CAM.....	32
QUADRO 5: Concentração das IC ₅₀ estimadas do tratamento combinado de paclitaxel e atorvastatina para a linhagem MCF-7.....	38
QUADRO 6: Concentração das IC ₅₀ estimadas do tratamento combinado de paclitaxel e atorvastatina para a linhagem MDA-MB-231.....	39
QUADRO 7: Concentração das IC ₅₀ estimadas do tratamento combinado de cisplatina e atorvastatina para a linhagem MCF-7.....	41
QUADRO 8: Concentração das IC ₅₀ estimadas do tratamento combinado de cisplatina e atorvastatina para a linhagem MDA-MB-231.....	42
QUADRO 9: Concentração das IC ₅₀ estimadas do tratamento combinado de olaparib e atorvastatina para a linhagem MCF-7.....	43
QUADRO 10: Concentração das IC ₅₀ estimadas do tratamento combinado de olaparib e atorvastatina para a linhagem MDA-MB-231.....	44
QUADRO 11: Concentração das IC ₅₀ estimadas do tratamento combinado de olaparib e atorvastatina para a linhagem HCC-1937.....	45

LISTA DE SIGLAS

AKT – Proteína cinase B

ATCC – American Type Culture Collection

ATV – Atorvastatina

BRCA1/2 – Gene de susceptibilidade ao câncer de mama 1 e 2

CAM – Câncer de mama

CDIS-SOE – Carcinoma invasivo sem outras especificações

CISP – Cisplatina

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – Dimetilsulfóxido

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HER2 – Receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano

IC₅₀ – Concentração Inibitória de 50% da proliferação celular

INCa – Instituto Nacional do Câncer

Ki67 – Proteína marcadora de proliferação celular

MTT – Metil-tiazol-tetrazólio

OLAP – olaparib

PARP – Poli-(adenosina 5'difosfato [ADP]-ribose) polimerase)

PBS – Tampão salino- fosfato

PI3K – Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-cinase

PTX – Paclitaxel

p53 – Oncogene 53

p62 – Sequestossoma 1

RE – Receptor de Estrogênio

RP – Receptor de Progesterona

SFB – Soro fetal bovino

TNBC – Câncer de mama triplo-negativo

VCM – Viabilidade Celular Metabólica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	CÂNCER DE MAMA.....	12
1.1.1	Classificação do câncer de mama	14
1.1.1.1	Classificação histológica.....	14
1.1.1.2	Classificação imuno-histoquímica.....	15
1.1.1.3	Classificação molecular.....	16
1.1.2	Abordagens terapêuticas	17
1.2	METABOLISMO DAS CÉLULAS CANCEROSAS.....	18
1.3	ESTATINAS.....	19
1.3.1	Estatinas e câncer	22
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL.....	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3	METODOLOGIA	25
3.1	CULTURA DE CÉLULAS.....	25
3.1.1	Obtenção e cultivo das células cancerosas	25
3.1.2	Descongelamento	25
3.2	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	26
3.2.1	Cálculo da IC₅₀ das drogas utilizadas	26
3.2.1.1	Obtenção e diluição das drogas.....	26
3.2.1.2	Teste de viabilidade celular metabólica <i>in vitro</i> pelo ensaio de MTT.....	26
3.3	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA.....	27
3.4	ENSAIO DE CICLO CELULAR.....	27
3.5	IMUNOBLOTTING.....	28
3.6	ANÁLISE DOS DADOS E TESTES ESTATÍSTICOS.....	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	EFEITO DA ATORVASTATINA NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA.....	31


4.2	EFEITO DA COMBINAÇÃO DE ATORVASTATINA COM QUIMIOTERÁPICOS CONVENCIONAIS.....	36
4.2.1	Efeito da combinação de Paclitaxel com Atorvastatina na Viabilidade Celular Metabólica.....	36
4.2.2	Efeito da combinação de Cisplatina com Atorvastatina na Viabilidade Celular Metabólica.....	39
4.2.3	Efeito da combinação de Olaparib com Atorvastatina na Viabilidade Celular Metabólica.....	42
4.2.4	Efeito do pré-tratamento com Atorvastatina na Viabilidade Celular Metabólica.....	46
4.3	EFEITO DA ATORVASTATINA NA FORMAÇÃO DE COLÔNIA.....	49
4.4	EFEITO DA ATORVASTATINA NO CICLO CELULAR.....	50
4.5	AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS VIAS CELULARES ENVOLVIDAS NO MECANISMO DE AÇÃO DA ATORVASTATINA NA LINHAGEM MCF-7.....	52
4.5.1	Avaliação da expressão de proteínas envolvidas na autofagia.....	52
4.5.2	Avaliação da expressão de proteína envolvida na apoptose.....	55
5	CONCLUSÃO.....	57
6	PERSPECTIVAS.....	58
7	REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 CÂNCER DE MAMA

A oncologia é um domínio incomparavelmente complexo e que se altera a uma velocidade inaudita. O avanço técnico-científico registrado ao longo das últimas duas décadas por meio do desenvolvimento de estratégias e ferramentas cada vez mais refinadas e confiáveis mudaram o cenário da cancerologia. O resultado se reflete em abordagens diagnósticas mais apuradas, testes genéticos, tratamentos direcionados, técnicas cirúrgicas mais precisas e entendimento mais aprofundado das bases celulares e moleculares do câncer humano. Não obstante esse progresso, o câncer ainda configura uma doença de incidência elevada e crescente e está entre as principais causas de morte em todo mundo.

Dentre os diferentes sítios primários de tumores malignos, o câncer de mama (CAM) representa o segundo tipo mais frequente no mundo, com exceção dos tumores de pele não melanoma, sendo o que mais acomete as mulheres. A taxa de ocorrência do CAM vem se tornando alarmante, configurando, desta maneira, um grande desafio à saúde mundial. Nos Estados Unidos, 255 mil novos casos de CAM são esperados para o ano vigente, e aproximadamente 40 mil mulheres morrerão em decorrência da doença (ACS, 2017). No Brasil, especula-se para o biênio 2016-2017 o registro de aproximadamente 58 mil novos casos, com um risco estimado de 57 casos a cada 100 mil mulheres (INCa, 2015) (Figura 1).



	Localização Primária	Casos	%
Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
	Cólon e Reto	17.620	8,6%
	Colo do útero	16.340	7,9%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
	Estômago	7.600	3,7%
	Corpo do útero	6.950	3,4%
	Ovário	6.150	3,0%
	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016-2017 para o sexo feminino, no Brasil, exceto pele não melanoma (INCa, 2015)

A etiologia do CAM não é totalmente compreendida, mas sabe-se que determinados fatores aumentam o risco e a probabilidade para o início de transformação neoplásica celular e de progressão para doença clínica. A idade configura o principal fator de risco para o CAM. O CAM é raro em mulheres antes dos 35 anos, mas, acima dessa faixa etária, a taxa de incidência cresce rápida e progressivamente (HOWLADER et al., 2014). Ainda, o acúmulo de exposições ao longo da vida e as próprias alterações biológicas com o envelhecimento aumentam, de modo geral, esse risco. Adicionalmente, outros fatores de risco já estão bem estabelecidos, a exemplo, aqueles relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação acima dos 30 anos, anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia hormonal), história familiar de câncer da mama e alta densidade do tecido mamário (razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama) (INCA, 2015). Ademais, a obesidade e a hiperinsulinemia são condições que também favorecem o desenvolvimento do carcinoma, principalmente para tumores que expressam receptores hormonais em mulheres na pós-menopausa que, além de aumentar os níveis circulantes de estrogênio, capaz de induzir a proliferação de células mamárias, aumenta a resistência à insulina e as concentrações circulantes desse importante hormônio mitogênico (AHN et al., 2007; MORIMOTO et al., 2002). Um crescente corpo de evidências reporta forte relação do CAM e o diabetes (LARSSON, MANTZOROS & WOLK, 2007; LIPSCOMBE et al., 2006), entretanto ainda não há um consenso nessa associação.

O caráter hereditário do CAM é bem estabelecido. Todavia, apenas uma fração minoritária dos CAM, aproximadamente 20% de todos os casos da doença, é de origem hereditária e decorre de mutações germinativas hereditárias e somáticas em genes de suscetibilidade ao câncer de mama 1 (BRCA1) e 2 (BRCA2) (revisado por LALLOO & EVANS, 2012). Por outro lado, a maioria dos casos de CAM não está relacionada ao componente hereditário, mas às alterações genéticas ocorridas de modo esporádico em genes que codificam proteínas envolvidas em importantes processos celulares, como proliferação, viabilidade, diferenciação, metabolismo celular, dentre outros (APOSTOLOU; FOSTIRA, 2013).

O CAM configura uma doença complexa e heterogênea que abrange tumores de diferentes tipos histológicos, com características clínicas e moleculares igualmente distintas, além de respostas discrepantes às terapias vigentes (revisado por VIALE, 2012). Os esquemas de classificação do CAM evoluíram ao longo de muitas

décadas e têm sido utilizados para auxiliar no tratamento e no prognóstico da doença. Atualmente, o CAM pode ser categorizado de acordo com suas características histológicas, imuno-histoquímicas e moleculares.

1.1.1 Classificação do Câncer de Mama

1.1.1.1 Classificação Histológica

Esta classificação é essencialmente baseada na morfologia e padrão de crescimento dos tumores. É o método de avaliação mais empregado no CAM devido ao seu baixo custo e importância prognóstica na graduação dos carcinomas (RAKHA et al., 2007).

Inicialmente, o CAM pode ser amplamente dividido em invasivo (infiltrante) ou *in situ* (localizado) (Figura 2). O carcinoma de mama *in situ* é o primeiro estágio de desenvolvimento onde uma lesão epitelial proliferativa da mama é considerada maligna, e cujo tratamento adequado resulta em excelente sobrevida global. A membrana basal delimita o estágio *in situ* do tumor e quando o carcinoma atinge o tecido conjuntivo vascularizado (estroma mamário) é denominado de carcinoma invasor (TAVASSOLI; DEVILLEE, 2003). Esses carcinomas são classificados, ainda, tanto no estágio *in situ* quanto no invasor, em lobular e ductal (VARGA; MALLON, 2009). Além disso, existem subtipos de carcinoma invasivo que muitas vezes são nomeados após a caracterização de padrões citológicos, de crescimento e diferenciação, assinalados como carcinoma mucinoso, tubular, medular e papilar (FLETCHER, 2007). Não obstante a utilidade da classificação histológica, a maioria dos tumores de mama (60 a 70%) é classificada como carcinoma invasivo sem outras especificações (CDI-SOE), compreendendo carcinomas que não satisfazem os critérios para serem inserido nas categorias mencionadas (revisado por RAKHA, 2010). Devido a esta grande variabilidade histológica, técnicas imuno-histoquímicas tem sido empregadas com o intuito de aprimorar o diagnóstico do CAM, possibilitando o desenvolvimento racional de estratégias terapêuticas para as pacientes.

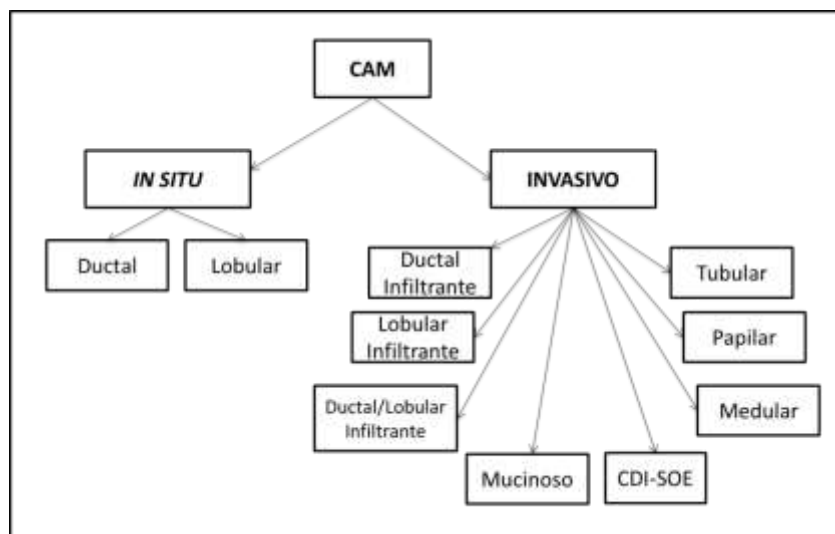


Figura 2: Esquema geral da classificação histológica de câncer de mama. Fonte: Adaptação de MALHOTRA et al., 2010.

1.1.1.2 Classificação Imuno-histoquímica

A análise imuno-histoquímica dos tumores mamários baseia-se na avaliação da expressão do receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano (HER2) e avaliação do índice de proliferação celular por meio da investigação da expressão da proteína marcadora de proliferação (Ki67). Dessa forma, o CAM pode ser estratificado em quatro subtipos: luminal A, luminal B, HER2-*enriched* e triplo-negativo (TNBC) (Quadro 1).

O subtipo luminal A é caracterizado pela presença de receptores hormonais, ausência de HER2 e possui baixos níveis de proteína Ki67. Ademais, esses tumores são de baixo grau, apresentando bom prognóstico. Com relação ao subtipo luminal B, este apresenta marcação positiva para os receptores hormonais, podendo ou não exibir marcação para HER2 e altos níveis de Ki67. Esses tumores geralmente proliferam-se ligeiramente mais rápido e apresentam pior prognóstico, quando comparado ao subtipo luminal A. Vale salientar que a expressão dos receptores hormonais permite a esses subtipos o benefício da terapia endócrina com moduladores seletivos do RE (tamoxifeno) ou inibidores da enzima aromatase (anastrozol) (SOLIMAN; YUSSIF, 2016).

A superexpressão do HER2 aliada à ausência de expressão dos receptores hormonais pelas células de CAM caracteriza o subtipo HER2-*enriched*, conferindo um comportamento biológico e clínico mais agressivo em relação aos tumores

luminais. Entretanto, são frequentemente tratados com sucesso com terapias alvo-específicas, direcionadas para a proteína HER2 (CATALANOTTI et al., 2014).

O termo triplo-negativo refere-se à classificação imuno-histoquímica de tumores mamários sem expressão de proteína ER, PR e HER2. Representa um grupo consistente e altamente heterogêneo na apresentação clínica, histológica e resposta à terapia. Cumpre ressaltar que, tumores triplo-negativos são majoritariamente agressivos e invasivos, representando cerca de 15% dos casos de cânceres de mama (ANDERS; CAREY, 2009; OUYANG et. al., 2014). Estes estão associados a um pior prognóstico da doença com sobrevida inferior comparada àquela de mulheres portadoras de outros subtipos de CAM. Menos de 30% das mulheres com TNBC metastático sobrevivem cinco anos e quase todas morrem em decorrência da doença (DENT et al., 2007). Outrossim, nenhum tratamento direcionado está disponível para TNBC e a quimioterapia continua a ser a melhor estratégia terapêutica.

Quadro 1: Subtipos de câncer de mama definidos pelo método imuno-histoquímico. Fonte: Elaborado pelo autor.

Subtipo	Expressão de receptor	Ki67	Porcentagem de casos	Estratégia terapêutica
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2-,	baixo	50-60%	Quimioterapia / Terapia hormonal
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2 +/-,	alto	15-20%	Quimioterapia / Terapia hormonal/ Terapia anti-her2
Her2-enriched	RE-, RP-, HER2+	-	10-15%	Quimioterapia / Terapia anti-her2
Triplo-negativo	RE-, RP-, HER2-	-	15-20%	Quimioterapia

1.1.1.3 Classificação Molecular

Nos últimos anos, o perfil molecular tem sido intensamente estudado para caracterizar o CAM além do uso convencional de classificação histológica e imuno-histoquímicas, de forma a explicar a heterogeneidade fenotípica tumoral por meio das grandes variações na expressão gênica. Até o presente momento, são descritos seis subtipos moleculares intrínsecos de CAM com implicações clínicas e prognósticas, a saber: Luminal A, Luminal B, HER2-enriched, *Claudin-low*, basal-like e normal-símile (HERSCHKOWITZ et al., 2007; SCHNITT, 2010). Entretanto, apesar

da excelente utilidade e aplicabilidade do perfil de expressão gênica, sua utilização na prática clínica atual é extremamente limitada por razões técnicas e econômicas.

1.1.2 Abordagens terapêuticas

Um diagnóstico completo e preciso é o primeiro passo no desenvolvimento da estratégia terapêutica no CAM, que varia, sobretudo, com o estadiamento do tumor. O tratamento pode ser dividido em terapia local (radioterapia e cirurgia) e terapia sistêmica. O tratamento cirúrgico, geralmente é indicado para estágios iniciais do CAM, é a modalidade terapêutica mais antiga e engloba os tratamentos conservadores (cirurgia conservadora de mama, biópsia de linfonodo sentinela, mastectomia radical). A radioterapia, por sua vez, consiste do uso de raios-x de alta energia ou outras partículas, empregando-se tanto como medida pré-operatória (neoadjuvante) para diminuir o tamanho do tumor e permitir uma cirurgia conservadora, como complemento ao tratamento cirúrgico (adjuvante) a fim de eliminar as células residuais, especialmente em pacientes que foram acometidos por tumores maiores de cinco centímetros, com envolvimento marginal ou metástase nos gânglios linfáticos. Entretanto, a utilização da radioterapia é ineficaz em casos de tumores que apresentam metástases em outros sítios anatômicos (revisado por BALAJI et al., 2016).

O tratamento sistêmico, no qual a escolha é influenciada pelas características tumorais e características do paciente, envolve três modalidades, a saber: quimioterapia neo/adjuvante e paliativa, terapia hormonal neo/adjuvante e terapia biológica.

A hormonioterapia, também conhecida como terapia endócrina, foi a primeira terapia direcionada aprovada para o CAM e constitui um tratamento eficaz para a maioria dos tumores que apresentam expressão dos RE e RP. As principais drogas representantes dessa classe são tamoxifeno e inibidores de aromatase. A utilização desses tem demonstrado melhora da sobrevida das pacientes, diminuindo o risco de recorrência e mortalidade. Sua eficácia em longo prazo, no entanto, é limitada pela recidiva da doença e pelo desenvolvimento de resistência (OSBORNE; SCHIFF, 2011).

A terapia biológica por sua vez, é caracterizada pelo uso de anticorpos monoclonais e representa uma opção terapêutica promissora direcionada para os tumores que

superexpressam HER2. As principais drogas utilizadas nessa modalidade são Trastuzumab, Pertuzumab e Lapatinib (revisado por VRBIC et al., 2013).

É importante ressaltar que as opções terapêuticas utilizadas tanto no tratamento inicial do CAM como tardio são afetadas significativamente pela expressão dos marcadores imuno-histoquímicos. Nesse contexto, as paciente portadoras TNBC não se beneficiam do uso de terapias endócrinas e biológicas, limitando dessa forma o arsenal terapêutico à quimioterapia. O uso de quimioterapia citotóxica, tanto para o CAM em geral quanto para o subtipo TNBC, envolve regimes baseados em taxanos e antraciclinas. Entretanto, o uso desses quimioterápicos apresenta um grave perfil toxicológico para as pacientes. Os taxanos e antraciclinas são responsáveis por neurotoxicidade severa e cardiotoxicidade irreversível, respectivamente (revisado por GUIMARAES et al., 2013). Ademais, a quimioterapia não é realizada empregando-se somente uma droga e sim, vários esquemas diferentes de combinações, o que podem intensificar os efeitos adversos. A alta toxicidade altera significativamente a eficácia do tratamento, pois exige doses mais baixas do fármaco ou prolongam os intervalos entre ciclos de quimioterapia, o que pode proporcionar a progressão do tumor. Adicionalmente, apesar das pacientes com CAM responderem bem à quimioterapia inicial, a maioria desenvolve quimiorresistência ou apresenta recorrência da doença (CAREY et al., 2007; WAHBA; EL-HADAAD, 2015). Postula-se, portanto, que o tratamento das pacientes com CAM tem sido desafiador e novas abordagens terapêuticas a fim de contornar esses impasses se fazem necessárias.

1.2 METABOLISMO DAS CÉLULAS CANCEROSAS

Recentemente a reprogramação metabólica tem sido considerada uma característica emergente dos tumores, envolvida na disfunção do metabolismo energético de forma a sustentar as elevadas demandas proliferativas. É sabido que várias vias oncogênicas importantes convergem em mecanismos celulares que visam à adaptação do metabolismo das células tumorais, culminando no estímulo de crescimento e sobrevivência (HANAHAN; WEINBERG, 2011). O metabolismo alterado é uma característica fundamental do CAM e as alterações de vias metabólicas estão emergindo como abordagens terapêuticas promissoras.

A maioria dos estudos relacionando a desregulação metabólica nas células tumorais ressalta a importância dos carboidratos. Entretanto, vários estudos correlacionando

as alterações no metabolismo lipídico com a carcinogênese estão modificando esse cenário. As células tumorais apresentam forte afeição por lipídios e colesterol, aumentando a captação exógena ou superativando sua síntese endógena com o objetivo de alimentar suas demandas bioenergéticas e biossintéticas (CANTOR; SABATINI, 2012; ROBEY et al., 2015). O excesso de lipídios e colesterol nas células tumorais é estocado em *lipids droplets* (LDs) e, interessante, o aumento desse estoque tem sido relacionado com a agressividade tumoral e resistência à quimioterapia (DE GONZALO-CALVO et al., 2015)

O acúmulo de colesterol tem sido relatado em diferentes tipos de câncer, como câncer colorretal (TIRINATO et al., 2015), câncer de próstata (KYCER; BROWN, 2013), câncer de ovário (TANIA et al, 2010), sobretudo no CAM (NELSON; CHANG; MCDONNELL, 2014). Li e colaboradores (2011) demonstraram que algumas linhagens celulares de CAM são mais sensíveis à interrupção de vias lipídicas do que as linhagens de células mamárias normais. Em consonância ao exposto, substâncias que interferem com processos metabólicos como as estatinas, surgem como estratégias auxiliares promissoras no combate ao câncer.

1.3 ESTATINAS

Atualmente, as estatinas representam os agentes hipolipidêmicos de primeira escolha na prevenção primária e secundária das doenças cardiovasculares, sendo uma das classes de medicamentos mais prescritas no mundo (IMS, 2010). Atualmente, as principais estatinas disponíveis comercialmente são Sinvastatina, Lovastatina, Pravastatina, Rosuvastatina e Atorvastatina (ATV). Esses fármacos são inibidores seletivos e competitivos da hidroximetilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), enzima que catalisa a etapa limitante da biossíntese do colesterol hepático e outros isoprenóides essenciais para vários processos celulares, tais como crescimento e diferenciação celular (ISHIKAWA et al., 2014) (Figura 3).

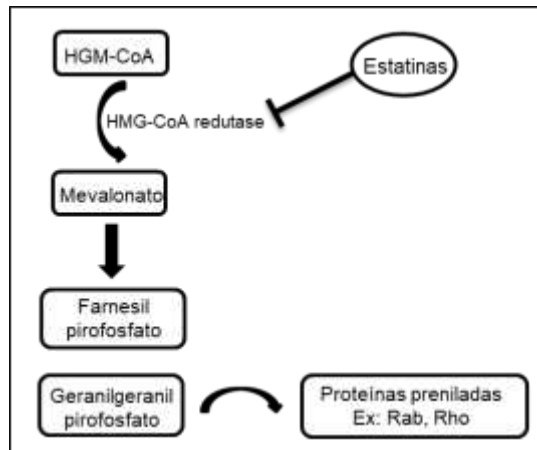


Figura 3: Mecanismo de ação das estatinas. Fonte: Elaborada pelo autor.

Apesar das estatinas serem fármacos bem tolerados pelo organismo, existe possibilidade da ocorrência de efeitos indesejáveis, embora discretos e pouco significativos, tais como: distúrbios gastrointestinais (diarréia e dispepsia), náusea, cefaléias, alteração da função hepática, visão turva, alteração do paladar, exantemas e miopatias. Ademais, em algumas situações, pode ocorrer surgimento de efeitos adversos de elevada gravidade como hepatotoxicidade e rabdomiólise (necrose celular músculo-esquelética) (revisado por THOMPSON, CLARKSON & KARAS, 2003). Na sua maioria, os efeitos descritos são reversíveis e de fácil reconhecimento, estando sua incidência dependente da dose e da administração concomitante de outros medicamentos. Em suma, sugere-se que os benefícios obtidos através da terapia com estatinas superem os riscos citados (MAJI et al., 2013).

Não obstante compartilharem o mesmo mecanismo de ação, as estatinas diferem em relação à eficácia com base nas suas estruturas químicas e por questões associadas à farmacocinética e farmacodinâmica das drogas (Figura 4). Dentre essas diversidades, a lipossolubilidade é uma característica essencial, pois a incorporação hepática das estatinas é dependente desse atributo. Ainda, os compostos sintéticos apresentam estrutura diferente, contendo uma cadeia lateral de ácido heptanóico que forma um análogo estrutural do intermediário da HMG-CoA, aprimorando suas ações biológicas (BRUTON; LAZO; PARKER, 2007; ISTVAN; DEISENHOFER, 2001). Dados recentes sugerem que as estatinas lipofílicas podem ser preferíveis sobre as estatinas hidrofílicas por oferecerem melhores resultados clínicos na terapia dos pacientes (ANOTHASINTAWEE, et al, 2016; BONSU;

REIDPATH; KADIRVELU, 2016).

A ATV é uma estatina sintética e lipofílica que se liga à HMG-CoA redutase por uma ligação de hidrogênio extra e isto pode contribuir para eficácia superior quando comparada às outras estatinas (ISTVAN; DEISENHOFER, 2001). Esse fármaco, ainda, possui meia vida maior em relação às outras estatinas, sendo sua meia vida de aproximadamente 14 horas. Além disso, os estudos têm demonstrado a segurança da utilização de altas doses de ATV (SCHWARTZ et al., 2001; KOREN et al., 2009).

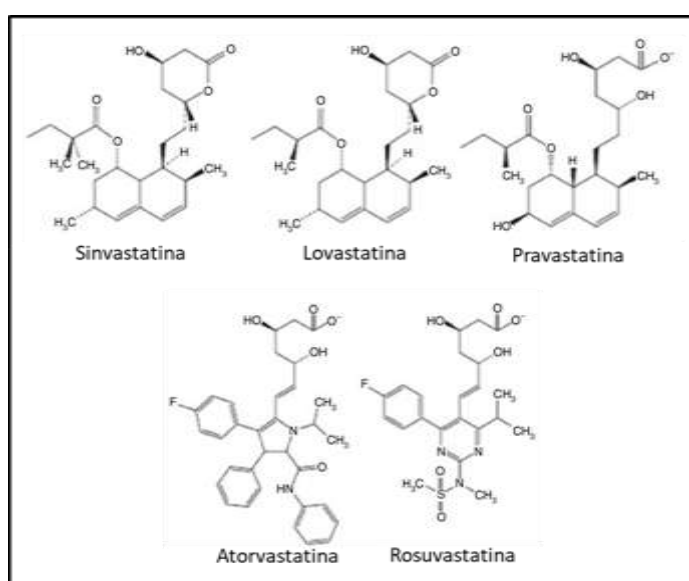


Figura 4: Estrutura química das principais estatinas utilizadas. Fonte: Adaptação de CAMPO & CARVALHO, 2007.

Por muito tempo se enfatizou a eficácia das estatinas ao seu efeito hipolipemiante, entretanto, o que inúmeros dados científicos revelam sobre as estatinas e seus efeitos pleiotrópicos é realmente impressionante. Esses efeitos extra-hipolipidêmicos perpassam pela melhoria na função endotelial (SAKABE et al., 2004), aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico (JASINSKA; OWCZAREK; ORSZULAK-MICHALAK, 2007), redução da inflamação vascular (ARAÚJO et al., 2013), ações antitrombóticas (MORAES et al., 2013), aumento da neovascularização do tecido isquêmico (revisado por WALTER; ZEIHNER; DIMMELER, 2004), estabilização da placa aterosclerótica (ROSA et al., 2014), aumento da fibrinólise (SAMEIRO et al., 2013), aumento na atividade da síntese dos osteoblastos, inibição da migração de células germinativas durante o desenvolvimento (revisado por WALTER; ZEIHNER;

DIMMELER, 2004), efeito neuroprotetor independente da ação hipolipidêmica (JOHNSON-ANUNA et al., 2005), além de propriedades imunomoduladoras (MASCITELLI; GOLDSTEIN, 2015)

1.3.1 Estatinas e câncer

Nos últimos anos, as estatinas também ganharam destaque no tratamento antineoplásico, uma vez que um número crescente de estudos tem apontado que seu uso está associado à redução do risco no desenvolvimento de diversas neoplasias (TAKAHASHI et al., 2006, FARWELL et al., 2008) e à redução da mortalidade por câncer, melhorando a sobrevida dos pacientes (WANG et al., 2016; VOORNEVELD et al., 2017).

Estudo conduzido por Poynter e colaboradores (2005) contendo 1.953 pacientes com câncer colorretal e 2.015 pacientes controles mostrou que o uso de estatinas por pelo menos cinco anos foi associado com um risco reduzido de desenvolvimento da doença. Outro estudo retrospectivo de casos, conduzido por Murakami e colaboradores em 2016, associou o uso de lovastatina ao risco reduzido de desenvolvimento de CAM, apontando a estatina como potencial agente quimiopreventivo. Entretanto, há relatos na literatura mostrando resultados contraditórios. Baandrup e colaboradores (2015) conduziram estudos onde não observaram nenhuma associação entre o uso de estatinas e o menor risco de desenvolvimento de câncer de ovário. Semelhantemente, ensaio clínico randomizado realizado por Seckl e colaboradores (2017) mostrou que o uso de pravastatina não beneficiou pacientes com câncer de pulmão. No entanto, apesar de numerosos estudos epidemiológicos, não foi alcançado nenhum consenso sobre a relação entre o uso de estatina e o risco de desenvolvimento de câncer. Essa indefinição de dados pode estar relacionada à grande heterogeneidade dos grupos estudados utilizando diferentes estatinas, sugerindo a seletividade das estatinas para certos tipos de câncer, bem como a importância das diferenças farmacocinéticas das estatinas empregadas.

1.3.2 O mecanismo de ação das estatinas no câncer

O mecanismo antineoplásico das estatinas ainda é incerto e, por isso, tem se

tornado tema de vários estudos. Segundo revisado por Brown (2007), além da diminuição da proliferação e da migração de células tumorais em função da redução na disponibilidade de colesterol, as estatinas podem diminuir a produção dos derivados de mevalonato, como o farnesol, um isoprenóide que constitui uma âncora lipídica para várias oncoproteínas como Ras e Rho. A proteína Ras ativa vias de sinalização extremamente importantes no câncer como a via de RAF/MEK/ERK e a via PI3K/AKT/mTORC que estão envolvidas no controle do crescimento, proliferação e sobrevivência celular, através da supressão da apoptose e autofagia.

Por outro lado, alguns estudos sugerem que o efeito citotóxico observado das estatinas é mediado por estresse oxidativo. Sanchez e colaboradores (2008) mostraram que as estatinas aumentaram a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na linhagem de CAM luminal A, levando a inibição da proliferação. É notório que os mecanismos que medeiam esses efeitos antiproliferativos das estatinas continuam em grande parte pouco claros, sendo necessários investigações e estudos mais aprofundados para dados mais consistentes.

Ademais, não consta na literatura se existe uma vantagem de tratamento quando a ATV é combinada aos quimioterápicos convencionais no tratamento do CAM.

Dessa forma, considerando que toxicidade e tolerabilidade são dois impasses significantes para a utilização dos agentes quimioterápicos convencionais, a ATV torna-se uma abordagem alternativa, modificando a perspectiva e a qualidade de vida dos pacientes com CAM.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Em face ao conteúdo exposto, o objetivo central do projeto foi avaliar os efeitos da atorvastatina e sua combinação com antineoplásicos convencionais em linhagens de CAM.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para contemplar o objetivo geral proposto, estabelecemos os objetivos específicos, a saber:

1. Determinação da atividade antitumoral da atorvastatina em um painel de linhagens de CAM.
2. Analisar a eficácia do regime monoterápico de atorvastatina e em combinação com os quimioterápicos convencionais.
3. Investigação dos mecanismos antineoplásicos potenciais da atorvastatina, incluindo avaliação do ciclo celular e modulação de importantes vias de sinalização celular.

3 METODOLOGIA

3.1 CULTURA DE CÉLULAS

3.1.1 Obtenção e Cultivo das Células

Para a realização desta pesquisa, empregaram-se linhagens de CAM, MDA-MB-231, HCC-1937 e MCF-7, cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCa). Segundo a “American Type Culture Collection” (ATCC), a linhagem MDA-MB-231 foi estabelecida a partir de células isoladas de efusão pleural de uma paciente caucasiana com adenocarcinoma de mama. É classificada como uma linhagem de TNBC do subtipo basal B ou *claudin-low*. A linhagem HCC-1937 também é TNBC, entretanto é do subtipo molecular basal A e apresenta mutação no gene BRCA1. A MCF-7, por sua vez, foi isolada em 1970, a partir de uma paciente caucasiana com adenocarcinoma de mama. Caracteriza-se pela expressão dos receptores hormonais (RE e RP) e ausência de HER-2, sendo classificada como Luminal A.

Todas as linhagens foram cultivadas em garrafas de 75 cm² com Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA) high glucose (4500.0 mg/L) suplementado com HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico), bicarbonato de sódio 0,22% (p/v), soro fetal bovino inativado 10% v/v (SFB, Gibco/Invitrogen, Nova Iorque, EUA), solução estabilizada de penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA). A manipulação das células foi realizada em capela de fluxo laminar, sendo as mesmas mantidas em incubação em estufa com condições controladas de temperatura (37°C), com atmosfera de 5% de CO₂, condições adequadas para o crescimento de células de mamíferos.

3.1.2 Descongelamento

As alíquotas das linhagens celulares armazenadas em freezer -80°C, foram descongeladas bruscamente a 37°C. O conteúdo armazenado em microtubo de 1,5 mL foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL estéril, livre de DNase e RNase, com 15 mL de meio DMEM high glucose acrescido de SFB a 10% v/v, solução

estabilizada de penicilina-estreptomicina numa concentração de 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 1 mL de DMEM high glucose suplementado com SFB 10 % inativado e antibióticos, citados anteriormente, e transferidas para uma garrafa de cultura de 75 cm², acrescidas do meio. As células foram então incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C.

3.2 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

3.2.1 Cálculo da IC₅₀ das drogas utilizadas

3.2.1.1 Obtenção e diluição das drogas

Para a realização dos experimentos de determinação da concentração inibitória de 50% da proliferação celular (IC₅₀), foi utilizada atorvastatina cálcica doada pelo Farmacêutico Paulo Palácio da Farmácia de Manipulação Imafar. A mesma foi diluída em Dimetilsulfóxido (DMSO) P.A. Paclitaxel e Cisplatina, foram diluídas em DMSO P.A. e PBS 1X, respectivamente.

3.2.1.2 Teste de Viabilidade Celular Metabólica *in vitro* pelo Ensaio de MTT

Para cálculo da IC₅₀ estimada, foi utilizado o método de determinação da viabilidade celular metabólica (VCM) por meio do ensaio com brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, conhecido como metil-tiazol-tetrazólio (MTT). As linhagens foram plaqueadas em placas de 96 poços e, após 24 horas de incubação para adesão das células à placa de cultura, iniciou-se o tratamento em um gradiente de concentração que variou de acordo com a droga utilizada (QUADRO 2). Para tal, adicionou-se 100 µL de solução preparada nas concentrações ideais de cada droga. Todas as condições testadas foram analisadas em quadruplicata. Os controles utilizados foram células tratadas apenas com DMSO ≤ 2%, células tratadas apenas com PBS 1x, células na ausência de qualquer droga

ou diluente; e como branco utilizou-se poços sem células, apenas com meio de cultura. Após as 48 e/ou 72 horas de incubação das placas com os respectivos tratamentos, adicionou-se 10 μ L MTT na concentração de 5 mg/mL em cada poço. A incubação com MTT foi realizada por 4 horas, a 37 °C e 5% de CO₂, protegido da luz, e, em seguida, o meio de cultura foi removido procedendo posteriormente a adição de 100 μ L de DMSO P.A. para dissolução dos cristais de formazan formados. Deste modo, a produção de formazan pela atividade da succinato desidrogenase mitocondrial reflete a proporção de células vivas em processo de estresse oxidativo causado pelos fármacos em teste (MOSMANN, 1983), cuja produção é proporcional ao número de células metabolicamente ativas. A leitura dos resultados foi realizada em leitor de microplaca no comprimento de onda de 540 nm.

Quadro 2: Faixa de concentração das drogas utilizadas para os ensaio de VCM.

Droga	Faixa de concentração	Unidade de medida
Atorvastatina	100 a 0,1 (diluição 1:2) *	μ M
	200 a 0,1 (diluição 1:2) **	
Paclitaxel	5 a 0,00032 (diluição 1:5)	μ M
Cisplatina	0,04 a 0,000064 (diluição 1:3/ diluição 1:5)	mM
Olaparib	400 a 1,5825 (diluição 1:2)	μ M

* Faixa de concentração utilizada para as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.

** Faixa de concentração utilizada para a linhagem HCC-1937.

3.3 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA

Para o ensaio de formação de colônia foi utilizado o protocolo adaptado de (FRANKEN et al., 2006). Sucintamente, 200 e 850 células por poço das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, respectivamente, foram semeadas em placas de 12 poços. Após 24 h de aderência, as células foram tratadas com atorvastatina e/ou cisplatina por 72 h. Após esse período, procedeu-se com a lavagem dos poços com PBS 1x e adição de meio novo (1000 μ L). Após 15 dias de cultivo, sem troca de meio nesse período, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (p/v) e coradas com cristal violeta 1% (p/v). Os experimentos foram realizados em triplicata biológica. A aquisição das imagens das colônias foi realizada utilizando Chemi-Doc® XRS

System (Bio-Rad, CA, EUA)

3.4 ENSAIO DE CICLO CELULAR

A avaliação do conteúdo de DNA para análise do ciclo celular foi realizado nas linhagens MDAMB-231 e MCF7. Para tal, foi utilizado um intercalante de DNA fluorescente, o iodeto de propídeo (PI), que entra na célula após sua permeabilização. O citômetro detecta a fluorescência do PI, permitindo avaliar o conteúdo de DNA referente a cada fase do ciclo celular.

As células foram plaqueadas seguindo a metodologia já descrita para o ensaio de proliferação celular. A mesma fórmula foi usada para o cálculo do número total de células, sendo possível o ajuste à concentração de células desejadas ($0,2 \times 10^6$ células) em cada um dos 12 poços da placa de cultura, acrescentando-se o volume calculado da suspensão e o volume de DMEM necessário para a totalização de 1 mL em cada poço da placa. Após o plaqueamento, foram executados os tratamentos com atorvastatina e/ou cisplatina. Após as 72h de tratamento, coletou-se o sobrenadante e as células foram tripsinadas com 300 μ L de Tripsina/EDTA (0,25 μ g/mL de tripsina e 1 μ g/mL de EDTA). Realizou-se a inativação do meio com o sobrenadante coletado e as amostras foram submetidas à centrifugação por 5 minutos a 450 g a 27°C. Em seguida foi descartado o sobrenadante e duas lavagens foram realizadas com PBS e subsequentes centrifugações por 5min a 450 g a 27°C. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet ressuspendido em 500 μ L de tampão de permeabilização, composto por Tris-Cl 3,4 mM em pH 7,6, NaCl 10 mM, NP40 0,1% (v/v), RNase 700u/L e PI 0,075 mM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). As amostras foram então incubadas no tampão por 15 minutos sob resfriamento, protegidas da luz e a leitura efetuada no citômetro FACSCanto II (BD) utilizando o canal FL-2 (585nm).

3.5 IMUNOBLOTTING

Para a análise da expressão das proteínas de interesse nas células de estudo, as mesmas foram cultivadas em placas de 12 poços na concentração de $0,2 \times 10^6$ células/poço. Ao atingirem subconfluência, as células foram lavadas com PBS 1X por 3 vezes e incubadas por 48/72 horas com as drogas, em meio DMEM livre de SFB, para eliminar qualquer influência do soro no perfil das células. Após o

tempo determinado, retirou-se o sobrenadante, lavando as células com PBS 1X por 3 vezes e, então, adicionou-se 500µL/poço de solução de tripsina/EDTA (0,25 µg/mL de tripsina e 1 µg/mL de EDTA), e as placas colocadas na estufa a 37°C por 2 minutos, para o total desprendimento das células da superfície das placa. Em seguida, foram acrescentados os sobrenadantes para bloquear a ação da tripsina, sendo as células transferidas para tubos Falcon de 15 mL. Essas amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 450 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, mantendo o pellet no fundo do tubo, ao qual foi adicionado 90 µL de tampão RPPA para a lise das células, composto por RPPA (Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 1 mM, Triton X100 1% v/v, desoxicolato de sódio 0,5% p/v, SDS 0,1% p/v) em uma concentração final de 1X, PPI 5 mM, NaF 5 mM vanadato 5 mM e inibidor de protease 1X (ROCHE, São Paulo, Brasil). O lisado celular foi transferido para eppendorfs mantidos no gelo por 30 minutos, e então os mesmos foram centrifugados por 15 minutos a 450 g a 4°C. Parte do sobrenadante foi aliqotado em tubos para dosagem das proteínas. Após a quantificação das proteínas, as amostras foram transferidas para outros tubos, onde receberam tampão de amostra composto por Tris 0,76% (p/v); glicerol 12 5% (v/v); SDS 2,3% (p/v); β3-mercaptoetanol 5% (v/v) e azul de bromofenol 0,19% (p/v). A mistura foi aquecida por 15 minutos à 95°C, seguida da aplicação no gel de eletroforese. A técnica de SDS-PAGE foi utilizada como a primeira etapa da técnica de Western Blot com o objetivo de separar as proteínas do lisado celular de acordo com o seu peso molecular. No gel SDS-PAGE 8% (p/v) foram aplicados 25µg de proteína paralelamente a um padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™B 10–250 kD, BioRad). Uma vez aplicadas as amostras e o padrão de peso molecular, o gel foi submetido a uma voltagem de 90V numa solução de corrida, composta por Tris base 0,3% (p/v), glicina 1,44% (p/v) e SDS 0,01% (p/v). Após a separação das proteínas presentes no lisado celular, o gel foi submetido à técnica de Western Blot para a identificação das proteínas de interesse (RANGEL et al., 2002; RANGEL et al., 2003a). Terminada a corrida eletroforética, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de PVDF (Sequi-Blotim PDVF membrane for proteinsequencing, 0,2µm, BioRad, EUA) por 2 hora, a 200 mA, em um tampão de transferência composto de tris 0,3% (p/v), glicina 1,44% (p/v) e metanol 15% (v/v). Após a transferência, a membrana foi mantida em agitação por 1 hora, à temperatura ambiente, numa solução composta por leite desnatado sem gordura 5%

(p/v) e TBS Tween 20 (TBS-T) 0,05% (p/v). Depois de lavada 3 vezes, por 10 minutos com TBS-T 0,05% (p/v) gelado, a membrana foi incubada over night com anticorpo específico para a proteína de interesse. Posteriormente, a membrana foi lavada e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário, que se liga especificamente ao anticorpo primário utilizado, sendo posteriormente lavada 3 vezes, por 10 minutos, com TBS-T 0,05% (p/v). Foi realizada uma última lavagem com TBS para eliminar resíduos do Tween. Os imunoblottings foram revelados usando o kit ECL-Plus (GE Healthcare, São Paulo - Brasil), segundo instruções do fabricante.

Quadro 3: Descrição dos anticorpos primários utilizados nos experimentos de análise de expressão proteica

Anticorpos	Fabricante	Diluição
Bax	BD	1:500
LC3B	Cell Signaling	1:500
p62	Sigma	1:500
GAPDH	Cell Signaling	1:4000

3.6 ANÁLISE DOS DADOS E TESTES ESTATÍSTICOS

As análises estatísticas foram efetuadas usando o Teste ANOVA de uma via, com significância de 5%. Em seguida, utilizou-se o Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni. As análises foram realizadas no *software GraphPadPrism v.5* para Windows (versão 5.00.288).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFEITO DA ATORVASTATINA NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA

Com o intuito de confirmar o potencial antineoplásico da ATV e determinar a concentração da IC_{50} estimada da droga testada, procedemos com ensaios de VCM pelo método de MTT nas linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e HCC-1937, em modelos *in vitro* representativos de CAM.

Como podemos observar na figura 5, ATV reduziu a proliferação celular de forma dose e tempo dependente na linhagem MCF-7 e MDA-MB-231. Entretanto, para a linhagem HCC-1937, somente foi observada redução na VCM a partir de da concentração de 50 μ M de ATV, em torno de 30%, quando comparada ao controle, não apresentando relação com tempo de tratamento. Adicionalmente, a ATV mostrou-se mais eficaz para a linhagem MDA-MB-231, uma vez que essa droga na concentração 100 μ M reduziu em 90% a VCM em 72h para esta linhagem, enquanto que para a mesma concentração e tempo a redução foi em torno de 70% e 60% para linhagem MCF-7 e HCC-1937, respectivamente. Ressalta-se ainda que, a ATV apresenta maior potência para MDA-MB-231, visto que a IC_{50} obtida para esta linhagem é muito menor em relação às outras (Quadro 4). Deste modo, nossos dados sugerem certa seletividade da droga quanto às características dessa linhagem. Entretanto, é importante destacar que as concentrações de IC_{50} estimadas de ATV, para todas as linhagens, encontraram-se acima da faixa de concentração farmacológica utilizada na clínica, em que disponibilidade sistêmica da ATV varia de 2 a 200nM, prescrito em doses de 10-80 mg/dia (CILLA, 1996).

Nossos dados corroboram com dados encontrados na literatura de que as estatinas em altas concentrações são capazes de inibir a proliferação de linhagens de CAM *in vitro* (SEEGER; WALLWIENER; MUECK, 2003; DENOYELLE et al., 2001). Ainda, Mueck, Seeger e Wallwiener (2003), observaram que a ação das estatinas tem maior eficácia sobre a linhagem triplo-negativa MDA-MB-231, quando comparada a MCF-7. Contudo, vale ressaltar que no estudo mencionado, foi observado um efeito tardio, visto que o tempo de tratamento com as estatinas foi superior ao realizado por nosso grupo, correspondendo a quatro dias de tratamento.

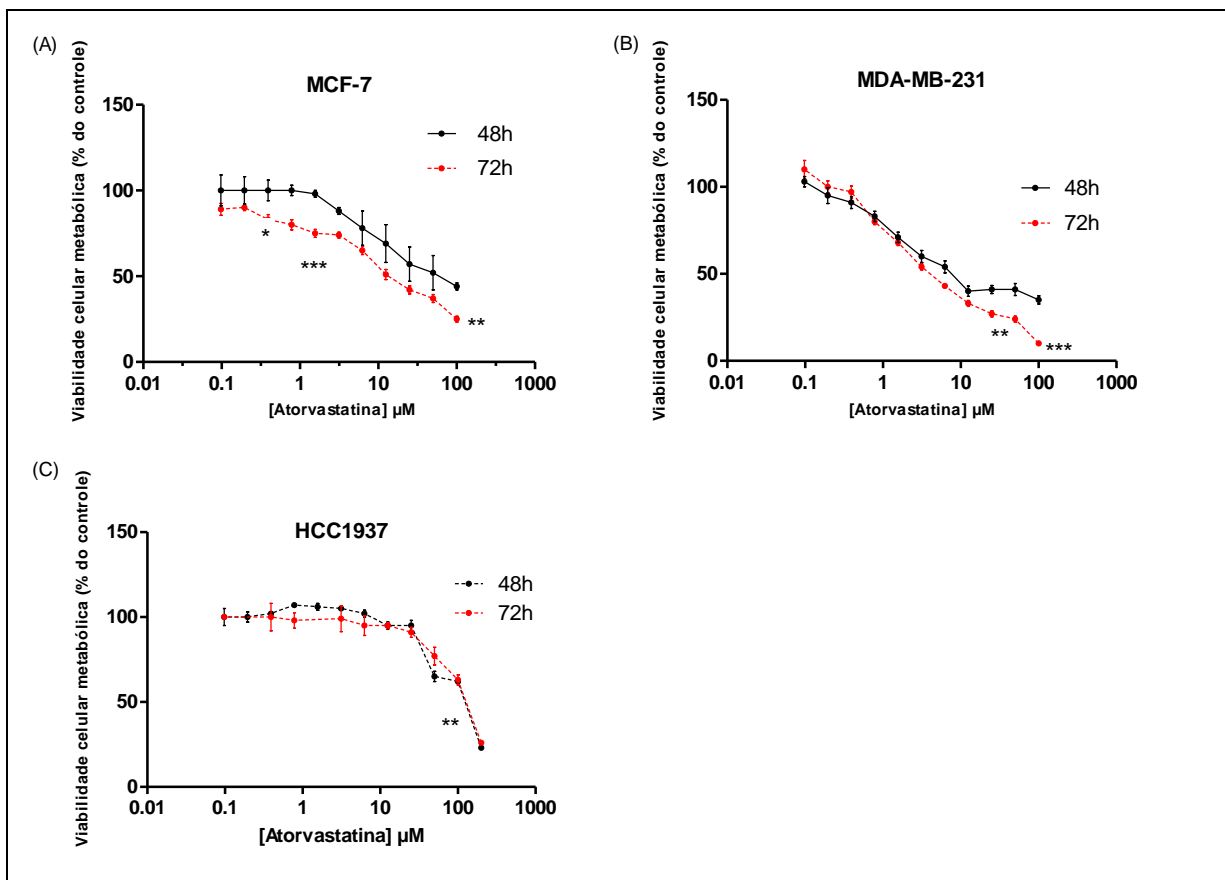


Figura 5: Estudo da VCM das linhagens de CAM após o tratamento com atorvastatina em concentrações que variavam de 100nM a 100μM, para as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, e de 100nM a 200μM para a linhagem HCC1-937, por 48/72 horas. O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. ***p < 0,001; **p < 0,01; quando comparada a condição 48h. Os resultados representam a média e desvio padrão de (±) 3 experimentos independentes.

Quadro 4: Concentração das IC₅₀ estimadas de atorvastatina para as linhagens de CAM.

Linhagens	IC ₅₀ Atorvastatina em μM	
	48 horas	72 horas
MCF-7	50	15
MDA-MB-231	10	5
HCC-1937	120	134

Adicionalmente, os dados obtidos pelo ensaio de MTT corroboram com as alterações visíveis na morfologia celular, características de morte celular,

observadas nas linhagens MCF-7 (Figura 6) e MDA-MB-231 (Figura 7) tratadas com ATV nas concentrações de IC_{50} , quando comparadas ao controle, nos tempos de tratamento 48 e 72h. Entretanto, assim como não houve alteração na viabilidade celular, também não parece haver mudanças aparentes no aspecto da célula quando empregada a concentração de atorvastatina sabidamente segura (100nM).

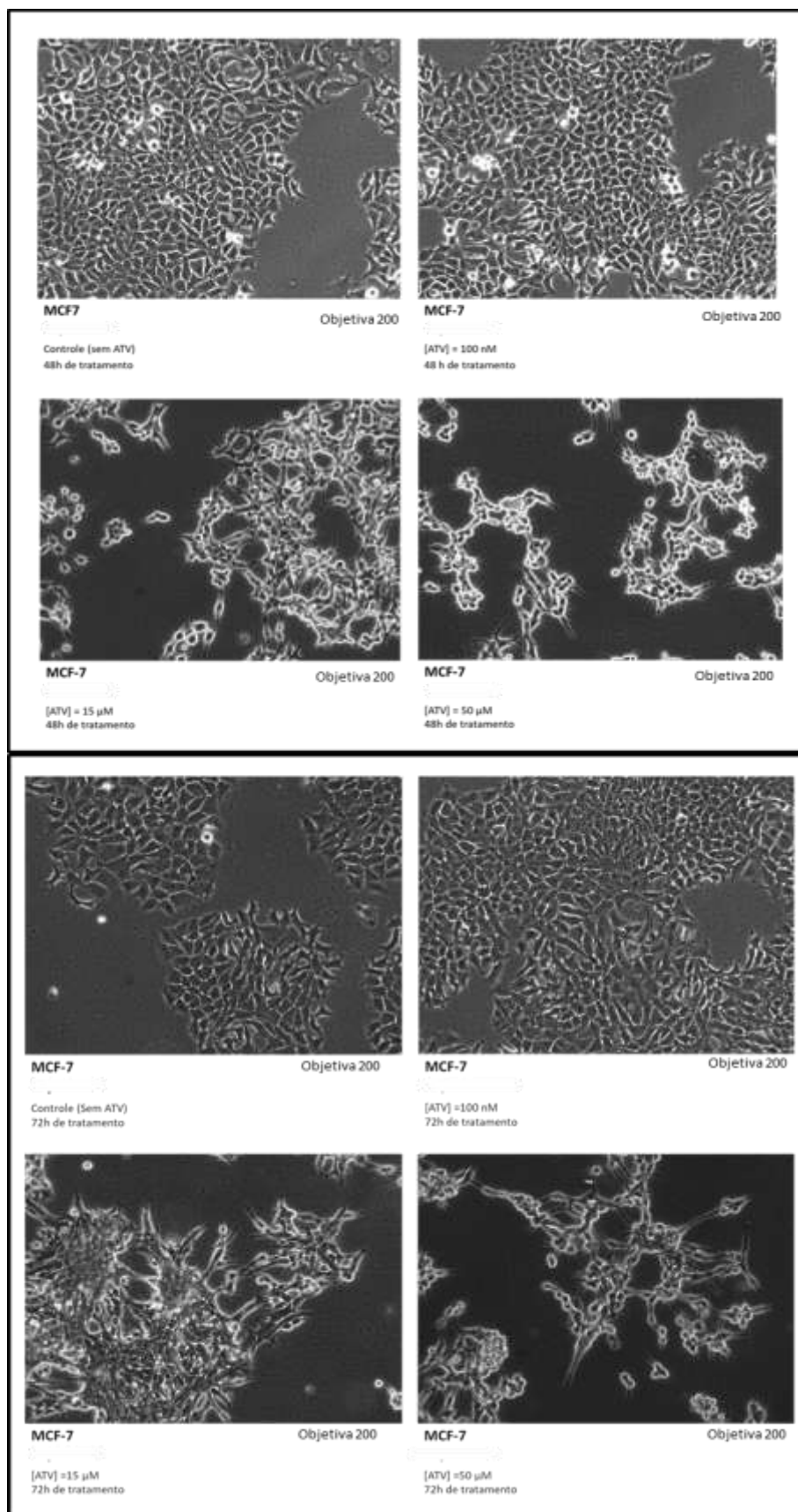


Figura 6: Tratamento com atorvastatina na linhagem MCF-7. Células foram plaqueadas em garrafas de 75m², e posteriormente tratadas com atorvastatinas por 48/72 horas. A aquisição das imagens foi realizada utilizando Chemi-Doc® XRS System (Bio-Rad, CA, EUA).

4.2 EFEITO DA COMBINAÇÃO DE ATORVASTATINA COM QUIMIOTERÁPICOS CONVENCIONAIS

Embora diversos estudos tenham determinado o efeito antineoplásico da ATV, nenhum dado na literatura relata a combinação de ATV com os quimioterápicos convencionais no CAM. Conforme enfatizado previamente, o TNBC é caracterizado por tumores predominantemente mais agressivos e pelo elevado índice de recidiva da doença em detrimento da responsividade inicial aos antineoplásicos convencionais (taxanos e antraciclinas) (ROUZIER et al., 2005; CAREY, 2006). Recentemente, derivados de platina e inibidores de Poli-(adenosina 5'difosfato [ADP]-ribose) polimerase) (PARP), enzima envolvida no mecanismo de reparo do DNA, têm emergido como opção no manejo clínico do TNBC (SILVER et al., 2010; CANCELLO et al., 2015). Esse interesse se deu pelo fato de que tumores triplo-negativos frequentemente apresentam um painel de alterações moleculares específicas, incluindo alterações nos mecanismos de reparo de DNA e mutações em BRCA1/2, tornando-os mais responsivos a esses agentes (CAREY et al., 2012). Deste modo, procedemos com a investigação da adição da atorvastatina aos tratamentos com paclitaxel (PTX), cisplatina (CISP) e olaparib (OLAP), utilizando tanto concentrações sabidamente seguras de ATV (100nM) bem como as concentrações de IC₅₀ determinadas previamente.

4.2.1 Efeito da combinação de Paclitaxel com Atorvastatina na Viabilidade Celular Metabólica

PTX é uma droga citotóxica, representativa da classe dos taxanos, corriqueiramente utilizada em pacientes com CAM em geral, independente do subtipo. Seu efeito antineoplásico se dá pela estabilização de microtúbulos durante a mitose, promovendo a parada do ciclo celular na fase G2/M e indução de apoptose (revisado por GUIMARAES et al., 2013). Empregando-se tanto na quimioterapia neo ou adjuvante, os tumores inicialmente apresentam altas taxas de resposta. No entanto, alguns impasses frente a essa droga são enfrentados frequentemente pelos pacientes, como grave toxicidade e desenvolvimento de resistência (AJABNOOR; CROOK; COLEY, 2012; revisado por GUIMARAES et al., 2013). O paclitaxel possui como principais efeitos adversos a neutropenia e severa neuropatia, o que pode

levar à descontinuidade do tratamento, gerando um impacto negativo no tratamento da doença (revisado por MARUPUDI et al., 2007). Sendo assim, há urgência na identificação de esquemas terapêuticos alternativos capazes tanto de aumentar a eficácia da droga convencional de forma a reduzir a dose empregada como controlar a progressão da doença.

Dessa forma, submetemos as linhagens representativas dos dois subtipos de CAM, MCF-7 e MDA-MB-231, ao tratamento com o PTX em monoterapia e em combinação com ATV. Como pode ser verificado por meio dos dados expostos na Figura 8A, no tempo de 48h, o tratamento combinado de ATV na concentração de IC_{50} com PTX para a linhagem MCF-7 foi eficaz em reduzir a viabilidade celular metabólica utilizando concentrações baixas de PTX. No entanto, a ATV na concentração sabidamente segura (100nM) atenuou o efeito citotóxico de PTX, aumentando o valor de IC_{50} quando comparado a utilização do taxano sozinho, em 48h de tratamento (Quadro 5). Em contrapartida, em 72h de tratamento, não houve benefício adicional dessas combinações para a mesma linhagem, com exceção para a menor concentração empregada do taxano (0.00032mM), onde temos uma redução da viabilidade em torno de 60% (Figura 8B).

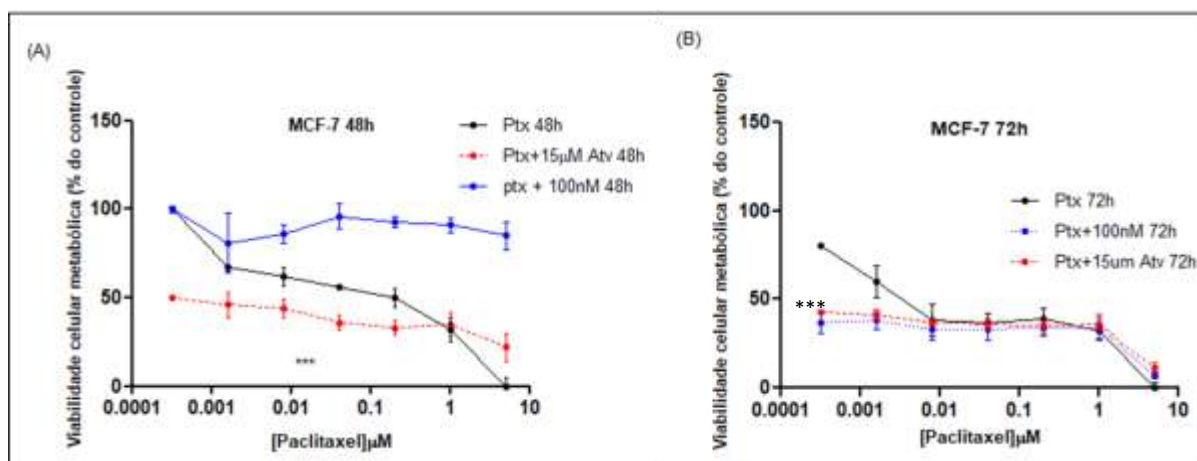


Figura 8: Efeitos do paclitaxel em monoterapia e em combinação com atorvastatina na linhagem MCF-7, em (A) 48h de tratamento e (B) 72h de tratamento, avaliados pelo método de MTT. Os resultados estão representados como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média \pm SD (n=4). Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni foi realizado. * indica $P\leq 0,05$; **, $P\leq 0,01$; ***, $P\leq 0,001$, quando comparados ao tratamento com paclitaxel.

Quadro 5: Concentração das IC₅₀ estimadas do tratamento combinado de paclitaxel e atorvastatina para a linhagem MCF-7

MCF-7		
Condições	48 horas	72 horas
PTX	0,096 µM	0,0048 µM
PTX + 100nM Atv	24,76 µM	0,0004 µM
PTX + 15µM Atv	0,001448 µM	0,0006 µM

Diferentemente da linhagem luminal, o efeito da associação de ATV ao tratamento com PTX na linhagem MDA-MB-231 é dose-tempo dependente, uma vez que, somente em 72h de tratamento observou-se efeito aditivo na redução da VCM (Figura 9B). Foi observada uma redução significativa da proliferação celular após adição de ATV na concentração do IC₅₀, em 72h de tratamento quando comparado ao taxano sozinho. Ainda, nota-se que ocorre uma redução de 42% da viabilidade celular em relação ao controle ao associarmos 5µM da estatina à menor concentração utilizada de PTX (0,00032µM). Ademais, o tratamento combinado de ATV 5µM e PTX por 72h, conferiu uma redução de 10⁸ vezes na IC₅₀ em relação ao PTX em monoterapia (Quadro 6). Vislumbrando o efeito clínico, a adição de ATV ao esquema terapêutico convencional com PTX permitiu a diminuição das doses utilizadas do taxano, podendo tornar-se uma estratégia futura de administração direcionada para limitar a toxicidade.

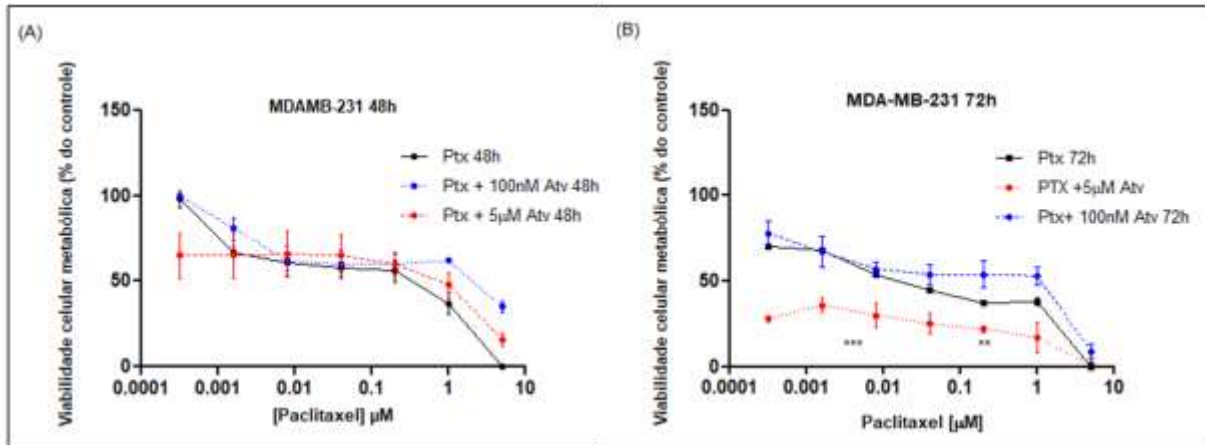


Figura 9: Efeitos do paclitaxel em monoterapia e em combinação com atorvastatina na linhagem MDA-MB-231, em (A) 48h de tratamento e (B) 72h de tratamento, avaliados pelo método de MTT. Os resultados estão representados como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média±SD (n=4). Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni foi realizado. * indica $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$, quando comparados ao tratamento com paclitaxel.

Quadro 6: Concentração das IC₅₀ estimadas do tratamento combinado de paclitaxel e atorvastatina para a linhagem MDA-MB-231.

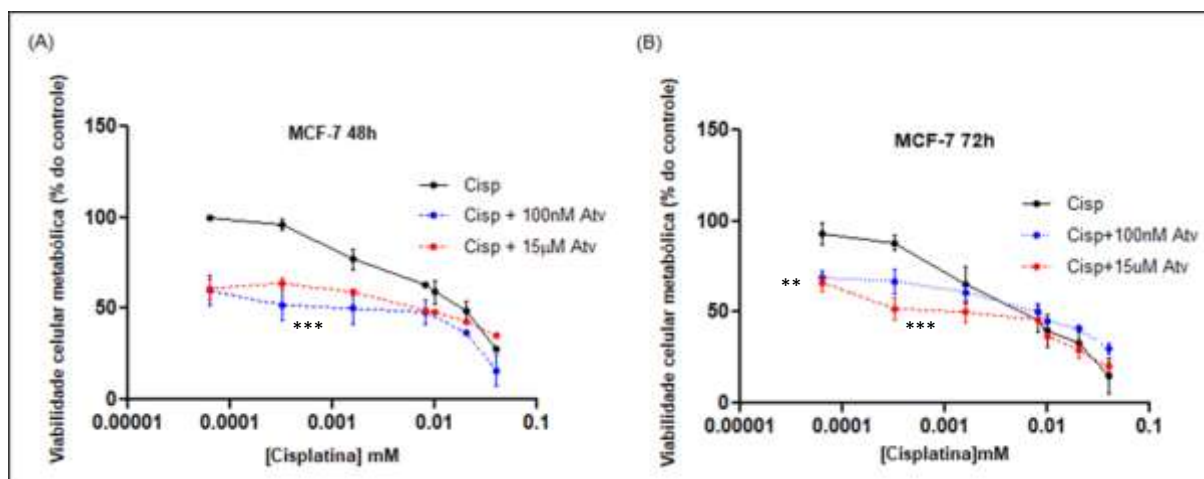
MDA-MB-231		
Condições	48 horas	72 horas
PTX	0,1650 µM	0,01748 µM
PTX + 100nM Atv	1,067 µM	0,08299 µM
PTX + 5µM Atv	0,3958 µM	5,857 x 10 ⁻⁶ µM

4.2.2 Efeito da combinação de Cisplatina com Atorvastatina na Viabilidade Celular Metabólica

Conforme mencionado anteriormente, os TNBC são tumores mais agressivos e resistentes ao tratamento. Dessa forma, derivados de platina, como a cisplatina, estão sendo incluídos no arsenal terapêutico contra esse subtipo. O mecanismo de ação dos derivados de platina consiste na ativação intracelular e, posterior ligação covalente com o sulco maior no DNA formando aductos por meio de ligações intra e

intercadeias, induzindo alterações estruturais no DNA. Dessa forma, ocorre a ativação de diversas vias de transdução de sinal como vias de reparo de DNA, ciclo celular e apoptose (KELLAND, 2007).

Avaliamos a proliferação celular de tratamentos utilizando CISP em monoterapia e combinado com ATV, em 48 e 72h de tratamento, nas linhagens MDA-MD-231 e MCF-7, para efeito comparativo. Como podemos observar na Figura 10, tanto em 48 e 72h, o efeito adicional na redução da VCM da linhagem MCF-7 do tratamento combinado só é visto em menores concentrações de CISP, enquanto que em maiores concentrações de CISP, a combinação não apresentou diferença estatística quando comparada ao tratamento com o derivado de platina em monoterapia. Ademais, empregando-se a combinação com a concentração sabidamente segura de ATV por 48h, verificou-se uma redução de aproximadamente 5 vezes no IC₅₀ quando comparado ao tratamento apenas com CISP (Quadro 7). Vale salientar ainda que, essa combinação nas mesmas condições, foi mais eficaz quando comparada a combinação com 5μM de ATV, cujo tratamento reduziu somente 1,66 vezes o valor da IC₅₀ do tratamento de CISP em monoterapia (Quadro 7).



Quadro 7: Concentração das IC₅₀ estimadas do tratamento combinado de cisplatina e atorvastatina

para a linhagem MCF-7

MCF-7		
Condições	48 horas	72 horas
CISP	15 μ M	6,2 μ M
CISP + 100nM Atv	2,8 μ M	8 μ M
CISP + 15 μ M Atv	8,7 μ M	4 μ M

Para a linhagem MDA-MB-231, a associação das drogas foi extremamente benéfica em relação à redução da VCM, mostrando ser dose e tempo dependentes (Figura 11). Interessantemente, o efeito máximo, da inibição da proliferação celular foi verificado empregando-se uma concentração baixa de CISP (0,01 mM) e 5 μ M de ATV em 72h de tratamento (Figura 11B). Ainda, por meio dos dados expostos no quadro 8, verificamos que o tratamento CISP+ 5 μ M ATV possibilitou uma redução na IC₅₀ em aproximadamente 78 vezes, após 48h de tratamento e 166 vezes em 72h de tratamento.

Esses dados nos deixaram bastante motivados devido à atual importância de se utilizar menores doses de quimioterápicos, visto que CISP apresenta muitos efeitos adversos como nefro, neuro e ototoxicidade acompanhados do aparecimento de resistência clínica, o que influencia na descontinuidade do tratamento (BURGER et al., 2011).

Deve ser enfatizado que assim como a adição de 5 μ M de ATV à CISP, a associação da concentração sabidamente segura de ATV (100nM) também apresentou efeito adicional na redução da VCM quando comparado ao tratamento com CISP em monoterapia. Adicionalmente, essa mesma combinação possibilitou uma redução na IC₅₀ de cisplatina em torno de 1,5 e duas vezes, em 48 e 72h de tratamento, respectivamente (Quadro 8). Esse fato é extremamente relevante, visto que, nos estudos que determinam os efeitos das estatinas sobre as células tumorais muitas vezes foram utilizadas altas concentrações da droga.

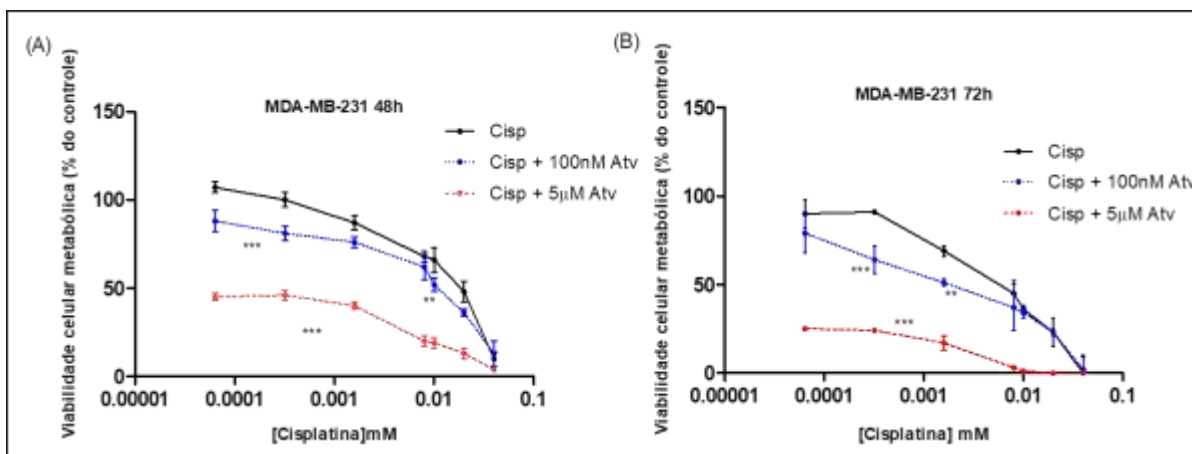


Figura 11: Efeitos da cisplatina em monoterapia e em combinação com atorvastatina na linhagem MDA-MB-231, em (A) 48h e (B) 72h de tratamento, avaliados pelo método de MTT. Os resultados estão representados como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média±SD (n=4). Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni foi realizado. * indica $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$, quando comparados ao tratamento com cisplatina.

Quadro 8: Concentração das IC_{50} estimadas do tratamento combinado de cisplatina e atorvastatina para a linhagem MDA-MB-231

MDA-MB-231		
Condições	48 horas	72 horas
CISP	14,8 μ M	5 μ M
CISP + 100nM Atv	9,9 μ M	2,5 μ M
CISP + 15 μ M Atv	0,19 μ M	0,03 μ M

4.2.3 Efeito da combinação de Olaparib com Atorvastatina na Viabilidade Celular Metabólica

Adicionalmente, avaliamos o efeito na proliferação celular do tratamento de OLAP em associação com ATV, de modo a verificar a eficiência desses tratamentos em diferentes linhagens representativas dos subtipos Luminal A (MCF-7), TNBC (MDA-MB-231) e TNBC-BRCA1 mutada (HCC-1937). Analisando de uma forma geral o efeito do olaparib em monoterapia, percebemos que o mesmo é mais eficiente

quando empregado para o tratamento do subtipo luminal A. OLAP na concentração de 400 μ M reduziu a VCM em torno de 80% e 90%, em 48h e 72h, respectivamente (Figura 12), enquanto que, para as linhagens MDA-MB-231 e HCC-1937, essa redução chegou próximo a 50% (Figura 13 e 14). Os valores elevados das IC₅₀ estimadas obtidos com o tratamento de OLAP em monoterapia para as linhagens triplo-negativas (Quadro 10 e 11) também evidenciam maior resistências das mesmas à droga em relação à linhagem luminal (Quadro 9)

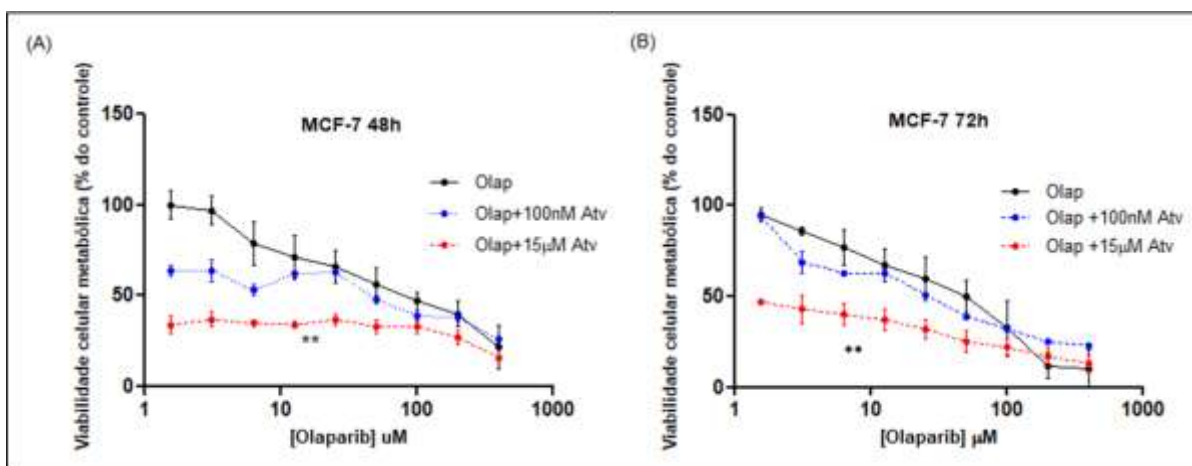


Figura 12: Efeitos do olaparib em monoterapia e combinado com atorvastatina na linhagem MCF-7 em (A) 48h e (B) 72h de tratamento, avaliados pelo método de MTT. Os resultados estão representados como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média \pm SD (n=4). Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni foi realizado. * indica P \leq 0,05; **, P \leq 0,01; ***, P \leq 0,001, quando comparados ao tratamento com olaparib.

Quadro 9: Concentração das IC₅₀ estimadas do tratamento combinado de olaparib e atorvastatina para a linhagem MCF-7.

MCF-7		
Condições	48 horas	72 horas
OLAP	71,20 μ M	36,53 μ M
OLAP + 100nM Atv	34,45 μ M	25,36 μ M
CISP + 15 μ M Atv	2,52 μ M	3,65 μ M

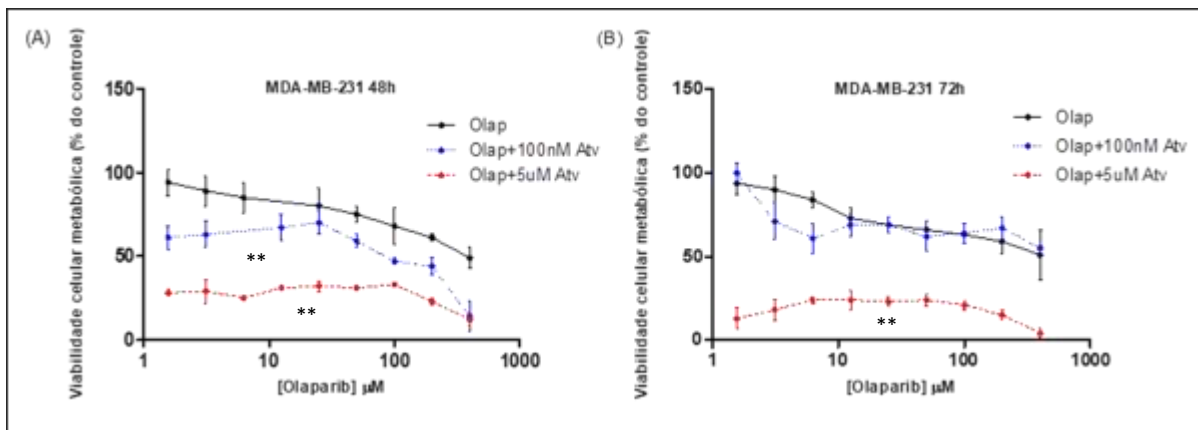


Figura 13: Efeitos do olaparib em monoterapia e combinado com atorvastatina na linhagem MDA-MB-231, em (A) 48h e (B) 72h de tratamento, avaliados pelo método de MTT. Os resultados estão representados como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média±SD (n=4). Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni foi realizado. * indica $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$, quando comparados ao tratamento com olaparib.

Quadro 10: Concentração das IC50 estimadas do tratamento combinado de olaparib e atorvastatina para a linhagem MDA-MB-231

MDA-MB-231		
Condições	48 horas	72 horas
OLAP	260 μM	192 μM
OLAP + 100nM Atv	69,16 μM	219 μM
CISP + 15 μM Atv	1,45 μM	0,63 μM

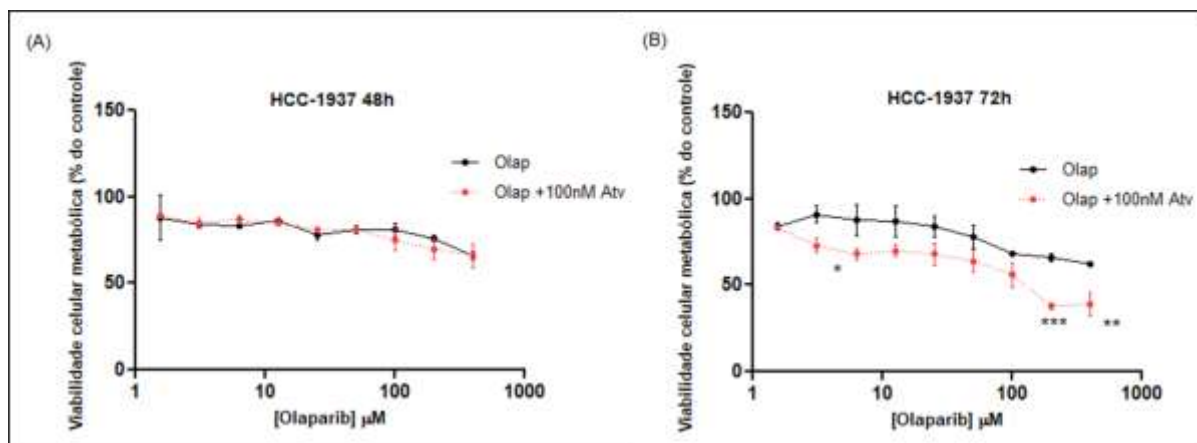


Figura 14: Efeitos do olaparib em monoterapia e em combinação com atorvastatina na linhagem HCC-1937, em (A) 48h e (B) 72h de tratamento, avaliados pelo método de MTT. Os resultados estão representados como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média±SD (n=4). Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni foi realizado. * indica $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$, quando comparados ao tratamento com olaparib.

Quadro 11: Concentração das IC50 estimadas do tratamento combinado de Olaparib e Atorvastatina para a linhagem HCC1937

HCC-1937		
Condições	48 horas	72 horas
OLAP	546 μM	361 μM
OLAP + 100nM Atv	461 μM	92,6 μM
CISP + 15 μM Atv	-	-

Olaparib foi o primeiro inibidor a obter aprovação para uso clínico em pacientes com câncer de ovário que apresentavam mutação no gene BRCA, sendo utilizado principalmente para aqueles tumores que progridem apesar da quimioterapia com cisplatina (ANDER et al., 2010; revisado por MARMÉ; SCHNEEWEISS, 2015; KONECNY; KRISTELEIT, 2016). Sabe-se que geralmente os tumores triplo-negativos, principalmente mutados em BRCA1, apresentam elevado grau de estabilidade genômica, resultando em falhas nos mecanismos de reparo do DNA e cuja restauração é dependente de PARP.

Nesse contexto, os inibidores de PARP têm sido explorados como estratégias terapêuticas promissoras para o tratamento do TNBC. Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que o efeito terapêutico benéfico desses inibidores não está

necessariamente associado à mutações nos genes BRCA1/2 em CAM (RIOS; PUHALLA, 2011; O'SULLIVAN et al., 2014). Nossos dados de VCM, em relação ao tratamento com OLAP em monoterapia, retificam os estudos recentes mencionados acima que abordam a eficácia do inibidor PARP independente da mutação em BRCA.

Embora essas drogas sejam promissoras e apresentarem respostas iniciais satisfatórias, o tratamento prolongado pode ocasionar o desenvolvimento de resistência nas pacientes, fato bem documentado na literatura (BARBER, 2013; DHILLON; TANIGUCHI, 2015; KIM et al., 2017). Interessantemente, a adição de ATV ao esquema de tratamento potencializou o efeito de OLAP nas linhagens TNBC. OLAP combinado com 5 μ M de ATV inibiu aproximadamente 80% da VCM da linhagem MDA-MB-231, em 48 e 72h de tratamento, revelando o efeito aditivo dessa combinação (Figura 13). Contudo, o efeito benéfico adicional do tratamento combinado de OLAP com a concentração plasmática de ATV (100nM) só foi observado em 48h de tratamento, onde aumentou a redução da VCM em torno de 80% (Figura 13A). Ademais, observou-se uma redução de aproximadamente 180 e 305 vezes na IC₅₀, em 48 e 72h, respectivamente, com a adição de 5 μ M de ATV ao tratamento de OLAP (Quadro 10). Para a linhagem HCC-1937, quando submetida ao tratamento com OLAP + ATV na concentração sabidamente segura, em 72h, aumentou-se a sensibilidade desta linhagem ao OLAP com uma redução de 50% da VCM (Figura 14B). Entretanto, não foi possível obter os dados da combinação de OLAP com a concentração de IC₅₀ de ATV para esta linhagem por problemas técnicos.

4.2.4 Efeito do pré-tratamento com Atorvastatina na Viabilidade Celular Metabólica

Tem se observado na clinica oncológica que a ordem de administração das drogas pode alterar a eficácia dos tratamentos empregados no combate ao câncer. Como para a linhagem MDA-MB-231 não obtivemos resultados tão promissores com PTX associado à ATV, comparado às outras drogas, decidimos averiguar se o pré-tratamento com ATV tornaria o tratamento combinado mais eficaz na redução da proliferação celular. Para tal, a linhagem foi pré-tratada, por 24h, com ATV na concentração de 5 μ M, e posteriormente foi realizado o tratamento combinado com

PTX por 48 e 72h. Em paralelo, também realizamos os mesmos experimentos utilizando CISP e OLAP.

Surpreendentemente, o pré-tratamento com ATV foi capaz de aumentar a eficácia citotóxica da combinação de PTX e ATV na linhagem MDA-MB-231, em 48h, reduzindo mais que 50% a proliferação celular quando comparado somente ao tratamento combinado (Figura 15A). Paralelamente, em 72h, apesar de não apresentar diferença estatística significativa, também é possível observar a tendência do efeito aditivo do pré-tratamento na redução da VCM (Figura 15B). Dessa forma, podemos inferir que o tratamento combinado de ATV e PTX não é uma estratégia eficaz em induzir a citotoxicidade, indicando que na situação clínica o pré-tratamento deve ser levado em consideração.

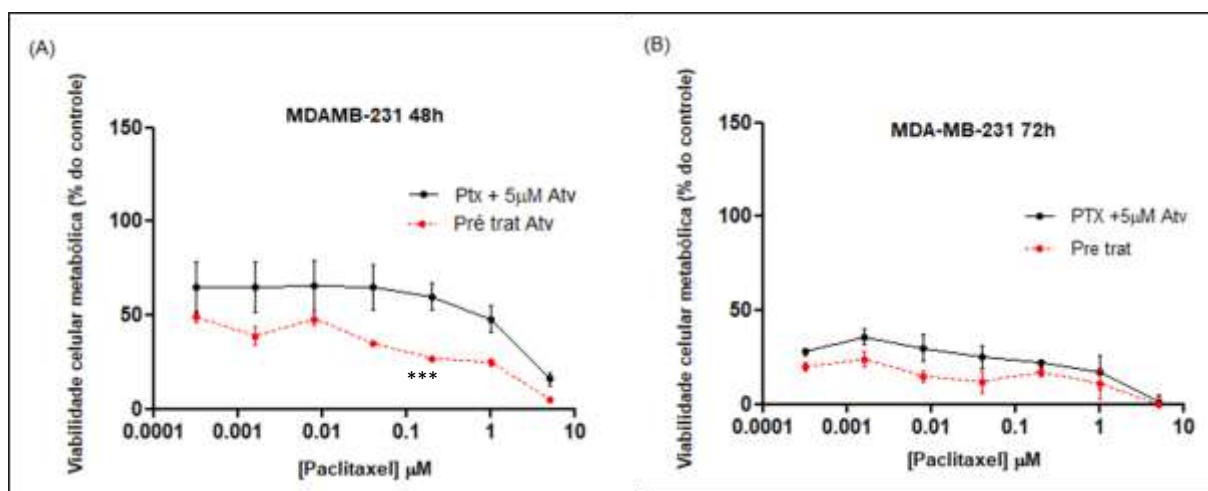


Figura 15: Efeitos do pré-tratamento com atorvastatina e do tratamento combinado com paclitaxel, em (A) 48h e (B) 72h de tratamento, avaliados pelo método de MTT. Os resultados estão representados como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média \pm SD (n=4). Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni foi realizado. * indica $P\leq 0,05$; **, $P\leq 0,01$; ***, $P\leq 0,001$, quando comparados ao tratamento somente com paclitaxel + atorvastatina.

Diferentemente do que foi observado para o quimioterápico PTX, o pré-tratamento com ATV não apresentou efeito benéfico complementar ao regime terapêutico de associação de CISP e ATV na diminuição da VCM, em ambos os tempos analisados (Figura 16)

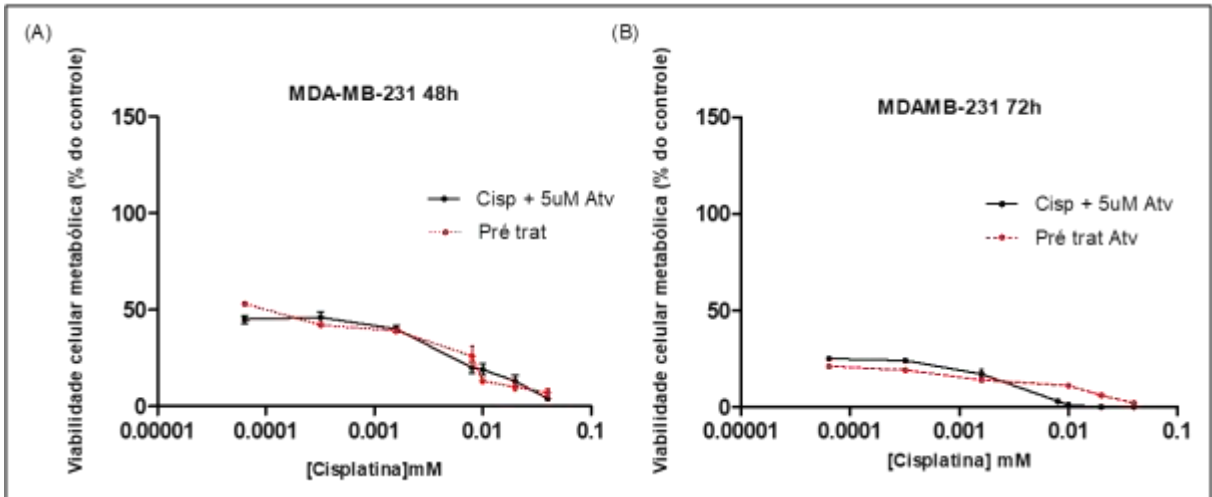


Figura 16: Efeitos do pré-tratamento com atorvastatina e do tratamento combinado com cisplatina, em (A) 48h e (B) 72h de tratamento, avaliados pelo método de MTT. Os resultados estão representados como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média±SD (n=4). Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni foi realizado. * indica $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$, quando comparados ao tratamento somente com cisplatina + atorvastatina.

Para o esquema de tratamento envolvendo OLAP, podemos constatar por meio da Figura 17 que o pré-tratamento com ATV promoveu uma redução significativa e total da VCM, em 72h, aumentando a sensibilidade das células ao tratamento combinado.

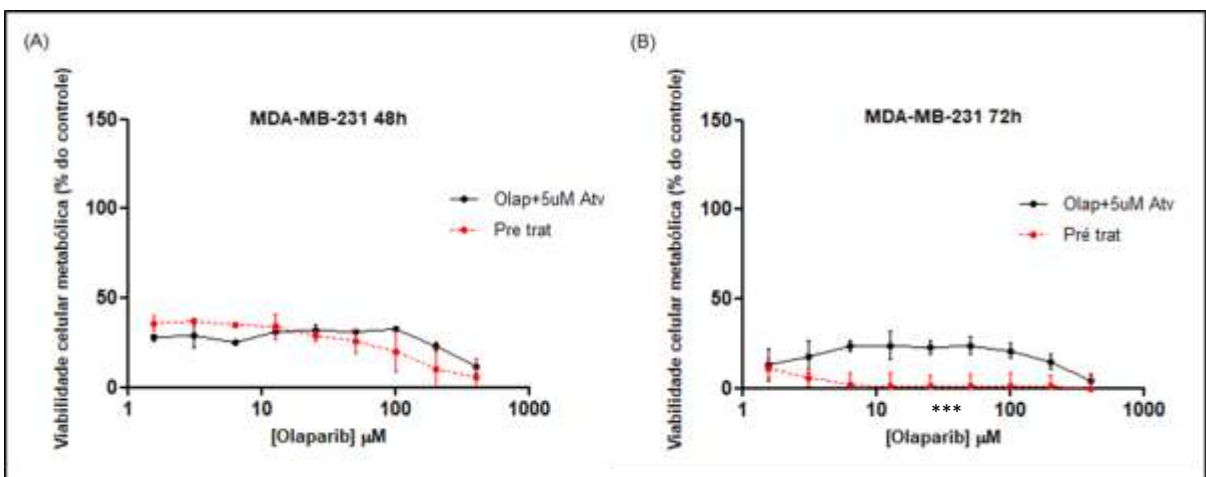


Figura 17: Efeitos do pré-tratamento com atorvastatina e do tratamento combinado com olaparib, em (A) 48h e (B) 72h de tratamento, avaliados pelo método de MTT. Os resultados estão representados como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média±SD (n=4). Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni foi realizado. * indica $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$, quando comparados ao tratamento somente com olaparib + atorvastatina.

4.3 EFEITO DA ATORVASTATINA NA FORMAÇÃO DE COLÔNIA

O ensaio clonogênico é uma técnica que permite uma avaliação da viabilidade reprodutiva das células, uma vez que nos indica a capacidade de uma única célula para geração de progênes depois de submetida ao tratamento. Para este ensaio, utilizamos os valores da IC_{50} das drogas, previamente calculados através do método de MTT, e concentrações menores correspondentes à metade do valor da IC_{50} para tratamento das linhagens MCF-7 e MDA-MB231.

Como podemos observar por meio dos dados expostos na figura 18D, ATV em monoterapia foi capaz de reduzir a formação de colônia em da linhagem MCF-7 somente quando empregada na concentração de $15\mu\text{M}$. Empregando-se metade da concentração da IC_{50} para esta linhagem ($7,5\mu\text{M}$), não foi observado alteração na formação de colônias (Figura 18E). Observou-se ainda que o tratamento combinado também foi capaz de reduzir o número de colônias quando comparado à condição controle (Figura 18F,G). Entretanto, não há como comparar com o tratamento de CISP em monoterapia, visto que as concentrações da IC_{50} e metade da mesma inibiram completamente a formação de colônia, sendo as concentrações utilizadas muito tóxicas para a finalidade do experimento (Figura 18 B,C).

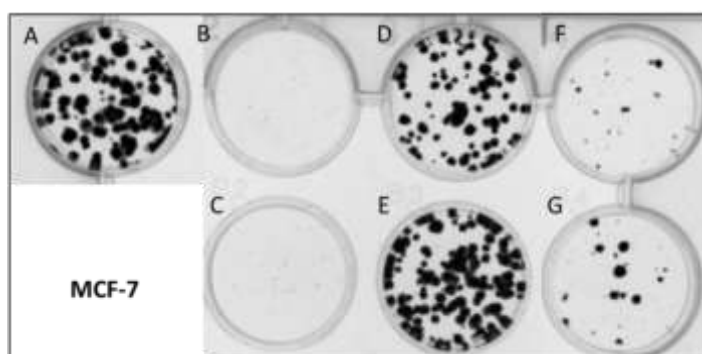


Figura 18: Ensaio Clonogênico. Linhagem MCF-7 foi plaqueada em placas de 12 poços e tratada por 72 horas com atorvastatina e/ou cisplatina. A: Controle. B: 6,5 mM CISP; C: 3,25 mM CISP; D: $15\mu\text{M}$ ATV; E: $7,5\mu\text{M}$ ATV; F: 6,5 mM CISP + $15\mu\text{M}$ ATV. G: 3,25 mM CISP + $7,5\mu\text{M}$ ATV. Foram realizados três ensaios independentes. Foto representativa de um experimento.

Para a linhagem triplo-negativa MDA-MD-231, o tratamento somente com a estatina, em ambas as concentrações, foi capaz de diminuir a geração de colônias em relação ao controle (Figura 19 D,E). Adicionalmente, tanto o tratamento de CISP em monoterapia (Figura 19 B,C) quanto o tratamento combinado com ATV (Figura

19 F,G), foram capazes de inibir a formação de colônias, sugerindo que concentração empregada foi muito alta para o ensaio. Compilando os dados obtidos, percebemos que a utilização da ATV tanto em monoterapia quanto em terapia combinada na diminuição da formação de colônia em relação à condição controle foi muito mais eficiente para a linhagem MDA-MB-231 quando comparado com MCF-7.

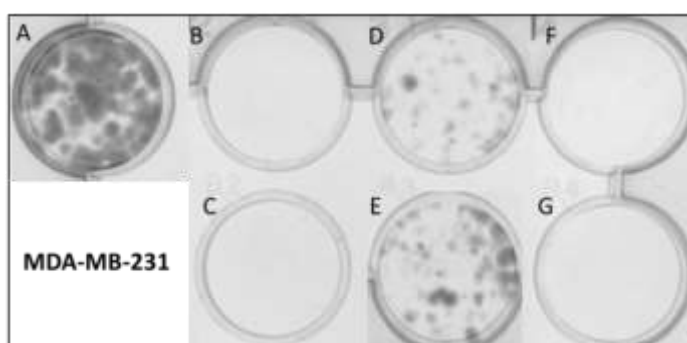


Figura 19: Ensaio Clonogênico. Linhagem MDA-MB-231 foi plaqueada em placas de 12 poços e tratadas por 72 horas com atorvastatina e/ou cisplatina. A: Controle. B: 5mM CISP; C: 2,5 mM CISP; D: 5 µM ATV; E: 2,5 µM ATV; F: 5 mM CISP + 5µM ATV; G: 2,5 mM CISP + 2,5 µM ATV. Foram realizados três ensaios independentes. Foto representativa de um experimento.

4.4 EFEITO DA ATORVASTATINA NO CICLO CELULAR

Como nossos resultados de viabilidade celular foram principalmente promissores com a combinação de CISP com ATV para linhagem MDA-MB-231 e o ensaio de formação de colônia também mostrou que a combinação é muito eficaz para essa linhagem, decidimos investigar o efeito dessa associação na divisão celular da linhagem MDA-MB-231. Para tal, conduzimos o ensaio de ciclo celular por meio de citometria de fluxo.

O ciclo celular representa a sequência de crescimento e divisão de uma celular, composto por uma série de eventos biológicos, nomeadamente a fase de repouso (G0), seguida pela fase de intérfase (G1, S, G2) e posteriormente o estágio final do processo, a fase mitótica (M). A desregulamentação desses processos está subjacente à proliferação celular aberrante, que caracteriza o câncer e a perda do controle dos mecanismos de reparo do ciclo celular promovendo instabilidade genética, que também contribui positivamente para a tumorigênese.

Dessa forma, ressalta-se a importância dos fármacos que possuem capacidade de

atuarem na divisão celular, impedindo a progressão para fase G2-M durante o ciclo. Analisando os dados expostos por meio da figura 20, nota-se que o tratamento com ATV em monoterapia tende a reduzir o número de células na fase S e induzir a parada do ciclo celular fase na fase G1, quando comparado ao controle. Semelhantemente, o tratamento ATV+CISP também diminui a porcentagem de células na fase S e aumenta a população de células na fase G1 do ciclo, mostrando-se mais eficiente quando comparado ao tratamento com cisplatina em monoterapia. Nossos achados são corroborados por dados na literatura que descreveram o efeito de estatinas no ciclo celular em células de outros tipos tumorais. Estudo conduzido por Relja e colaboradores (2010), mostrou que a sinvastastina nas concentrações 32 e 64µM, em 48h de tratamento, realizou parada do ciclo em G1 em células de carcinoma hepático. Adicionalmente, Hoque e colaboradores (2008) mostraram que o tratamento por cinco dias tanto com sinvastatina, como com lovastatina, foi capaz de induzir a parada do ciclo celular também na fase G1 em células de câncer de próstata. Paralelamente a parada em G1, o tratamento combinado ATV+CISP tende a aumentar a porcentagem de células em Sub-G1, o que pode ser sugestivo de apoptose (KAJSTURA M et al., 2007).

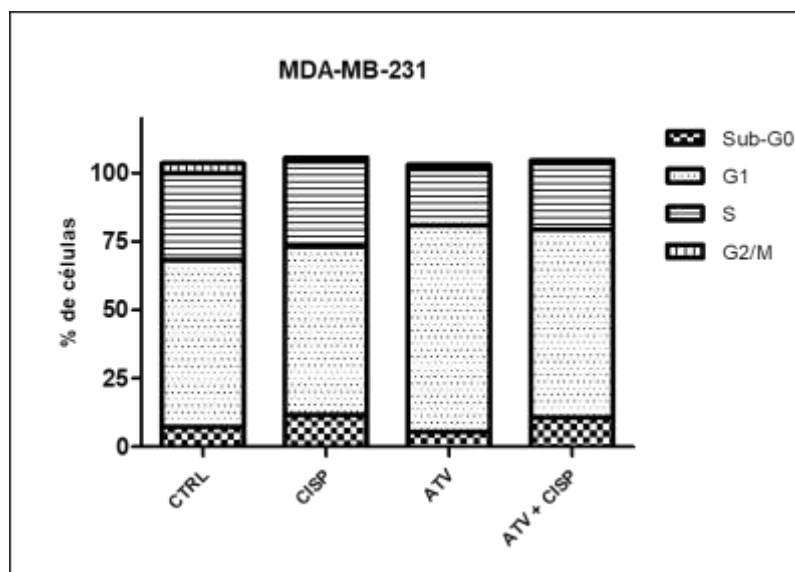


Figura 20: Análise do ciclo celular. A linhagem MDA-MB-231 foi tratada por 72h com atorvastatina e cisplatina em mono e politerapia. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.5 AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS VIAS CELULARES ENVOLVIDAS NO

MECANISMO DE AÇÃO DA ATORVASTATINA NA LINHAGEM MCF-7

Como não verificamos efeito benéfico adicional na redução da VCM do tratamento combinado de PTX e ATV para a linhagem MCF-7, pretendemos investigar se esse tratamento influenciava a expressão de proteínas moleculares envolvidas na sobrevivência celular independentemente da redução da proliferação. Desta forma, a linhagem MCF-7 foi submetida ao tratamento com ATV em monoterapia e em terapia combinada com PTX e, em seguida, o efeito foi avaliado em importantes vias relacionadas à proliferação, diferenciação e morte celular. Em paralelo, realizamos os mesmos ensaios utilizando esquemas de tratamento com CISP e ATV, para efeito comparativo.

4.5.1 Avaliação da expressão de proteínas envolvidas na autofagia

Com o propósito de compreender melhor o efeito da atorvastatina e das combinações com quimioterápicos sobre a autofagia, realizamos a análise da expressão protéica da proteína LC3 e p62, através da técnica de Immunoblotting, utilizando o GAPDH como controle de carregamento em cada experimento.

Como pode se observado por meio dos dados expostos na figura 21, tanto o tratamento com ATV em monoterapia quanto o tratamento combinado à CISP tendem aumentar a expressão de p62, na linhagem MCF-7 em 72h.

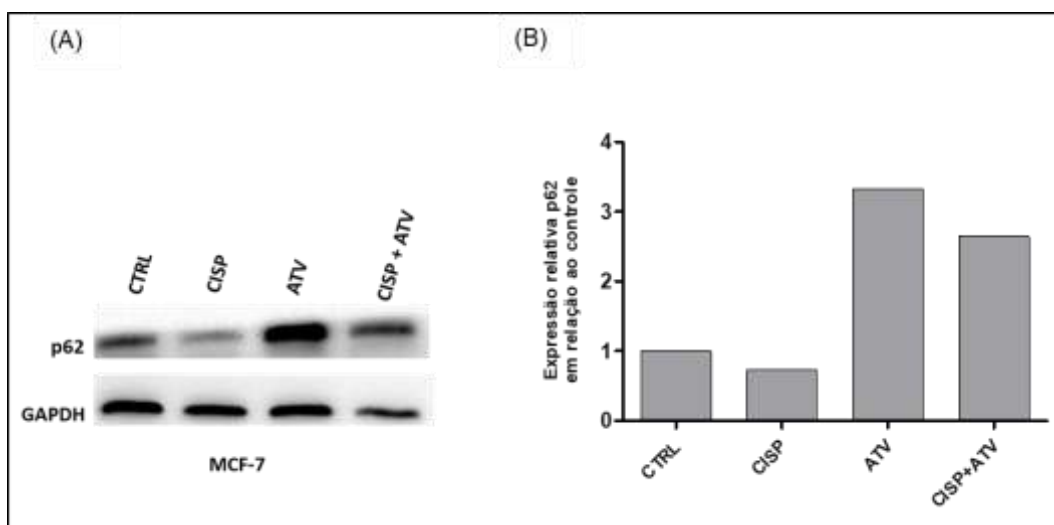


Figura 21: Análise da expressão de p62 na linhagem MCF-7. (A) As células foram tratadas com cisplatina e atorvastatina, tanto em monoterapia, como em associados. (B) Para a densitometria de

bandas das amostras foi utilizando o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado GAPDH.

Adicionalmente, como pode ser analisado por meio dos dados mostrados na figura 22, os tratamentos com ATV em monoterapia e em politerapia com PTX, também foram capazes de aumentar a expressão de p62, na linhagem MCF-7 em 72h de tratamento. Adicionalmente, o tratamento combinado aumentou exacerbadamente a expressão de LC3B nessa linhagem (Figura 23).

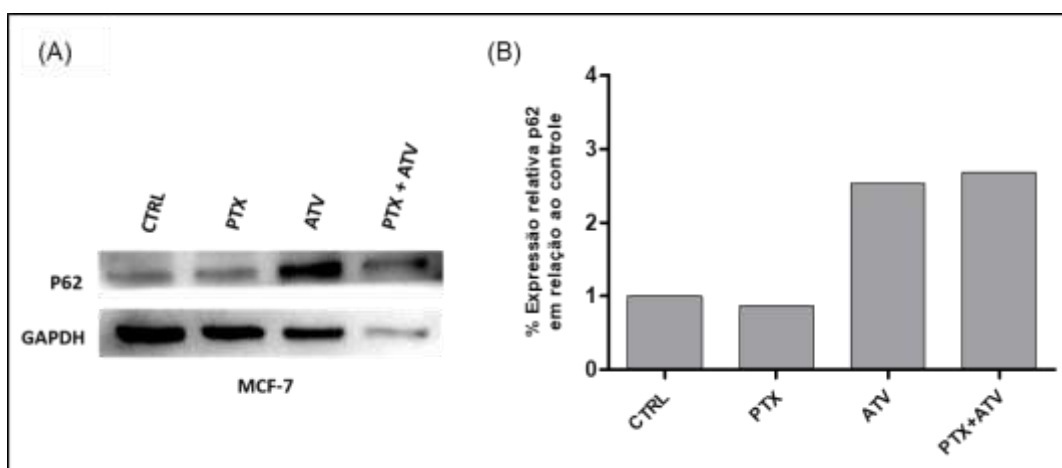


Figura 22: Análise da expressão de p62 na linhagem MCF-7. (A) As células foram tratadas com paclitaxel e atorvastatina, tanto em monoterapia, como associados. (B) Para a densitometria de bandas das amostras foi utilizando o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado GAPDH.

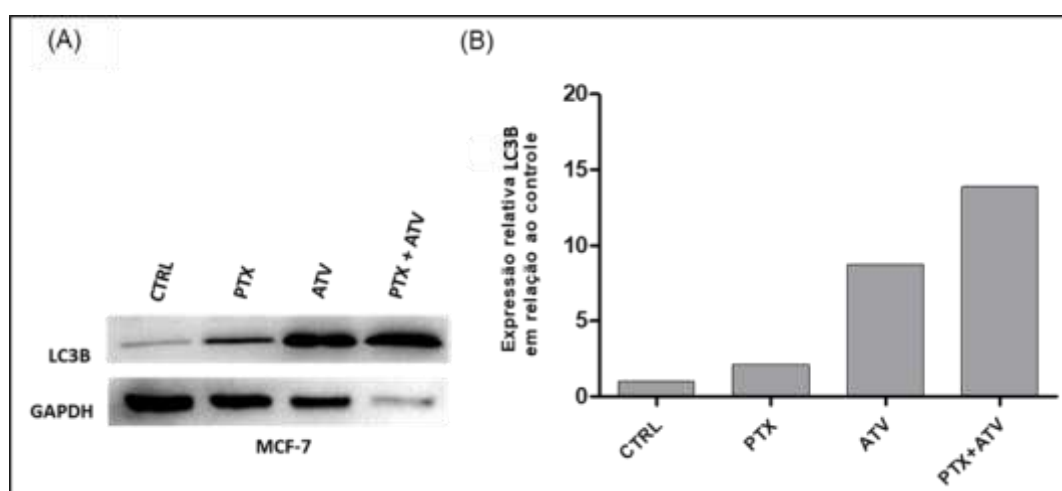


Figura 23: Análise da expressão de LC3B na linhagem MCF-7. (A) As células foram tratadas com paclitaxel e atorvastatina, tanto em monoterapia, como em associação. (B) Para a densitometria de bandas das amostras foi utilizando o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado GAPDH.

Nossos dados são corroborados por estudo conduzido por Peng e colaboradores

(2003) que mostrou que ATV na concentração de 5 μ M, por 48 e 72 h de tratamento, foi capaz de induzir a autofagia em células de câncer de próstata, evidenciado por aumento na expressão de LC3B. Entretanto, esse aumento foi juntamente com a redução da expressão de p62, o que não foi observado por nosso grupo.

A autofagia é um processo complexo envolvido na regulação do desenvolvimento e progressão de diversas malignidades, incluindo o CAM. Nesse processo, os componentes celulares normais ou disfuncionais que se acumulam durante o crescimento e a diferenciação celular são degradados através do lisossoma. Durante a autofagia, a proteína LC3 citoplasmática é lipidada e recrutada para as membranas autofagosomáticas, ligando-se diretamente ao sequestossoma 1 (p62). Em seguida, ocorre degradação lisossomal do autofagossoma, levando a uma diminuição de p62. Dessa forma, redução nos níveis de expressão de p62 com concomitante aumento de LC3B indica ativação autofágica.

Embora a autofagia constitua um alvo potencial para a terapia no câncer, esta pode apresentar dupla função, podendo atuar tanto como um supressor tumoral impedindo a acumulação de proteínas danificadas e organelas, bem como promovendo o crescimento celular (HIPPERT; O'TOOLE; THORBURN, 2006). Ressalta-se ainda que, a indução de autofagia em resposta à terapêutica também pode ter um desfecho para sobrevivência ou morte celular, o que contribui para a eficácia anticancerígena desses medicamentos, bem como a resistência ao tratamento. Ademais o efeito na autofagia das drogas antineoplásicas varia de acordo com o tipo de câncer. (YANG et al., 2010; XIONG et al., 2010; DE LA CRUZ-MORCILLO et al., 2012; revisado por SUI et al., 2013).

Dessa forma, devemos investigar melhor o significado do aumento da expressão de p62 e LC3B pela atorvastatina nas nossas linhagens para melhor entendimento do papel desempenhado dessas proteínas na progressão tumoral.

4.5.2 Avaliação da expressão de proteína envolvida na apoptose

Os eventos bioquímicos responsáveis pela apoptose dependem de uma família de proteases denominadas caspases. As proteínas intracelulares que regulam diretamente o processo de ativação das caspases constituem a denominada família BCL-2, constituídas por moléculas pró-apoptóticas (BAX, BAK, BCL-xS, BAD, BID, BIK, HRK, BIM e BOK) e antiapoptóticas (Bcl-2, BCL-xL, BCL-w, BFL-1, BRSAG-1)

(DESAGHER; MARTINOU, 2000). Com o intuito de verificar a associação de ATV aos regimes terapêuticos com CISP e PTX no processo apoptótico, analisou-se a expressão da proteína BAX.

Observando os dados expostos por meio da figura 24, verifica-se que a ATV parece reduzir a expressão relativa de BAX, quando comparado ao controle. Ainda, a associação de ATV com CISP também reduziu a expressão da proteína, tanto em relação ao controle, como em relação ao tratamento com CISP em monoterapia.

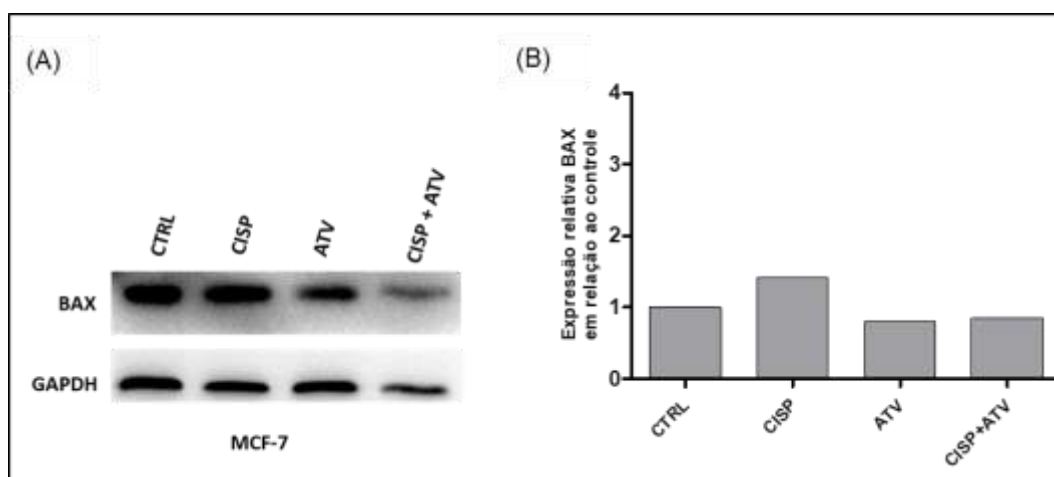


Figura 24: Análise da expressão de BAX na linhagem MCF-7. (A) As células foram tratadas com cisplatina e atorvastatina, tanto em monoterapia, como em terapia combinada, por 72h. (B) Para a densitometria de bandas das amostras foi utilizando o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado GAPDH.

Adicionalmente, como pode ser verificado por meio dos dados expostos na figura 25, a terapia combinada com PTX e ATV tende a aumentar a expressão de BAX em relação ao controle, entretanto, esse aumento é menor se comparado ao tratamento usando somente PTX.

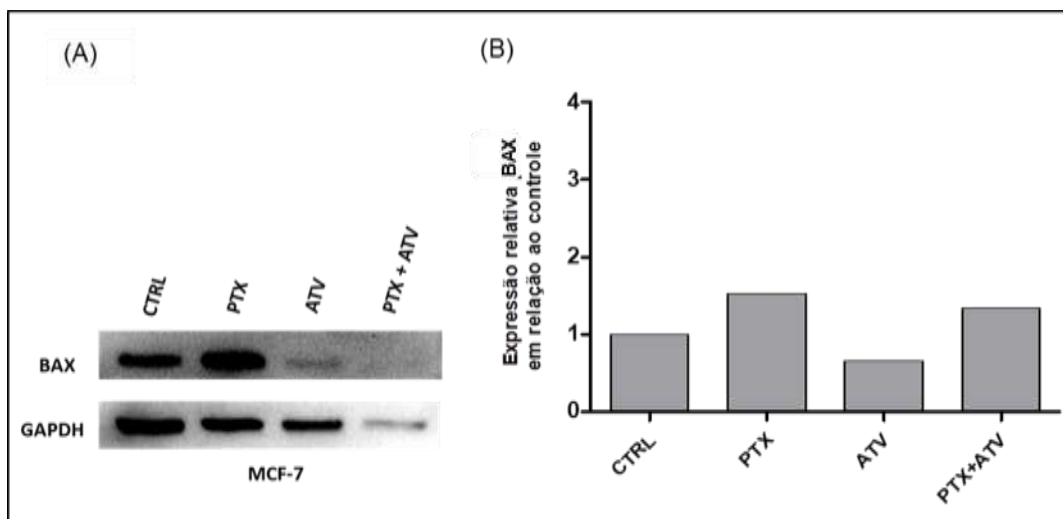


Figura 25: Análise da expressão de BAX na linhagem MCF-7. (A) As células foram tratadas com paclitaxel e atorvastatina, tanto em monoterapia, como associados, por 72h. (B) Para a densitometria de bandas das amostras foi utilizando o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado GAPDH.

Nossos resultados estão em contraste com alguns dados da literatura que mostram que o efeito das estatinas perpassa pela indução de apoptose através da regulação de proteínas associadas a esse fenômeno (JANG et al., 2016; LEE et al., 2016). Estudo conduzido por Spampanato e colaboradores (2012) utilizando a linhagem MCF-7, avaliou o efeito do tratamento com sinvastatina por 24 e 72h nas principais proteínas envolvidas no controle da apoptose e demonstrou que o tratamento regulou positivamente a proteína BAX, com redução na expressão de BCL-2 e esse efeito era dependente do tempo de exposição à droga.

A apoptose corresponde a um fenômeno biológico que além de desempenhar um papel importante no controle de diversos processos vitais, está associado a inúmeras doenças, sobretudo ao câncer (HASSAN et al., 2014). Defeitos nas vias apoptóticas são altamente associados ao CAM, e a compreensão dos mecanismos apoptóticos permitiu o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento da doença. Entretanto, o processo de apoptose induzido por fármacos não é orientado somente pela regulação positiva de moléculas pró-apoptóticas, mas também por diversos genes envolvidos na indução ou inibição da apoptose como o oncogene 53 (p53), proteína cinase B (AKT) e fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-cinase (PI3K) (OSAKI; OSHIMURA; ITO, 2004; YANG et al., 2005; LEE et al., 2011). Dessa forma, por se tratar de um mecanismo complexo, estudos adicionais para melhor compreender o papel da ATV na apoptose são necessários.

5 CONCLUSÃO

O CAM representa uma malignidade cada vez mais comum em todo o mundo e a busca por drogas cada vez mais potentes e menos tóxicas é incessante. Este estudo destaca a importância da ATV como estratégia auxiliar promissora, uma vez demonstrado que:

- ATV em monoterapia foi capaz de inibir a proliferação celular bem como a formação de colônias em linhagens de CAM, exibindo um perfil de maior citotoxicidade na linhagem MDA-MB-231, representativa do subtipo TNBC, que congrega tumores majoritariamente agressivos e quimiorresistentes;
- A associação da ATV aos antineoplásicos convencionais parece ser benéfica, sobretudo quando associado à CISP para a linhagem MDA-MB-231.
- A associação de concentração sabidamente segura de ATV com OLAP, aumentou a eficácia desse quimioterápico na linhagem triplo-negativa BRCA1 mutada, HCC-1937.
- Constatamos que o efeito antineoplásico da ATV parece estar associado à autofagia, uma vez que houve superexpressão dos marcadores desse processo como LC3B, na linhagem luminal A.
- Observamos ainda que, a ATV pode não aumentar a indução de apoptose, entretanto, para inferir com certeza, será necessário realizar mais duas réplicas biológicas do experimento.

6 PERSPECTIVAS

Dada a relevância do presente estudo, nosso grupo pretende prosseguir com as investigações da aplicabilidade da ATV em regimes terapêuticos, conforme descrito a seguir:

- 1- Finalizar os experimentos de ciclo celular para a linhagem MCF-7.
- 2- Concluir os ensaios de Immunoblotting para a linhagem MDA-MB-231, de modo a investigarmos os mecanismos antineoplásicos potenciais da ATV, incluindo a modulação da via de sinalização celular de PI3K/AKT/mTOR e de AMPK, além da análise de indução de apoptose/necrose e autofagia.
- 3- Verificar o efeito da ATV na modulação da resistência tumoral, sobretudo no subtipo TNBC, através do ensaio de MTT.
- 4- Testar a segurança do uso de concentrações de ATV superiores às sabidamente seguras por meio de ensaios *in vivo*. Este será realizado em parceria com o INCa.

7 REFERÊNCIAS

AHN, J. et al. Adiposity, adult weight change, and postmenopausal breast cancer risk. *Archives of Internal Medicine*, v. 167, n. 19, p. 2091-2102, 2007.

AJABNOOR, G.M.A.; CROOK, T.; COLEY, H.M. Paclitaxel resistance is associated with switch from apoptotic to autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Cell Death & Disease*, v.3, n.1, p.e260, 2012.

American Cancer Society. Breast cancer facts & figures 2013-2014. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-040951.pdf>> Acesso em Fevereiro de 2017.

ANDERS, C.K.; CAREY, L.A. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, v.9, p.S73-S81, 2009.

ANDERS, C.K.; WINER, E.P.; FORD, J.M., et al. PARP Inhibition: “Targeted” Therapy for Triple Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, v.16, n.19,p.4702-4710, 2010.

ANOTHASINTAWEE T, UDOMSUBPAYAKUL U, MCEVOY M, LERDSITTHICHAI P, ATTIA J, THAKKINSTIAN A. Effect of Lipophilic and Hydrophilic Statins on Breast Cancer Risk in Thai Women: A Cross-sectional Study. *Journal of Cancer*.; v.7(9):1163-1168, 2016.

APOSTOLOU, P.; FOSTIRA, F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *Biomed Research International*, v. 2013, p.2-10, 2013

ARAÚJO, F.A. et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor (fluvastatin) decreases inflammatory angiogenesis in mice. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, v. 121, n. 5, p. 422-30, 2013.

BAANDRUP, L. et al. Statin use and risk for ovarian cancer: a Danish nationwide

case-control study. *British Journal of Cancer*, v.112, n.1, p.157-161, 2015.

BALAJI, K. et al. Radiation therapy for breast cancer: Literature review. *Medical Dosimetry: the official journal of the American Association of Medical Dosimetrists*, v.41, n.3, p.253-257, 2016.

BARBER, L.J. et al. Secondary mutations in BRCA2 associated with clinical resistance to a PARP inhibitor. *The Journal of Pathology*, v.229, n.3, p.422-429, 2013.

BONSU, K.O.; REIDPATH, D.D.; KADIRVELU, A. Lipophilic Statin Versus Rosuvastatin (Hydrophilic) Treatment for Heart Failure: a Meta-Analysis and Adjusted Indirect Comparison of Randomised Trials. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, v.30, n.2, p.177-188, 2016.

BROWN, A.J. Cholesterol, statins and cancer. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 34, n. 3, p. 135-41, 2007

BRUTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11th Ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2007.

BURGER, H. et al. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug Resistance Updates*, v.14, n.1, p,22-34, 2011.

CAMPO, V.L.; CARVALHO, I. Estatinas hipoglicêmicas e novas tendências terapêuticas. *Química nova*, v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007.

CANCELLO, G. et al. Phase II Study With Epirubicin, Cisplatin, and Infusional Fluorouracil Followed by Weekly Paclitaxel With Metronomic Cyclophosphamide as a Preoperative Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*, v.15, n.4, p.259-265, 2015.

CANTOR, J.R.; SABATINI, D.M. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discovery*, v. 2, n. 10, p. 881-98, 2012.

CATALANOTTI, V. et al. Treatment of Advanced Breast Cancer (ABC): The Expanding Landscape of Targeted Therapies. *Journal of Cancer Biology & Research*, v.2, n.1, p.1036, 2014.

CAREY, L.A. et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clinical Cancer Research*, v. 13, n. 8, p. 2329-2334, 2007.

CAREY, L.A. et al. TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology*, v.30, n.21, p. 2615-2623, 2012.

CILLA, D.D. et al. Multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy subjects. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v.60, n.6, p.687–695, 1996.

DE GONZALO-CALVO D. et al. Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. *BMC Cancer*, v.15, p. 460, 2015.

DE LA CRUZ-MORCILLO, M.A. et al. P38MAPK is a major determinant of the balance between apoptosis and autophagy triggered by 5-fluorouracil: implication in resistance. *Oncogene*, v.31, p.1073–1085, 2012.

DENOYELLE, C. et al. Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study. *Carcinogenesis*, v. 22, n. 8, p.1139-48, 2001.

DENT, R. et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*, v.13, n.15, p.4429–4434, 2007.

DESAGHER, S.; MARTINOU, J-C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*, v. 10, p. 369-77, 2000

DHILLON, K.K.; TANIGUCHI, T. Resistance to PARP Inhibitors Mediated by Secondary BRCA1/2 Mutations; PARP Inhibitors for Cancer Therapy. *Springer International Publishing*, p.431-452, 2015.

FLETCHER CDM. Diagnostic Histopathology of tumors. 3^a ed. Churchill Livingstone Elsevier; 2007.

FRANKEN, N.A. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, v.1, n.5, p.2315-2319, 2006.

GUIMARAES, I.S. et al. Conventional Cancer Treatment. In: Cancer treatment: Conventional and innovative approaches, Chapter 1, *In Tech*, p. 3-39, 2013.

HASSAN, M. et al. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *BioMed Research International*, v.2014, p.1-23, 2014.

HERSCHKOWITZ , J.I. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biology*, v.8, p.R76, 2007.

HIPPERT, M.M.; O'TOOLE, P.S.; THORBURN, A. Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Research*, v.66, n.19, p.9349-9351, 2006.

HOQUE, A.; CHEN, H.; XU, X.C. Statin induces apoptosis and cell growth arrest in prostate cancer cells. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, v. 17, n.1, p.88-94, 2008.

HOWLADER, N. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Bethesda, MD. Disponível em <https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/> Acessado em Agosto de 2017.

IMS HEALTH, National Prescription Audit, 2010. Disponível em: <<https://www.imshealth.com>>. Acessado em Agosto 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCa). Estimativas 2014: incidência de câncer no Brasil, 2013. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>. Acesso em Abril de 2014.

ISHIKAWA, S. et al. Statins inhibit tumor progression via an enhancer of zeste homolog 2-mediated epigenetic alteration in colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, v.135, n.11, p.2528-2536, 2014.

ISTVAN, E.; DEISENHOFER, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*, v. 292, n. 5519, p. 1160-4, 2001.

JANG, H.J. et al. Statin induces apoptosis of human colon cancer cells and downregulation of insulin-like growth factor 1 receptor via proapoptotic ERK activation. *Oncology Letters*, v.12, n.1, p.250-256, 2016.

JASINSKA, M.; OWCZAREK, J.; ORSZULAK-MICHALAK, D. Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacological Reports*, v.59, n.5, p.483–499, 2007.

JOHNSON-ANUNA, L.N. et al. Chronic administration of statins alters multiple gene expression patterns in mouse cerebral cortex. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 312, n. 2, p. 786-93, 2005.

KAJSTURA, M. et al. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms. *Cytometry A*, v.71, n.3, p.125-131, 2007.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, v.7, n.8, p.573-584, 2007.

KIM, Y. et al. Reverse the Resistance to PARP Inhibitors. *International Journal of Biological Sciences*, v.13, n.2, p.198-208, 2017.

KONECNY, G.E.; KRISTELEIT, R.S. PARP inhibitors for BRCA1/2-mutated and sporadic ovarian cancer: current practice and future directions. *British Journal of Cancer*, v.115, n.10, p.1157-1173, 2016.

KOREN, M.J.; FELDMAN, T.; MENDES, R.A. Impact of high-dose atorvastatin in coronary heart disease patients age 65 to 78 years. *Clinical Cardiology*, v. 32, n. 5, p. 256-63, 2009.

KYCER JR, BROWN JA. Cholesterol accumulation in prostate cancer: a classic observation from a modern perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1835, n.2, p.219-29, 2013.

LALLOO, F.; EVANS, D.G. Familial breast cancer. *Clinical Genetics*, v. 82, n. 2, p. 105-14, 2012.

LARSSON, S.C.; MANTZOROS, C.S.; WOLK, A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. *International Journal of Cancer*, v. 121, n. 4, p. 856-862, 2007.

LEE, S.K. et al. Stabilization and translocation of p53 to mitochondria is linked to Bax translocation to mitochondria in simvastatin-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.391, n.4, p.1592–1597, 2010.

LEE, J. et al. Simvastatin Induces Apoptosis and Suppresses Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor in Bile Duct Cancer Cells. *Gut and Liver*, v.10, n.2, p.310-317, 2016.

LING, K.S. et al. Mechanisms involved in chemoresistance in ovarian cancer Kar-San. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 44, n. 3, p. 209–217, 2005

LIPSCOMBE, L.L. et al. Diabetes mellitus and breast cancer: a retrospective population-based cohort study. *Breast Cancer Research and Treatment*, v.98, n.3, p.349–356, 2006.

MAJI, D. et al. Safety of statins. *Indian Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 17, n. 4, p. 636-46, 2013.

MALHOTRA, G.K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*, v.10, p.995-960, 2010.

MARMÉ, F.; SCHNEEWEISS, A. Targeted Therapies in Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Care*, v.10, n.3, p.159-166, 2015.

MARUPUDI, N.I. et al. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. *Expert Opin Drug Saf*, v.6, n.5, p.609-621, 2007.

MASCITELLI, L.; GOLDSTEIN, M.R. Statin immunomodulation and thyroid cancer. *Clinical Endocrinology*, v.82, n.4, p.620, 2015.

MORAES, L.A. et al. Antithrombotic actions of statins involve PECAM-1 signaling. *Blood*, v. 122, n. 18, p. 3188-96, 2013.

MORIMOTO, L.M. et al. Body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States). *Cancer Causes & Control*, v. 13, n. 8, p. 741-751, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MÜCK, A.O.; SEEGER, H.; WALLWIENER, D. Inhibitory effect of statins on the proliferation of human breast cancer cells. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 42, n. 12, p. 695-700, 2004.

MUECK, A.O.; SEEGER, H.; WALLWIENER, D. Effect of statins combined with estradiol on the proliferation of human receptor-positive and receptor-negative breast cancer cells. *Menopause*, v. 10, n. 4, p. 332-6, 2003.

MURAKAMI, R. et al. Lovastatin lowers the risk of breast cancer: a population-based study using logistic regression with a random effects model. *SpringerPlus*, v.5, n.1, p.1932, 2015.

NELSON, E.R.; CHANG, C.; MCDONNELL, D.P. Cholesterol and Breast Cancer Pathophysiology. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v.25, n.12, p. 649-655, 2014.

OSAKI M1, OSHIMURA M, ITO H.PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, v.9, n.6, p.667-676, 2004.

OSBORNE, C.K.; SCHIFF, R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annual review of medicine*, v.62, p.233-247, 2011.

O'SULLIVAN, C.C. et al. Beyond Breast and Ovarian Cancers: PARP Inhibitors for BRCA Mutation-Associated and BRCA-Like Solid Tumors. *Frontiers in Oncology*, p.4:42, 2014.

OUYANG, M. et al. MicroRNA profiling implies new markers of chemoresistance of triple-negative breast cancer. *PLoS One*, v. 9, n. 5, p. e96228, 2014.

PENG, X. et al. Inhibition of proliferation and induction of autophagy by atorvastatin in PC3 prostate cancer cells correlate with downregulation of Bcl2 and upregulation of miR-182 and p21. *PLoS One*, v.8, n.8, p.e70442, 2013.

POYNTER, J.N et al. Statins and the risk of colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 352, n. 21, p. 2184-92, 2005.

RAKHA, E. A. et al. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology*, v. 50, n. 4, p. 434–438, 2007.

RELJA, B. et al. Simvastatin inhibits cell growth and induces apoptosis and G0/G1

cell cycle arrest in hepatic cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine*, v.26, n.5, p.735-741, 2010.

RIOS, J.; PUHALLA, S. PARP inhibitors in breast cancer: BRCA and beyond. *Oncology*, v.25, n.11, p.1014-1025, 2011.

ROBEY, R.B. et al. Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism: cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis? *Carcinogenesis*, v.36, Suppl 1, p.S203-S231, 2015.

ROSA, G.M. et al. Update on the efficacy of statin treatment in acute coronary syndromes. *European Journal of Clinical Investigation*, v.445, p. 501-15, 2014.

ROUZIER, R. et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, v. 11, n. 16, p. 5678-5685, 2005.

SAKABE, K. et al. Lipid-altering changes and pleiotropic effects of atorvastatin in patients with hypercholesterolemia. *American Journal of Cardiology*, v. 94, n. 4, p. 497-500, 2004.

SAMEIRO, F.M. et al. Vascular access versus the effect of statins on inflammation and fibrinolysis in renal dialysis patients. *Journal of the Association for Vascular Access*, v. 14, n. 4, p. 335-41, 2013.

SÁNCHEZ, C.A. et al. Statin-induced inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation is related to cell cycle arrest and apoptotic and necrotic cell death mediated by an enhanced oxidative stress. *Cancer Investigation*, v. 26, n. 7, p. 698-707, 2008.

SCHWARTZ, G.G. et al. Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*, v. 285, n.

13, p. 1711-8, 2001.

SECKL, M.J. et al. Multicenter, Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Pravastatin Added to First-Line Standard Chemotherapy in Small-Cell Lung Cancer (LUNGSTAR). *Journal of Clinical Oncology*, v.35, n.14, p.1506-1514, 2017.

SEEGER, H.; WALLWIENER, D.; MUECK, A.O. Statins can inhibit proliferation of human breast cancer cells in vitro. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, v. 111, n. 1, p. 47-8, 2003.

SILVER, D.P. et al. Efficacy of Neoadjuvant Cisplatin in Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v.28, n.7, p.1145-1153, 2010.

SOLIMAN NA, YUSSIF SM. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. *Cancer Biology & Medicine*, v.13, n.4, p.496-504, 2016.

SPAMPANATO C, DE MARIA S, SARNATARO M, et al. Simvastatin inhibits cancer cell growth by inducing apoptosis correlated to activation of Bax and down-regulation of BCL-2 gene expression. *International Journal of Oncology*, v.40, n.4, p.935-941, 2012.

SUI, X. et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death & Disease*, v.4, n.10, p.e838, 2013.

TAKAHASHI, H.K. et al. Hypothesis: the antitumor activities of statins may be mediated by IL-18. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 80, n. 2, p. 215-6, 2006.

TANIA, M. et al. Association of lipid metabolism with ovarian cancer. *Current Oncology*, v.17, n.5, p.6-11, 2010.

TAVASSOLI FA, DEVILEE P. World Health Organization classification of tumor. Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs. *Lyon: IARC Press*; 2003.

THOMSON S. et al. A systems view of epithelial-mesenchymal transition signaling states. *Clinical & Experimental Metastasis*, v.28, n.2, p.137–155, 2011.

TIRINATO, L. et al. Lipid droplets: a new player in colorectal cancer stem cells unveiled by spectroscopic imaging. *Stem Cells*, v.33, n.1, p.35-44, 2015.

VARGA Z, MALLON E. Histology and immunophenotype of invasive lobular breast cancer. Daily practice and pitfalls. *Breast Disease*, v.30, n.1, p.15-19, 2009.

VIALE, G. The current state of breast cancer classification. *Annals Of Oncology*, v. 23, suppl. 10, p. 207-210, 2012.

VOORNEVELD, P.W. et al. Statin Use After Diagnosis of Colon Cancer and Patient Survival. *Gastroenterology*, v.153, n.2, p.470-479, 2017.

VRBIC, S. et al. Current and future anti-HER2 therapy in breast cancer. *Journal of BOUN*, v.18, n.1, p.4-16, 2013.

WALTER, D.H.; ZEIHNER, A.M.; DIMMELER, S. Effects of statins on endothelium and their contribution to neovascularization by mobilization of endothelial progenitor cells. *Coronary Artery Disease*, v. 15, n. 5, p. 235-42, 2004.

WANG, A. et al. Statin use and all-cancer survival: prospective results from the Women's Health Initiative. *British Journal of Cancer*, v.115, n.1, p.129-135, 2016.

XIONG, H.Y. et al. Autophagic cell death induced by 5-FU in Bax or PUMA deficient human colon cancer cell. *Cancer Letters*, v.288:68–74, 2010.

YANG, P.M. et al. Inhibition of autophagy enhances anticancer effects of atorvastatin in digestive malignancies. *Cancer Research*, v.70, p.7699–7709, 2010.

YANG, Y.P. et al. The p53-dependent apoptotic pathway of breast cancer cells (BC-M1) induced by the bis-type bioreductive compound aziridinylnaphthoquinone. *Breast Cancer Research*, v.7, n.1, p.R19-R27, 2005.

