

Tiago Filipe Rodrigues de Oliveira

Via de sinalização mTOR e efeito dos seus inibidores no tratamento do cancro

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto 2013

Via de sinalização mTOR e efeito dos seus inibidores no tratamento do cancro

Tiago Filipe Rodrigues de Oliveira

Via de sinalização mTOR e efeito dos seus inibidores no tratamento do cancro

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto 2013

Tiago Filipe Rodrigues de Oliveira

Trabalho apresentado à Universidade
Fernando Pessoa como parte dos requisitos à obtenção
do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

Tiago Filipe Rodrigues de Oliveira

Resumo

O cancro é o termo utilizado para referir todos os diferentes tipos de tumores malignos, porém estes podem adotar uma nomenclatura mais específica tendo em conta o local onde se desenvolveram. O cancro é responsável pela morte de quase 8 milhões de pessoas por ano em todo o mundo, número este que tem vindo a aumentar com os anos.

Existem inúmeros fatores que podem aumentar o risco de desenvolvimento de um tumor maligno, daí ser extremamente importante, conhece-los para que possam ser evitados e deste modo prevenir o desenvolvimento desta terrível patologia.

É neste contexto, que surge o estudo da via de sinalização do mTOR, que se apresenta alterada em mais de 50% dos cancros que surgem na atualidade. A proteína mTOR desempenha um papel crucial nesta via de sinalização sendo responsável pela regulação do crescimento celular e síntese de proteínas. Alterações nesta via estão associadas com a tumorigénese, angiogénese, crescimento do tumor e metastização

O mTOR está inserido na via PI3K/AKT/mTOR e divide-se em dois complexos: mTORC1 e mTORC2. A jusante do mTOR encontramos duas proteínas fundamentais, a 4EBP1 e p70S6K1, proteínas envolvidas em processos de proliferação, sobrevivência celular e angiogénese, processos fundamentais no desenvolvimento de mutações que podem conduzir a cancro.

A rapamicina foi o primeiro inibidor do mTOR descoberto e aprovado para o tratamento do cancro, no entanto, as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas pouco favoráveis levaram ao desenvolvimento dos análogos da rapamicina: o temsirolimus e o everolimus são exemplos desta classe de fármacos. Contudo, com o evoluir da investigação foram descobertos mais fármacos com a capacidade de inibir a via do mTOR.

Um melhor entendimento do cancro, e desta via de sinalização poderá levar ao desenvolvimento de fármacos mais eficazes e específicos ao tipo de tumor, que usados isolados ou em combinação, podem melhorar a qualidade de vida destes pacientes.

Abstract

Cancer is the term used when referring to different types of malignant tumors, however, they can have a more specific definition given where they developed. Cancer is responsible for the deaths of nearly 8 million people worldwide, and this number tends to increase.

There are numerous factors that can increase the risk of developing a malignant tumor, it is extremely important to know them, so they can be avoided and thus prevent the development of this terrible disease.

In this context the investigation arises of the mTOR signaling pathway, which is altered in more than 50% of cancers. MTOR protein plays a crucial role in this signaling pathway and is responsible for the regulation of cell growth and protein synthesis. Alterations in this pathway are associated with tumorigenesis, angiogenesis, tumor growth and metastasis.

mTOR is inserted into the PI3K/AKT/mTOR pathway and is divided into two complexes: mTORC1 and mTORC2. Downstream of mTOR there are two fundamental proteins, the 4EBP1 and the p70S6K1. These proteins are involved in proliferation, cell survival and angiogenesis, key processes in the development of mutations that can lead to cancer.

Rapamycin was the first mTOR inhibitor approved for the treatment of cancer, however its poor pharmacokinetic and pharmacodynamic properties led to the development of rapamycin analogues. Temsirolimus and everolimus are examples of this class of drugs. However, with the progress of the investigation there were more drugs discovered with the ability to inhibit the mTOR pathway.

A better understanding of cancer, specifically signaling pathway may lead to the development of more effective and targeted drugs, used alone or in combination, to the tumor and thus improve the quality of life of this patients.

Dedico este trabalho à minha família, nomeadamente aos meus pais, irmã, avó e namorada, as pessoas mais importantes da minha vida

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof. Céu Costa, por toda a dedicação, empenho e ajuda o meu muito obrigado!

À Prof. Sandra Clara, pela disponibilidade e opinião muito construtiva o meu agradecimento.

À minha namorada, Mariana Borges, por estes 5 anos maravilhosos, com toda a entreaajuda, compreensão, amor e carinho, foi possível concluir esta etapa importante das nossas vidas.

À minha família, pais, irmã, avó, por todo o apoio, carinho e compreensão!

A todos o meu sincero muito obrigado!

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,

Mas não esqueço de que minha vida

É a maior empresa do mundo...

E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver

Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e

Se tornar um autor da própria história...

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar

Um oásis no recôndito da sua alma...

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo.

É ter coragem para ouvir um “Não”!!!

É ter segurança para receber uma crítica,

Mesmo que injusta...

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa, o nosso maior Patrono...

Lista de abreviaturas

ADME – Absorção, distribuição, metabolização e excreção

DNA – ácido desoxirribonucleico

AKT – proteína-cinase B

AMPK – proteína cinase

AST/ALT - transaminases

CCL – 779 – temsirolimus

CCR – carcinoma das células renais

EGCG – epigallocatequina galato

EGFR – recetor do fator de crescimento epidérmico

Elf4E – fator de iniciação

Eurostat – gabinete de estatística da União Europeia

FDA – Food and Drug Administration

FKBP12 – recetor intracelular

G1 – Etapa do ciclo celular

GPCRs – recetores acoplados à proteína G

GSK3 – sintetase cinase glicogénio 3

HIF-1 – fator induzível de hipoxia

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HPV – vírus do papiloma humano

IARC – agência internacional para a pesquisa sobre o cancro

IGF-1R – recetor do fator de crescimento 1 da insulina

LMC – leucemia mieloide crónica

mRNA – RNA mensageiro

TKR – recetor da tirosina cinase

SHIP1 – fosfatases Src

SIDA – síndrome da imunodeficiência adquirida

SPF – fator de proteção solar

STK11 – serina-treonina cinase 11

TSC – complexo esclerose tuberosa

VeGF – fator de crescimento endotelial vascular

VHL – proteína Van Hippel-lindau

WHO – organização mundial de saúde

XL 147 - exelixis

Índice geral

I Introdução.....	15
II Cancro.....	17
2.1 Fases da carcinogénese.....	17
2.2 Epidemiologia.....	19
2.3 Fatores de risco.....	21
III Via de sinalização mTOR.....	23
3.1 Estrutura do mTOR e ativação.....	24
3.2 Sinalização "upstream" do mTOR.....	26
3.2.1 PI3K/AKT.....	26
3.2.2 Vias proximais ao mTOR.....	28
3.2.2.1 Ras/RAf/MEK/ERK.....	28
3.2.2.2 AMPK e outras moléculas.....	29
3.3 Sinalização "downstream" do mTOR.....	29
3.3.1 4EBP1.....	29
3.3.2 p70S6K1.....	30
4. mTOR e cancro.....	31
5. Inibidores do mTOR e seletividade tumoral.....	33
5.1.1 Rapamicina.....	33
5.1.2 Análogos da rapamicina.....	34
5.1.3 Inibidores competitivos ATP-cinase.....	35
5.1.4 Inibidores seletivos mTORC1/2.....	36
5.1.5 Inibidores derivados de produtos naturais.....	37

5.2 Potenciais inibidores do mTOR.....	39
5.2.1 Composto 28 (XL 388).....	39
5.2.2 O potencial das biguanidas (metformina).....	40
6. Estudos realizados nos diversos modelos tumorais.....	44
6.1 Temsirolimus.....	44
6.2 Everolimus.....	46
6.3 LY294002 e Wortmanina.....	49
6.4 XL 147.....	50
6.5 MKC-1.....	51
7. Perspetivas futuras.....	52
8. Bibliografia.....	54

Índice de figuras

Figura 1 – Fases da carcinogénese

Figura 2 – Incidência e mortalidade por cancro a nível mundial em 2008

Figura 3 – Mortes por cancro em 2008, nas mulheres que viviam no continente europeu

Figura 4 – Mortes por cancro em 2008, nos homens que viviam no continente europeu

Figura 5 – Os tumores mais frequentes no sexo masculino e feminino em 2008

Figura 6 – Via de sinalização mTOR

Figura 7 – Via de sinalização PI3K/AKT/mTOR

Figura 8 – Estrutura química da rapamicina

Figura 9 – Estruturas químicas do temsirolimus e do deforolimus

Figura 10 – Estruturas químicas do PP292 2 PP30

Figura 11 – Estruturas químicas do INK128 e AZD8055

Figura 12 – Estrutura química do EGCG

Figura 13 – Estrutura química do Resveratrol

Figura 14 – Estrutura química da Curcumina

Figura 15 – Estrutura química do composto 28 (XL 388)

Figura 16 – Estrutura química da Metformina

Figura 17 – Efeitos da metformina no cancro

I - Introdução

O cancro é o termo utilizado para designar o crescimento descontrolado de células e a sua disseminação a tecidos adjacentes. Frequentemente o crescimento celular invade os tecidos circundantes podendo contudo metastizar para locais bem distantes do local inicial. Muitos tipos de cancro podem ser prevenidos evitando a exposição a determinados fatores de risco como o fumo do tabaco ou exposição solar nos períodos onde a mesma é mais intensa, no entanto, este tipo de patologia continua a ser das principais causas de morte a nível mundial (WHO, 2013). Embora nas últimas décadas, o sucesso resultante da prevenção do cancro, deteção precoce, diagnóstico e tratamento terem reduzido a mortalidade em alguns países desenvolvidos, é necessário continuar com a intensa pesquisa, uma vez que o cancro continua a ser uma doença com uma elevada mortalidade (Soerjomataram I, 2012).

Os protocolos e esquemas terapêuticos correntes para os diversos tipos de tumores muitas vezes não conseguem responder com eficácia a todos os grupos de doentes, promovendo uma intensa investigação na descoberta de novas formas de prevenir, detetar e tratar de forma mais específica e seletiva o cancro e tendo sempre em atenção a melhoria da qualidade de vida das pessoas, durante e após o tratamento.

Nos últimos anos, as descobertas no âmbito da transdução de sinais levaram à identificação de moléculas-chave envolvidas em vias de sinalização que regulam a apoptose, proliferação, sobrevivência celular e que se encontram frequentemente associados a processos tumorais tais como a angiogénese e a metastização (Peng *et al.*, 2002).

É neste sentido que surge uma molécula de sinalização extremamente atrativa e que tem suscitado um grande interesse por parte dos investigadores, visto constituir um importante e promissor alvo terapêutico. Esta molécula é a proteína alvo da rapamicina nos mamíferos (mTOR). O mTOR é uma cinase serina/treonina, que pertence à via de sinalização PI3K/AKT e desempenha um papel central como regulador de sobrevivência, crescimento celular, proliferação e motilidade, funcionando como um sensor da mitogénese, nível de energia e nutrientes (Cortot *et al.*, 2006).

Alterações da sua via tais como amplificação/sobreexpressão do S6K1 e eIF4E são comuns em diversos cancros humanos. Por exemplo, mutações a nível da AKT

(amplificação) estão envolvidas nos carcinomas da próstata, ovário e da mama e mutações a nível da PTEN (mutações de inativação) aparecem associados ao cancro do cólon, próstata, mama, tiroide, rim, linfomas e melanomas (Cortot *et al.*, 2006). Deste modo tem sido demonstrado que as alterações nesta via, parecem influenciar o comportamento tumoral.

A primeira geração de inibidores do mTOR a serem usados em esquemas terapêuticos em oncologia incluem a rapamicina e os seus derivados (análogos da rapamicina) que podem ser classificados em inibidores alostéricos. No entanto existe outro grupo de inibidores que são os inibidores ATP-competitivos, normalmente representados por moléculas sintéticas pequenas que têm como alvo o local catalítico da enzima.

Neste trabalho irão ser abordados em pormenor alguns dos fármacos mais importantes e utilizados para inativar esta via, bem como fármacos com grande potencial terapêutico em oncologia (Schenone *et al.*, 2011).

O presente projeto de graduação surge como um dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas e tem como objetivo geral, através da realização de uma extensa revisão bibliográfica perceber a ativação da cascata de sinalização mTOR, assim como o seu envolvimento no cancro. Os objetivos específicos que este trabalho pretende clarificar são: avaliar a importância e o envolvimento da via de sinalização mTOR no cancro, perceber se existem alvos na cascata mTOR com interesse terapêutico no tratamento do cancro, conhecer os inibidores do mTOR utilizados e os que se encontram ainda em fase de estudo.

II – Cancro

O cancro é um grupo complexo de doenças de grande latência, pois o tempo que decorre entre a exposição ao carcinogéneo e a manifestação clínica da doença pode exceder os 20 anos. Existem múltiplas causas para este tipo de doenças como a ação dos carcinogéneos químicos tais como os produtos da pirólise do tabaco, físicos como as radiações, biológicos como agentes infecciosos (vírus), hormonas, inflamação crónica e stress oxidativo (Santos, Teixeira, 2011).

Cancro é o termo geral usado para referir todos os tipos de tumores malignos, sendo estes definidos de acordo com o tecido onde se iniciam. Assim, se o tumor tem origem nos tecidos epiteliais é designado como carcinoma, se tem origem no tecido conjuntivo é conhecido por sarcoma. O cancro pode, igualmente, envolver linfócitos (linfomas) e células da glia (gliomas) (Santos, Teixeira, 2011).

2.1 Fases da carcinogénese

O processo de carcinogénese é dividido em quatro fases: a iniciação, a promoção, a transformação maligna e a progressão (invasão e metastização).

A primeira etapa consiste numa mutação e/ou alterações genéticas numa única célula, ou seja é a ocorrência de um evento que altera o genoma celular. Ainda é desconhecida a natureza das alterações iniciais que levam ao despoletar deste processo, contudo uma só alteração no DNA não é suficiente para provocar doença, são necessárias várias mutações em sequência, para o desenvolvimento de cancro. Por outro lado, apesar destas alterações ocorrerem o organismo está apetrechado com mecanismos de reparação, e além disso é necessário que estas ocorram em locais específicos, como genes supressores de tumores e protooncogenes (Stevens *et al.*, 2002; Rubin *et al.*, 2006).

A seguir à iniciação segue-se a promoção que consiste na indução da proliferação celular das células iniciadas. Nesta fase as células alteradas estão dependentes de um estímulo para proliferar e estes são agrupados em três grupos tendo em conta o mecanismo através do qual induzem o surgimento de neoplasias. A primeira classe são os genotóxicos que causam danos direto ao DNA através da formação de aduções de DNA. A segunda classe são os mitogénicos que se ligam a recetores nas células e estimulam a divisão celular causando deste modo uma hiperplasia sustentada. Por fim, temos os citotóxicos que induzem dano tecidual levando à hiperplasia sem causar danos

diretos ao nível do DNA. O acumular destas alterações (mutações), responsáveis pela perda do controlo fisiológico da proliferação celular e de múltiplas atividades biológicas, leva à transformação maligna (Stevens *et al.*, 2002; Rubin *et al.*, 2006).

Por último, temos a progressão que é uma fase durante a qual o crescimento celular se torna autónomo, ou seja independente do carcinogénico ou promotor e neste momento já existem mutações suficientes para imortalizar as células. O desenvolvimento de uma neoplasia invasiva é o ponto final da progressão (figura 1) (Stevens *et al.*, 2002; Rubin *et al.*, 2006).

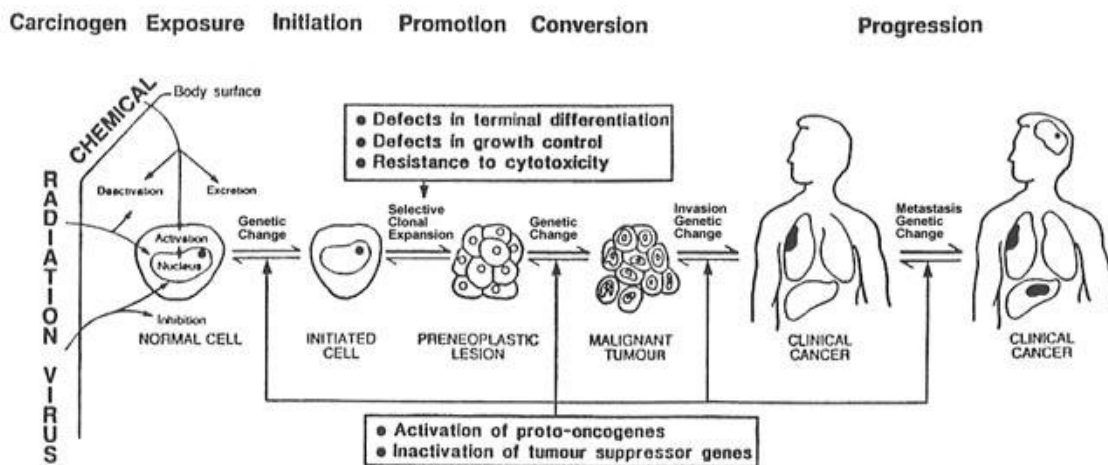


Fig. 1 Fases da carcinogénese (In http://www.bvsde.paho.org/bvstox/i/fulltext/training/Section%202_1.htm). [Consultado em 19/06/13]).

2.2 Epidemiologia

O cancro é uma das principais causas de morte a nível mundial tendo sido responsável por 7,6 milhões de mortes (13% de todas as mortes) em 2008 (IARC, 2008). O cancro mais prevalente no ano de 2008, a nível mundial foi o do pulmão, sendo responsável também pelo maior número de mortes; o segundo tipo de cancro mais mortal em 2008 foi o cancro do estômago (26,6% mortes), contudo os outros tipos de cancro que existem foram responsáveis por 41,4% da incidência a nível mundial (consultar a figura 2). Nos Estados Unidos da América o cancro foi responsável pela morte de 565644 pessoas no mesmo ano (IARC, 2008).

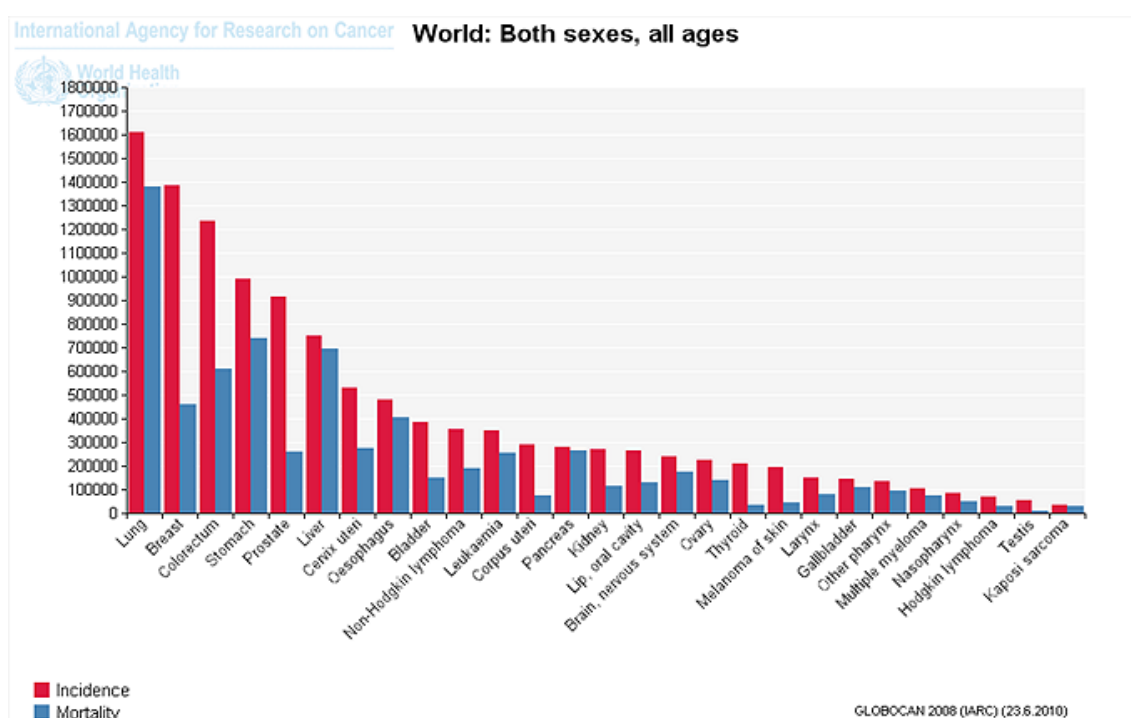


Fig. 2 Incidência e mortalidade por cancro a nível mundial em 2008 (In <http://old.ecco.org.eu/News/Cancer-statistics/World-Cancer-total-chart/page.aspx/367>. [Consultado em 10/07/13].

A nível europeu, segundo dados de 2009, o cancro mata 169 pessoas por cada 100 000 habitantes. Os países mais afetados por esta doença são a Hungria, a Eslovénia, a Republica Checa, a Eslováquia, a Letónia e a Lituânia (Eurostat, 2009).

O cancro com maior taxa de incidência e mortalidade é o cancro da próstata (21,8%), seguindo-se o cancro colo-retal (11,5%) e o cancro do estomago (7,2%), dados estes relativos ao sexo masculino (figura 4). Relativamente às mulheres, o cancro com maior incidência e mortalidade é o cancro da mama (17%), o segundo mais mortal é o cancro colo-retal (13,5%), seguindo-se o cancro do pulmão que tirou a vida a quase 90000 mulheres no ano de 2008, no continente europeu (figura 3) (IARC, 2008).

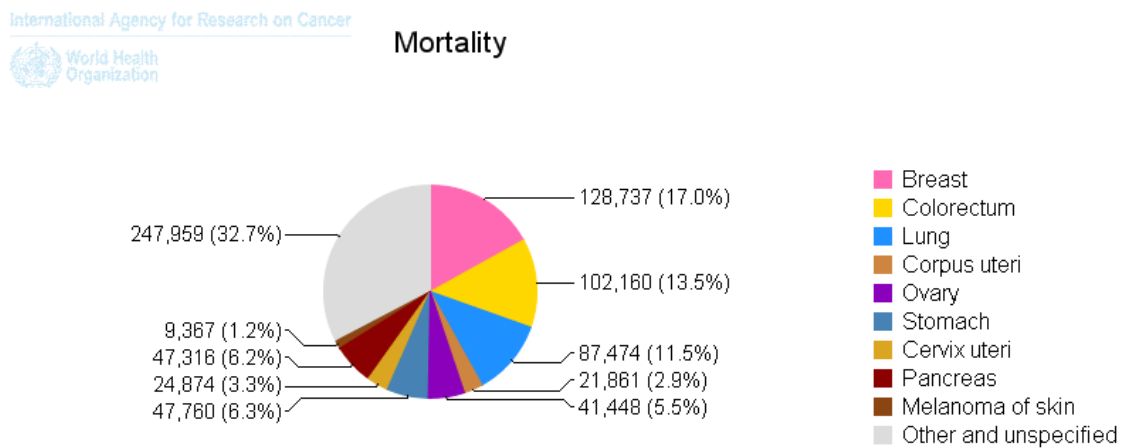


Fig.3 Mortes por cancro em 2008, nas mulheres que viviam no continente europeu (IARC, 2008).

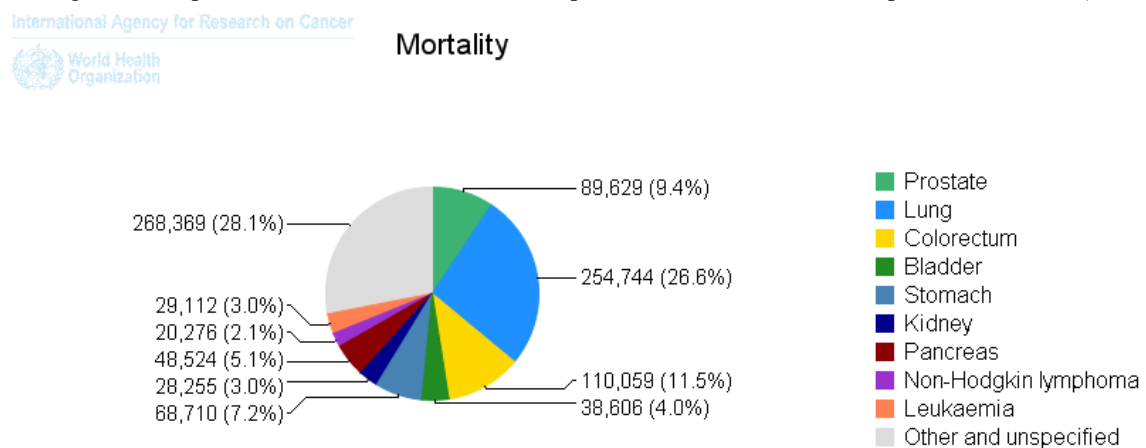


Fig.4 Mortes por cancro em 2008, nos homens que viviam no continente europeu (IARC, 2008).

Em 2008, a nível nacional o cancro matou 156 pessoas por cada 100 000 habitantes; na mulher a neoplasia mais frequente é o cancro da mama (27,2%) e no homem é o da próstata (19,5%), como se pode confirmar na imagem abaixo (figura 5) referente aos tumores mais frequentes entre homens e mulheres (Roreno, 2008).

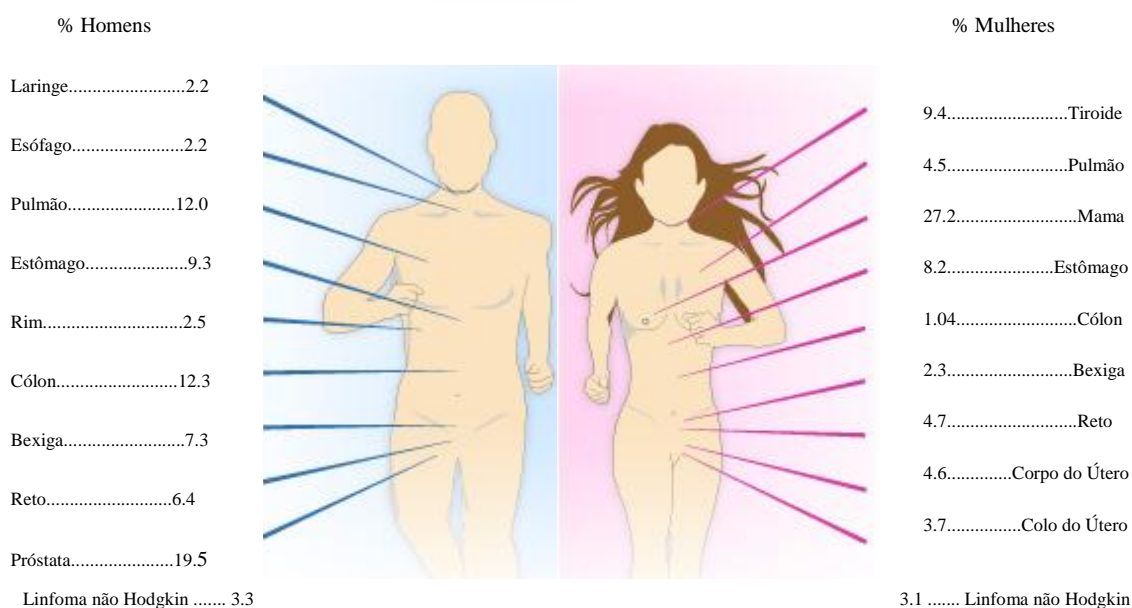


Fig.5 Os tumores mais frequentes no sexo Masculino e Feminino em 2008 (% do N° Total de Casos) (Imagem adaptada Roreno, 2008).

2.3 Fatores de risco

Os fatores de risco aumentam a probabilidade de uma pessoa desenvolver cancro, contudo não significa que uma pessoa estando exposto a um determinado fator de risco vá, no futuro, desenvolver cancro. Este é um tema bastante complexo e de difícil compreensão, pois não se entende porque uma pessoa desenvolve cancro e a outra não, se ambas estiveram sujeitas ao mesmo fator de risco, embora a carga genética de cada indivíduo influencie o seu percurso. Os fatores de risco mais conhecidos e mais comuns são: a idade (envelhecer), o tabaco, a exposição solar, a radiação ionizante, determinados produtos químicos, alguns vírus e bactérias, algumas hormonas, álcool e má alimentação associado à falta de atividade física regular; com o passar do tempo

vários fatores podem agir em conjunto para causar cancro (National Cancer Institute, 2006; Douglas, R., Lowy, M.D., 1996; Ames *et al.*, 1995).

Com o envelhecimento da população, o risco de desenvolver cancro é maior uma vez que grande parte dos cancros ocorre em pessoas com idade superior a 65 anos, porém isto não significa que pessoas mais novas ou mesmo crianças não desenvolvam cancro contudo, é menos provável (National Cancer Institute, 2006; Douglas, R., Lowy, M.D., 1996; Ames *et al.*, 1995). Outro fator extremamente importante é o tabaco e este representa a maior causa evitável de morte. O uso do tabaco ou produtos relacionados com o mesmo aumenta consideravelmente o risco de desenvolver cancro; os fumadores estão mais suscetíveis a desenvolver cancro do pulmão, laringe, boca, esófago e garganta, daí ser essencial a cessação tabágica como método de prevenção (National Cancer Institute, 2006; Douglas, R., Lowy, M.D., 1996; Ames *et al.*, 1995).

A radiação ultravioleta é outro grande fator de risco implicado no cancro. Este fator causa envelhecimento da pele, provocando lesões que podem evoluir para cancro, daí ser extremamente importante limitar o tempo de exposição solar, evitando as horas em que a intensidade solar é maior, utilizar protetores com fator de proteção solar (SPF) de, pelo menos, 30 e utilizar mangas compridas, chapéu e óculos de sol (National Cancer Institute, 2006; Douglas, R., Lowy, M.D., 1996; Ames *et al.*, 1995).

A radiação ionizante também pode causar danos celulares levando ao desenvolvimento de cancro. Esta radiação pode provir do espaço ou resultar de acidentes em centrais nucleares utilizadas para a produção de energia ou armas. As pessoas expostas a este tipo de radiação têm um risco aumentado de desenvolver cancro da tiroide, mama, pulmão e leucemia. A radiação ionizante também é utilizada em procedimentos médicos para obter imagens do interior do corpo, mas nesta situação o risco de desenvolver cancro é extremamente baixo uma vez que a dose utilizada é muito pequena e portanto o benefício supera o risco (National Cancer Institute, 2006; Douglas, R., Lowy, M.D., 1996; Ames *et al.*, 1995).

Estar infetado com determinadas bactérias ou vírus pode aumentar o risco de desenvolvimento de cancro: o vírus do papiloma humano (HPV) é a principal causa de cancro cervical podendo também estar implicado noutros tipos de cancro. Outro vírus muito comum é o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus que causa a SIDA. Os doentes infetados com HIV têm um maior risco de desenvolver cancro, como linfoma

ou mesmo sarcoma de Kaposi. Por outro lado temos as bactérias como a *Helicobacter pylori*, que pode causar úlceras estomacais que podem evoluir para cancro (National Cancer Institute, 2006; Douglas, R., Lowy, M.D., 1996; Ames *et al.*, 1995).

III – Via de sinalização mTOR

A ativação dos recetores de membrana por vários fatores de crescimento envolve a transmissão de um sinal, através do citoplasma, para o núcleo. A modulação de sinal é dependente da ativação de determinados genes e a transmissão deste sinal é realizada através da fosforilação por proteínas chamadas cinases (Cortot *et al.*, 2006).

A proteína mTOR é uma cinase serina/treonina que regula o crescimento celular e desempenha um papel fundamental na regulação da síntese de proteínas (figura 6). Mutações e desregulações nesta via de sinalização estão associadas à tumorigénese, angiogénese, crescimento do tumor e metastização. É importante perceber esta via de sinalização bem como as que interagem com esta, quer a montante do mTOR como a jusante, o processo de ativação do complexo mTOR, as interações moleculares e a sua regulação. A montante do mTOR os principais reguladores de atividade são PI3K/PTEN/AKT e Ras/Raf/MEK/ERK. Esta é uma via com grande potencial terapêutico e o primeiro inibidor do mTOR a ser descoberto foi a rapamicina, porém, devido às suas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas, nomeadamente a sua toxicidade, a sua instabilidade físico-química e a sua baixa biodisponibilidade, foi necessário desenvolver análogos da rapamicina, que possuem estas características melhoradas (Jiang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011; Schenone *et al.*, 2011).

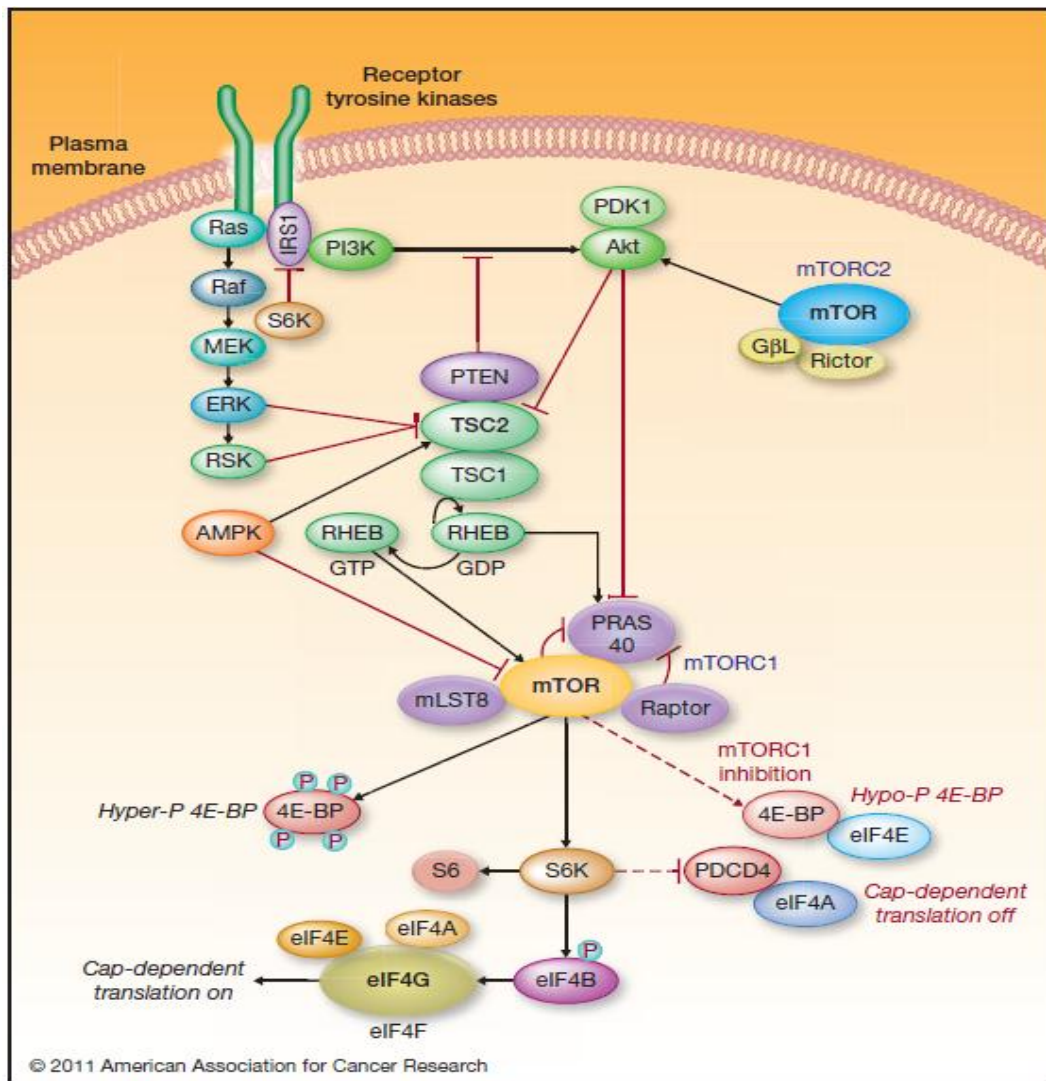


Fig. 6 Via de sinalização mTOR (Korets *et al*, 2011)

3.1 Estrutura do mTOR e ativação

A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), também conhecida como proteína associada à rapamicina (FRAP) foi identificada e clonada após a descoberta dos dois genes da levedura TOR1 e TOR2 (Brown *et al.*, 1994, Chiu *et al.*, 1994, Sabatini *et al.*, 1994). A via do mTOR é fundamental no crescimento e desenvolvimento de células, como é exemplo em moscas da fruta e nêmatodes. A desregulação do gene que codifica o mTOR tem graves consequências para a vida da célula. O mTOR regula funções celulares extremamente importantes, onde estão incluídas a tradução, a transcrição, o volume de mRNA, a estabilidade da proteína e a organização do citoesqueleto (Schenone *et al.*, 2011; Moretti *et al.*, 2007; Inoki *et al.*, 2005). O terminal N do mTOR é incluído por 20 resíduos, que contêm o fator 3 de alongamento e a

subunidade da proteína fosfatase 2A (PP2A). O terminal C é um domínio de transformação e transcrição associado a uma proteína por uma ligação FKPB12. O domínio catalítico da cinase do terminal C tem muita similaridade com o domínio catalítico de PI3K, porém não existem evidências científicas de que exiba atividade lipídica (Falasca *et al.*, 2011; Panwalker *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2008).

O mTOR existe em dois complexos diferentes, o mTORC1 e o mTORC2. O mTORC1 é uma proteína cinase heterotrimérica, constituída por uma subunidade catalítica mTOR e várias proteínas, entre elas, a mLST8, DEPTOR, a PRAS40 e uma proteína associada à regulação celular (RAPTOR). Este complexo é sensível à rapamicina e a sua função está relacionada com a síntese de proteínas. O mTORC2 é constituído pelas proteínas mTOR, Rictor, GβL e mSin1, envolvidas na regulação das funções do citoesqueleto estimulam fibras de actina, paxilina, RhoA, RAC1 e proteína cinase (PKCα). Este complexo não é sensível à rapamicina (Schenone *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2008).

A inativação do complexo esclerose tuberosa 1 (TSC1), também designada harmatina e o complexo esclerose tuberosa 2 (TSC2) ou tuberina, que funcionam como um elemento regulador negativo do mTOR, pode resultar na síndrome do complexo esclerose tuberosa. O heterodímero TSC1-TSC2 é uma GTPase da proteína de ativação Rheb, e é fundamental na ativação do mTORC1 (Gao *et al.*, 2002; Schenone *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2008).

A inativação de certos genes supressores tumorais, como a PTEN, a serina-treonina-cinase 11 (STK11) (também designada como LKB1) ou p53 leva à inibição do complexo TSC1-TSC2, tendo como consequência a ativação da via do mTOR. A inativação ou mutação do PTEN ativa a AKT, que vai fosforilar e inibir o complexo TSC1-TSC2. A perda da STK11 suprime a AMPK (proteína que é ativada por AMP cinase), que geralmente regula uma fosforilação ativante do complexo TSC1-TSC2. O envolvimento do p53 na regulação da via de sinalização mTOR também é extremamente importante; a ativação de p53 é regulada pela ativação de AMPK sob a forma p53-dependente com a consequente ativação do complexo TSC1-TSC2. A ativação de p53 aumenta a expressão dos genes de mRNA, PTEN, e TSC2 e deste modo a inativação de p53 leva à ativação do mTOR pela inibição do complexo TSC1-TSC2 (Feng *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011; Schenone *et al.*, 2011).

3.2 Sinalização "upstream" do mTOR

3.2.1 PI3K/AKT

PI3K

A PI3K é uma enzima lipídica heterodimérica composta por uma subunidade catalítica e uma subunidade reguladora/adaptadora. No Homem existem 8 formas divididas em três classes (I,II e III) de acordo com a homologia da sequência e preferência do substrato (Engelman *et al.*, 2006; Cortot *et al.*, 2006).

A subunidade reguladora/adaptadora é representada pela enzima p85d e a combinação destas duas subunidades forma um complexo heterodimérico. Enzimas do grupo Ia são capazes de se ligarem a proteínas fosforiladas bem como sequências que contêm a proteína tirosina (Engelman *et al.*, 2006; Cortot *et al.*, 2006).

Uma função da PI3K é fosforilar o fosfoinositol, o que resulta na formação de lípidos tais como o Pi3-Fosfato [Pi(3)P], PI3,4-bifosfato [Pi(3,4)P₂] e Pi3,4,5 trifosfato [PiP₃(3,4,5)]. Estes lípidos estão envolvidos em vários processos intracelulares, incluindo a proliferação, a sobrevivência da célula, a reorganização do citoesqueleto, o transporte de membrana, adesão celular, motilidade celular, angiogénese e ação da insulina; o PiP₃ (3,4,5) é o lípido principal produzido *in vivo* e duas fosfatases diferentes são capazes de degradar este lípido, as fosfatases Src (SHIP1) e a fosfatase PTEN (Engelman *et al.*, 2006; Cortot *et al.*, 2006).

A PI3K e a PTEN são proteínas implicadas na perda de sensibilidade à insulina de tumores cancerígenos. Mutações no gene que codifica a PTEN são verificadas em algumas doenças benignas congénitas (ex: Cowden, Bannayan Zonana), bem como em vários tumores (ex: mama, melanoma, próstata, rim, ovário, endométrio) enfatizando o papel da PTEN e consequentemente do PI3K na carcinogénese (Cortot *et al.*, 2006). Alterações a nível da PTEN (mutações de inativação), estão implicadas no cancro da próstata, do colon, mama, tiroide, rim, linfomas, melanomas e glioblastomas (Cortot *et al.*, 2006).

PDK1

A proteína cinase fosfatidilinositol-3-dependente 1, é uma proteína-cinase e é a última a interagir com o PiP3 (3,4,5). Tem a capacidade de fosforilar as cinases T. Algumas destas cinases requerem uma interação da membrana através de domínios PH (Cortot *et al.*, 2006; Falasca *et al.*, 2011; Vanhaesebroeck *et al.*, 2010).

AKT

A AKT ou proteína-cinase ou B é uma cinase serina/treonina com homologia para o oncogene V-AKT-AKT8. Existem três tipos (AKT 1,2,3), cada um codificado por um gene diferente e a sua expressão varia, sendo a AKT2 mais abundante nos tecidos sensíveis à insulina. A expressão de AKT1 e 3 não compensa a perda de AKT2 (Cortot *et al.*, 2006; Falasca *et al.*, 2011; Vanhaesebroeck *et al.*, 2010).

A proteína AKT está envolvida na sobrevivência celular a vários níveis, incluindo a ativação de mTOR, inibindo a GSK3 (sintetase cinase glicogénio 3), provocando um aumento dos níveis de β -catetina, ou inibindo a proteína BAD que se encontra envolvida no processo apoptótico (Cortot *et al.*, 2006; James *et al.*, 1996).

Anomalias ao nível da AKT, nomeadamente a sua amplificação, estão envolvidas no cancro da próstata, ovário e da mama, em seres humanos, e linfomas em ratinhos (Cortot *et al.*, 2006).

A AKT é a molécula sinalizadora mais estudada a jusante da PI3K. A ativação da AKT é responsável pelas alterações na atividade nuclear do fator KB, alterações no fator relacionado com a hipoxia e alterações nos fatores de transcrição o que resulta numa modificação do ciclo celular e inibição da apoptose. A AKT aparece frequentemente ativada nos tumores do pâncreas, representando um indicador biológico da agressividade tumoral (figura 7) (Falasca *et al.*, 2011; James *et al.*, 1996).

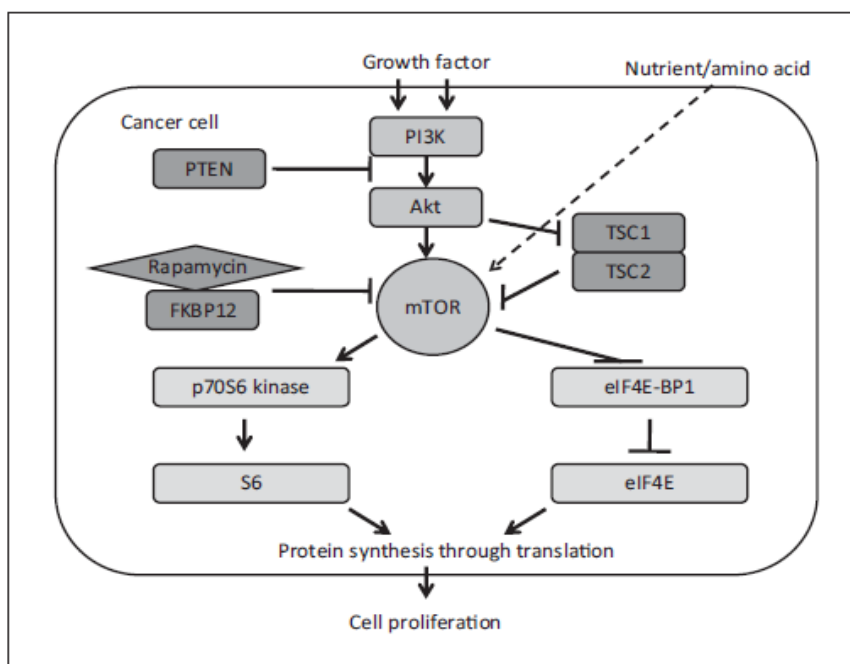


Fig.7 Via de sinalização PI3K/AKT/mTOR (Kudo, 2011).

3.2.2 Vias proximais ao mTOR

3.2.2.1 Ras/RAF/MEK/ERK

A via Ras/Raf/MEK/ERK é ativada por muitos fatores de crescimento e citocinas, que são importantes para a proliferação celular e apoptose. Esta via tem como alvo o complexo TSC2, uma vez que o Ras ativado induz a fosforilação da TSC2, funcionando como um “interruptor” para importantes oncoproteínas. A molécula Ras ativa a Raf cinase, depois de estimulada por fatores de crescimento, hormonas ou citocinas. A Raf pertence a uma família de multigenes que consiste em RAF1, Araf e BRAF, que codificam proteínas de 74, 68 e 94 Kda, respetivamente (Roux *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2008).

A Raf fosforila a MEK que ativa a ERK e esta, por sua vez fosforila substratos citosólicos e nucleares essenciais para a regulação da expressão, metabolismo e rearranjos do citoesqueleto. O Ras e Raf aparecem geralmente mutados em cancros humanos nomeadamente mutações ao nível do Ras associam-se ao cancro do pâncreas, da tiroide, cólon, pulmão, bexiga e mama. Existem três isoformas de Raf em mamíferos: A-Raf, B-Raf, C-Raf, contudo a mais importante e que aparece mais frequentemente

mutada é o B-Raf; mutações ao nível desta isoforma foram encontradas em 27-70% dos casos de melanomas humanos, 36-53% dos cancros da tiroide e 30% dos cancros do ovário (Jiang *et al.*, 2008; Shubbert *et al.*, 2007).

3.2.2.2 AMPK e outras moléculas

Os nutrientes representam um importante papel regulador da atividade do mTOR. Uma escassez de aminoácidos tem como consequência uma rápida desfosforilação de 4EBP1 e p70S6K1 e por outro lado, uma grande quantidade de aminoácidos restaura rapidamente a fosforilação de 4EBP1 e p70S6K1 de uma forma dependente do mTORC1. Os nutrientes também podem regular a atividade do mTOR através da produção de energia sob a forma de ATP. O AMPciclo tem interferência na atividade da proteína cinase (AMPK) podendo ser regulado através do nível de energia celular; quando existe uma privação de nutrientes há um desequilíbrio ao nível do AMP destabilizando a atividade da AMPK. A AMPK ativada pode por sua vez fosforilar a TSC2 em múltiplos sítios que levam à inativação do mTOR (Hay, Sonenberg, 2004; Jiang *et al.*, 2008; Inoki *et al.*, 2003).

Fatores ambientais, como a hipoxia e radiações, também podem interferir com a atividade do mTOR. O fator induzível de hipoxia (HIF-1) atua a montante da TSC inibindo a síntese de mTOR. Danos a nível do DNA podem inibir a via de sinalização do mTOR, uma vez que podem interferir com a expressão de p53 e a ativação de AMPK (Jiang *et al.*, 2008; Tsang *et al.*, 2007).

3.3 Sinalização "downstream" do mTOR

Como já referido anteriormente, o mTOR tem um papel central na síntese de proteínas, evolução do ciclo celular e sobrevivência celular. O mTORC1 regula o crescimento celular por meio de reguladores de tradução como 4EBP1 e p70S6K1.

3.3.1 4EBP1

A 4EBP1 atua como um repressor da translação, inibindo a tradução do mRNA por ligação e inativação de eIF4E. O mTOR fosforila diretamente e inibe a atividade da 4EBP1, podendo também, indiretamente inibir a fosfatase da proteína, que por sua vez desfosforila 4EBP1 durante as etapas do ciclo celular G1 para S. O eIF4E é um fator de

iniciação, que é ativado por vários estímulos mutagênicos. A fosforilação do 4EBP1 conduz à libertação de eIF4E, permitindo deste modo o início da tradução. O eIF4E aumenta a proliferação, sobrevivência celular e angiogenese, levando à tradução de mRNA que codifica para proteínas tais como a ciclina D1, Bcl-2 e Bcl-x1 (Sonenberg, Gingras, 1998; Ciuffreda *et al.*, 2010).

Este processo sofre regulação através da proteína RAPTOR, pois quando esta está presente no complexo mTOR, este fosforila eficientemente tanto o 4EBP1 como o p70S6K1, contudo quando a RAPTOR está ausente existe uma diminuição da capacidade do mTOR fosforilar os seus substratos. Estudos recentes afirmam que a formação do complexo entre mTOR e RAPTOR é essencial para a função do mTOR (Inoki *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2008).

3.3.2 p70S6K1

A cinase p70S6K1 é outra importante efetor a jusante do mTOR, podendo também ser ativada por PDK1 e MAPK. O mTOR fosforila p70S6K1 conduzindo deste modo à recolha de subunidades 40S dos ribossomas aumentando consequentemente a tradução de mRNAs que codificam proteínas ribossomais, fatores de alongamento e fator de crescimento da insulina (Jiang *et al.*, 2008, Dennis *et al.*, 1996; Faivre *et al.*, 2006).

Existem pelo menos três locais onde pode ocorrer fosforilação da p70S6K1, e todos eles podem ser bloqueados por inibidores do mTOR. A fosforilação da p70S6K1 é fundamental porque leva à substituição deste resíduo por blocos de alanina e à consequente ativação da cinase. O mTOR pode bloquear a serina/treonina fosfatase que vai desfosforilar locais na p70S6K1 que são sensíveis à rapamicina. Isto explica o porquê da p70S6K1 sofrer uma desfosforilação rápida quando as células são tratadas com inibidores do mTOR. O p70S6K1 tem como alvos proteínas ribossomais e fatores de crescimento de insulina (Jiang *et al.*, 2008; Faivre *et al.*, 2006).

4 mTOR e cancro

A via em que o mTOR se encontra inserido é frequentemente ativada em cancros humanos, estudos demonstram claramente que mutações a nível do crescimento celular ou metabolismo contribuem significativamente para o desenvolvimento de tumores (Yecies, Manning, 2011; Cornu, 2012). A obesidade e a diabetes são fatores de risco, uma vez que está provada uma relação entre estes fatores metabólicos e o crescimento tumoral, o que significa que os hábitos de vida, nomeadamente a alimentação errada e o sedentarismo, podem ter um papel preponderante no desenvolvimento desta grave e preocupante patologia, ex: muitas vezes, a esteatose pode evoluir para carcinoma hepatocelular. Um estudo recente realizado em camundongos demonstra a ligação entre o mTOR e o metabolismo, uma vez que um mTORC1 hiperativo leva a alterações metabólicas, que incluem defeitos na glucose e lípidos que posteriormente pode progredir para carcinoma hepatocelular (Cornu, 2012).

Alterações na via PI3K/mTOR associam-se a cancro através de diferentes e complexos mecanismos que incluem amplificação ou hiperactivação de proto-oncogenes, tais como: Ras, PI3K, AKT, recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), HER2/neu, BCR-Ab ou perda da função dos genes supressores tumorais nomeadamente, PTEN, TSC, LBK (Schenone *et al.*, 2011).

Como referido anteriormente, o mecanismo de regulação do mTOR, em células, é realizado através da via PI3K/AKT mas também recebe sinais de múltiplas vias de ativação/sinalização AKT independentes, que incluem vias de mitogene-responsiva; o mTOR também pode ser ativado em resposta a situações de hipoxia, pelo baixo nível de nutrientes, por fosfolipase D ou por ação do ácido fosfatídico (Schenone *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2008).

A desregulação da via PI3K/AKT/mTOR leva ao descontrolo do crescimento celular, proliferação e evasão da apoptose, especialmente, em neoplasias malignas (Schenone *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2008):

- Níveis aumentados de fosforilação dos alvos a jusante foram relatados em diversos tumores e estão relacionados diretamente com a agressividade e prognóstico.

- Proteínas que interagem com o mTOR; com atividade de tirosina cinase, estão amplificados no tumor gastrointestinal, fígado, pâncreas bem como pulmão.
- A PTEN encontra-se inativada/reduzida em gliomas, melanomas, cancro da próstata e cancro da mama.
- A proteína TSC está mutada no cancro da bexiga.
- A cinase de ligação ao GTP K-Ras está mutada no cancro da bexiga (Schenone *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2008).

Além disso muitos componentes da via PI3K/AKT/mTOR apresentam-se mutados e desregulados em carcinomas de células renais (CCR), incluindo IGF-1, IGFIR, PTEN, TSC e VHL (proteína Van Hippel-Lindau) (Schenone *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2008).

O mTOR regula também a tirosina cinase BCR-Ab citoplasmática, proteína de fusão codificada pelo cromossoma de Filadélfia que é o agente etiológico da Leucemia Mieloide Crónica (LMC), onde a ativação da via PI3K/AKT/mTOR é crucial para a sobrevivência e proliferação celular (Schenone *et al.*, 2011).

5 Inibidores do mTOR e seletividade tumoral

Como já foi referido a via de sinalização mTOR está desregulada em muitos tipos de tumores, daí a necessidade de se identificarem alvos com potencial terapêutico e desenvolver novos fármacos para a sua inibição (Schenone *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2008).

Atualmente, sabe-se que o mTOR funciona em dois complexos mTORC1 e mTORC2, sendo os análogos da rapamicina seletivos para o mTORC1 e tendo já demonstrado eficácia clínica. Contudo tem vindo a surgir novas classes de inibidores do mTOR para combater as deficiências dos primeiros inibidores a surgir no mercado. Uma dessas novas gerações de fármacos são os inibidores competitivos ATP-cinases, que competem com o ATP no sítio catalítico do mTOR e inibem tanto o mTORC1 como o mTORC2 (Zhang *et al.*, 2011). Embora os análogos da rapamicina demonstrem eficácia clínica em alguns subtipos de cancro é necessário explorar todo o potencial anti tumoral da via mTOR de maneira a desenvolver novos fármacos (Zhang *et al.*, 2011).

5.1.1 Rapamicina

A rapamicina (Fig.8) é uma lactona macrocíclica, produzida por *Streptomyces hygroscopicus*, inicialmente desenvolvida como um agente antifúngico, contudo, posteriormente, descobriu-se que possuía propriedades imunossupressoras. Foi o primeiro inibidor do mTOR a ser descoberto, e, em 1999, foi aprovado pela FDA como uma molécula imunossupressora (Vézina *et al.*, 1975; Zhou *et al.*, 2010).

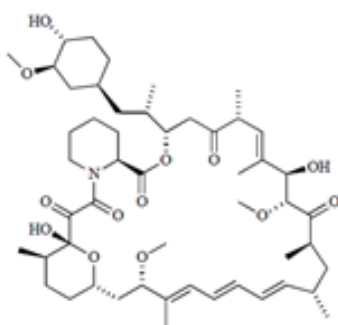


Fig.8 Estrutura química da rapamicina (WU *et al.*, 2010).

A rapamicina entra nas células e liga-se ao recetor intracelular FKBP12 formando um complexo inibidor. Este complexo liga-se à região C terminal de proteínas denominadas TOR FRB, onde exerce o seu efeito citotóxico, inibindo deste modo as funções de sinalização TOR para alvos a jusante. O mecanismo de ativação da rapamicina ainda não se encontra totalmente esclarecido, mas estudos recentes propõem que o complexo rapamicina FKBP12 pode inibir a função mTOR pela inativação da proteína RAPTOR, impedindo que esta se ligue ao mTORC1 (Oshiro *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2010).

A rapamicina inibe a proliferação celular em diferentes linhagens celulares derivadas de rabiomiossarcoma, neuroblastoma, glioblastoma, melanoma, cancro do pulmão e da próstata, provando que a rapamicina tem efeito sobre diferentes tipos de cancros. A inibição do mTOR pela rapamicina suprime a hipoxia provocada pela angiogenese e pela proliferação de células endoteliais. A inibição da angiogenese e da proliferação celular está relacionada com uma diminuição da produção do fator de crescimento endotelial vascular (VeGF). Por outro lado, a rapamicina induz também apoptose nos casos de rabiomiossarcoma, através da inibição do mTOR (Hosoi *et al.*, 1999; Humar *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2010).

A rapamicina apresenta como grandes desvantagens a sua fraca solubilidade em água e a sua baixa estabilidade físico-química, daí que para contrariar estas limitações surgiram os seus análogos com propriedades farmacocinéticas melhoradas. Existem inúmeras moléculas análogas em estudos pré-clínicos e clínicos de modo a avaliar o seu efeito imunossupressor (Zhou *et al.*, 2010; Guba *et al.*, 2002).

5.1.2 Análogos da rapamicina

Um dos exemplos destas moléculas é o temsirolimus (Fig.9), que é um éster do ácido di-hidroximetil-propiónico da rapamicina; foi desenvolvido para aumentar a solubilidade da rapamicina e deste modo pode ser administrado por via oral e por via intravenosa. O temsirolimus atua inibindo a fosforilação do mTOR ao nível de S6K1 e 4E-BP1, diminuindo deste modo a expressão de várias proteínas chave envolvidas na regulação do ciclo celular. Em modelos tumorais animais, o temsirolimus sozinho ou em combinação com outros fármacos quimioterapêuticos, demonstrou uma atividade

anti tumoral significativa em gliomas, cancro da cabeça, pescoço e pâncreas (Zhou *et al.*, 2010; Dudkin *et al.*, 2001; Ekshyyan *et al.*, 2009; García-Echeverría, 2010).

Outro exemplo desta categoria, é o deforolimus (Fig.9), um análogo da rapamicina que foi desenvolvido com base em estudos de modelação computacional. Em comparação com a rapamicina, o deforolimus possui melhores propriedades farmacológicas e farmacocinéticas como a solubilidade aquosa, melhor estabilidade físico-química e maior biodisponibilidade. O deforolimus sozinho ou em combinação com outros agentes quimioterapêuticos demonstrou potentes efeitos inibidores sobre a proliferação de diversas linhas celulares (ex: mononucleares) e em diversos cancros, através da diminuição da fosforilação da 4E-BP1. O deforolimus é bem tolerado quando administrado por via oral apresentando boa atividade anti tumoral (Zhou *et al.*, 2010; Mita *et al.*, 2008).

O sucesso clínico dos análogos da rapamicina tem sido limitado a alguns cancros raros e as taxas de resposta em grandes tumores, utilizando unicamente rapamicina ou seus análogos, têm sido modestas. Apesar destas moléculas atuarem como inibidoras parciais do mTOR, é cada vez mais reconhecido que este mecanismo é insuficiente na obtenção de um efeito anticancerígeno extenso e potente, quando usados sozinhos, por conseguinte vão surgindo no mercado, novas classes de inibidores (Shor *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011; García-Echeverría, 2010).

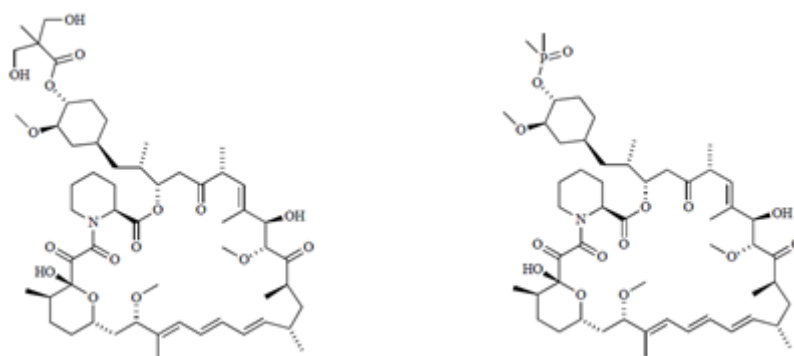


Fig.9 Estruturas químicas do temsirolimus e do deforolimus – (WU *et al.*, 2010).

5.1.3 Inibidores competitivos ATP-cinase

Uma classe de inibidores que tem grande interesse são os inibidores competitivos ATP-cinase. São moléculas que ainda se encontram em estudo contudo o primeiro conjunto

de inibidores já se encontra em ensaios clínicos. Atualmente, sabe-se que o mTORC2 também está envolvido no crescimento de células cancerosas e sobrevivência das mesmas, logo são necessários fármacos que inibam simultaneamente os complexos mTORC1/2 (Zhang *et al.*, 2011; Blaser *et al.*, 2012; García-Echeverría, 2010).

O desenvolvimento de novos fármacos capazes de inibir o mTOR por um mecanismo diferente da rapamicina representa uma abordagem mais eficaz contornando os problemas que estão relacionados com a utilização dos análogos da rapamicina, uma vez que só inibem o mTORC1. As moléculas deste grupo caracterizam-se por serem moléculas pequenas orientadas para o domínio cinase, com um mecanismo competitivo-ATP capaz de inibir os dois complexos mTORC1/2 conduzindo deste modo a um efeito inibitório mais potente, e representando uma alternativa mais eficaz e eficiente à tradicional, para o tratamento de cancro. As primeiras moléculas a surgir foram a PP242 e PP30 (Fig.10). Estas moléculas, a nível químico, são pirazolo [3,4-d] piridina, possuindo um grupo NH₂ no carbono 4 e dois substituintes heterocíclicos diferentes no carbono 3. Nos primeiros ensaios clínicos revelaram uma grande seletividade, um forte efeito inibitório sobre o crescimento celular bem como no avanço do ciclo celular. Estes efeitos inibitórios são conseguidos através da inibição da fosforilação da p70S6K1 bem como da 4E-BP1 (Zhang *et al.*, 2011; García-Echeverría, 2010; Schenone *et al.*, 2011).

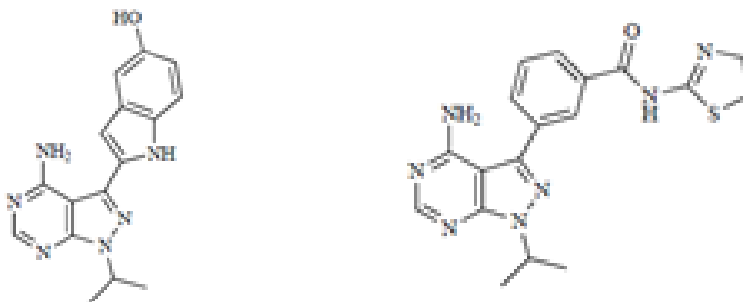


Fig.10 Estruturas químicas do PP242 e do PP30 (Schenone *et al.*, 2011).

5.1.4 Inibidores seletivos mTORC1/2

Recentemente surgiu uma nova geração de inibidores do mTOR específicos para a cinase, e por bloquearem ambos os complexos do mTOR foram designados inibidores duplos mTORC1/2. Entre estas moléculas encontram-se o INK128, AZD8055 e o AZD2014 que entraram recentemente em ensaios clínicos. Estes compostos são mais

eficazes do que a rapamicina na citorredução e indução da apoptose, em leucemias. O INK128 (Fig.11), administrado por via oral, é extremamente potente e seletivo, inibindo deste modo a angiogénese bem como o crescimento tumoral em vários cancros e encontra-se na fase I dos ensaios clínicos. O AZD8055 (Fig.4) é outro inibidor administrado por via oral que se encontra na Fase II dos ensaios clínicos, mais direcionado para o carcinoma hepatocelular em estado avançado (García-Echeverría, 2010; Zhang *et al.*, 2011).

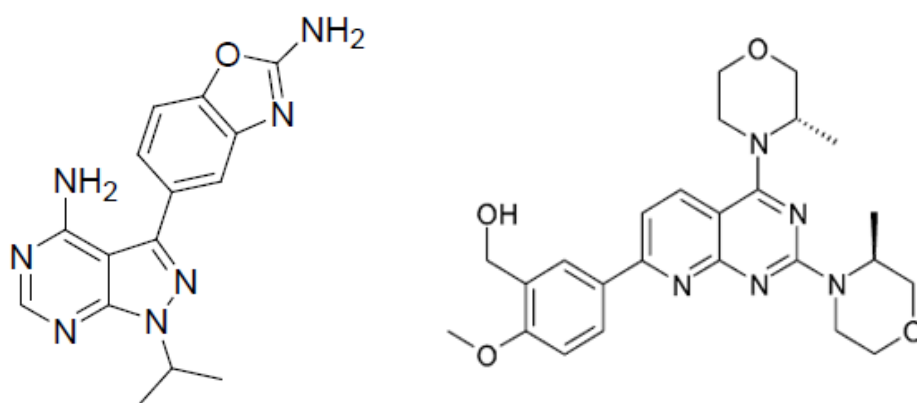


Fig.11 Estruturas químicas do INK128 e do AZD8055 (Zhang *et al.*, 2011).

5.1.5 Inibidores derivados de produtos naturais

Estudos recentes têm provado que derivados de produtos naturais, nomeadamente a curcumina, o resveratrol, epigallocatequina galato (EGCG) e a cafeína, podem direta ou indiretamente inibir a via do mTOR. O EGCG (Fig.12) é um polifenol existente no chá verde, com um forte poder antioxidante, podendo ser utilizado no tratamento de várias doenças nomeadamente no cancro. Este efeito está dependente da dose porém na dose correta reduz a fosforilação de AKT, p70S6K e 4E-BP1, originando uma diminuição na tradução do mRNA (Zhou *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2006).

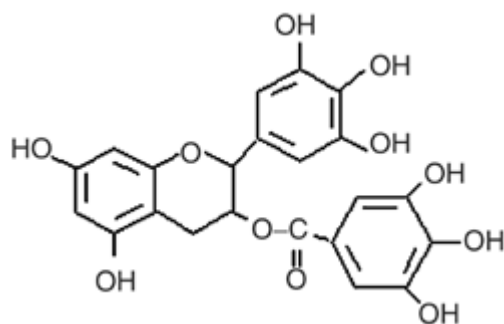


Fig.12 Estrutura química do EGCG (Bigelow *et al.*, 2006).

O resveratrol é um flavonóide polifenólico existente nas uvas e vinho tinto, com um grande potencial antioxidante, anti-inflamatório e anticancerígeno. O resveratrol em combinação com a rapamicina, inativa a via do mTOR conduzindo à morte células de glioma. Foi descrito recentemente que o resveratrol atua também no cancro da mama, uma vez que inibe a 4E-BP1 e conseqüentemente diminui a tradução do mRNA (figura 13) (Marques *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010).

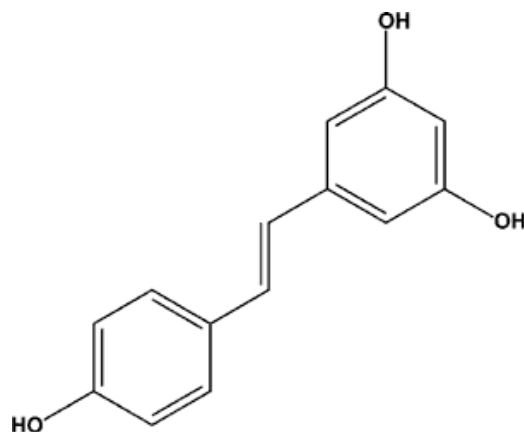


Fig.13 Estrutura química do Resveratrol (In. <http://www.wiley.com/legacy/college/boyer/0471661791/cutting_edge/resveratrol/resveratrol.htm>. [Consultado em 27/03/13].

Por último, a curcumina (figura 14) que é um polifenol isolado do rizoma da Curcuma, apresenta um grande poder antiproliferativo que pode ser utilizado para inibir o mTOR. Estudos têm evidenciado que a curcumina inibe o crescimento de uma grande variedade de células cancerígenas induzindo a apoptose. A curcumina inibe a fosforilação do mTOR e dos seus alvos a jusante nomeadamente a p70S6K e 4E-BP1. Recentemente,

conclui-se que a curcumina é capaz de dissociar o RAPTOR do mTOR conduzindo desta forma à inativação do mTORC1 (Johnson *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010).

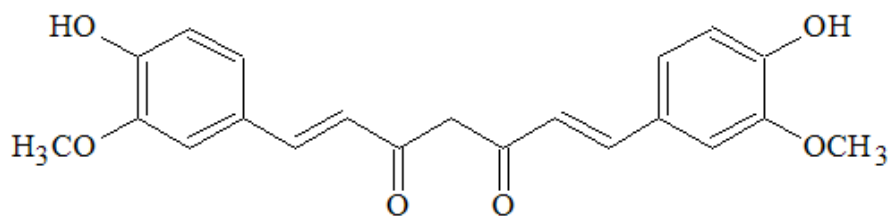


Fig.14 Estrutura química da Curcumina (In. <<http://www.curcumina.it/>>. [Consultado em 27/03/13].

5.2 Potenciais inibidores do mTOR

5.2.1 Composto 28 (XL 388)

Um grupo de investigadores analisou várias moléculas, partindo da estrutura da benzoxazepina, estrutura esta que sofreu várias modificações dando origem a possíveis inibidores do mTOR; de entre os vários foi selecionado o composto 28 (figura 15) como sendo o mais promissor (Takeuchi *et al.*, 2013).

O composto 28 (XL 388) é um bezimidazolo aminopiridina selecionado uma vez que reunia o perfil farmacocinético e farmacodinâmico mais favorável. Não é o composto mais ativo nem o mais seletivo nos ensaios bioquímicos e celulares, contudo demonstra propriedades físico-químicas e um perfil ADME (absorção, distribuição, metabolização e excreção) muito promissor (Takeuchi *et al.*, 2013).

Analisando os ensaios *in vitro* e *in vivo*, juntamente com o perfil ADME mais favorável, a bioquímica e o potencial celular, o composto 28 foi sugerido como um possível inibidor seletivo do mTOR ou ATP-competitivo viável (Takeuchi *et al.*, 2013).

Foi avaliado o poder antitumoral, sobre a via de sinalização do mTOR, em ratinhos portadores de tumores PC-3 da próstata, administrando este composto por via oral, a uma concentração de 100mg/kg. A rapamicina foi utilizada como composto de referência, com administrações via intraperitoneal de 5mg/kg. As amostras foram sendo recolhidas em períodos de tempo regulares, obtendo-se uma forte inibição do mTORC1 bem como do mTORC2, e uma diminuição drástica dos níveis de fosforilação ao fim de

16 horas nos ratinhos tratados com o composto 28; a rapamicina obteve uma forte inibição dos biomarcadores do complexo mTORC1, porém não obteve qualquer efeito sobre o mTORC2, como já era previsível (Takeuchi *et al.*, 2013).

Utilizando novamente os mesmos compostos, mas testando em ratinhos portadores de tumores MCF-7, o composto 28 inibiu (85% - 96%) a fosforilação do mTORC1 bem como do mTORC2, efeito conseguido ao fim de 1 hora, sendo mantido após 8 horas (Takeuchi *et al.*, 2013).

É um composto com grande eficácia antitumoral, uma vez que resultou na inibição de células tumorais MCF-7, com regressão significativa do tumor, 22% para uma concentração de 50mg/kg e 40% para concentração de 100mg/kg, além de que apresenta uma baixa toxicidade (Takeuchi *et al.*, 2013).

Em suma, o composto 28 inativa os dois complexos do mTOR e seus substratos, demonstrando propriedades farmacocinéticas muito favoráveis, necessitando de uma baixa concentração de inativação aliada a uma excelente seletividade, tendo como grande vantagem o fato de ser administrada por via oral. De entre os vários compostos analisados, o composto 28 foi o selecionado para ser submetido a avaliação pré-clínica (Takeuchi *et al.*, 2013).

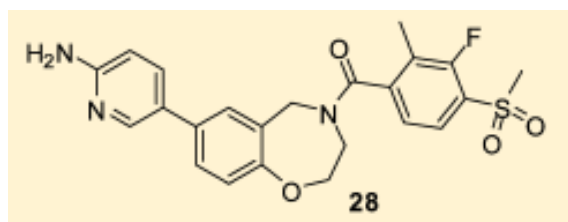


Fig. 15 Estrutura química do composto 28 (XL 388) (Takeuchi *et al.*, 2013).

5.2.2 O potencial das biguanidas (metformina)

As biguanidas foram desenvolvidas para o tratamento da hiperglicemia e diabetes tipo 2 sendo vendidas, atualmente, cerca de 120 milhões de fármacos desta classe, a nível mundial. A metformina (figura 16) é o fármaco desta classe mais prescrito em todo o mundo e, recentemente tem surgido como um potencial agente anticancerígeno. A

capacidade da metformina para diminuir a insulina circulante pode ser particularmente importante para o tratamento de cânceros que estão associados com hiperglicemia, como o cancro da mama e do colon (Sahra *et al.*, 2010; Dowling *et al.*, 2011).

Inúmeros estudos mostram uma diminuição da incidência de cancro e mortalidade em pacientes diabéticos que receberam metformina como terapêutica. Um estudo recente envolvendo 2529 mulheres com cancro da mama demonstraram taxas de resposta mais elevada em doentes diabéticos tratados com metformina (obtiveram 24%) em contraste com os 8% dos pacientes que não receberam metformina. Contudo, apesar do aumento da taxa de resposta, a metformina não melhorou a sobrevida, livre de recidiva. Um estudo semelhante elaborado em pacientes diabéticos com cancro da próstata não obteve, no entanto, os mesmos resultados (Sahra *et al.*, 2010; Dowling *et al.*, 2011).

Neste sentido, surge a necessidade de confirmar o benefício da utilização da metformina em patologias oncológicas. Um estudo recente, utilizando doses baixas de metformina (250 mg/dia), confirmou a diminuição de focos de criptas aberrantes (um marcador para cancro colorrectal) e diminuição da atividade proliferativa do epitélio do colon em pacientes não diabéticos (Sahra *et al.*, 2010; Dowling *et al.*, 2011).. Os últimos estudos que envolvem a metformina no tratamento de pacientes com cancro da mama têm demonstrado que a metformina é segura e bem tolerada pelos pacientes, exibindo efeitos satisfatórios sobre o metabolismo da insulina, proliferação de células tumorais e apoptose (Sahra *et al.*, 2010; Dowling *et al.*, 2011).

Os efeitos anticancerígenos da metformina estão associados com a ativação da AMPK, reduzindo a estimulação do mTOR e a síntese de proteínas. A diminuição do EGFR, Src e proteína cinase ativada leva a uma diminuição da expressão das ciclinas e aumento da expressão de p27. A metformina também tem capacidade de induzir a apoptose em certas linhas celulares derivadas de cânceros endometriais, glioma e cancro da mama triplo negativo, subtipo de cancro da mama que se caracteriza por não apresentar recetores de estrogénio, progesterona e HER2; contudo este efeito não se verifica em todas as células (Sahra *et al.*, 2010; Dowling *et al.*, 2011).

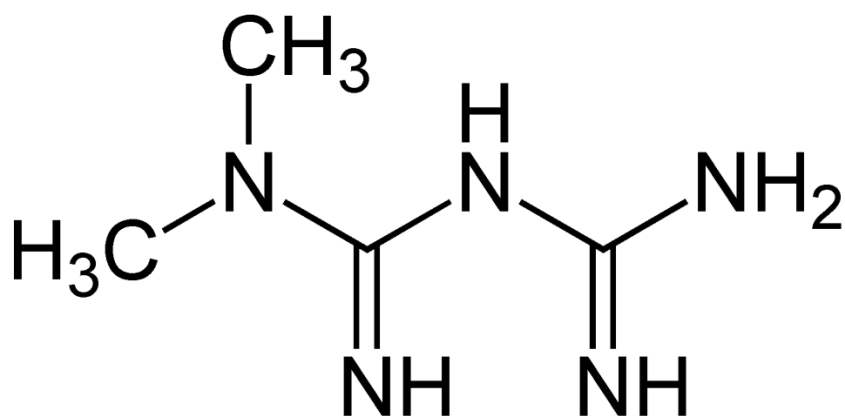


Fig.16 Estrutura química da Metformina (In. <http://alzheimeravancos.blogspot.pt/2011/01/coquetel-de-baixo-custo-pode-prevenir.html>. Consultado em 8-6-2013).

Indiretamente, os efeitos da metformina associam-se à capacidade da AMPK para inibir a transcrição de genes envolvidos na gluconeogenese, que consiste na captação de glicose pelo músculo, reduzindo deste modo a glicose no sangue bem como a insulina. Nas células tumorais são encontrados, frequentemente, um elevado número de recetores da insulina indicando um potencial crescimento tumoral por estimulação desta hormona, consequentemente a metformina pode diminuir os efeitos prejudiciais da insulina sobre o crescimento e desenvolvimento do cancro (Sahra *et al.*, 2010; Dowling *et al.*, 2011).

Em ensaios realizados em mulheres não-diabéticas com cancro da mama, a metformina reduziu em 22% os níveis de insulina circulante e melhorou em 25% a sensibilidade das mesmas à insulina, sendo este um potencial mecanismo de tratamento em pacientes com cancro da mama (Sahra *et al.*, 2010; Dowling *et al.*, 2011).

A metformina, como referido atrás, ativa diretamente a AMPK que leva a uma redução na sinalização do mTOR e síntese de proteínas, em células cancerosas. A inibição do mTOR leva a uma redução da fosforilação das proteínas a jusante nomeadamente do 4E-BP1 e do p70S6K levando consequentemente a uma inibição da síntese e da proliferação de diferentes linhagens celulares tumorais (figura 17) (Sahra *et al.*, 2010; Dowling *et al.*, 2011).

A eficácia terapêutica, a segurança, as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas bem caracterizadas e o baixo custo da metformina fazem dela um candidato ideal para o seu desenvolvimento como um fármaco antineoplásico. Contudo,

é necessário perceber melhor o mecanismo de ação da metformina, os seus efeitos diretos e indiretos, identificar os pacientes alvos, diabéticos ou não-diabéticos, de modo a poder organizar ensaios pré-clínicos e clínicos e desenvolver um fármaco eficaz e seguro para a terapêutica oncológica (Sahra *et al.*, 2010; Dowling *et al.*, 2011).

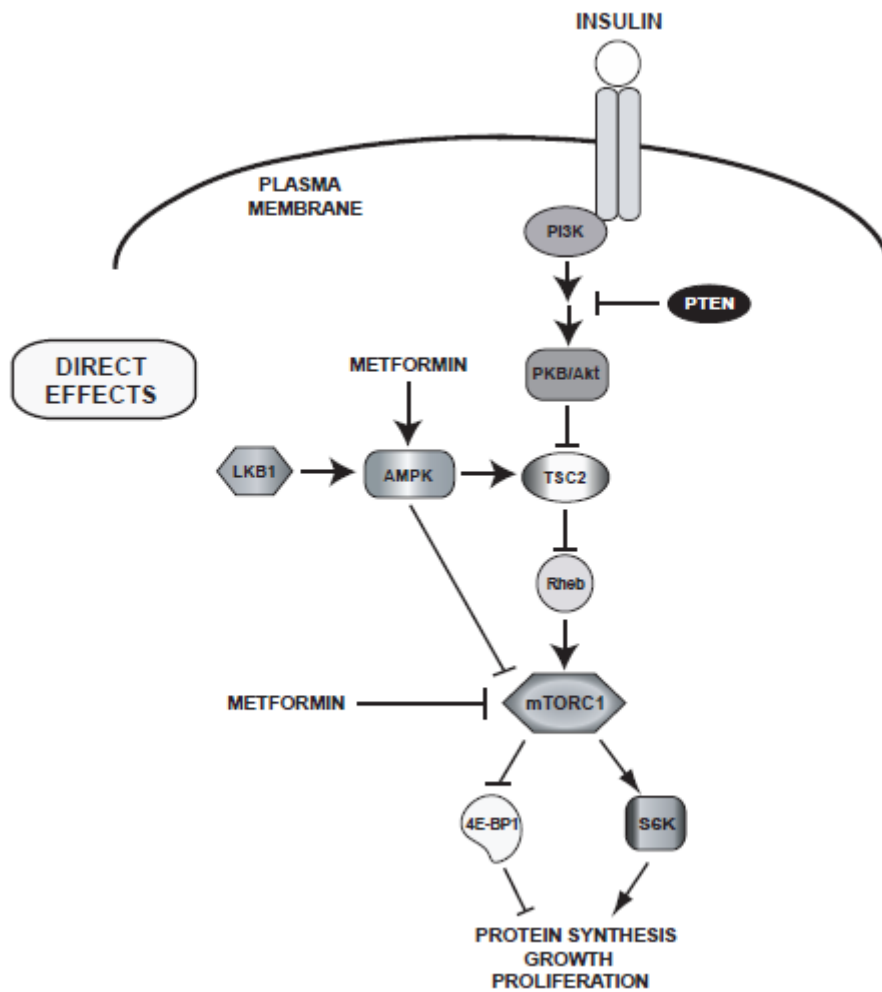


Fig.17 Efeitos da metformina no cancro (Dowling *et al.*, 2011).

6. Estudos realizados nos diversos modelos tumorais

6.1 Temsirolimus

O temsirolimus (CCL – 779) é um inibidor do ciclo celular, análogo da rapamicina, e de administração parentérica. Em 2007 tornou-se o primeiro inibidor do mTOR utilizado como antineoplásico para o tratamento de doentes com carcinoma de células renais refratário (Raymond *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2012).

Foram efetuados ensaios clínicos para averiguar e definir a sua farmacocinética, as dosagens, os efeitos adversos e a resposta tumoral. Inicialmente estabeleceu-se administrações diárias, a cada duas semanas com uma dose máxima tolerada, situada entre 15 e 19 mg/m²/dia; neste estudo foram intervenientes 24 pacientes com carcinoma das células renais refratário em ensaios clínicos de fase I. Um estudo de eficácia demonstrou uma ampla janela terapêutica o que significa que a inibição do mTOR pode ser conseguida com doses abaixo da dose máxima tolerada (Raymond *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2012).

Nos ensaios clínicos de fase II foram utilizados 111 pacientes com carcinoma das células renais em estado avançado, recebendo uma vez por semana 25mg, 75mg ou 250mg de temsirolimus obtendo-se respostas bastante promissoras: uma resposta completa, 7 respostas parciais e 29 respostas menores, sugerindo que o efeito é independente da dose; uma dose única semanal de 25 mg deve ser suficiente para se obter bons resultados (Raymond *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2012).

Na fase III dos ensaios clínicos, utilizando 626 pacientes, foi comparada a eficácia do temsirolimus e do interferão α , individualmente e em conjunto. Os pacientes que receberam 25mg de temsirolimus uma vez por semana apresentaram uma melhoria de 49% na sobrevida global, uma melhoria de 50% no tempo de sobrevida de progressão bem como uma redução de 27% no risco de morte. Os investigadores referem que os pacientes que receberam 3 doses de temsirolimus apresentaram uma diminuição na fosforilação dos alvos a jusante do mTOR, p70S6K e 4E-BP1 (Raymond *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2012).

Este fármaco apresenta como efeitos adversos mucosite, estomatite, neutropenia, trombocitopenia, hipofosfatemia, astenia, diarreia e pneumonite não infecciosa, efeitos

estes, inerentes a todos os análogos da rapamicina (Raymond *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2012).

O temsirolimus é um inibidor específico da cinase do mTOR ligando-se com grande afinidade à proteína de ligação à imunofilina FK506; por sua vez este complexo liga-se ao mTOR inibindo a sua atividade. O tratamento com temsirolimus inibe a angiogenese do tumor reduzindo a síntese do VEGF e parando o ciclo celular na fase G1 (Zagouri *et al.*, 2012).

O temsirolimus está aprovado para o tratamento do carcinoma de células em estado avançado e a sua atividade tem sido avaliada para inúmeros cancros incluindo gliomas, rabdomiossarcoma, meduloblastoma e cancro da próstata. Relativamente ao cancro da mama, em estudos pré-clínicos, o temsirolimus inibiu a proliferação de linhas celulares do cancro da mama que eram dependentes de estrogénios; noutra subtipo de cancro da mama o temsirolimus inibiu o crescimento do tumor da mama provocado por uma alteração na PTEN, portanto pode afirmar-se que o temsirolimus pode ser útil em alguns subtipos de cancros da mama (Zagouri *et al.*, 2012).

Foram obtidos resultados promissores nos ensaios clínicos de fase II e III que tinham como objetivo avaliar a eficácia do temsirolimus demonstrando que este fármaco pode representar, no futuro, um papel importante no tratamento de vários subtipos de cancro da mama, contudo é necessário aprofundar os resultados para selecionar quais as melhores combinações de terapêutica, estudar detalhadamente as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, e identificar marcadores de resposta do temsirolimus (Zagouri *et al.*, 2012).

O temsirolimus demonstrou também uma clara eficácia no tratamento do linfoma quando usados em monoterapia. Ensaios de fase II utilizando o temsirolimus mostraram taxas de sucesso de 38% para 41% em linfoma de células do manto e 35% em células do linfoma não-Hodgkin (Ciuffreda *et al.*, 2010).

O temsirolimus também mostrou eficácia terapêutica no mieloma múltiplo: num estudo de fase III em células do manto refratário demonstrou uma taxa de sucesso de 22% com administrações de 175 mg/semana durante 3 semanas seguidas (Ciuffreda *et al.*, 2010).

Existem ensaios de fase III a decorrer utilizando o temsirolimus em pacientes com cancro do pescoço ou da cabeça ainda sem resultados, porém estudos, *in vivo*,

utilizando ratos como modelo referem que o temsirolimus, na menor dose possível, inibiu o crescimento em 70% das linhas celulares de cancro da cabeça e pescoço em 7 dias e ao final de 21 dias este valor subiu para 80%. Estudos recentes que tem como objetivo avaliar as propriedades farmacodinâmicas do temsirolimus, nestes tipo de cancros, demonstra que os pacientes que receberam 3 doses do fármaco obtiveram uma diminuição da fosforilação dos alvos a jusante do mTOR, nomeadamente o 4E-BP1 e p70S6K (Nyuyen *et al.*, 2012).

6.2 Everolimus

O everolimus (RAD-001) e o ridaforolimus são dois fármacos pertencentes à classe dos análogos da rapamicina que poderão ser utilizados no futuro para o tratamento do cancro da cabeça e do pescoço, uma vez que os primeiros ensaios clínicos para estes fármacos são positivos, nomeadamente para o everolimus; contudo são necessários mais ensaios (Nyuyen *et al.*, 2012).

São fármacos que provocam alguns efeitos adversos que podem incluir: erupção, estomatite, hiperglicemia, hiperlipidemia, trombocitopenia, fadiga e anemia. De entre estes todos a estomatite tem sido o mais frequente, limitando, deste modo, a dose administrada ao paciente (Martins *et al.*, 2013).

O everolimus e o deforolimus têm atividade antineoplásica demonstrada em vários tipos de cancros nomeadamente os hematológicos. Em fase preliminar estes análogos da rapamicina têm mostrado uma eficácia promissora também em sarcoma endotelial (Ciuffreda *et al.*, 2010).

O everolimus também tem sido testado em pacientes com tumores neuroendócrinos que, apesar de raros, têm vindo a aumentar gradualmente; é um cancro de desenvolvimento lento daí que os doentes consigam viver com a doença durante vários anos, mesmo num estado avançado. Uma vez que se trata de um tumor raro os fármacos disponíveis no mercado ainda são escassos bem como os ensaios, utilizando como modelo clínico, este tipo de cancro (Wiedenmann *et al.*, 2011).

Os primeiros tratamentos para este tipo de cancro utilizavam análogos da somatostatina para aliviar os sintomas da hipersecreção hormonal; hoje em dia estes fármacos ainda

são extremamente importantes no tratamento deste cancro. Atualmente estão em desenvolvimento análogos da somatostatina com propriedades farmacocinéticas melhoradas como tempo de semivida mais curto e uma maior afinidade para os recetores (Wiedenmann *et al.*, 2011).

Investigações recentes sugerem uma associação entre o mTOR e o desenvolvimento de tumores neuroendócrinos. Mutações em genes supressores de tumores associados ao mTOR aumentam o risco de desenvolvimento de cancro dos pâncreas (Wiedenmann *et al.*, 2011).

Estudos pré-clínicos têm demonstrado atividade antineoplásica do everolimus em células pancreáticas humanas, *in vitro* e *in vivo*. O everolimus atua fosforilando alvos a jusante da Akt, incluindo a TSC2, mTOR e p70S6K, mantendo a célula na fase G0 e induzindo, conseqüentemente, a apoptose (Wiedenmann *et al.*, 2011).

Num estudo de fase II, o everolimus foi combinado com octreotida para tratamento de cancro neuroendócrino em estado avançado, obtendo-se resultados satisfatórios, contudo, a taxa de sobrevivência global não se alterou. Num estudo de fase III, o everolimus confirmou a atividade antineoplásica em pacientes com cancro do pâncreas em estado avançado. A proporção de pacientes vivos e livre de progressão em 18 meses, foi de 34% com everolimus, em contraste com os 9% obtidos com placebo (Wiedenmann *et al.*, 2011).

A terapêutica com everolimus obteve resultados para já encorajadores em cancro neuroendócrino, contudo necessita de mais ensaios clínicos de eficácia e segurança para poder ser aprovado pelas entidades reguladoras. Encontram-se também em andamento ensaios clínicos para averiguar a eficácia do temsirolimus neste tipo de cancro (Wiedenmann *et al.*, 2011).

O everolimus é usado no tratamento do carcinoma de células renais e quando comparado com a rapamicina, tem um tempo de semivida mais curto permitindo o estabelecimento mais rápido de “steady-state”. Quando utilizado em doentes com tumores sólidos demonstrou uma dose e esquema terapêutico dependente da via mTOR, inibindo os substratos a jusante do mTOR, p70S6K e 4E-PB1 com uma toma de 10mg/dia em doses superiores a 50mg/semana. Os efeitos adversos mais comuns provocados por este fármaco incluem irritação cutânea, estomatite, fadiga, náuseas e

vómitos contudo podem existir efeitos mais graves como hiperglicemia, hipertrigliceridemia e trombocitopenia (Nguyen *et al.*, 2012).

Na fase II dos ensaios clínicos, utilizado como terapia de primeira ou segunda linha, o everolimus (10mg/dia) foi eficaz em 12 de 41 pacientes com cancro renal metastático. Num estudo realizado a nível internacional com doentes com cancro renal avançado nos quais a terapia padrão foi ineficaz, o RAD001 atuou eficazmente prolongando a sobrevida de 1,9 a 4 meses (Kudo, 2011).

Num estudo realizado no Japão, foram observadas respostas favoráveis em pacientes com cancro do estomago em que todas as outras quimioterapias não foram eficazes. Foi administrado o RAD001 em monoterapia (10 mg/dia) verificando-se uma melhoria da sobrevida de 84 dias. Contudo na administração deste fármaco foram observados vários efeitos adversos como já mencionados erupções cutâneas, estomatite, fadiga, náuseas, anorexia, diarreia, vómitos, hiperlipidemia, hiperglicemia e trombocitopenia por conseguinte a sua administração exige um controlo rigoroso da dose (Kudo, 2011).

Apesar das medidas cada vez mais eficazes no tratamento, o cancro da mama, como referido anteriormente continua a ser o segundo cancro mais mortal no sexo feminino provocando a morte a cerca de 39.970 mulheres nos Estados Unidos da América no passado ano de 2011 (Zagouri *et al.*, 2012).

Com o objetivo de contrariar estes números alarmantes houve uma clara necessidade de desenvolver novas moléculas para o tratamento desta patologia, encontrando-se muitos fármacos em desenvolvimento clínico, tendo estes fármacos como alvo o mTOR ou a via em que este se encontra inserido PI3K/AKT/mTOR. Entre os potenciais agentes terapêuticos para pacientes com cancro da mama também se encontram o everolimus e temsirolimus (Zagouri *et al.*, 2012).

O everolimus está aprovado para o tratamento do cancro renal em estado avançado, astrocitoma de células gigantes e tumores neuroendócrinos pancreáticos não passíveis de cirurgia (Zagouri *et al.*, 2012). Ensaios clínicos de fase III encontram-se em andamento para avaliar a atividade do everolimus no tratamento do cancro gástrico, carcinoma hepatocelular e linfoma, relativamente ao cancro da mama as células cancerosas parecem ser sensíveis ao everolimus com valores de IC50 baixos (Zagouri *et al.*, 2012).

Em modelos pré-clínicos a atividade do everolimus foi testada em conjunto com o tamoxifeno resultando na inibição sinérgica da proliferação e indução da apoptose em pacientes com cancro da mama. A combinação dos dois fármacos obteve uma redução no risco de progressão, o risco de morte foi reduzido em 55%, e foram bem tolerados uma vez que houve uma diminuição dos efeitos adversos, diminuindo a fadiga, o risco de estomatite, exantema, anorexia e diarreia (Zagouri *et al.*, 2012).

Em suma, o everolimus ou RAD001 é um inibidor do mTOR dose-dependente que também deriva da rapamicina, pode ser administrado oralmente, e inibe a proliferação celular e angiogênese. Encontra-se em estudos clínicos utilizado em monoterapia ou combinado com outros agentes anticancerígenos para tratar vários tipos de cancros, como o tumor neuroendócrino, o cancro da mama, o cancro do estômago, o cancro do pulmão, linfoma maligno e carcinoma das células renais (Kudo, 2011).

6.3 LY294002 e Wortmanina

O carcinoma do ovário é a neoplasia maligna ginecológica que mais mortes provoca em mulheres no pós-menopausa. O cancro do ovário, de acordo com um padrão internacional, é classificado em quatro etapas tendo em conta a gravidade da doença. Doentes em fase 1 significa que o tumor ainda se encontra limitado aos ovários, na fase 2 já se encontram metástases nos órgãos pélvicos, na fase 3 a metastização avançou para a zona abdominal e por último temos a fase 4 onde as metástases ultrapassaram a cavidade peritoneal (Mazzoletti, Brogini, 2010).

Inúmeras estruturas químicas foram desenvolvidas e aprovadas como inibidores PI3K. O LY294002 e wortmanina foram os primeiros fármacos a serem desenvolvidos para inibir a via PI3K. Muitos trabalhos evidenciaram como o LY294002 ou a Wortmanina reduzem o crescimento das células do cancro do ovário quer *in vitro* quer *in vivo* quando combinados com outros agentes anti tumorais tais como o paclitaxel e carboplatina. A via PI3K está alterada em aproximadamente 70% dos cancros do ovário o que dificulta o tratamento, uma vez que o PI3K é a principal mediadora de resistências aos fármacos. Para o tratamento deste cancro são utilizados inibidores específicos da via PI3K, com diferentes mecanismos e usados em monoterapia ou combinados com outros

fármacos. Os PI3Ks, como atrás referido, são elementos fundamentais de uma sinalização intracelular que inclui o PI3K/PDK/AKT e que tem como funções a regulação da proliferação de células, o crescimento, a sobrevivência e a apoptose. A ativação da PI3K tem efeito a jusante quer ao nível da AKT bem como ao nível do mTOR, sendo esta uma etapa fundamental na iniciação e manutenção do fenótipo cancerígeno daí que inúmeras substâncias foram desenvolvidas e aprovadas como inibidores do PI3K. Moléculas extracelulares como fatores de crescimento e insulina são as principais moléculas efectoras para a ativação da via PI3K através da interação com o recetor da tirosina cinase (RTK) e recetores acoplados à proteína G (GPCRs) (Mazzoletti, Brogini, 2010).

Devido à toxicidade demonstrada, *in vivo*, por estas moléculas foi necessário desenvolver outras moléculas com base nestas mas com os efeitos tóxicos atenuados e foi neste sentido que surgiu o PX-866, um derivado do wortmanina, mais estável e com menor hepatotoxicidade. O PX-866 reduz o crescimento da linha celular do cancro do ovário em células humanas (Mazzoletti, Brogini, 2010).

6.4 XL 147

Outro fármaco inibidor da PI3K é o XL 147 (exelixis) que se encontra em ensaios clínicos de fase I e II para avaliar a sua atividade anti tumoral em comparação com outros fármacos utilizados em monoterapia ou em combinação com paclitaxel e carboplatina, para o tratamento do carcinoma do ovário. Os primeiros resultados obtidos são muito satisfatórios uma vez que em ensaios pré-clínicos o XL 147 bloqueou o PI3K reduzindo a proliferação e aumentando a apoptose (Mazzoletti, Brogini, 2010).

6.5 MKC-1

O MKC-1 é uma pequena molécula, promissora no tratamento de tumores sólidos que inibe o ciclo celular e que pode ser utilizada no tratamento do cancro da mama uma vez que possui atividade antineoplásica. O MKC-1 e os seus derivados inibem a polimerização da tubulina, bloqueando a formação do eixo mitótico levando à paragem do ciclo celular na fase G2 e consequentemente à morte da célula por apoptose. Esta molécula inibe a atividade da AKT, mTOR e também da tubulina e importin- β uma proteína fundamental para o transporte de compostos do citosol para o núcleo. De acordo com estudos de fase I e fase II o MKC-1 é bem tolerado pelos pacientes, apresentando uma boa atividade anti tumoral no cancro da mama metastático. Relativamente aos efeitos adversos foram observados neuropatia sensorial, creatinina elevada, mucosite, neutropenia e elevação de AST/ALT sendo necessário estudos mais aprofundados sobre esta molécula com o objetivo de ser introduzida na terapêutica futura (Zagouri *et al*, 2012).

7. Perspetivas futuras

O mTOR tem um papel preponderante no desenvolvimento de cancro e doenças metabólicas nomeadamente diabetes e obesidade. Os recentes avanços permitiram uma melhor leitura e compreensão dos alvos a jusante e montante do mTOR, permitindo deste modo explicar as origens e os desenvolvimentos destas doenças; a insulina interage a montante do mTOR aumentando a síntese de proteínas em resposta à glucose. As deficiências na sinalização do mTOR podem ter um papel essencial no desenvolvimento de diabetes tipo II e de doença oncológica (Hay, Sonenberg, 2004).

Como referido ao longo deste trabalho a via do mTOR está claramente associada ao desenvolvimento de cancro uma vez que os componentes a jusante bem como a montante do mTOR estão implicados na iniciação e progressão do cancro (Hay, Sonenberg, 2004).

Um melhor entendimento da via de sinalização mTOR levou e poderá levar ao desenvolvimento de fármacos para tratar estas patologias. O sucesso da rapamicina e dos seus análogos em ensaios clínicos para o tratamento do cancro demonstra bem o potencial de tratamento que existe associado a esta via. Porém, vários aspetos relacionados com a regulação da atividade do mTOR continuam por ser esclarecidos, em particular a interação entre fatores de crescimento e a regulação da atividade do mTOR. Outro aspeto importante é saber qual o componente a jusante do p70S6K que ativa a tradução do mRNA fundamental na estimulação do crescimento celular (Hay, Sonenberg, 2004).

A complexidade inerente ao uso de vias de sinalização do cancro como um alvo terapêutico, colocou em risco o desenvolvimento de fármacos, principalmente devido à falta de biomarcadores válidos e à caracterização insuficiente dos pacientes adequados para certos tratamentos. Portanto é necessário descobrir novas estratégias terapêuticas adequadas para pacientes com cancro (Ciuffreda *et al.*, 2010).

O temsirolimus e o everolimus, análogos da rapamicina, são os inibidores do mTOR mais promissores desta classe farmacológica. Estão os dois aprovados para o tratamento do carcinoma de células renais, encontrando-se ambos em ensaios clínicos para averiguar a sua eficácia terapêutica em diversos cancros, como exemplo, cancro gástrico, carcinoma hepatocelular, cancro da mama, gliomas e cancro da próstata, sendo

os primeiros resultados bastante satisfatórios e encorajadores, estando a sua aprovação iminente para o tratamento desta grave patologia. A grande vantagem do everolimus é poder ser administrado via oral, facilitando deste modo a administração e dando ao paciente uma maior autonomia. Contudo, é necessário continuar com a constante procura de fármacos que, sozinhos ou em combinação com os existentes, possam ser alternativas mais eficazes e seletivas no tratamento do cancro.

8. Bibliografia

Ames, B., Gold, L., Willett, W. (1995). The causes and prevention of cancer. *Pro. Natl. Acad. Sci*, 92, pp. 5258-5265.

Bigelow, R.L.H., Cardelli, J.A. (2006). The green tea catechins, (–)-Epigallocatechin3-gallate (EGCG) and (–)-Epicatechin3-gallate (ECG), inhibit HGF/Met signaling in immortalized and tumorigenic breast epithelial cells. *Oncoge*, 25, pp. 1922-1930.

Blaser, B., Waselle, L., Dormond-Meuwly, A., Dufour, M., Roulin, D., Demartines, N., Dormond, O. (2012). Antitumor activities of ATP-competitive inhibitors of mTOR in colon cancer cells. *BMC Cancer*, 12, 86, pp. 1-10.

Brown, E., Albers, M., Shin, T., Ichikawa, K., Keith, C., Lane, W., Schreiber, S. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, 369, pp. 756-758.

World Health Organization, Cancer. [Em linha]. Disponível em <<http://www.who.int/topics/cancer/en/>>. [Consultado em 28/03/13].

Carcinogenesis. The university of Arizona. [Em linha]. Disponível em <<http://swehsc.pharmacy.arizona.edu/rfg1/carcinogenesis>>. [Consultado em 19/06/13].

Carcinogenesis. Genotoxicity and carcinogenicity. General scientific principles of chemical safety. [Em linha]. <http://www.bvsde.paho.org/bvstox/i/fulltext/training/Section%202_1.htm> . [Consultado em 19/06/13].

Chiu, M., Katz, H., Berlin, V. (1994). RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Genetics*, 91, pp. 12574-12578.

Chiu, M., Katz, H., Berlin, V. (1994). RAPT1, a mammalian homolog of yeast TOR, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Genetics*, 91, pp. 12574-12578.

Ciuffreda, L., Di Sanza, C., Incani, U.C., Milella, M. (2010). The mTOR Pathway: A New Target in Cancer Therapy Current. *Cancer Drug Targets*, 10, pp. 484-495.

Ciuffreda, L., Di Sanza, C., Incani, U.C., Milella, M. (2010). The mTOR Pathway: A New Target in Cancer Therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 10, pp.484-495.

Cornu, M., Albert, V., Hall, M. H. (2012). mTOR in aging, metabolismo, and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 23.

Cortot, A., Armand, J-P., Soria, J-C. (2006). Les inhibiteurs de la voie PI3 kinase-AKT-mTOR. *Bull Cancer*, pp. 19-26.

Curcumina. [Em linha]. Disponível em <<http://www.curcumina.it/>>. [Consultado em 27/03/13].

Dennis, P., Pullen, N., Kozma, S., Thomas, G. (1996). The Principa Rapamycin-Sensitive p70S6K Phosphorylation Sites, T-229 and T-389, Are Differentially Regulated by Rapamycin-Insensitive Kinase Kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 16,11, pp. 6242-6251.

Douglas, R., Lowy, M.D. (1996). The Causes of Cancer. *Molecular Oncology*. 3, pp. 41-59.

Dowling, R., Goodwin, P., Stambolic, V. (2011). Understanding the benefit of metformina use in cancer treatment. *BMC Medicine* 9,33, pp. 1-6.

Dudkin, L., Dilling, M., Cheshire, P., Harwood, F., Hollingshead, M., Arbuck, S., Travis, R., Sausville, E., Houghton, P. (2001). Biochemical Correlates of mTOR Inhibition by the Rapamycin Ester CCI-779 and Tumor Growth Inhibition. *Clinical Cancer Research*, 7, pp. 1758-1764.

Ekshyyan, O., Rong, Y., Rong, X., Pattani, K., Abreo, F., Caldito, G., Chang, J., Ampil, F., Glass, J., Nathan, C. (2009). Comparison of radiosensitizing effects of the mammalian target of rapamycin inhibitor CCI-779 to cisplatin in experimental models of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Ther*, 8, pp.2255-2265.

Engelman, J., Luo, J., Cantley, L. (2006). The evolution of phosphatidylinositol3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Publishing Group*, 7, pp.606-619.

Estatísticas de causas de morte. Eurostat. [Em linha]. Disponível em <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/index.php/Causes_of_death_statistics/pt#Cancro>. [Consultado em 28/03/13].

Estimated cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Disability-adjusted life years (DALYs) Worldwide in 2008. International Agency for Research on Cancer. [Em linha]. Disponível em <<http://globocan.iarc.fr/>>. [Consultado em 28/03/13].

Faivre, S., Kroemer, G., Raymond, E. (2006). Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Drug Discovery*, 5, pp. 671- 688.

Falasca, M., Selvaggi, F., Buus, R., Sulpizio, S., Edling, Charlotte. (2011). Targeting Phosphoinositide 3-Kinase Pathways in Pancreatic Cancer – from Molecular Signalling to Clinical Trials. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 11(5), pp. 455-463.

Feng, Z., Zhang, H., Levine, A., Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *PNAS*, 102, 23, pp.8204-8209.

Gao, X., Zhang, Y., Arrazola, P., Hino, O., Kobayashi, T., Raymond, S., Pan, D. (2002). Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino acid-TOR signalling. *Nature Cell Biology*, 4, pp. 699-704.

García-Echeverría, C. (2010). Allosteric and ATP-competitive kinase inhibitors of mTOR for cancer treatment. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, pp.4308-4312.

Guba, M., Breitenbuch, P., Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M., Bruns, C., Zuelke, C., Farkas, S., Anthuber, M., Jauch, K., Geissler, E. (2002). rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature Medicine*, 8, 2, pp.128-135.

Hay, N., Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development*, 18, pp. 1926-1945.

Hosoi, H., Dilin, M., Shikata, T., Liu, L., Shu, L., Ashmun, R., Germain, G., Abraham, R., Houghton, P. (1999). Rapamycin Causes Poorly Inhibition of mTOR and Induces p53-independent Apoptosis in Human Rhabdomyosarcoma Cells. *Cancer Research*, 59, pp. 886-894.

Humar, R., Kiefer, F., Berns, H., Resink, T., Battegay, E. (2002). hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR)-dependent signaling. *Faseb*, 16, pp. 771-780.

Incidência e mortalidade por cancro em 2008. ECCO. [Em linha]. Disponível em <<http://old.ecco-org.eu/News/Cancer-statistics/World-Cancer-total-chart/page.aspx/367>>. [Consultado em 10/07/13].

INK. [Em linha]. Disponível em <<http://www.activebiochem.com/Product/INK-128.html>>. [Consultado em 27/03/2013].

Inoki, K., Corradetti, M., Guan, K-L. (2005). Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nature Genetics*, 37, 1, pp. 19-25.

Inoki, K., Ouyang, H., Li, Y., Guan, K.-L. (2005). Signaling by Target of Rapamycin Proteins in Cell Growth Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69 (1), pp. 79-100.

Inoki, K., Zhu, T., Guan, K.-L. (2003). TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and survival. *Cell*, 115, pp. 577-590.

James, S., Downes, P., Gigg, R., Grove, S., Holmes, A., Alessis, D. (1996). Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem. J.*, 315, pp.709-713.

Jiang, B.-H., Liu, L.-Z. (2008). Role of mTOR in anticancer drug resistance: Perspectives for improved drug treatment. *Drug Resistance Updates*, 11 pp 63-76.

Johnson, S., Gulhati, P., Arrieta, I., Wang, X., Uchida, T., Gao, T., Evers, M. (2009). Curcumin Inhibits Proliferation of Colorectal Carcinoma by Modulating Akt/mTOR Signaling. *Anticancer Research*, 29, pp. 3185-3190.

Kawauchi, K., Ogasawara, T., Yasuyama, M., Otsuka, K., Yamada, O. (2009). Regulation and Importance of the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Hematologic Malignancies. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 9, pp. 1024-1038.

Korets, S., Czok, S., Blank, S. (2011). Targeting the mTOR/4E-BP Pathway in Endometrial Cancer. *Clinical Cancer Research*, 17, pp.7518-7528.

Kudo, M., (2011). mTOR Inhibitor for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Digestive Diseases*, 29, pp.310-315.

Marques, F., Markus, A., Morris, B. (2009). Resveratrol: Cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41, pp. 2125-2128.

Martins, F., Oliveira, M., Wang, Q., Sonis, S., Gallottini, M., George, S., Treister, N. (2013). A review of oral toxicity associated with mTOR inhibitor therapy in cancer patients, *Oral Oncology*.

Mazzoletti, M., Brogini, M. (2010). PI3K/AKT/mTOR Inhibitors In Ovarian Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 17(36), pp. 4433-4444.

Mita, M., Mita, A., Chu, Q., Rowinsky, E., Fetterly, G., Goldston, M., Patnaik, A., Mathews, I., Ricart, A. (2008). Phase I Trial of the Novel Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Deferolimus Administered Intravenously Daily for 5 Days Every 2 Weeks to Patients With Advanced Malignancies. *Journal of Clinical Oncology*, 26, 3, pp. 361- 367.

Moretti, L., Yang, E., Kim, K., Lu, B. (2007). Autophagy signaling in cancer and its potential as novel target to improve anticancer therapy. *Drug Resistance Updates*, 10, pp. 135-143.

Nguyen, S., Walker, D., Gillespie, M., Gutkind, J., Day, T. (2012). mTOR Inhibitors and its Role in the Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Current Treatment Options in Oncology*, 13, pp. 71-81.

Nguyen, S., Walker, D., Gillespie, M., Gutkind, J.S., Day, T.A. (2012). mTOR Inhibitors and its Role in the Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Current Treatment Options in Oncology*, 13, pp. 71-81.

Roreno, Os tumores mais frequentes no sexo masculino e feminino em 2008. [Em linha]. Disponível em <<http://www.roreno.com.pt/pt/estatisticas.html>>. [Consultado em 28/03/13].

Oshiro, N., Yoshino, K., Hidayat, S., Tokunaga, C., Hara, K., Eguchi, S., Avruch, J., Yonezawa, K. (2004). Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes*, 9, pp. 359-366.

Panwalkar, A., Verstovsek, S., Giles, F.J. (2004). Mammalian target of rapamycin inhibition as therapy for hematologic malignancies. *Cancer*, 100, pp. 657-666.

Peng, T., Golub, T., Sabatini, D. (2002). The immunosuppressant Rapamycin Mimics a Starvation-Like Signal Distinct from Amino Acid and Glucose Deprivation. *Molecular and Cellular Biology*, 22(15), pp. 5575-5584.

Raymond, E., Alexandre, J., Faivre, S., Vera, K., Materman, E., Bomi, J., Leister, C., Korth-Brdly, J., Hanauske, A., Armand, J. (2004). Safety and Pharmacokinetics of Escalated Doses of Weekly Intravenous Infusion of CCL-779, a Novel mTOR Inhibitor, in Patients With Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22, 12, pp.2336-2347.

Resveratrol. Interactive Concepts in Biochemistry. [Em linha]. Disponível em <http://www.wiley.com/legacy/college/boyer/0471661791/cutting_edge/resveratrol/resveratrol.htm>. [Consultado em 27/03/13].

Roux, P., Ballif, B., Anjum, R., Gygi, S., Blenis, J. (2004). Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *PNAS*, 101, 37, pp. 13489-13494.

Rubin, E., Gorstein, F., Rubin, R., Schawarting, R., Strayer, D. (2006). Bases Clinicopatológicas da Medicina. 4 Edição. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, pp. 96-98.

Sabatini, D., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., Snyder, S. (1994). RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*, 78, 1, pp. 35-43.

Sahra, I., Marchand-Brustel, Y., Tanti, J., Bost, F. (2010). Metformin in Cancer Therapy: A New Perspective for an Old Antidiabetic Drug?. *Mol Cancer Ther*, 9, pp. 1092-1099.

Santos, L., Teixeira, L. (2011) Oncologia geral. Edições Lidel.

Schenone, S., Brullo, C., Musumeci, F., Radi, M., Botta, M. (2011). ATP-Competitive Inhibitors of mTOR: An Update. *Current Medicinal Chemistry*, 18(20), pp. 2995-3014.

Schubbert, S., Shannon, K., Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature Publishing Group*, 7, pp. 295-308.

- Shor, B., Gibbons, J., Abraham, R., Yu, K. (2009). Targeting mTOR globally in cancer Thinking beyond rapamycin. *Cell Cycle*, 8, 23, pp. 3831-3837.
- Sonenberg, N., Gingras, A.-C. (1998). the mRNA 5'cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Current Opinion in Cell Biology*, 10, pp.268-275.
- Stevens, A., Lowe, J. (2002). Neoplasia, Patologia. 2 Edição. Brasil, Editora Manole, pp. 205-210.
- Takeuchi, C., Kim, B., Blazey, C., Ma, S., Johnson, H., *et al*, (2013). Discovery of a Novel Class of Highly Potent, Selective, ATP-Competitive, and Orally Bioavailable Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR). *Journal of Medicinal Chemistry*, 56, pp.2218-2234.
- Tsang, C., Qi, H., Liu, L., Zheng, S. (2007). Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discovery Today*, 12, 3/4, pp. 112-124.
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., Bilanges, B.(2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Molecular Cell Biology*, 11, pp. 329-341.
- Vézina, C., Kudelski, A., Sehgal, S.N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), A NEW ANTIGUNGAL ANTIBIOTIC. *The Journal of Antibiotics*, 28, pp. 721-726.
- What you Need To Know About Cancer. (2006). National Cancer Institute, pp. 06-1566.
- Wiedenmann, B., Pavel, M., Kos-Kudla, B. (2011). From Targets to Treatments: A Review of Molecular Targets in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology*, 98, pp. 177-190.
- Wu, P., Hu, Y.-Z. (2010). PI3K/AKT/mTOR Pathway inhibitors in Cancer: A Perspective on Clinical Progress. *Current Medicinal Chemistry*. 17, pp. 4326-4341.
- Yecies, J., Manning, B. (2011). mTOR links oncogenic signaling to tumor cell metabolism. *J. Mol. Med.*, 89 pp.221-228.

Zagouri, F., Sergentanis, T., Chrysikos, D., Filipits, M., Bartsch, R. (2012). mTOR inhibitors in breast cancer: A systematic review. *Gynecologic Oncology*, 127, pp. 662-672.

Zhang, Q., Kelly, P., Wang, L., French, S., Tang, X., Duong, H., Messadi, D., Le, A. (2006). Green Tea Extract and (-)- Epigallocatechin-3-Gallate Inhibit Mast Cell-Stimulated Type I Collagen Expression in Keloid Fibroblasts via Blocking PI-3K/Akt Signaling Pathways. *Journal of Investigative Dermatology*, 126, pp.2607-2613.

Zhang, Y., Duan, Y., Zheng, X. F. S. (2011). Targeting the mTOR kinase domain: the second generation of mTOR inhibitors. *Drug Discov Today*, 16 (7-8), pp. 325- 331.

Zhou, H., Luo, Y., Huang, S. (2010). Updates of mTOR inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem.*, 10(7) pp, 571-581.