UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

MURILLO DORILEO LEITE BERNARDI

Efeito citotóxico e citostático de novos inibidores da mTOR em culturas bi e tridimensionais de câncer de próstata (DU145) e hepatocarcinoma (HepG2)

São Carlos

2018

MURILLO DORILEO LEITE BERNARDI

Efeito citotóxico e citostático de novos inibidores da mTOR em culturas bi e tridimensionais de câncer de próstata (DU145) e hepatocarcinoma (HepG2)

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Andrei Leitão

São Carlos

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

B523e Bernardi, Murillo Dorileo Leite
Efeito citotóxico e citostático de novos inibidores
da mTOR em culturas bi e tridimensionais de câncer de
próstata (DU145) e hepatocarcinoma (HepG2) / Murillo
Dorileo Leite Bernardi; orientador Andrei Leitão. São
Carlos, 2018.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Bioengenharia e Área de Concentração
em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
2018.

1. Câncer. 2. Cultura 3D. 3. Inibidores de quinase.
4. mTOR. I. Título.

MURILLO DORILÊO LEITE BERNARDI

Título: "Efeito citotóxico e citostático de novos inibidores da mTOR em culturas bi e tridimensionais de câncer de próstata (DU145) e hepatocarcinoma (HepG2)".

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS - GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM
BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE
BIOENGENHARIA.

Data da defesa: 21/03/2018

Prof. Dr. Andrei Leitão (Orientador)	Instituto de Química de São Carlos / USP
Assinatura:	Não votante

Profa. Dra. Cristina Kurachi	Instituto de Física de São Carlos / USP
Assinatura:	Resultado: <i>Aprovado</i>

Profa. Dra. Kamilla Swiech Antonietto	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP
Assinatura:	Resultado: <i>Aprovado</i>

Dra. Ana Carolina Baptista Moreno Martin	Universidade Federal de São Carlos
Assinatura:	Resultado: <i>Aprovado</i>

Homologado em: ____ / ____ / ____

*Dedico este trabalho a meu pai, Dirceu
Bernardi Júnior, que sempre foi meu
exemplo e me incentivou a ir mais longe e
à minha mãe Mônica (in memoriam), cuja
presença e amor eu sinto em todos
momentos importantes de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Andrei Leitão pela oportunidade de desenvolver este projeto, bem como sua confiança na minha capacidade de desenvolvê-lo.

Ao Professor Dr. Carlos Montanari pela disponibilidade do laboratório e equipamentos científicos.

Ao colegas e ex-colegas do NEQUIMED que sempre foram dispostos a ajudar nas técnicas e discussões científicas: Ariel, Daiane, Talita, Pedro, Samelyn, Lorenzo, Fernanda, Daniella, etc.

Ao meu grande amigo e futuro padrinho de casamento, Júnior, pelo companheirismo e pelo enorme auxílio na parte científica deste trabalho.

A Camila de Melo Romero Rocha, que embarcou comigo nessa jornada de dois anos rumo ao desconhecido, na qual iniciamos como namorados e terminamos como noivos. Nossa vida de companheiros de laboratório e de apartamento, durante esses dois anos, me fez ter cada vez mais certeza de que é com você que quero passar o resto da minha vida.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro.

*“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser
descoberto.”*

(Carl Sagan)

RESUMO

BERNARDI, MURILLO D. L. **Efeito citotóxico e citostático de novos inibidores da mTOR em culturas bi e tridimensional de câncer de próstata (DU145) e hepatocarcinoma (HepG2)** 2018. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

O desenvolvimento de novas terapias para o câncer envolve um processo longo e custoso no qual apenas 5% dos candidatos a fármacos em ensaios clínicos são aprovados. Os ensaios celulares são um importante pilar neste processo, no entanto, eles são geralmente feitos em células cultivadas em monocamada, o que apresenta algumas limitações. Assim, o desenvolvimento e aplicação de modelos tridimensionais (3D) para ensaios pré-clínicos tem sido cada vez mais investigado, devido a suas maiores similaridades com tumores *in vivo* em relação a características físicas, espaciais e bioquímicas. A via PI3K-AKT-mTOR, que está frequentemente desregulada em diversos cânceres, é uma rota metabólica essencial por integrar fatores de crescimento e sinais internos com a expressão de proteínas relacionadas ao crescimento celular. Sendo assim, novos compostos inibitórios dessa via têm sido estudados pelo grupo NEQUIMED como alternativa terapêutica para essas doenças. Dessa forma, este trabalho teve o objetivo de avaliar o potencial citostático e citotóxico de novos inibidores da via da mTOR em culturas celulares bi e tridimensionais de câncer de próstata e hepatocarcinoma. Para isso, o modelo de cultura 3D foi padronizado para ambas linhagens usando duas técnicas diferentes, além da padronização da técnica de redução da resazurina para a determinação da viabilidade celular em 2D e 3D. No ensaio citotóxico, células em monocamada e esferoides foram tratadas com diferentes concentrações dos fármacos de referência e dos novos inibidores e tiveram sua viabilidade determinada pelo ensaio de redução da resazurina. Já para o ensaio citostático, baixas concentrações de células foram plaqueadas em monocamada e tratadas por até 6 dias, tendo sua viabilidade medida a cada 48 h pelo ensaio de MTT. Os esferoides foram tratados por 9 dias com as mesmas substâncias, tendo seu volume medido a cada 3 dias. No geral, os novos compostos não apresentaram efeitos citotóxicos relevantes, contudo, os compostos Neq0438 e seu análogo, Neq0679, tiveram maior efeito citostático que a Rapamicina em culturas 2D e 3D de HepG2. Além disso, os compostos tiveram maior efeito citostático em esferoides do que em células cultivadas em monocamada para as duas linhagens. Isso pode ser justificado pela alteração na

expressão de proteínas da via da mTOR em relação ao modelo de cultura, já que foi demonstrado sua maior ativação nos modelos tridimensionais. Futuramente esses compostos poderão ser testados sozinhos, ou em terapia combinada em modelos animais para melhor avaliação de sua segurança e sua evolução no estudo pré-clínico.

Palavras-chave: Câncer, Cultura 3D, inibidores de quinases, mTOR.

ABSTRACT

BERNARDI, MURILLO D. L. **Cytotoxic and Cytostatic effects of new mTOR inhibitors in bi and tridimensional cultures of prostate câncer (DU145) and hepatocarcinoma (HepG2)** 2018. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

The development of new cancer therapies involves a long and expensive process in which only 5% of the clinical trial candidates for new drugs get approval. Cell assays are an essential pillar in this process; however, they are usually carried out in cells grown as a monolayer, which have some limitations. Thus, the development and application of new tridimensional (3D) models for preclinical trials has been deeply investigated, due to their higher similarities with *in vivo* tumors, regarding physical, spatial and biochemical features. The PI3K-AKT-mTOR pathway, which integrates growth factors and the expressions of proteins for the cellular growth, is often upregulated in several types of cancer. Hence, the NEQUIMED group is studying new pathway inhibitors as a therapeutic alternative for cancer. Here, the cytotoxic and cytostatic effects of the new PI3K-AKT-mTOR inhibitors were assessed in two and three-dimensional cells models of prostate cancer and hepatocarcinoma. To that end, the 3D culture model was standardized for both cell lines using two different techniques. The resazurin reduction assay was also standardized to determine cell viability in 2D and 3D models. For the cytotoxic assay, cells grown in a monolayer and 3D spheroids were treated with a range of concentrations of the reference drugs and new mTOR inhibitors and had their viability assessed by the resazurin assay. For the cytostatic assay, low cell density was plated on 2D and treated for 6 days, having their viability determined every 48 h using the MTT assay. Spheroids were treated for 9 days with the same substances and had their volume measured every 3 days. Overall, the new mTOR inhibitors did not show relevant cytotoxic effects, however, Neq0438 and its analog Neq0679, had a higher cytostatic effect than Rapamycin for both 2D and 3D cultures of HepG2. Besides, all mTOR inhibitors had a higher cytostatic effect on 3D cultures when compared to monolayers, which can be related to the overexpression of the mTOR pathway in this culture system, already reported on the literature. Based on these results, Neq0438 and Neq0679 should now be used alone or in combination using *in vivo* models to investigate their antitumoral effects.

Keywords: Cancer, 3D culture, kinase inhibitors, mTOR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema do microambiente tumoral e interações entre as diversas células presentes.	25
Figura 2 – Esquema simplificado da via de sinalização da mTOR.	29
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura dos domínios da mTOR.	30
Figura 4 – Representação estrutural de alguns inibidores da mTOR.	32
Figura 5 - Estrutura química das novas substâncias bioativas testadas neste trabalho. Todas as substâncias apresentam o código Neq0xxx onde os três últimos números são mostrados para cada uma.	33
Figura 6 –Combinação de imagens analíticas de secções de esferoides estudados com diferentes técnicas: Autorradiografia, ensaio de TUNEL, bioluminescência e sondas de microeletrodos para o oxigênio.	35
Figura 7 – Imagens por microscopia de campo claro de esferoides desenvolvidos com 4 linhagens diferentes. a) DU145; b) HepG2; c) PC-3 e d) Mia-PaCa2. Objetiva: 10x.	50
Figura 8 - Padronização da cultura tridimensional de DU145 usando a técnica de gota suspensa. Objetiva: 10x.	51
Figura 9 – Análise do crescimento dos esferoides. A) Curva de crescimento para linhagens HepG2 e DU145 (N=30). B) Imagens dos esferoides obtidas por microscopia de campo claro após diferentes dias de crescimento (Objetiva 10x).	51
Figura 10 - Relação entre o volume e o número de células por esferoide para a linhagem DU145.	53
Figura 11 - Relação linear entre a fluorescência emitida pela redução da resazurina (5 μ M) e a concentração de células plaqueadas a partir de cultura bidimensional.	54
Figura 12 - Relação linear entre a fluorescência emitida pela redução da resazurina (500 μ M) e o diâmetro de esferoides HepG2 em diferentes tempos de incubação.	55

Figura 13 - Relação linear entre a fluorescência emitida pela redução da resazurina (500 μ M) e o diâmetro de esferoides DU145 após duas horas de incubação.	55
Figura 14 - Curvas concentração-resposta de cultura bidimensional das duas linhagens para as substâncias de interesse. (Θ - HepG2; ♦ - DU145).	56
Figura 15 - Curvas concentração-resposta de substâncias de referência em esferoides de câncer de próstata e hepatocarcinoma (O - DU145; ♦ - HepG2).	59
Figura 16 - Linearidade entre o método MTT e a concentração de células plaqueadas.	62
Figura 17 - Curva de crescimento de células DU145 tratadas com apenas uma adição de composto	63
Figura 18 - Curva de crescimento de células DU145 tratadas com múltiplas aplicações de cada composto.	64
Figura 19 - Variação da absorbância após 9 dias de tratamento em cultura 2D de DU145. *** p<0.0005; **** p<0.0001.	65
Figura 20 - Curva concentração-resposta da inibição de crescimento celular em culturas 2D de DU145.	65
Figura 21 - Curva de crescimento de células HepG2 tratadas com apenas uma adição de cada composto.	66
Figura 22 - Curva de crescimento de células HepG2 tratadas com múltiplas adições de cada composto	67
Figura 23 - Variação da absorbância após 9 dias de tratamento em cultura 2D de HepG2. **** p<0.0001.....	68
Figura 24 - Curva concentração-resposta da inibição de crescimento celular em culturas 2D de HepG2.....	68
Figura 25 - A)Triagem do efeito citostático de novas substâncias bioativas a 100 μ M. B)Micrografia de esferoides DU145 após 9 dias de tratamento com o Neq0438 (Objetiva: 10x) **** p<0.0001 *** p<0.0005 ** p<0.001.....	69

Figura 26 - Curvas de crescimento de esferoides DU145 tratados com as novas substâncias bioativas.	70
Figura 27 - Variação do volume de esferoides DU145 em relação ao controle negativo após 9 dias de tratamento com as novas substâncias bioativas. **** $p < 0.0001$	71
Figura 28 - Micrografias de campo claro de esferoides DU145 após 9 dias de tratamento. Objetiva 10x: A) Rapamicina B) Neq0438 C) Neq0440 D)Neq0678 E)Neq0679 F)Neq0680.....	71
Figura 29 - Comparação do efeito citostático das novas substâncias bioativas em culturas 2D e 3D de DU145.....	72
Figura 30 - Curva de crescimento de esferoides HepG2 após 9 dias de tratamento com as novas substâncias bioativas.....	73
Figura 31 - Variação do volume de esferoides HepG2 em relação ao controle negativo após 9 dias de tratamento com as novas substâncias bioativas. **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.0005$...	74
Figura 32 - Micrografias de campo claro de esferoides HepG2 após 9 dias de tratamento. Aumento 5x A) Rapamicina B) Neq438 C) Neq440 D)Neq678 E)Neq679 F)Neq680....	74
Figura 33 - Comparação dos ensaios citostáticos com novas substâncias bioativas em culturas 2D e 3D de HepG2.	75
Figura 34 – Representação esquemática das vias de sinalização Ras-RAF-MEK-ERK e Ras-PI3K-AKT-mTOR.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de R^2 e desvio-padrão dos diferentes tempos de incubação de esferoides HepG2 com resazurina.	55
Tabela 2 – Valores de IC_{50} para as substâncias de interesse em culturas 2D de HepG2 e DU145. (NA = Valores não determinados).....	57
Tabela 3 — Valores de IC_{50} para os compostos de referencias em culturas 3D de DU145 e HepG2.	59
Tabela 4 - Comparação de valores de IC_{50} nos dois modelos de cultura para HepG2 e DU145.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	–	Bidimensional
3D	–	Tridimensional
AKT	–	Proteína Quinase B
CO ₂	–	Dióxido de Carbono
DHT	–	Dihidrotestosterona
DMEM	–	Meio de cultura Dulbecco Eagle modificado
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DNA	–	Ácido Desoxirribonucleico
HBV	–	Vírus da Hepatite B
HC	–	Hepatocarcinoma
IARC	–	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
INCA	–	Instituto Nacional Do Câncer
Kda	–	Kilo-Dalton
MCTS	–	Esferoides tumorais multicelulares
MEC	–	Matriz extracelular
mTOR	–	Alvo da Rapamicina em mamíferos
MTT	–	Brometo de [3-(4,5- dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
NK	–	Células Natural Killer
OMS	–	Organização Mundial Da Saúde
PBS	–	Tampão fosfato salino
PI3K	–	Phosphatidylinositol-3-kinase

PSA	–	Antígeno Prostático Específico
RNA	–	Ácido Ribonucleico
RPM	–	Rotações por minuto
RR	–	Redução da Resazurina
S6K	–	Proteína ribossomal S6
SDS	–	Dodecil sulfato de sódio
TGF- β	–	Fator de crescimento tumoral beta
ULA	–	Ultra Low Attachment

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Câncer: Epidemiologia e principais características.....	21
2.1.1 Câncer de Próstata	25
2.1.2 Hepatocarcinoma.....	27
2.2 Via da mTOR e seus inibidores	28
2.3 Cultura tridimensional de células.....	33
2.3 Substâncias de referência	37
3 OBJETIVOS	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Materiais e Reagentes	43
4.2 Padronização da cultura tridimensional.....	43
4.2.1 Escolha das linhagens e padronização da técnica	43
4.2.2 Avaliação do crescimento e morfologia.....	44
4.2.3 Padronização do ensaio de redução da resazurina	45
4.3 Ensaios Citotóxicos	46
4.3.1 Cultura bidimensional	46
4.3.2 Cultura tridimensional.....	46
4.4 Ensaios Citostáticos	47
4.4.1 Cultura bidimensional	47
4.4.2 Cultura tridimensional.....	48
4.5 Análise Estatística	48

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 Padronização da cultura tridimensional.....	50
5.1.1 Escolha das linhagens e padronização da técnica	50
5.1.2 Avaliação do crescimento e morfologia.....	51
5.1.3 Padronização do ensaio de redução da resazurina	53
5.2 Ensaios Citotóxicos	56
5.2.1 Cultura bidimensional	56
4.2.2 Cultura tridimensional.....	58
5.3 Ensaios Citostáticos	61
5.3.1 Cultura bidimensional	62
5.3.2 Cultura tridimensional.....	69
6 CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

O câncer compreende uma série de doenças originadas por alterações genéticas de causas hereditárias ou ambientais, que levam ao descontrole da proliferação celular e geram um grande impacto negativo na sociedade. O desenvolvimento de novas terapias para essa síndrome passa por ensaios pré-clínicos, geralmente feitos em laboratório com cultura de células em monocamada, seguido de testes em modelos animais, para só então se realizarem os testes clínicos em humanos. Esse processo é altamente custoso e demorado, e cerca de 95% das substâncias que entram em ensaios clínicos falham por alta toxicidade ou baixa eficácia.

Uma alternativa que tem sido estudada nos últimos anos para diminuir o custo associado ao desenvolvimento de novos fármacos é o uso de modelos *in vitro* que sejam mais biologicamente relevantes e mimetizem com maior precisão as características observadas em tumores *in vivo*. Nesse contexto, o uso de esferoides tridimensionais (3D) vem ganhando espaço como potencial substituto das culturas bidimensionais (2D) para a triagem de novas substâncias bioativas, já que eles possuem características espaciais, bioquímicas e físicas que influenciam a resposta dessas estruturas ao tratamento.

A PI3K-AKT-mTOR é uma das vias metabólicas que tem sido estudada como alvo para o desenvolvimento de novas terapias antitumorais pelo grupo de estudos em química medicinal (NEQUIMED). Ela está frequentemente desregulada em diversos tipos de câncer e associada com a progressão e prognóstico mais agressivo da doença. Além disso, evidências recentes indicam que a ativação dessa via em cultura 3D se assemelha mais com o que é observado em tumores retirados de pacientes do que células em cultura 2D.

Dessa forma, esse trabalho objetiva analisar o efeito citotóxico e citostático de novos inibidores da via da mTOR em modelos bi e tridimensionais de cultura celular de câncer de próstata e hepatocarcinoma.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer: Epidemiologia e principais características

Os novos quimioterápicos descobertos ao longo de anos de pesquisa têm levado a um significativo progresso no tratamento de diversos tipos de câncer, com aumento na taxa de sobrevivência dos pacientes. No entanto, o câncer continua sendo um grande problema de saúde pública no mundo, sendo responsável por cerca de 16% de todas as causas de morte. De acordo com o último relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que a incidência mundial da doença aumente de 14 milhões de novos casos por ano (2012) para mais 22 milhões em 2030, além do aumento da mortalidade de 8 milhões de pessoas anualmente (2012) para mais de 13 milhões, como consequência do contínuo crescimento da população e seu envelhecimento¹.

No Brasil, as estimativas referentes ao ano de 2016 indicam a detecção de 576.580 novos casos de câncer, número maior do que o previsto para 2013 (520 mil), conforme projeção do Instituto Nacional do Câncer (INCA). Os tipos mais incidentes são os cânceres de pele não-melanoma (182 mil casos), seguido dos cânceres de próstata no sexo masculino e de mama no sexo feminino². Os dados do INCA revelam que as neoplasias estão em segundo lugar como causa de morte por doença no Brasil, além de terem um impacto de milhões de reais na saúde pública. Dessa forma, este cenário justifica novos investimentos em ações para o controle da doença².

No geral, o câncer pode ser definido como uma síndrome formada por um conjunto de doenças cuja principal característica é a proliferação descontrolada de células, causada diversas alterações genéticas. O trabalho de revisão publicado por Hanahan e Weinberg com as principais características do câncer se tornou um marco para sua pesquisa³. Nele estão descritas seis capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento do tumor e responsáveis pela sua potencial malignidade. Com o passar dos anos, novas descobertas foram feitas a respeito dessas doenças, incluindo a interação de células cancerígenas com o sistema imune e sua modulação do metabolismo energético, o que estimulou a atualização desse importante trabalho.

A nova geração dos *hallmarks* do câncer inclui a sinalização sustentada para a proliferação celular, a evasão de supressores de crescimento, resistência à morte celular, habilidade de imortalidade replicativa, indução de angiogênese, ativação da invasão e metástase, reprogramação do metabolismo energético e a evasão do sistema imune⁴. Por trás de todas essas características está a instabilidade genômica, que por sua vez, pode ser causada por fatores ambientais, incluindo a exposição crônica a agentes carcinogênicos, ou fatores hereditários.

A sustentação da sinalização celular para o estímulo do crescimento independente do meio externo é uma das características mais importantes presente em diversos tumores. Tecidos normais controlam a produção e liberação de fatores de crescimento que estimulam a progressão do ciclo celular e consequente divisão, mantendo a homeostase do número de células e a correta arquitetura e função tecidual. Esses sinais são transmitidos, em grande parte, por receptores localizados na superfície celular que contêm um domínio intracelular do tipo quinase, responsável pela transmissão e propagação do sinal⁵.

As vias de sinalizações celulares não são isoladas uma das outras, mas interconectadas para formar complexas redes de sinalização, nas quais as células recebem informações de diferentes receptores de crescimento, contatos intercelulares e contatos célula-matriz extracelular (MEC). Esses sinais são integrados para regular diversos processos como a síntese proteica, crescimento celular, motilidade, polaridade, diferenciação e morte celular programada⁶. Células cancerígenas adquirem a capacidade de manter a sinalização proliferativa de diversas formas, incluindo a produção autócrina dos fatores de crescimento, a sinalização parácrina para que células vizinhas produzam esses fatores, expressão aumentada dos próprios receptores ou alterações na sua estrutura ou de outras proteínas da via sinalizatória, levando a ativação contínua da sinalização proliferativa⁷.

Alguns exemplos das mutações que levam ao desenvolvimento dessa capacidade sinalizatória em tumores são as alterações observadas na estrutura da proteína B-Raf em cerca de 40% dos melanomas, que levam a ativação constante da sinalização da via MAP-quinase, relacionada com a síntese proteica e proliferação celular⁸. Outra via comumente afetada por mutações e envolvida no desenvolvimento tumoral é a PI3K-AKT-mTOR, frequentemente envolvida em cânceres de próstata⁹, mama¹⁰, e hepatocarcinoma¹¹ e que será discutida em maiores detalhes posteriormente.

O segundo *hallmark* essencial para o estabelecimento da doença é a evasão de supressores de crescimento, que são programas celulares responsáveis pela regulação negativa da proliferação celular e estão ligados a ação de genes supressores de tumor. Os dois mais envolvidos em diversos tumores são os genes que codificam a proteína RB (proteína associada ao retinoblastoma) e a p53, que operam como controles centrais e governam as decisões de proliferação celular ou ativação de programas de senescência e apoptose¹².

A resistência a morte celular está intimamente relacionada com os dois primeiros *hallmarks*, já que as vias de sinalização e resistência a apoptose estão interligadas com os genes supressores de tumor. Em células saudáveis, a morte celular programada serve como barreira natural ao desenvolvimento tumoral, pois a indução da apoptose ocorre em resposta a detecção de alterações malignas nas vias de sinalização celular e danos ao DNA associados com hiperproliferação¹³. A maquinaria de sinalização apoptótica é composta de componentes efetores que processam sinais extra e intracelulares. Os primeiros participam da via extrínseca da apoptose, que envolve o receptor Fas e FasL enquanto os segundos estão relacionados com a via intrínseca, que converge sinais de origem intracelular. Ambas as vias levam a ativação comum de proteases latentes que por sua vez iniciam uma cascata proteolítica envolvendo outras caspases efectoras, culminando na morte celular¹⁴. Grande parte das células tumorais possui algum tipo de alteração que leva a inibição da apoptose, que aconteceria normalmente nas condições adversas. Além da perda do gene supressor de tumor p53, que possui uma função crítica nesse processo, a superexpressão de proteínas antiapoptóticas como as da família Bcl-2 ou a diminuição da expressão de fatores apoptóticos já foi reportada em diversos tipos de tumores¹⁵.

O potencial replicativo ilimitado é outra característica inerente de tecidos tumorais. Essa capacidade contrasta com o comportamento da maioria das células saudáveis, que passam por uma quantidade limitada de divisões celulares antes de entrarem em senescência e consequente morte celular. Isso se dá pela presença de um regulador das divisões celulares na região terminal dos cromossomos, denominado telômero. Essa região é composta de repetições múltiplas de hexanucleotídeos não-codificantes que são encurtados progressivamente a cada divisão celular em células não-imortalizadas, o que eventualmente leva a perda da proteção da região terminal dos cromossomos e sua consequente fusão com outros cromossomos, formando dímeros instáveis que estimulam a morte celular¹⁶. A manutenção da imortalidade celular está relacionada com a atividade da telomerase, uma DNA polimerase especializada que adiciona segmentos de DNA não-codificantes aos

telômero após cada ciclo de divisão celular. Sua expressão está predominantemente inibida em células não-imortalizadas e aumentada em grande maioria das células tumorais¹⁶.

Como qualquer tecido saudável, o tecido tumoral também necessita de nutrientes e oxigênio, até mesmo em maiores quantidades devido a seu elevado metabolismo em comparação a células saudáveis. Como o limite de difusão dessas moléculas pelo tecido tridimensional é de apenas 150-200 µm, se faz essencial o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos para o crescimento do tumor¹⁷. Esse desenvolvimento se dá por dois processos distintos: vasculogênese, no qual ocorre a formação de vasos sanguíneos a partir de novas células epiteliais, e a angiogênese, que envolve o brotamento a partir de vasos já existentes. Ambos processos estão ativos em seres humanos principalmente durante a embriogênese, mas durante a vida adulta eles agem de forma transiente para a recuperação de feridas e durante o ciclo menstrual em mulheres. Tecidos tumorais, no entanto, têm a capacidade de estimular esse crescimento vascular através da expressão contínua de moléculas sinalizadoras como o fator de crescimento vaso-endotelial (VEGF) e inibição de fatores inibitórios como a trombospondina-1 (TSP-1)¹⁸.

Os mecanismos que abrangem a invasão celular e metástase têm sido amplamente estudados nos últimos anos devido a importância desses processos no desenvolvimento da doença. Essas alterações seguem uma cascata de passos que se inicia com a perda do contato intercelular, como ocorre em células tumorais após a perda da expressão de E-caderina, uma molécula de adesão chave nesse processo. A redução de sua expressão já foi relacionada com esse fenótipo maligno, enquanto o seu aumento caracteriza a inibição do mesmo¹⁹. A invasão e a metástase dependem do processo de transição epitélio-mesenquimal (do inglês, EMT), que está normalmente relacionado com a morfogênese embrionária e pelo qual uma gama de fatores de transcrição são induzidos para facilitar a migração celular, sua entrada em vasos sanguíneos e consequente difusão pelo corpo^{20,21}.

Os dois últimos novos *hallmarks* para desenvolvimento tumoral são a reprogramação do metabolismo energético e a evasão do sistema imune. O primeiro está relacionado com a habilidade dessas células em ajustar seu metabolismo para estimular seu crescimento e divisão. Para isso, ocorrem alterações principalmente no metabolismo da glicose e a limitação de seu metabolismo energético para a via de glicólise ao invés do ciclo do ácido cítrico, além do consequente aumento da expressão de transportadores de glicose (GLUT1) para o citoplasma²². Já o segundo envolve a capacidade de células cancerígenas em escapar do

sistema imunológico através da inibição da atividade das células desse sistema, como ocorre devido a secreção de TGF- β e outros fatores imunossupressores²³.

Nas últimas décadas houve uma mudança de paradigma em relação a complexidade do tecido tumoral, incluindo o reconhecimento da importância do microambiente e das células associadas ao tumor na progressão da doença. O microambiente tumoral é composto de células cancerígenas, células endoteliais e pericíticas associadas a vasculatura tumoral, células inflamatórias do sistema imune, incluindo linfócitos T e células NK e fibroblastos associados ao câncer. Todas interagem entre si e com a matriz extracelular, formando uma rede de comunicação molecular complexa que influencia o desenvolvimento e progressão da doença⁴ (*Figura 1*).

Figura 1 - Esquema do microambiente tumoral e interações entre as diversas células presentes.

Adaptado de Hanahan, 2011⁴.

2.1.1 Câncer de Próstata

O câncer de próstata (CaP) é o tipo mais comum de câncer entre homens no mundo todo, com cerca de 1,6 milhão de novos casos em 2015²⁴ e a segunda causa de morte entre homens nos Estados Unidos. Estimativas da *American Cancer Society* para o ano de 2018 apontam a incidência de 165 mil novos casos nos EUA, correspondendo a 1 em cada 5 novos casos diagnosticados, além de quase 30 mil mortes relacionadas a esta doença²⁵. A incidência

da doença tem crescido principalmente nos últimos anos devido ao aumento da detecção precoce pela quantificação do antígeno prostático específico (PSA)²⁵.

Estudos epidemiológicos do CaP revelam diversos fatores biológicos e comportamentais que influenciam o risco de desenvolvimento da doença, em especial a idade elevada, descendência africana, histórico familiar, obesidade, e fumo²⁶.

A maior parte dos CaP depende da estimulação por hormônios andrógenos para seu crescimento, especialmente a testosterona e di-hidrotestosterona (DHT), dessa forma, a primeira linha de tratamento para a doença é a terapia de supressão androgênica. Essa terapia é baseada no uso de compostos antagonistas do receptor andrógeno, como nilutamida, bicalutamida, flutamida e enzalutamida, que interagem no domínio de ligação desse receptor e bloqueiam a ligação dos hormônios, atuando assim na interrupção da proliferação celular²⁷. Contudo, a maioria dos pacientes desenvolve resistência a terapia de supressão androgênica, progredindo para o fenótipo de câncer de próstata resistente a castração, caracterizado pelo crescimento tumoral persistente independente da testosterona, levando ao aumento significativo da mortalidade²⁸. No nível celular, ocorre uma resposta compensatória ao estresse induzido pela deprivação androgênica, o que permite que as células se dividam mesmo em condições desfavoráveis.

Um dos mecanismos que levam a essa resistência é a sinalização persistente do receptor andrógeno (AR), que pode ser causada por mutações no domínio de ligação²⁹, amplificação do gene AR³⁰ e expressão de receptores variantes que apresentam ativação constitutiva³¹. Outro mecanismo inclui a expressão de genes responsáveis pela conversão de outros hormônios andrógenos em DHT³² e até mesmo mutações que levam ao ganho de função em enzimas responsáveis pela produção de DHT³³. Além disso, a compensação sinalizatória através da ativação de vias metabólicas secundárias está diretamente envolvida nesse mecanismo de resistência, incluindo a via da PI3K-AKT-mTOR, que será discutida em detalhes posteriormente.

Dessa forma, a mortalidade de CaP de grau avançado continua alta, justificando a necessidade de novas alternativas terapêuticas que atuem em vias sinalizatórias diferentes da sinalização hormonal.

2.1.2 Hepatocarcinoma

O hepatocarcinoma (HC) é o terceiro tipo de câncer mais mortal no mundo, e apenas 30 a 40% dos pacientes são submetidos a terapias como remoção cirúrgica devido ao estágio avançado da doença no momento do diagnóstico²⁴. A grande maioria dos casos (85%) afeta principalmente países em desenvolvimento, onde a infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) é endêmica, como a África Subsaariana e o sudeste asiático, apesar de sua incidência também estar aumentando consideravelmente em países desenvolvidos²⁴.

No geral, o HC é caracterizado por um tumor originado de células primárias do fígado que passam por mutações em genes que controlam sua proliferação, fazendo com que seu crescimento fique descontrolado. Os principais fatores de risco relacionados ao HC são infecções pelo vírus das hepatites B e C, que correspondem a mais de 50% dos casos, além do alcoolismo crônico e esteatose hepática não-alcóolica. A maioria desses fatores leva a progressão da cirrose, presente em 90% dos pacientes com HC³⁴.

A carcinogênese induzida por infecção com HBV envolve três diferentes mecanismos de mediação: a integração do DNA viral no genoma do hospedeiro, induzindo a instabilidade cromossômica, múltiplas mutações por inserção que podem levar a ativação de genes exógenos carcinogênicos e a modulação da proliferação celular pela expressão de proteínas virais, em especial a HBx³⁵. Essa proteína atua na coordenação do balanço entre proliferação celular e apoptose pela ativação de promotores de genes associados com a proliferação celular, incluindo a interleucina-8, TNF e o EGFR³⁶. Além disso, sua interação com importante vias de sinalização como a Ras/Raf/MAPK e PI3K/AKT/mTOR já foi descrita, indicando a importância dessa proteína viral para a progressão da doença^{37,38}.

O inibidor de quinase Sorafenib é atualmente, uma das únicas terapias sistêmicas para a doença que aumenta a sobrevida de pacientes em estágios avançados³⁹. Dessa forma, é fundamental o estudo e desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas buscando diminuir sua mortalidade.

2.2 Via da mTOR e seus inibidores

O alvo da rapamicina em mamíferos, do inglês mTOR, é uma serina/treonina quinase com massa de 289 kD, expressa em quase todas as células e frequentemente abordada como alvo terapêutico para o câncer. Essa quinase é parte de uma rota bioquímica que integra sinais celulares e extracelulares e serve como regulador central do metabolismo, crescimento e proliferação celular⁴⁰ (**Figura 2**). Descobertas dos últimos anos mostram que essa via está desregulada em vários processos patogênicos, incluindo o câncer e diabetes tipo II⁴¹.

A família de quinases PI3K forma uma importante interface entre a sinalização de fatores de crescimento extracelular e a maquinaria de transdução do sinal intracelular. Essas enzimas são agrupadas em três classes (I-III) de acordo com sua preferência de substrato e sua principal função é a fosforilação do grupo hidroxila-3' do fosfatidilinositol e fosfoinositídeos. Uma variedade de sinais estimula a atividade da PI3K através de receptores tirosino-quinases⁴², receptores acoplados a proteína G⁴³ e oncogenes como Ras⁴⁴. Após sua estimulação, a unidade catalítica da PI3K converte o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃), que age como mensageiro secundário e recruta uma variedade de proteínas com o domínio PH (*plekstrin homology*) para a membrana celular, incluindo a PDK1 e a AKT⁴⁵. Esse processo, no entanto, pode ser revertido pela proteína supressora de tumor PTEN, que atua na desfosforilação da PIP₃. O recrutamento da AKT leva a fosforilação e consequente ativação, que por sua vez atua na fosforilação de outros efetores importantes, incluindo o TSC2 e TSC1, GSK3, FOXO, p27, BAD e eNOS, relacionados com a regulação de processos de crescimento, sobrevivência, proliferação, metabolismo e angiogênese⁴⁶. A PI3K pode também atuar diretamente na ativação do complexo mTORC2 através do recrutamento de ribossomos e a promoção de sua ligação com o complexo⁴⁷.

Figura 2 – Esquema simplificado da via de sinalização da mTOR.

Adaptado de Benjamin, 2011. *Nature Reviews: Drug discovery*⁴⁸

A mTOR abrange dois complexos multi-proteicos distintos: mTORC1 e mTORC2. O primeiro é composto por cinco componentes: mTOR, que é a subunidade catalítica do complexo (**Figura 3**); a proteína regulatória associada ao mTOR (Raptor); mLST8 e dois reguladores negativos: PRAS40 e Deptor. A proteína Raptor regula a atividade e função da mTOR dependendo de seu estado de fosforilação e recrutamento de substratos^{49,50}. A mLST8, por outro lado, se liga ao domínio quinase da mTOR e regula positivamente sua atividade⁵¹. Além disso, outro estudo identificou que ela atua no transporte da subunidade mTOR entre os dois complexos, sendo essencial para a manutenção de seu equilíbrio dinâmico nas células⁵². Esse complexo é ativado pela rota PI3K/AKT (**Figura 2**) e é um importante regulador da biogênese ribossomal, síntese de proteínas e lipídios e outros processos, através da fosforilação e ativação da proteína S6K e inativação do repressor de tradução 4EBP1⁵³. Dessa forma, ao integrar vários estímulos relacionados ao crescimento, o complexo faz a mediação do crescimento da massa celular, por isso, células com maior atividade do complexo mTORC1 são maiores em relação ao tamanho médio observado⁵⁴.

Figura 3 - Representação esquemática da estrutura dos domínios da mTOR.

Adaptado de Benjamin, 2011. *Nature Reviews: Drug discovery*⁴⁸

O complexo mTORC2 também contém mTOR e mLST8 além de outros compostos diferentes como Protor, rictor, mSin1, Hsp70 e DEPTOR. Como visto anteriormente, mLST8 é um componente estável de ambos complexos e com função regulatória⁵¹, enquanto mSin1 é uma subunidade exclusiva da mTORC2 e essencial para sua integridade e atividade frente a fosforilação da Ser473 na quinase AKT⁵⁵. Protor-1 interage com a rictor e mantém a estabilidade do complexo, apesar de não ser essencial para sua formação⁵⁶. Hsp70, uma proteína *heat shock*, é requerida para a atividade quinase do complexo em condições basais e em choque térmico⁵⁷. Por fim, o DEPTOR foi identificado como regulador negativo dos dois complexos da mTOR⁵⁸. O complexo mTORC2 é ativado por fatores de crescimento e envolvendo a associação com ribossomos, então fosforila PKC- α , AKT e paxillina, regulando a atividade de pequenas GTPases relacionadas à sobrevivência celular, migração e regulação do citoesqueleto de actina⁵⁹. Dessa forma, esse complexo apresenta uma importância significativa no câncer, onde já foi associado à motilidade, invasão e metástase⁶⁰.

Os dois complexos também estão relacionados entre si em um mecanismo de retroalimentação negativa. A mTORC1, ao fosforilar IRS1 via S6K, pode suprimir a sinalização inicial da insulina, inibindo assim a sinalização de PI3K no complexo mTORC2. Assim, a inibição da mTORC1 pode ativar a mTORC2, ilustrando a complexidade dessa via de sinalização^{61,62}.

A descoberta do alvo de mamífero da rapamicina (mTOR) ocorreu, como o nome sugere, após o descobrimento da rapamicina. Essa substância foi isolada em 1970 como metabólito secundário da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, isolada de uma amostra de solo coletada na Ilha da Páscoa (Chile)⁶³. Foi observado então que ela apresenta uma potente atividade antifúngica e que em células de mamíferos, possui efeito antitumoral e imunossupressor^{64,65}. Seu mecanismo de ação envolve a formação de um complexo com a proteína FKBP12, que atua como cofator, e a ligação ao domínio FRB da mTOR, causando a

sua inibição alostérica (**Figura 3**). Essa inibição previne a fosforilação dos efetores 4EBP1 e S6K1, inibindo assim a síntese proteica e a proliferação celular e mantendo as células retidas na fase G1 do ciclo celular⁴⁰.

A rapamicina foi aprovada pelo FDA para uso clínico em 1999 para aplicações em pacientes recém-transplantados, devido a seu efeito imunossupressor. Em 2002 foi aprovada sua aplicação como um agente anti-estenótico após constatação de seu efeito na inibição do crescimento da musculatura lisa vascular⁶⁶. Com a elucidação dos mecanismos da mTOR e outras proteínas envolvidas no mecanismo do câncer, novos análogos sintéticos da Rapamicina surgiram, denominados Rapalogues. Temsirolimus, everolimus e ridaforolimus fazem parte desse grupo, apresentando o mesmo mecanismo de ação da Rapamicina e melhores propriedades farmacocinéticas, devido a substituições na posição C-40⁶⁷. As três substâncias foram aprovadas para uso nos Estados Unidos e na Europa para pacientes com câncer renal metastático, porém a expectativa de atividade em um amplo espectro de cânceres mostrou-se falha^{68,69}.

A atividade limitada desses rapalogues pode estar relacionada com a complexidade da via da mTOR e o mecanismo de retroalimentação negativo no qual a inibição da mTORC1 estimula a sinalização da PI3K-AKT e pode aumentar a sobrevivência das células cancerígenas, já que a ativação do AKT leva a uma resposta anti-apoptótica⁷⁰. Além disso, a Rapamicina e os rapalogues levam apenas a uma inibição incompleta da mTORC1, permitindo que a síntese proteica continue em um nível basal suficiente para a manutenção do tumor⁷¹. Por fim, essas substâncias não atuam na inibição da mTORC2, cuja rota PI3K-AKT-mTORC2- está superativada em inúmeros tumores⁷².

A resistência da mTOR a Rapamicina, observada em função de mutações no domínio FRB⁷³, juntamente com as outras desvantagens descritas previamente levou a busca de novos inibidores que atuem em outros sítios ativos da proteína ou até de outras enzimas da rota PI3K-mTOR. Dentre eles, o NVP-BKM120 é um potente e seletivo inibidor de PI3K classe I, com elevada atividade citostática para células com PI3K desregulada, incluindo a DU145 ($GI_{50} = 0.43 \text{ nM}$)⁷⁴. Outra substância alternativa é o AZD-8055 que, assim como a Rapamicina, atua diretamente na mTOR, porém no domínio do ATP. Sua principal vantagem é que ele atua tanto na mTORC1 quanto na mTORC2 e suas proteínas efetoras, além de possuir formulação para ingestão via oral e induzir um efeito dose-dependente da inibição do

crescimento celular *in vitro* e *in vivo*⁷⁵. A estrutura química dessas duas substâncias, além da Rapamicina, estão dispostas na Figura 4.

Figura 4 – Representação estrutural de alguns inibidores da mTOR.

No câncer de próstata, alterações em níveis genômicas e transicionais dessa via foram detectadas em 42% de tumores *in situ* e em 100% dos tumores em estágio avançado⁷⁶, o que implica que essa alteração é um pré-requisito para o desenvolvimento de resistência andrôgena. Ademais, a ligação entre a via da mTOR e sinalização andrôgena foi demonstrada, revelando a dinâmica entre essas vias no processo de resistência androgênica⁷⁷. As principais alterações presentes são a perda do gene supressor de tumor PTEN e ativação do oncogene AKT, levando a hiperativação da via e consequente proliferação celular descontrolada⁷⁸.

Já em hepatocarcinoma, alterações na via PI3K-AKT-mTOR foram detectadas em até 48% dos tumores e a relação entre o prognóstico ruim e ativação dessa via já foi demonstrada⁷⁹, como por exemplo a fosforilação do AKT na S473 detectada em 71% das amostras associadas com invasão, metástase e neovascularização tumoral⁸⁰. Dessa forma, esta via também é um importante alvo terapêutico para ser explorado no tratamento de ambas doenças.

O grupo de química medicinal (NEQUIMED), localizado no Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC-USP) atua no planejamento, síntese e avaliação de novas substâncias com potencial efeito antiparasitário e antineoplásico. Um dos coordenadores do grupo, o Prof. Dr. Andrei Leitão realizou um estudo *in silico* no qual foram identificadas novas substâncias que atuam como inibidores competitivos ao ATP na via PI3K-AKT-mTOR⁸¹. Em seguida, uma série dessas substâncias foram testadas *in vitro* em células de câncer de próstata, e os compostos Neq0438 e Neq0440 foram os mais efetivos e com índice de seletividade acima de 1.3 frente a células saudáveis. Análise de citometria de fluxo confirmou que essas substâncias apresentam uma resposta semelhante à Rapamicina, na qual apenas a fosforilação da proteína S6 foi reduzida, sem grandes alterações na fosforilação da

AKT. Além disso, um ensaio virtual baseado na estrutura dos dois compostos confirmou sua interação no domínio quinase das proteínas mTOR e PI3K, corroborando para seu mecanismo de ação⁸¹.

Com base nesses resultados recentes, uma série de compostos com estruturas similares aos compostos Neq0438 e Neq440 foi adquirida para estudos complementares (**Figura 5**). O composto Neq0678 é derivado do Neq0440, com uma variação no átomo usado como ligante (oxigênio ao invés do enxofre). Já o Neq0679, é derivado do Neq0438 e sua única alteração é a posição do átomo de flúor no anel aromático, alternando da posição *para* para a posição *orto*. Por fim, o Neq0680 foi obtido para comprovar a importância do grupo terminal amina na ligação do composto à proteína alvo. Ele é semelhante ao Neq0440, onde o grupo nitrila substitui a amina.

Figura 5 - Estrutura química das novas substâncias bioativas testadas neste trabalho. Todas as substâncias apresentam o código Neq0xxx onde os três últimos números são mostrados para cada uma.

2.3 Cultura tridimensional de células

A pesquisa pré-clínica de substâncias bioativas para o tratamento do câncer envolve a avaliação de potenciais intervenções terapêuticas em células e animais. O custo da pesquisa e desenvolvimento de um único novo fármaco requer quase 2 bilhões de dólares em investimento e até 12 anos de pesquisa, na qual os ensaios clínicos correspondem ao estágio mais custoso⁸². O elevado custo e tempo para a comercialização dos novos fármacos se dá pela grande dificuldade na transição de terapias promissoras da bancada laboratorial para a clínica, que apesar de esforços conjuntos de instituições acadêmicas, indústrias farmacêuticas e agências regulatórias, ainda persiste em todas as etapas da pesquisa. Uma das maiores dificuldades é a inabilidade de prever precisamente quais candidatos pré-clínicos a fármacos

apresentarão atividade biológica em ensaios clínicos posteriores. Apesar de várias substâncias serem eficazes para o tratamento de câncer em culturas celulares e estudos em animais, candidatos promissores apresentam baixa ou nenhuma eficácia quando testados em humanos. Estudos recentes, por exemplo, mostram que 95% das novas substâncias anticâncer que entram no ensaio clínico falham como resultado de elevada toxicidade e baixa eficácia^{83,84}.

Um dos principais motivos para esta elevada taxa é a falha que os modelos pré-clínicos têm em mimetizar a heterogeneidade e o microambiente tumoral, além da limitada extrapolação para os mais diversos efeitos biológicos *in vivo* a partir dos ensaios celulares mais comuns⁸⁵ realizados em linhagens celulares cultivadas em monocamada (2D). Assim, as substâncias selecionadas usando culturas 2D são subsequentemente aplicadas em modelos animais, como por exemplo em xenoinxertos subcutâneos tridimensionais em ratos imunocomprometidos⁸³. De qualquer maneira, os resultados deste modelo reducionista apresentam limitações que comprometem o avanço destas substâncias nos ensaios pré-clínicos.

Desta forma, modelos pré-clínicos de câncer devem ser aperfeiçoados ao máximo buscando replicar, *in vitro*, a complexidade que ocorre naturalmente na doença⁸⁶. Em vista disso, os ensaios convencionais de pesquisa para o tratamento do câncer estão sendo revisados minuciosamente e o seu refinamento é considerado uma prioridade, já que o aumento do valor preditivo da pesquisa pré-clínica contribui para a seleção com maior acurácia de substâncias que irão para as fases clínicas posteriores.

Uma das alternativas desenvolvidas e aperfeiçoadas nos últimos anos é o uso de modelos tridimensionais (3D) de cultura de células para os ensaios pré-clínicos, dado que estes mimetizam mais precisamente as características nativas de tumores *in vivo*⁸⁷. A principal vantagem desse sistema é a oportunidade de cultivar células de câncer em uma maneira espacialmente relevante, juntamente com componentes adicionais do microambiente tumoral, mimetizando assim as interações intercelulares e com a matriz, além de propriedades físico-químicas e mecânicas⁸⁸. Com isso, é possível definir com precisão as contribuições da geometria tridimensional, interação celular, estroma tumoral e difusão das substâncias químicas no crescimento do tumor, potencial metastático e sensibilidade aos candidatos a fármaco, o que não seria possível ser determinado usando modelos tradicionais de cultura em monocamada^{87,89}.

Dentre as diferentes configurações tridimensionais que têm sido alvo de investigação, os esferoides tumorais multicelulares (do inglês, MCTS) constituem o modelo mais simples. Essas estruturas foram propostas inicialmente por Costachel *et al.* (1969)⁹⁰ bem como Sutherland e Durand (1976)⁹¹ e são constituídas de arranjos multicelulares, organizados de forma esférica ou irregular, dependendo da natureza das interações celulares. Por serem similares a microtumores avasculares, os MCTS também apresentam características como deposição endógena de matriz e mimetizam as barreiras fisiológicas para a difusão e permeação de substâncias *in vivo*. Além disso, dependendo do tamanho, os esferoides também podem recapitular algumas condições físico-químicas observadas *in vivo*, como já observado para a hipóxia, acidose, diferenças no ciclo celular, expressão de receptores, entre outros⁹² (*Figura 6*).

Figura 6 –Combinação de imagens analíticas de seções de esferoides estudados com diferentes técnicas: Autorradiografia, ensaio de TUNEL, bioluminescência e sondas de microeletrodos para o oxigênio.

Adaptado de Franziska Hirschhaeuser, 2010.⁹³

As técnicas mais comuns utilizadas para a fabricação dos MCTS incluem abordagens de flutuação forçada, como no uso de placas não-aderentes, gota suspensa, agitação constante, uso de matriz extracelular ou *scaffolds* tridimensionais e microfluídica⁹⁴. Cada técnica

apresenta vantagens e desvantagens e sua escolha depende de características desejadas e do material disponível no laboratório.

Um dos métodos mais simples para a formação de MCTS consiste na prevenção de sua adesão na superfície de cultura, por meio de modificações químicas ou adição de polímeros antiaderentes ao fundo da placa, como o polimetilmetacrilato e ágar. Esta técnica de flutuação forçada promove o contato intercelular, que por sua vez leva a formação da estrutura tridimensional. Suas principais vantagens são a facilidade de reprodução, homogeneidade na forma e tamanho das estruturas e consequente compatibilidade com automação e triagem de alta eficiência de novas substâncias bioativas⁹⁴. A principal desvantagem observada nesta técnica, no entanto, é o tempo necessário para tratar a placa com as substâncias antiaderentes previamente a sementeação das células, que pode ser superada ao comprar placas de aderência ultrabaixa (do inglês, ULA) prontas, ao custo mais elevado.

O método de gota suspensa para a formação de esferoides usa uma pequena alíquota de suspensão celular que é pipetada em uma placa especial onde a tensão superficial permite a formação de gotas e por ação da gravidade, as células se ligam entre si e formam a estrutura tridimensional⁹⁵. Assim como no modelo de flutuação forçada, a densidade celular pode ser alterada para formar esferoides de diferentes tamanhos, de acordo com a necessidade de cada experimento. Esse método é simples e produz esferoides compactos com baixa variedade em tamanho, com produção da própria MEC e similares aos tecidos originais⁹⁶.

Além das diferenças no arranjo celular entre as culturas 2D e 3D, existe um número de diferenças biológicas que contribuem na resposta a agentes terapêuticos. Os efeitos que o microambiente tumoral tridimensional possui no seu comportamento já foram amplamente documentados incluindo por exemplo alterações na expressão de receptores de superfície e proteínas associadas a importantes vias metabólicas^{97,98}. Isso faz com que os MCTS apresentem respostas mais similares ao observado *in vivo*, seja mais sensível ou mais resistente do que as culturas em monocamada.

O maior desafio na implementação de modelos tridimensionais de cultura na triagem pré-clínica de novas substâncias bioativas é estabelecer a relação entre a elevada relevância fisiológica do sistema com a habilidade de extrair mensuramentos exatos da eficácia desses compostos. A maioria dos métodos quantitativos disponíveis para esse modelo de cultura analisa a viabilidade e atividade metabólica total do esferoide, dificultando a compreensão da contribuição individual de cada componente do sistema.

Além de análises microscópicas, pelas quais é possível acompanhar o efeito de substâncias no tamanho do esferoide, o uso de indicadores de viabilidade celular tem sido frequente para a determinação do efeito citotóxico de diversos compostos em culturas 3D⁹⁹. O ensaio da redução da resazurina, por exemplo, tem sido amplamente utilizado na literatura para a determinação da citotoxicidade de substâncias bioativas. Estudos indicam que este é um método simples e preciso na detecção da viabilidade celular em células HepG2¹⁰⁰ e que ao ser usado em esferoides multicelulares, também é capaz de identificar substâncias como citotóxicas ou citostáticas¹⁰¹. Este método fluorimétrico estima o número de células viáveis através da mensuração da redução da resazurina em resorfurina, um produto vermelho fluorescente. Esta redução é feita apenas por mitocôndrias vivas e possui grande aplicabilidade em ensaios em massa (HTS), após sua correta padronização para cada tipo celular¹⁰².

2.3 Substâncias de referência

A doxorubicina é um agente antitumoral amplamente utilizado que pertence a classe de compostos com estrutura similar, denominados antraciclinas. Este composto tem mostrado grande eficácia na morte de células tumorais em tumores líquidos e sólidos. No entanto, seu uso tem sido limitado devido a resistência adquirida em alguns casos e efeitos colaterais. O mecanismo pelo qual a doxorubicina leva a morte celular ainda não é claro, sendo que alguns modelos já foram propostos, incluindo a superprodução de ceramida, formação de adutos de DNA, estresse oxidativo e inibição da topoisomerase II¹⁰³.

O maior efeito colateral observado com o tratamento de doxorubicina é a cardiomiopatia, causando dano a células que não estão se dividindo, nas quais a TOPII β é a forma mais presente. Já foi demonstrado que a depleção desse subtipo de topoisomerase protege ratos deste efeito colateral. Como a maioria das drogas antitumorais desenvolvidas são efetivas apenas em células crescendo de forma exponencial, a presença de células em diferentes fases do ciclo celular dentro do mesmo tumor é um grande desafio ao tratamento. A vantagem da doxorubicina é que ela induz a retenção do ciclo celular independente da fase em que a célula está. Estudos recentes indicam que a forma reduzida dessa substância pode induzir a fragmentação e dano ao DNA ao liberar radicais livres e superóxidos^{104,105}. Outro

estudo mostrou que a profundidade de penetração da doxorrubicina *in vivo* e *in vitro* depende da composição e função da MEC em um determinado tumor ou esferoide¹⁰⁶.

Estudos feitos com a doxorrubicina em células de hepatocarcinoma mostram uma significativa redução na viabilidade celular após exposição¹⁰⁷, no entanto, o uso de modelos de cultura tridimensional levou ao aumento considerável dos valores de IC₅₀¹⁰⁸. A redução da viabilidade celular foi observada em câncer de endométrio (KLE), cólon (HCT116), sarcoma (Saos-2) e osteosarcoma (HOS) cultivadas tridimensionalmente¹⁰⁹.

Outro estudo feito com diversas linhagens cultivadas tridimensionalmente, incluindo câncer cervical (HELA), muscular (C2C12), neuroblastoma (SH-SY5Y), entre outros, investigou o efeito da doxorrubicina em tempo real e o correlacionou com a produção de ATP. Foi descoberto que o composto precisa ser internalizado via endocitose para ser efetivo, já que a citotoxicidade em esferoides foi vista após um dia de tratamento. O efeito citotóxico da doxorrubicina na linhagem de neuroblastoma também causou a degradação da MEC, levando a completa dissociação da estrutura¹⁰⁶.

Outra substância frequentemente usada como controle positivo para a diminuição da viabilidade celular em diversas linhagens de câncer é o YM-155, também conhecido como brometo de sepântronio. Essa pequena molécula atua como inibidor da survivina, uma proteína inibitória da apoptose relacionada com a sobrevivência celular e regulação da mitose no câncer^{110,111} que está superexpressa em todos os tipos de tumores primários¹¹² e indetectável na maioria de tecidos normais diferenciados¹¹³, fazendo com que ela seja um alvo interessante para várias novas terapias.

Evidências indicam que a survivina possui um papel importante nas estratégias de sobrevivência para o câncer de próstata, já que ela não está expressa em células epiteliais secretórias normais da próstata e superexpressa nas células tumorais¹¹⁴. Essa maior expressão está correlacionada com fenótipos mais agressivos da doença, como maior taxa de metástase e baixa sobrevivência^{115,116}.

Estudos preliminares com o YM-155 mostram que ele levou a supressão da expressão de survivina e induziu a apoptose a 10 nM em duas linhagens de câncer de próstata, com o aumento concomitante da atividade da caspase-3. Ensaios *in vivo* também indicam que o tratamento em ratos levou a uma massiva regressão tumoral acompanhado da redução de

survivina intratumoral¹¹⁷. Assim, ensaios clínicos de fase I e II já foram completados, com resultados promissores para a aplicação dessa molécula na prática clínica¹¹⁸.

Dessa forma, ambas substâncias já são bem conhecidas e usadas em modelos bi e tridimensional de cultura, portanto, podem ser usadas como fármacos de referência para identificar a sensibilidade das diferentes linhagens e modelos de cultura a sua exposição.

3 OBJETIVOS

Este trabalho visa realizar uma avaliação do potencial citostático e citotóxico de novos inibidores da mTOR em culturas bidimensionais e tridimensionais de células de câncer de próstata (DU145) e hepatocarcinoma (HepG2). Para isso, alguns objetivos secundários foram estabelecidos, incluindo:

- Padronização da técnica de cultura tridimensional de esferoides usando a metodologia de gota suspensa e flutuação forçada;
- Padronização do ensaio de redução da resazurina para detecção da viabilidade celular em esferoides e cultura 2D;
- Análise do efeito citotóxico de substâncias de referência e novas substâncias nas condições padronizadas para cultura 2D e 3D.
- Análise do efeito citostático dos novos compostos e da Rapamicina nas culturas 2D e 3D de ambas linhagens.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e Reagentes

O sal de sódio de resazurina, o dimetilsulfóxido (DMSO), o brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), a placa *Perfecta 3D hanging drop* da 3D Biomatrix e as placas de cultura *Costar ultra low attachment (ULA)* foram comprados da empresa Sigma-Aldrich®. As substâncias de referência Doxorubicina, YM-155 (brometo de sepantrônio), Rapamicina, AZD-8055 e NVP-BKM120 foram obtidas da Selleckchem LLC, EUA. As novas substâncias bioativas em estudo (Neq0438, 440, 678, 679 e 680) foram compradas da empresa ChemBridge Corporation® (San Diego, CA, EUA). O tampão fosfato salino (PBS) e o meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sem vermelho fenol são da marca Cultilab®. O soro bovino fetal (FBS) e tripsina foram adquiridos da empresa Vitrocell®.

As linhagens celulares de carcinoma epitelial de próstata (DU145) e carcinoma hepatocelular (HepG2) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Estas células foram mantidas em frascos de cultura T75 com meio DMEM em incubadora a 37°C, 90% de umidade e 5% de pressão de CO₂ até atingirem a confluência de trabalho. Para a manutenção das células, após cada período de cultura efetivou-se uma nova passagem de frascos e, a cada 48 horas, foi realizada a troca do meio de cultura.

Os compostos de referência e novos inibidores foram diluídos em DMSO para a formação da solução estoque na concentração de 50 mM. A partir de então, eles foram diluídos em meio de cultura DMEM para os ensaios posteriores, sendo que a concentração final de DMSO é menor que 0,5%.

4.2 Padronização da cultura tridimensional

4.2.1 Escolha das linhagens e padronização da técnica

Para a formação de esferoides multicelulares, foram avaliadas quatro linhagens celulares disponíveis no laboratório em relação à sua capacidade de formar estruturas tridimensionais compactas: carcinoma hepatocelular (HepG2), células metastáticas de câncer de próstata (DU145 e PC-3) e células de adenocarcinoma de ducto do pâncreas (Mia-Pacca2).

A escolha das linhagens mais adequadas para a realização dos experimentos ocorreu a partir da padronização da cultura tridimensional, usando duas técnicas diferentes: Gota suspensa, com placas de cultura *Hanging Drop* ou baixa aderência, com placas *ULA*. Na primeira, foram testadas concentrações variando de 500 a 5000 células por esferoides em gotas de 30 a 80 μL . Após três dias de cultura, a gota foi transferida para uma placa de 96 poços com uma fina camada de ágar e as imagens foram capturadas com uma câmera acoplada a um microscópio invertido de campo claro (Moticam 2000, Motic©). Já na técnica usando placas de fundo redondo com aderência ultra reduzida (do inglês, *ULA*), foram testadas as mesmas concentrações de células por esferoide, centrifugadas em 450 g por 10 minutos e após três dias de cultura as imagens foram obtidas da mesma forma.

4.2.2 Avaliação do crescimento e morfologia

O crescimento dos esferoides foi avaliado por meio de microscopia de campo claro pelo período total de 15 dias, sendo as imagens capturadas utilizando o software Motic Image Plus 3.0[®] e analisadas pelo software ImageJ[®] (*National Institute of Health*, EUA). Os dois diâmetros cruzados da estrutura celular foram mensurados a cada três dias e usados para o cálculo de seu volume de acordo com a fórmula abaixo baseado no trabalho de Schwartz (1961)¹¹⁹, na qual a e b são os diâmetros menores e maiores, respectivamente.

$$V = a \cdot b^2 \cdot \frac{\pi}{6}$$

Em seguida, a curva de crescimento foi feita em uma escala semi-logarítmica, onde a curva de crescimento apresenta as fases *lag*, linear (logarítmica) e platô. Na fase logarítmica os esferoides crescem seguindo a equação:

$$V = V_0 \cdot e^{kt}$$

Onde V_0 corresponde ao volume inicial, V é o volume após o tempo t e k a inclinação da curva na fase logarítmica. Por fim, tempo de dobramento de volume (TDV) foi calculado com base na seguinte equação:

$$TDV = \frac{\ln 2}{k}$$

Por fim, o número de células em esferoides de diferentes volumes foi determinado após sua tripsinização, dissociação mecânica e posterior contagem das células no citômetro de fluxo Guava[®] easyCyte Merck-Millipore 8HT

4.2.3 Padronização do ensaio de redução da resazurina

O método de detecção da viabilidade pela redução da resazurina (RR) foi padronizado, buscando identificar a melhor concentração do marcador e tempo de incubação no qual ainda é observada uma relação linear entre a intensidade do sinal fluorescente e a concentração de células, seja para as culturas em monocamada quanto para os esferoides. Diferentes concentrações de HepG2 e DU145 (de 10^4 a 10^6 células·mL⁻¹) foram pipetadas em uma placa preta de fundo transparente de 96 poços (100 µL por poço) e incubadas *overnight* para sua adesão. Em seguida, 10 µL da solução de resazurina foram adicionados nas células para a obtenção das concentrações finais de 5 ou 50 µM e incubou-se por 6 horas a 37 °C, seguindo as condições descritas por McMillian *et al*¹⁰⁰. A fluorescência foi medida nos mesmos poços após 2, 4 e 6 horas, usando o fluorímetro Biotek Synergy HT (λ_{exc} = 535/40 e λ_{emis} = 600/40 nm).

A mesma padronização foi feita para esferoides de HepG2 em diferentes tamanhos. Após a formação pelo protocolo previamente estabelecido, os esferoides foram coletados nos seguintes intervalos de tempo: 3, 6, 9, 13 e 16 dias. O volume de cada esferoide foi mensurado seguido de incubação com 50 ou 500 µM de resazurina por 2, 4 e 6 horas, baseado em ensaios da literatura^{99,120}. A fluorescência foi detectada no mesmo comprimento de onda (λ_{exc} = 535/40 e λ_{emis} = 600/40 nm). Já nos esferoides com células DU145, foram usadas as melhores condições obtidas na HepG2 (500 µM e 2h de incubação) em estruturas de diferentes tamanhos. Os resultados obtidos foram analisados usando o software GraphPad Prism[®] 5.

4.3 Ensaios Citotóxicos

A citotoxicidade das substâncias de referência YM-155, Doxorubicina, Rapamicina, AZD-8055 e NVP-BKM120, bem como as novas substâncias bioativas em estudo foram avaliadas para fins de comparação, em culturas em monocamada e esferoides tridimensionais. O valor de IC_{50} corresponde à concentração da substância que levou a diminuição de 50% da viabilidade celular em relação ao controle negativo.

4.3.1 Cultura bidimensional

Para os ensaios de viabilidade 2D, foi usada a técnica de RR na qual 100 μ L de células na concentração 10^5 células·mL⁻¹ foram semeadas em placas de 96 poços e deixadas para aderir *overnight*. Em seguida, elas foram tratadas com as substâncias em concentrações que variaram de 0,01 a 100 μ M pelo período de 72 horas. Depois, foi adicionado 10 μ L por poço da solução de Resazurina, para obter a concentração final de 5 μ M, e as placas foram incubadas por 2 horas, a fim da metabolização pelas células e consequente formação do produto fluorescente Resorfurina. Por fim, foi realizada a leitura de fluorescência (λ_{exc} = 535/40 e λ_{emis} = 600/40 nm) no fluorímetro Biotek Synergy HT. Os resultados obtidos levaram a obtenção de curvas concentração-resposta.

4.3.2 Cultura tridimensional

A avaliação da citotoxicidade dos compostos de referência em esferoides multicelulares de HepG2 e DU145 foi feita por meio da técnica de redução da resazurina, nas condições previamente estabelecidas. Para a formação das estruturas tridimensionais, duas mil células foram plaqueadas por poço em 100 μ L usando placas *ULA* de 96 poços. Em seguida, elas foram centrifugadas a 450 g por 10 minutos, para auxiliar na agregação das células no centro do poço, e foram deixadas em cultura por 72h nas condições-padrão (37°C, 90% umidade e atmosfera com 5% CO₂).

Após a formação da estrutura tridimensional em três dias de incubação, os esferoides foram tratados com concentrações variadas das substâncias de referência (0,01 a 100 μM) pelo período de 72 horas. Por fim, 10 μL da solução de sal de resazurina foram adicionados a cada esferoide na concentração final de 500 μM e pelo período de 2 horas, seguido da leitura de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 535/40$ e $\lambda_{\text{emis}} = 600/40$). Os resultados obtidos levaram a obtenção de curvas concentração-resposta.

4.4 Ensaios Citostáticos

O efeito citostático das novas substâncias bioativas Neq0438, 440, 678, 679 e 680 bem como da Rapamicina como controle positivo, foi avaliado para fins de comparação, em culturas em monocamada e esferoides tridimensionais.

4.4.1 Cultura bidimensional

Para avaliar o potencial citostático das novas substâncias bioativas, foi primeiro necessário descobrir a linearidade da técnica de MTT em relação à quantidade de células plaqueadas. Para isso, diferentes concentrações de células ($0,1$ a 10×10^5 células·mL⁻¹) foram pipetadas em placas de 96 poços e deixadas para aderir por 24h. Então, o meio de cultura foi retirado, adicionou-se 100 μL por poço da solução de MTT (1 mg/mL de DMEM) em cada poço. As placas foram incubadas por 3 horas, para ocorrer a metabolização pelas células, e consequente formação dos sais de formazan. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado, adicionando-se 100 μL de um agente da solução solubilizante com SDS (10% m/v) e ácido acético glacial (0,6% v/v) em DMSO. As placas foram incubadas novamente por 1 hora em agitação para a solubilização do formazan. Por fim, foi realizada a leitura de absorbância no comprimento de onda de 570 nm no fluorímetro Biotek Synergy HT.

Com a linearidade obtida, a quantidade inicial de células semeadas foi determinada. Na linhagem HepG2, a concentração usada foi de 5×10^4 células·mL⁻¹ enquanto na linhagem

DU145, 1×10^4 células·mL⁻¹. Outra diferença entre as linhagens foram as concentrações das substâncias testadas. Em células HepG2, foram testadas 0,1, 1, 5 e 20 µM dos compostos Neq0438, 440, 678, 679, 680 e Rapamicina. Já em DU145 as concentrações usadas foram 1, 5, 25 e 50 µM para mesmas substâncias, devido a maior resistência dessa linhagem.

Dois ensaios distintos foram realizados para determinar o efeito citostático das novas substâncias bioativas. No primeiro, as células foram tratadas apenas uma vez com diferentes concentrações do composto. Após 48h, o meio de cultura com o composto foi retirado e um novo meio de cultura sem o composto foi adicionado, que por sua vez foi trocado novamente após mais 48h. Já no segundo ensaio, as substâncias foram adicionadas múltiplas vezes, ou seja, a cada dois dias o meio de cultura com os compostos era trocado, com exceção do controle negativo. Por fim, a leitura do MTT foi feita em ambos ensaios após 0, 2, 4 e 6 dias nas mesmas condições descritas anteriormente. Os valores de inibição de 50% do crescimento em relação ao crescimento observado no controle negativo no mesmo período (GI₅₀) foram calculados levando em consideração a variação da absorbância em relação ao controle negativo (Δ_{Abs}) após 6 dias de tratamento.

4.4.2 Cultura tridimensional

O ensaio citostático das mesmas substâncias foi feito em esferoides HepG2 e DU145. Para isso, as estruturas tridimensionais foram formadas e cultivadas conforme descrito no tópico 3.3.2, e foram tratadas por nove dias com 1, 10, 50 e 100 µM das substâncias descritas no ensaio bidimensional. O meio de cultura contendo os compostos foi trocado e novos compostos adicionados a cada três dias, quando o diâmetro das estruturas também foi mensurado e o volume calculado conforme descrito no item 3.2.2. Com esses dados, foi montada uma curva de crescimento para cada substância nas quatro concentrações, além de um único gráfico contendo todas as substâncias para comparar a variação do volume ao final dos 9 dias de tratamento.

4.5 Análise Estatística

Para os ensaios de avaliação do potencial de formar esferoides, as células foram testadas em quadruplicata para cada condição, em dois ensaios independentes. Já ns ensaios de avaliação do crescimento e morfologia dos esferoides foi feito apenas uma vez com um N=30. Os demais ensaios de padronização da redução de resazurina, MTT e avaliação dos efeitos citostáticos/citotóxicos foram feitos em quadruplicata em dois ensaios independentes. Todos os dados foram tratados no programa Microsoft Excel[®] e os gráficos e valores de IC₅₀ e GI₅₀ calculados por regressão linear usando o software GraphPad Prism[®] 5. Para a comparação do efeito citostático em ambos modelos de cultura foram usados valores de $p < 0.005$ e $p < 0.001$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Padronização da cultura tridimensional

5.1.1 Escolha das linhagens e padronização da técnica

Dentre as linhagens testadas para a padronização da cultura tridimensional, apenas a HepG2 e DU145 formaram esferoides compactos apropriados para os ensaios citotóxicos e citostáticos (Figura 7). As células da linhagem PC-3, usando a técnica de gota suspensa, formaram agregados celulares frouxos, com morfologia disforme e poucos contatos intracelulares, como descrito previamente por Harma *et al.* (2010)¹²¹. As células Mia-PaCa2 se agregaram com mais facilidade, no entanto, é possível observar a distinção das células independentes na região marginal do esferoide bem como uma morfologia disforme e não-esférica (Fig. 7D). Outros trabalhos já descreveram que esferoides dessa linhagem apresentam células marginais com morfologia redonda e uma baixa robustez geral, mesmo em cultura com polímeros adesivos¹²².

Figura 7 – Imagens por microscopia de campo claro de esferoides desenvolvidos com 4 linhagens diferentes. a) DU145; b) HepG2; c) PC-3 e d) Mia-PaCa2. Objetiva: 10x.

Dessa forma, a padronização da cultura celular tridimensional foi feita usando a técnica de gota suspensa para esferoides DU145, com diferentes volumes e concentrações de

células plaqueadas (**Figura 8**). As concentrações que geraram estruturas mais esféricas e de tamanho ideal foram de 3000 a 1000 células em gotas de 45 μL .

Figura 8 - Padronização da cultura tridimensional de DU145 usando a técnica de gota suspensa. Objetiva: 10x.

5.1.2 Avaliação do crescimento e morfologia

O volume obtido nos esfesroides da linhagem DU145 variou de 0,019 mm^3 no terceiro dia após sua formação, a 0,043 mm^3 em 15 dias de crescimento. Já os esfesroides da linhagem HepG2 obtiveram uma taxa de crescimento maior, variando de 0,014 a 0,101 mm^3 no mesmo período (Figura 9).

Figura 9 – Análise do crescimento dos esfesroides. A) Curva de crescimento para linhagens HepG2 e DU145 (N=30). B) Imagens dos esfesroides obtidas por microscopia de campo claro após diferentes dias de crescimento (Objetiva 10x).

Fonte: Autoria Própria

Enquanto as células em cultura bidimensional apresentam uma curva de crescimento exponencial e podem ter sua taxa de crescimento facilmente determinada pelo tempo de duplicação¹²³, os esferoides possuem crescimento do tipo nodular, composto por camadas proliferativas que possuem maior contato com os nutrientes do meio de cultura, se encaixando, portanto, em uma taxa de crescimento logarítmico¹²⁴. Seguindo as equações descritas por Schwartz (1961)¹¹⁹ para o crescimento tumoral, o tempo de duplicação do volume para HepG2 e DU145 foi de 1,98 e 4,42 dias, respectivamente.

Quando comparamos com o tempo de duplicação em culturas bidimensionais, que é de 48h para HepG2 e 34h para DU145^{125,126}, nota-se que na cultura tridimensional há uma diminuição na taxa de crescimento para a linhagem de câncer de próstata e o aumento para o hepatocarcinoma. Essas observações estão de acordo com alguns estudos na literatura, que mostram que a maioria das células diminui sua taxa de crescimento quando cultivadas tridimensionalmente^{127,128}, enquanto algumas apresentam características opostas¹²⁹. Independente se a taxa de crescimento aumenta ou diminui nos modelos 3D, suas características de crescimento são, no geral, mais próximas ao que se é observado em tumores *in vivo*¹³⁰.

No caso da linhagem DU145, a maior taxa de crescimento quando cultivada em monocamada pode estar relacionada com a própria forma de cultivo, na qual todas as células estão expostas igualmente a grande quantidade de nutrientes e fatores de crescimento, tornando-as mais suscetíveis a proliferarem em uma taxa uniforme na superfície plana. Outros fatores que podem influenciar no crescimento são os contatos celulares e o contato das células com a matriz extracelular, que podem alterar a expressão de genes e proteínas associadas ao crescimento e proliferação^{130,131}.

Já na linhagem HepG2, um estudo recente corrobora com as características aqui descritas, no qual a expressão do marcador proliferativo Ki-67 foi maior em esferoides do que em culturas 2D, diminuindo proporcionalmente com o aumento do tempo em cultura¹³². Um perfil similar também foi detectado em linhagens de câncer de mama cultivadas tridimensionalmente, na qual foi observada uma maior taxa de crescimento e expressão de genes relacionados à proliferação celular em esferoides do que em monocamada¹²⁹. Dentro do próprio esferoide, no entanto, existe uma diminuição bem descrita de células positivas para o marcador de proliferação Ki67 do córtex para o interior do esferoide, indicando a presença de camadas proliferativas de acordo com a disponibilidade de nutrientes e oxigênio^{133,134}.

Essa diferença observada entre a proliferação de esferoides HepG2 e DU145 se dá por características intrínsecas de cada célula como, por exemplo, a tendência que a primeira tem de crescer formando agregados espontaneamente mesmo em superfícies planas. Além disso, variações na morfologia e taxa de crescimento existem naturalmente entre diferentes tipos de tumor ou até mesmo entre células de diferentes regiões do próprio tumor¹³⁵. Além disso, tumores de próstata são reconhecidamente de crescimento lento *in vivo*, o que leva muitas vezes ao acompanhamento do paciente por um longo período de tempo para analisar sua evolução¹³⁶.

Após a dissociação de esferoides DU145 de diferentes tamanhos, foi determinado o número de células presente e observou-se a relação linear mostrada na Figura 10. Isso indica que o número de células presente na estrutura é diretamente proporcional ao volume do esferoide, podendo ser extrapolado com base na reta obtida.

Figura 10 - Relação entre o volume e o número de células por esferoide para a linhagem DU145.

5.1.3 Padronização do ensaio de redução da resazurina

Em ambas as linhagens avaliadas, a relação entre a intensidade de fluorescência (RFU) e a quantidade de células plaqueadas em monocamada foi linear até a concentração de $2,5 \cdot 10^5$ células·mL⁻¹. Além disso, dentre as condições testadas para o marcador, a melhor concentração para a detecção de fluorescência foi de 5 µM e o tempo de incubação de 2 horas já foi adequado para obter uma correlação linear para ambas as células ($R^2_{Du145} = 0,998$ (sy.x

= 22,14); $R^2_{\text{HepG2}} = 0,993$ (sy.x = 148,5)) (Figura 11). Pode-se observar que tempos de incubação mais longos (4 e 6 h) a linearidade é pior, provavelmente devido a possibilidade de limitação na concentração da resazurina, o que afeta o metabolismo da mesma pelas células.

Figura 11 - Relação linear entre a fluorescência emitida pela redução da resazurina (5 μM) e a concentração de células plaqueadas a partir de cultura bidimensional.

Já no teste em cultura 3D da linhagem HepG2, a relação linear entre a intensidade de fluorescência e o volume foi observada com a resazurina na concentração final de 500 μM , sendo que o valor de R^2 obtido foi acima de 0,94 que em todos os tempos de incubação (Figura 12 e Tabela 1). De fato, alguns trabalhos publicados recentemente usaram este mesmo marcador para determinar a viabilidade de células em culturas tridimensionais. Lovitt e colaboradores, por exemplo, compararam a resposta de esferoides de câncer de mama (MCF-7) e de pâncreas (PANC-1 e BxPC-3) frente a diversas substâncias de referência, usando como indicador de viabilidade em ambos os casos a resazurina na concentração final de 600 μM ^{99,120,137}.

Outro dado importante que pode ser obtido com esse resultado é o fato de que a maior intensidade de fluorescência ocorreu no período entre 9 e 13 dias após a incubação, quando o volume passou de 0,08 para 0,35 mm^3 (Figura 12). Além disso, pouca diferença pode ser observada nas duas últimas análises, pois como visto posteriormente, o crescimento da estrutura atinge um platô ao chegar neste tamanho, isto é, há uma estabilização na taxa de crescimento da estrutura, provavelmente causada pela limitação da difusão de nutrientes e oxigênio e limitação de espaço físico em placas de 96 poços.

Figura 12 - Relação linear entre a fluorescência emitida pela redução da resazurina (500 μ M) e o diâmetro de esferoides HepG2 em diferentes tempos de incubação.

Tabela 1 – Valores de R^2 e desvio-padrão dos diferentes tempos de incubação de esferoides HepG2 com resazurina.

	2h	4h	6h
R^2	0.9802	0.9744	0.9791
Sy.x	606.1	1021	1124

Com o resultado obtido na linhagem HepG2, esferoides DU145 foram tratados com a mesma concentração de resazurina, mas em apenas um tempo de incubação: 2 horas. Dessa forma, foi possível observar a mesma relação linear, apesar do menor crescimento da estrutura tridimensional em comparação à HepG2 (Figura 13). Assim, o uso de 500 μ M de resazurina e o tempo de incubação de 2 horas são as condições ideais para os ensaios citotóxicos em ambas linhagens celulares para os esferoides, enquanto que a concentração de 5 μ M de resazurina e 2 horas de incubação são indicados para células em cultura bidimensional.

Figura 13 - Relação linear entre a fluorescência emitida pela redução da resazurina (500 μ M) e o diâmetro de esferoides DU145 após duas horas de incubação.

5.2 Ensaios Citotóxicos

Os ensaios citotóxicos foram feitos em culturas 2D e 3D das linhagens de câncer de próstata (DU145) e hepatocarcinoma (HepG2) usando substâncias de referência com diferentes mecanismos de ação. Os valores de IC_{50} correspondem a concentração das substâncias que levou a morte de 50% das células em relação ao controle negativo.

5.2.1 Cultura bidimensional

As curvas de IC_{50} obtidas para ambas as linhagens estão dispostas na Figura 14 e os valores, bem como os parâmetros estatísticos estão descritos na Tabela 2. Curvas com valores de R^2 menor que 0.7 foram consideradas não ativas nas concentrações testadas.

Figura 14 - Curvas concentração-resposta de cultura bidimensional das duas linhagens para as substâncias de interesse. (○ - HepG2; ◆ - DU145).

Tabela 2 – Valores de IC_{50} para as substâncias de interesse em culturas 2D de HepG2 e DU145. (NA = Valores não determinados).

COMPOSTOS	HepG2		DU145	
	IC_{50}	$R^2 / Sy.x$	IC_{50}	$R^2 / Sy.x$
YM-155	$0,92 \pm 0,1 \mu M$	0,987 / 4,90	$0,005 \pm 0,001 \mu M$	0,974 / 5,65
DOXORRUBICINA	$0,13 \pm 0,03 \mu M$	0,968 / 6,35	$0,094,1 \pm 41 \mu M$	0,889 / 15,59
RAPAMICINA	$96,22 \pm 69 \mu M$	0,702 / 8,30	$11,8 \pm 5 \mu M$	0,867 / 10,98
NVP-BKM120	$88,84 \pm 42 \mu M$	0,885 / 6,77	$36,12 \pm 22 \mu M$	0,716 / 19,66
AZD-8055	NA	-	NA	-
Neq0438	NA	-	NA	-
Neq0440	NA	-	NA	-
Neq0678	$93,10 \pm 36 \mu M$	0,839 / 8,12	$110,4 \pm 0,2 \mu M$	0,921 / 7,16
Neq0679	$51,05 \pm 13 \mu M$	0,918 / 6,32	$150,8 \pm 0,3 \mu M$	0,930 / 6,42
Neq0680	NA	-	NA	-

A linhagem DU145 foi mais sensível ao tratamento com todas as substâncias de referência e menos sensíveis aos novos inibidores. Os resultados obtidos foram, no geral, similares a valores reportados na literatura para os compostos YM-155 e doxorubicina^{117,138}. As substâncias que atuam inibindo a via PI3K/mTOR, por outro lado, apresentaram elevados valores de IC₅₀ em ambas as linhagens, isto é, apresentam baixa potência devido ao próprio mecanismo de ação. A inatividade das substâncias Neq0438 e Neq0440 foi relatada previamente em nosso grupo⁸¹. Estudos indicam que, por exemplo, o Buparlisib (NVP-BKM120) possui um potente efeito citostático em células DU145 (GI₅₀ = 0.4 nM) e seu uso em terapia combinada em células de câncer de pulmão potencializa o efeito citostático de outras substâncias^{139,140}. O composto AZD-8055, inibidor competitivo de ATP na mTOR, induz a autofagia e inibição do crescimento tumoral também em concentrações na ordem de nanomolar, em diversas linhagens tumorais *in vitro* bem como em ensaios *in vivo* em concentrações de até 20 mg/kg⁷⁵.

Em HepG2, não foi possível determinar as curvas concentração-resposta do Neq0438 e Neq0440 nas concentrações avaliadas, porém é possível observar no gráfico que, para ambas substâncias, a concentração de 100 µM começa a levar a morte celular. Dessa forma, ao analisar a modificação da estrutura química do composto Neq0440 para o análogo Neq0678 (**Figura 5**), nota-se que a troca do enxofre pelo oxigênio como ligante levou a um leve aumento na potência do composto. No caso dos Neqs0438 e 0679, por outro lado, a mudança da posição do átomo de flúor da posição *para* para a posição *orto* aumentou sua potência em quase duas vezes. Nas células DU145 o mesmo efeito foi observado para ambas substâncias, porém em menor intensidade. Por fim, o composto Neq0680, que apresenta basicamente a mesma estrutura do Neq0440, exceto pela substituição do grupo terminal amina por uma nitrila, foi inativo para as duas linhagens mesmo em concentrações mais altas. Isso confirma a hipótese de que a presença da amina ligada ao anel heterocíclico é essencial para a ligação da molécula ao domínio quinase da mTOR⁸¹.

4.2.2 Cultura tridimensional

As curvas concentração-resposta dos mesmos compostos-padrão foi determinada em esferoides DU145 e HepG2 (**Figura 15**). Os compostos NVP-BKM120, AZD-8055 bem

como todos as novas substâncias bioativas, não tiveram atividade citotóxica significativa no período e nas concentrações avaliadas para esferoides de ambas linhagens. Os valores de IC_{50} e os parâmetros estatísticos para os tratamentos com YM-155, Doxorubicina e Rapamicina estão dispostos na Tabela 3.

Figura 15 - Curvas concentração-resposta de substâncias de referência em esferoides de câncer de próstata e hepatocarcinoma (O - DU145; ♦ - HepG2).

Tabela 3 — Valores de IC_{50} para os compostos de referencias em culturas 3D de DU145 e HepG2.

COMPOSTOS	HepG2		DU145	
	IC_{50}	$R^2 / Sy.x$	IC_{50}	$R^2 / Sy.x$
YM-155	$7,05 \pm 5 \mu M$	0,877 / 14,17	$488 \pm 40 \text{ nM}$	0,895 / 13,41
DOXORRUBICINA	$6,41 \pm 3 \mu M$	0,974 / 5,63	$60,6 \pm 16 \text{ nM}$	0,963 / 6,64
RAPAMICINA	$10,49 \pm 12 \mu M$	0,710 / 21,77	$98,6 \pm 20 \mu M$	0,979 / 4,51

A doxorrubicina foi a substância mais potente para ambas linhagens tumorais, seguida do YM-155 e da Rapamicina. Além disso, assim como visto na cultura em monocamada, a linhagem DU145 foi mais sensível que a HepG2 para quase todas substâncias, exceto a Rapamicina. Um dos motivos pelo qual os esferoides HepG2 são mais resistentes a alguns compostos pode ser a dificuldade de difusão das substâncias para o interior da estrutura tridimensional, devido a sua matriz extracelular mais compacta.. Na Tabela 4 estão indicados os valores de IC₅₀ em culturas bi e tridimensionais, para melhor comparação.

Tabela 4 - Comparação de valores de IC₅₀ nos dois modelos de cultura para HepG2 e DU145.

COMPOSTOS	HepG2		DU145	
	2D	3D	2D	3D
YM-155	0,92 ± 0,8 µM	7,05 ± 5 µM	5,5 ± 1 nM	488 ± 40 nM
DOXORRUBICINA	0,13 ± 0,3 µM	6,41 ± 3 µM	94,1 ± 41 nM	60,6 ± 16 nM
RAPAMICINA	96,22 ± 69 µM	10,49 ± 12 µM	11,8 ± 5.8 µM	98,6 ± 20 µM

A variação do IC₅₀ entre a cultura 2D e 3D de HepG2 para YM-155 e Doxorrubicina foi de 7,6 e 49 vezes, respectivamente, enquanto para a Rapamicina, houve uma diminuição de 9,1 vezes. Para a DU145, houve um aumento no IC₅₀ de YM-155 em 88 vezes e da Rapamicina em 8,3 vezes, enquanto para a doxorrubicina o valor não foi estatisticamente diferente. Como os três compostos possuem mecanismos de ação diferentes, há hipóteses diferentes para esses resultados.

Geralmente, a maior resistência dos esferoides, como visto para os compostos YM155 e Doxorrubicina, resulta principalmente de sinais das interações celulares dinâmicas entre células vizinhas e a matriz extracelular, além da difusão limitada para o interior da estrutura tridimensional e a hipóxia, que está envolvida na ativação de genes relacionados a sobrevivência e sensibilidade aos fármacos¹⁴¹. A expressão de proteínas anti-apoptótica como a Bcl-2 e survivina em duas linhagens de glioma, por exemplo, foi aumentada significativamente em modelos tridimensionais de cultura¹⁴², o que pode justificar a maior resistência de esferoides a esses compostos testados.

Além disso, a variação na sensibilidade à doxorrubicina pode estar relacionada com o fato de que células cultivadas em 2D possuem uma oxigenação uniforme, o que resulta no

acúmulo rápido de espécies reativas de oxigênio quando exposta a esse fármaco. Em esferoides, por outro lado, as células no interior da estrutura são menos oxigenadas e em teoria, formariam menos dessas espécies, diminuindo a eficácia da substância¹⁰⁶. Como confirmação desta hipótese, células cultivadas em monocamada em condições de hipóxia, assim como os esferoides, apresentaram maior resistência a doxorrubicina¹⁴².

Em contraste, o aumento da potência da Rapamicina em cultura tridimensional de HepG2 pode estar relacionado com mecanismos moleculares de sinalização, como por exemplo, a superexpressão de alguns receptores específicos nos esferoides. Foi detectado que nesse modelo de cultura, algumas rotas metabólicas no câncer, como a PI3K/MAPK estavam alteradas, sendo que a proteína AKT estava subexpressa em comparação à cultura 2D, enquanto MEK1/2 e MAPK estavam superexpressas. Em suma, a reorganização da superfície celular que ocorre com a cultura tridimensional induz a mudanças na associação e localização de proteínas importantes para a proliferação da doença, oferecendo assim vias de sinalização alternativas que não estão presentes em culturas 2D¹⁴³.

5.3 Ensaios Citostáticos

Os novos inibidores da mTOR, além da Rapamicina usada como controle positivo, foram testados em culturas 2D e 3D para a avaliação de seu potencial citostático. O método de MTT foi usado para este ensaio devido a sua maior praticidade, além da dificuldade na padronização do método de redução da resazurina para ensaios citostáticos. Primeiramente, foi necessário determinar a linearidade do método colorimétrico MTT em relação a concentração de células plaqueadas, para então poder determinar a quantidade máxima de células a ser usada. Em ambas linhagens, o método foi linear até a concentração de 4×10^5 células·mL⁻¹ (**Figura 16**). Devido a diferença entre o tempo de duplicação das células (48h para HepG2 e 34h para DU145)^{125,126} e a consequente velocidade de crescimento, decidiu-se plaquear uma quantidade menor da linhagem de câncer de próstata (1.000 células por poço) do que do hepatocarcinoma (5.000 células por poço) no ensaio citostático 2D.

Figura 16 - Linearidade entre o método MTT e a concentração de células plaqueadas.

5.3.1 Cultura bidimensional

DU145

Nas culturas em monocamada, as substâncias foram testadas de duas maneiras distintas: (i) uma administração com 48h de exposição seguida da adição de meio de cultura sem composto por mais 72h, ou (ii) várias adições dos compostos, sendo substituído a cada 48h juntamente com o meio de cultura. A **Figura 17** apresenta as curvas de crescimento das células DU145 após apenas uma adição de cada composto. Pode-se observar que o tratamento da Rapamicina a 50 μ M teve efeito citotóxico (linha azul), enquanto as menores concentrações inibiram praticamente por completo o crescimento das células sem efeito citotóxico no período avaliado. O composto Neq0438 também mostrou um leve efeito citostático concentração-dependente após seis dias, ou seja, maiores concentrações levaram a uma menor taxa de crescimento no período avaliado. Por fim, a única outra substância com um leve efeito citostático com apenas uma adição na concentração de 50 μ M foi o Neq0679.

Figura 17 - Curva de crescimento de células DU145 tratadas com apenas uma adição de composto

De forma a avaliar o total potencial citostático dessa série de compostos, o ensaio 2D foi repetido, mas dessa vez, com novos compostos nas respectivas concentrações sendo adicionados a cada 48h juntamente com o meio de cultura. (**Figura 18**). Esta mudança no ensaio levou ao aumento do efeito citostático de todas as substâncias, inclusive o Neq0680. A Rapamicina, no entanto, seguiu o mesmo padrão da curva de adição única, com efeito citotóxico na concentração de 50 µM e potente efeito citostático nas menores concentrações. Os compostos Neqs0438, 440, 678 e 679 apresentaram efeito citostático dose-dependente, sendo o primeiro mais potente.

Figura 18 - Curva de crescimento de células DU145 tratadas com múltiplas aplicações de cada composto.

Com isso, após os 6 dias de tratamento no ensaio de múltiplas adições, a variação de absorbância de cada tratamento em relação ao controle foi calculada (**Figura 19**). É possível observar a relação concentração-dependente de inibição do crescimento em alguns compostos, em específico as substâncias Neq0438 e Neq0440. Estes dois, além da Rapamicina, foram os únicos a inibirem 50% do crescimento das células nas concentrações avaliadas e por isso, seus valores foram usados para obter uma curva concentração-resposta para o cálculo do GI_{50} (**Figura 20**).

Figura 19- Variação da absorbância após 9 dias de tratamento em cultura 2D de DU145. *** $p < 0.0005$; **** $p < 0.0001$.

Figura 20 - Curva concentração-resposta da inibição de crescimento celular em culturas 2D de DU145.

O valor de GI_{50} para o Neq0438 foi de $4,5 \pm 1 \mu M$ ($R^2 = 0,940$; $Sy.x = 6,16$) enquanto para o Neq0440 foi quase dez vezes maior: $42,5 \pm 5 \mu M$ ($R^2 = 0,954$; $Sy.x = 5,90$).

HepG2

Na linhagem HepG2, foram feitos os mesmos dois ensaios citostáticos descritos anteriormente: (i) com apenas uma adição das substâncias (**Figura 21**) e (ii) com múltiplas adições (**Figura 22**).

Figura 21 - Curva de crescimento de células HepG2 tratadas com apenas uma adição de cada composto.

Diferente do que foi observado na linhagem DU145, a Rapamicina não teve efeito citostático no ensaio quando foi adicionada somente uma vez para a linhagem HepG2, mesmo em concentrações mais altas. Já no ensaio de múltiplas adições, foi notado leve efeito

citostático concentração-dependente, porém ainda menor do que visto em todos os outros compostos (exceto o Neq0680).

Figura 22 - Curva de crescimento de células HepG2 tratadas com múltiplas adições de cada composto

O tratamento com 20 µM dos compostos Neq0438, 440, 678 e 679 teve um potente efeito citostático nas culturas de HepG2 após 6 dias de crescimento, maior até que a

Rapamicina, usada como controle positivo (**Figura 23**). No entanto, analisar os dados na curva concentração-resposta para a determinação do GI_{50} , apenas o Neq0438 e Neq0679 obtiveram um perfil adequado (**Figura 24**).

Figura 23 - Variação da absorbância após 9 dias de tratamento em cultura 2D de HepG2. **** $p < 0.0001$.

Figura 24 - Curva concentração-resposta da inibição de crescimento celular em culturas 2D de HepG2.

Para o Neq0438 o valor de GI_{50} foi $17,9 \pm 4 \mu M$ ($R^2 = 0,874$ / $Sy.x = 11,09$), enquanto para o Neq0679 foi de $7,5 \pm 2 \mu M$ ($R^2 = 0,940$ / $Sy.x = 10,38$).

Ao analisar os resultados do ensaio citostático em culturas bidimensionais nas duas linhagens, nota-se que o Neq0438 foi o único composto com efeito citostático em ambas, sendo mais potente na DU145. Na avaliação do efeito citotóxico, essa substância não tinha levado a morte celular significativa mesmo em concentrações mais altas, no entanto o tratamento com apenas $5 \mu M$ foi suficiente para inibir o crescimento de 50% para as células DU145. Isso ocorre justamente pelo próprio mecanismo de ação do composto, que ao inibir o complexo mTOR, atua na inibição de vias sinalizatórias envolvidas nos processos de proliferação celular e não necessariamente morte celular. Outro dado importante é que o Neq0680, assim como observado no ensaio citotóxico, não teve efeito citostático em ambas

células testadas em relação ao controle negativo, demonstrando assim a importância do grupo amina na posição terminal para a interação dos compostos ao alvo molecular de acordo com a hipótese proposta para o modo de ação⁸¹.

Uma alternativa para aumentar ainda mais a potência dos compostos seria a terapia combinada com outros inibidores da via. Em um estudo com culturas 2D de diversas linhagens de hepatocarcinoma, o uso de inibidores da via levou a diminuição da fosforilação de seus efetores¹⁴⁴. Além disso, foi detectado o sinergismo na terapia combinada de inibidores da mTOR com inibidores do AKT em células HepG2, resultando em um aumento significativo da porcentagem de células nas fases G0/G1 em comparação a cada substância separada ou o controle negativo¹⁴⁴.

5.3.2 Cultura tridimensional

DU145

Para a realização do ensaio citostático na cultura tridimensional foi feita uma triagem inicial com algumas substâncias na concentração de 100µM pelo período de 9 dias em esferoides DU145 (**Figura 25**). A substância Neq0554 é um inibidor de cisteíno-proteases em estudo pelo grupo NEQUIMED que mostrou resultados positivo contra a linhagem Mia-PaCa2, por isso decidiu-se também testar seu efeito citostático em esferoides de câncer de próstata.

Figura 25 - A)Triagem do efeito citostático de novas substâncias bioativas a 100 µM. B)Micrografia de esferoides DU145 após 9 dias de tratamento com o Neq0438 (Objetiva: 10x) **** p<0.0001 *** p<0.0005 ** p<0.001.

Com isso, foi testado o efeito citostático em esferoides das mesmas linhagens testadas em 2D, usando diferentes concentrações dos compostos que demonstraram potencial inibitório na triagem para determinar seu GI_{50} em culturas tridimensionais, ou seja, a concentração da substância que inibe 50% do crescimento tumoral quando comparado ao controle sem tratamento. Os gráficos de crescimento tumoral estão dispostos na **Figura 26**. Como o efeito citostático em culturas bidimensionais foi maior no ensaio com múltiplas doses, foi realizado apenas este na cultura tridimensional.

Figura 26 - Curvas de crescimento de esferoides DU145 tratados com as novas substâncias bioativas.

Após 9 dias a variação total no volume de cada tratamento foi calculada e usada como porcentagem do controle negativo na **Figura 27**. Os Neqs0438, 440, 678 e 679 tiveram efeito citostático concentração-dependente no período avaliado, sendo o primeiro e o último os mais

potentes. O tratamento com 100 μM de Rapamicina levou a completa dissociação do esferoide e perda dos contatos intercelulares, por isso não foi possível medir a alteração no volume (**Figura 28**). Devido a grande variação do volume relativo entre as diferentes concentrações, não foi possível calcular os valores de GI_{50} das substâncias analisadas para culturas tridimensionais.

Figura 27 - Variação do volume de esferoides DU145 em relação ao controle negativo após 9 dias de tratamento com as novas substâncias bioativas. **** $p < 0.0001$.

Figura 28 - Micrografias de campo claro de esferoides DU145 após 9 dias de tratamento. Objetiva 10x: A) Rapamicina B) Neq0438 C) Neq0440 D) Neq0678 E) Neq0679 F) Neq0680.

Ao compararmos o efeito citostático dos compostos na cultura bidimensional e tridimensional (**Figura 29**) nota-se, por exemplo, que a concentração de Rapamicina na qual

houve a completa inibição do crescimento celular em 2D foi de 25 μM . Já o tratamento com apenas 1 μM da mesma substância em esferoides, além de inibir o crescimento, levou a diminuição de 21% no volume inicial da estrutura após 9 dias. O mesmo foi observado para alguns dos novos inibidores da mTOR, como o Neq0438 e 0679, por exemplo, que na concentração de 50 μM na cultura 3D levou a uma diminuição do volume tumoral inicial em 26% e 28%, respectivamente. Na cultura em monocamada, na mesma concentração, foi observado um crescimento celular de 16% e 66% em relação ao crescimento do controle negativo no mesmo período.

Figura 29 - Comparação do efeito citostático das novas substâncias bioativas em culturas 2D e 3D de DU145.

HepG2

Esferoides HepG2 também foram tratados com diferentes concentrações dos compostos inibidores da via PI3K-AKT-mTOR para determinação de seu potencial citostático (**Figura 30**). Assim como observado em DU145, os volumes finais após nove dias de tratamento foram expressos na **Figura 31** como porcentagem em relação ao controle negativo. Apesar de vários compostos inibirem o crescimento em mais de 50%, não foi possível calcular os valores de GI_{50} devido a grande variação de inibição entre as diferentes concentrações, necessitando concentrações intermediárias para fechar o *gap*.

Figura 30 - Curva de crescimento de esferoides HepG2 após 9 dias de tratamento com as novas substâncias bioativas.

O composto mais eficaz foi o Neq0438, que na concentração de 50 µM levou a redução de 20% do volume inicial após 9 dias de tratamento (*Figura 32*). Os Neqs0440 e 679, além da Rapamicina, tiveram seus maiores efeitos citotóxicos apenas na concentração de 100 µM, na qual inibiram 100 e 98% do crescimento, além da diminuição de 35% do volume do esferoide, respectivamente. Os compostos Neq0678 e 679 tiveram um potente efeito citostático, inibindo em 50% o crescimento de esferoides na concentração de 1 µM. Em alguns casos, como para os Neqs0678 e 440, maiores concentrações dos inibidores aparentemente estimularam o crescimento tumoral em níveis até 50% maiores que o controle,

o que pode estar relacionado com a perda de contatos intercelulares e consequente aumento aparente do volume. Além disso, devido a morfologia disforme de esferoides HepG2, em alguns casos a precisão da determinação do volume fica comprometida, já que as estruturas apresentam grandes variações em relação a uma esfera perfeita. A **Figura 32** mostra as imagens dos esferoides tratados com as diferentes concentrações de cada composto após 9 dias de tratamento.

Figura 31 - Variação do volume de esferoides HepG2 em relação ao controle negativo após 9 dias de tratamento com as novas substâncias bioativas. **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.0005$.

Figura 32 - Micrografias de campo claro de esferoides HepG2 após 9 dias de tratamento. Aumento 5x
A) Rapamicina B) Neq438 C) Neq440 D) Neq678 E) Neq679 F) Neq680.

No geral, a inibição de crescimento dos esferoides seguiu um padrão similar ao observado no ensaio 2D, com os compostos estruturalmente similares Neq0438 e 679 sendo os mais efetivos e o Neq0680 o menos efetivo (**Figura 33**). Nos esferoides HepG2, nem sempre foi possível detectar uma relação entre concentração da substância e inibição do crescimento, como nos casos dos Neqs0440, 678 e 679. No entanto, o Neq0679, substância mais potente na cultura 2D, também foi eficaz na inibição do crescimento do esferoide, reduzindo em 50% seu crescimento relativo ao controle na concentração de 1 μ M.

De forma geral, assim como foi observado em relação ao efeito citotóxico, os esferoides HepG2 também foram mais resistentes ao efeito citostático do que os DU145 para quase todos os compostos avaliados, enquanto a cultura 2D foi mais sensível.

Figura 33 - Comparação dos ensaios citostáticos com novas substâncias bioativas em culturas 2D e 3D de HepG2.

A maior sensibilidade de esferoides DU145 a esses compostos em comparação a cultura em monocamada pode estar relacionada com diferenças induzidas pelo próprio ambiente de cultura, como por exemplo a intensidade de ativação da via PI3K-AKT-mTOR, que de acordo com evidências recentes, varia de acordo com o modelo de cultura celular (2D ou 3D)¹⁴⁶. Em cinco linhagens de câncer de cólon, por exemplo, a fosforilação de AKT foi reduzida nas culturas tridimensionais, associada com a diminuição da fosforilação das proteínas efetoras PRAS40, S6K e 4E-BP1, o que indica a redução da atividade do complexo mTORC1¹⁴⁶. O mesmo trabalho mostrou que após tratamento com Rapamicina ou outros inibidores de quinases, as células cultivadas em 2D não mostraram nenhuma mudança morfológica significativa, enquanto os esferoides tiveram reduções de 50 a 75% do volume em relação ao controle, similarmente aos resultados obtidos aqui com esferoides DU145 para todos os compostos e HepG2 para o Neq0679. Além disso, foi detectada uma alteração

significativa no ciclo celular das células cultivadas tridimensionalmente e tratadas com Rapamicina, em comparação a monocamada, com 50% de diminuição da porcentagem de células na fase S e consequente maior retenção do ciclo celular associado a células nas fases G0/G1¹⁴⁶.

Outra importante observação nesse mesmo estudo foi a detecção de um gradiente de fosforilação da proteína RPS6, no qual ela está mais ativa nas células da superfície e menos ativa ao centro. Ao comparar com tumores extraídos de ratos *in vivo*, foi possível notar um padrão similar de distribuição de intensidade do sinal, com os maiores níveis de fosfo-RPS6 nas regiões corticais e os menores níveis no interior da estrutura. Sendo assim, o modelo tridimensional de cultura de células é confiável para mimetizar a sinalização mTOR -SK6 observada *in vivo* em células DLD-1 e HCT116¹⁴⁶. Esse gradiente se deve, possivelmente, a formação dos gradientes de nutrientes, fatores de crescimento e oxigênio, que difundem com mais dificuldade para o interior da estrutura. Dessa forma, a atividade total do mTORC1 é diminuída nesta localidade, devido a redução da disponibilidade de nutrientes como aminoácidos, que são necessários para a ativação do complexo^{40,146}.

Em resumo, esses experimentos revelam uma diminuição significativa da sinalização PI3K-AKT-mTOR-S6K em modelos tridimensionais de cultura celular, em comparação a modelos 2D. Dessa forma, a inibição da via mTOR-AKT resulta em efeitos antiproliferativos mais severos em esferoides do que culturas em monocamada, com bloqueio da proliferação e alterações no ciclo celular, incluindo a forte redução da porcentagem de células na fase S e diminuição geral da taxa metabólica¹⁴⁶. A seguir serão discutidos três possíveis mecanismos pelo qual essa alteração ocorre.

Primeiramente, a diminuição na ativação da via PI3K-AKT-mTOR em esferoides pode estar relacionada com a expressão de receptores de membrana envolvidos na sua ativação, como o receptor epidérmico de fatores de crescimento (EGFR), uma proteína de superfície do tipo tirosina-quinase cuja ativação estimula a via e leva ao crescimento celular¹⁴⁷. Apesar de sua expressão não estar diretamente associada com a sensibilidade a Rapamicina, estudos indicam que inibidores de EGFR frequentemente aumentam a sensibilidade das células de câncer a esta substância e vice-versa¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Em esferoides de câncer de mama e ovário, a sinalização dos receptores EGFR e HER2 também está superexpressa em contraste com as culturas em monocamada¹⁴³, bem como em células de câncer de pulmão, onde foram detectados elevados níveis basais de EGFR e fosforilação de

Met também em modelos 3D de cultura¹⁵¹. Dessa forma, a diminuição da expressão de EGFR em 2D pode ser um dos motivos para a redução da sensibilidade de células DU145 e HepG2 a rapamicina e os novos inibidores testados.

Outra explicação para esta redução pode ser a mudança da via AKT-mTOR em 2D para a cascata de sinalização RAS-RAF-MAPK-ERK em 3D. As duas vias são ativadas por fatores extrínsecos, compartilham proteínas efetoras e promovem o crescimento celular (**Figura 34**). Os níveis de MEK1 estão aumentados em culturas 3D de câncer de ovário e mama¹⁴³ e, em linhagens de câncer de cólon, o perfil de expressão revelou a ativação da via MAPK e um aumento da fosforilação de ERK1/2 em culturas 3D¹⁵². Em hepatocarcinoma, esta via apresenta grande relevância para a progressão da doença, sendo ativada em quase todas as linhagens celulares¹⁵³. Além disso, recentemente foi demonstrado que a ativação da cascata MAPK também funciona muitas vezes como um mecanismo de retroalimentação positiva após a inibição da via PI3K-AKT-mTOR¹⁵⁴. Assim, a maior resistência aos inibidores da mTOR observada em esferoides HepG2, quando comparado a DU145, pode estar relacionada com esse mecanismo de alteração da via, no qual a cascata MAPK passa a ser mais ativa após a inibição da mTOR.

Figura 34 – Representação esquemática das vias de sinalização Ras-RAF-MEK-ERK e Ras-PI3K-AKT-mTOR.

Fonte: Adaptado de Oikonomou E, Koustas (2014)¹⁵⁵

Por fim, acredita-se que a presença de matriz extracelular seja um fator extra para o aumento da complexidade da resposta ao tratamento por meio da sinalização de moléculas de

adesão, como a integrina. A perda da sinalização dessa proteína, expressa em 2D na ligação com a superfície plástica do frasco de cultura, pode ser outro fator envolvido na diminuição da cascata AKT-mTOR, já que elas possuem um importante papel de indução da ativação de AKT¹⁵⁶.

Ademais, outras proteínas da MEC também podem estar envolvidas na resistência a tratamentos com compostos que inibem a via PI3K/AKT/mTOR. Um estudo com esferoides de câncer de ovário e mama mostrou que o tratamento com uma gama de inibidores de PI3K/mTOR, incluindo a Rapamicina, levou a duas diferentes respostas apoptótica. As células localizadas na região interna da estrutura sofreram apoptose enquanto as localizadas nas camadas mais externas apenas tiveram seu crescimento suprimido¹⁵⁷. Supõe-se que isso se dá pela diferença na quantidade de matriz extracelular nas regiões do esferoide, já que as células resistentes à apoptose estão localizadas nas camadas mais externas e com maior presença de matriz, enquanto as células sensíveis estão na região interna e com menor quantidade¹⁵⁷. O tratamento de células cultivadas em monocamada com inibidores de PI3K/mTOR suprime a proliferação celular, no entanto, a apoptose não é comumente observada assim como em células das camadas mais externas de esferoides. Isso ocorre pois nestas células há a indução de uma resposta adaptativa, incluindo a expressão de diversas proteínas relacionadas à sobrevivência celular, o que também pode explicar a baixa toxicidade dessas substâncias em culturas 2D. Dessa forma, as células externas dos esferoides apresentam uma resposta similar à cultura em monocamada, na qual ocorre uma maior inibição do complexo mTORC2 e consequente supressão da proliferação celular, enquanto nas células internas de esferoides ocorre a inibição do complexo mTORC1 e a indução da apoptose.

O aumento da sensibilidade das células internas de esferoides tridimensionais a apoptose infere que a atividade da PI3K é especificamente necessária para a sobrevivência dessa população celular. Essas células não estão expostas aos componentes da matriz e, possivelmente, dependem da atividade contínua da PI3K para essa sobrevivência independente de ancoragem. De fato, variantes genéticas de PI3K mostraram recuperar células da apoptose causada por perda da sinalização da matriz em dois estudos distintos^{158,159}.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, o modelo de cultura tridimensional foi padronizado para células de hepatocarcinoma (HepG2) e câncer metastático de próstata (DU145) em nosso laboratório usando duas técnicas diferentes: Gota suspensa e flutuação forçada. Devido sua maior praticidade e facilidade, a segunda foi usada como padrão para os ensaios seguintes. As características de crescimento foram analisadas em cada linhagem na cultura tridimensional e assim foi possível identificar alterações no tempo de dobramento de cada modelo de cultura. Para a linhagem HepG2 os esferoides cresceram mais rápido que a cultura em monocamada, enquanto que para a linhagem DU145 o contrário foi observado.

A padronização do ensaio de redução de resazurina foi realizada adequadamente, com potência para as substâncias de referência de acordo com os valores observados na literatura para culturas 2D e 3D. Em ambos modelos o tempo de incubação ideal para a resazurina foi de 2 h, sendo que para células cultivadas em monocamada a concentração utilizada foi de 5 μ M enquanto para esferoides foi de 500 μ M. A doxorrubicina e o YM155 foram as substâncias mais potentes na cultura em monocamada, porém perderam a potência quando testadas em esferoides. O contrário foi observado para a Rapamicina, cuja potência foi quase 10 vezes maior em esferoides HepG2 em comparação com a cultura em monocamada. Dentre os novos inibidores da mTOR, o mais potente foi o Neq0679 na linhagem HepG2.

Devido ao mecanismo de ação desses novos inibidores, que levam a inibição do crescimento e não necessariamente a morte celular, também foi realizado o ensaio citostático nos modelos 2D e 3D. Em geral, os compostos foram mais potentes para inibição do crescimento na cultura tridimensional do que em monocamada, o que pode ser explicado por alterações na expressão da via PI3K/AKT/mTOR entre os dois modelos de cultura. Nas duas linhagens o Neq0438 e seu análogo, Neq0679, foram as substâncias mais potentes. O Neq0680 não teve efeito significativo em qualquer das linhagens ou modelos de cultura testados, o que confirma a hipótese de que o grupo amina presente nas outras substâncias é fundamental para sua interação no domínio quinase da mTOR e seu consequente efeito inibitório. Esses resultados apontam a importância do modelo tridimensional de cultura de células como uma abordagem valiosa para a predição da eficácia de substâncias bioativas, já que culturas 3D permitem a detecção e monitoramento de mudanças fenotípicas induzidas por

drogas em células, o que não poderia ser possível de ser medido em modelos tradicionais de cultura bidimensional.

Com base nos resultados obtidos, novos ensaios podem ser realizados para avaliar o potencial citostático *in vivo* com as substâncias mais eficazes em ambos modelos *in vitro* (Neq0438 e Neq0679). Além disso, a combinação dessas substâncias com outros inibidores de quinases pode também ser feita nos modelos 3D aqui padronizados, já que elas demonstraram efeito potencializador na terapia combinada com outras substâncias em estudos 2D em nosso laboratório.

REFERÊNCIAS

1. Stewart BW, Wild CP. World cancer report 2014. *World Heal Organ.* 2014;1-2. doi:9283204298.
2. INCA. Instituto Nacional do Cancer - Estimativa 2016. *Ministério Da Saúde.* 2016. doi:978-85-7318-194-4.
3. Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000. doi:10.1007/s00262-010-0968-0.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell.* 2011. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
5. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2010. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011.
6. Martin GS. Cell signaling and cancer. *Cancer Cell.* 2003;4(3):167-174. doi:10.1016/S1535-6108(03)00216-2.
7. Sever R, Brugge JS. Signal Transduction in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(4).
8. Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene.* 2010. doi:10.1038/onc.2010.323.
9. Hsieh A, Edlind M. PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance. *Asian J Androl.* 2014;16(3):378. doi:10.4103/1008-682X.122876.
10. Paplomata E, O'regan R. The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: Targets, trials and biomarkers. *Ther Adv Med Oncol.* 2014;6(4):154-166. doi:10.1177/1758834014530023.

11. Matter MS, Decaens T, Andersen JB, Thorgeirsson SS. Targeting the mTOR pathway in hepatocellular carcinoma: Current state and future trends. *J Hepatol*. 2014;60(4):855-865. doi:10.1016/j.jacc.2007.01.076.White.
12. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. 2002. doi:10.1016/S1535-6108(02)00102-2.
13. Bold RJ, Termuhlen PM, McConkey DJ. Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surg Oncol*. 1997. doi:10.1016/S0960-7404(97)00015-7.
14. Vaux DL, Strasser A. THE MOLECULAR BIOLOGY OF APOPTOSIS [Review]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996. doi:10.1073/pnas.93.6.2239.
15. Krajewska M, Zapata JM, Meinhold-Heerlein I, et al. Expression of Bcl-2 family member Bid in normal and malignant tissues. *Neoplasia*. 2002. doi:10.1038/sj/neo/7900222.
16. Blasco MA. Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005. doi:10.1038/nrg1656.
17. Vaupel P, Kallinowki F, Okunieff P. Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review. *Cancer Res*. 1989;49(23):6449-6465.
18. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996. doi:10.1016/S0092-8674(00)80108-7.
19. Berx G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009. doi:10.1101/cshperspect.a003129.
20. Dave B, Mittal V, Tan NM, Chang JC. Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. *Breast Cancer Res*. 2011. doi:10.1186/bcr2938.
21. Gos M, Miloszezewska J, Przybyszewska M. [Epithelial-mesenchymal transition in cancer progression]. *Postep Biochem*. 2009. doi:10.1159/000147848.

22. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: A recipe for cancer growth. *Genes Dev.* 2009. doi:10.1101/gad.1756509.
23. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 2010. doi:10.1016/j.it.2010.04.002.
24. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study Global Burden of Disease Cancer Collaboration. *JAMA Oncol.* 2017. doi:10.1001/jamaoncol.2016.5688.
25. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7-30. doi:10.3322/caac.21442.
26. Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018:a030361. doi:10.1101/cshperspect.a030361.
27. Anderson J. The role of antiandrogen monotherapy in the treatment of prostate cancer. *BJU Int.* 2003. doi:10.1046/j.1464-410X.2003.04026.x.
28. Tannock IF, De Wit R, Berry WR, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone for advanced prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2004. doi:10.1200/JCO.2007.12.4008.
29. Matias PM, Carrondo MA, Coelho R, et al. Structural basis for the glucocorticoid response in a mutant human androgen receptor (ARccr) derived from an androgen-independent prostate cancer. *J Med Chem.* 2002. doi:10.1021/jm011072j.
30. Edwards J, Krishna NS, Grigor KM, Bartlett JMS. Androgen receptor gene amplification and protein expression in hormone refractory prostate cancer. *Br J Cancer.* 2003. doi:10.1038/sj.bjc.6601127.
31. Zhang X, Morrissey C, Sun S, et al. Androgen receptor variants occur frequently in castration resistant prostate cancer metastases. *PLoS One.* 2011. doi:10.1371/journal.pone.0027970.

32. Stanbrough M, Bubley GJ, Ross K, et al. Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 2006. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4000.
33. Chang KH, Li R, Kuri B, et al. A gain-of-function mutation in DHT synthesis in castration-resistant prostate cancer. *Cell.* 2013. doi:10.1016/j.cell.2013.07.029.
34. António Gomes M, Gonçalves Priolli D, Guilherme Tralhão J, Filomena Botelho M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies. *Rev da Assoc Médica Bras (English Ed.* 2013;59(5):514-524. doi:10.1016/S2255-4823(13)70511-3.
35. Xu H-Z, Liu Y-P, Guleng B, Ren J-L. Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma: Pathogenic Mechanisms and Novel Therapeutic Interventions. *Gastrointest Tumors.* 2014. doi:10.1159/000365307.
36. Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis (Review). *Int J Oncol.* 1999.
37. Yen CJ, Lin YJ, Yen CS, et al. Hepatitis B virus X protein upregulates mTOR signaling through IKK β to increase cell proliferation and VEGF production in hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2012. doi:10.1371/journal.pone.0041931.
38. Tarn C, Lee S, Hu Y, Ashendel C, Andrisani OM. Hepatitis B Virus X Protein Differentially Activates RAS-RAF-MAPK and JNK Pathways in X-transforming Versus Non-transforming AML12 Hepatocytes. *J Biol Chem.* 2001. doi:10.1074/jbc.M104105200.
39. GM K, Santoro A. Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma. *Drugs.* 2009. doi:10.2165/00003495-200969020-00006.
40. Gomez-Pinillos A, Ferrari AC. MTOR Signaling Pathway and mTOR Inhibitors in Cancer Therapy. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2012;26(3):483-505. doi:10.1016/j.hoc.2012.02.014.
41. Pópulo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci.* 2012;13(2):1886-1918. doi:10.3390/ijms13021886.

42. Carpenter CL, Auger KR, Chanudhuri M, et al. Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. *J Biol Chem.* 1993. doi:VL - 268.
43. Stephens L, Smrcka A, Cooke FT, Jackson TR, Sternweis PC, Hawkins PT. A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell.* 1994. doi:0092-8674(94)90237-2 [pii].
44. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, et al. Phosphatidylinositol-3-OH kinase direct target of Ras. *Nature.* 1994. doi:10.1038/370527a0.
45. Lemmon MA. Pleckstrin homology (PH) domains. In: *Handbook of Cell Signaling*, 2/e. ; 2010. doi:10.1016/B978-0-12-374145-5.00136-4.
46. Manning BD, Cantley LC, Accili D, et al. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007. doi:10.1016/j.cell.2007.06.009.
47. Zinzalla V, Stracka D, Oppliger W, Hall MN. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell.* 2011. doi:10.1016/j.cell.2011.02.014.
48. Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN. Rapamycin passes the torch: A new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(11):868-880. doi:10.1038/nrd3531.
49. Hara K, Maruki Y, Long X, et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell.* 2002. doi:10.1016/S0092-8674(02)00833-4.
50. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell.* 2002. doi:10.1016/S0092-8674(02)00808-5.
51. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, et al. GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell.* 2003. doi:10.1016/S1097-2765(03)00114-X.

52. Zeng Z, Sarbassov DD, Samudio IJ, et al. Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood*. 2007. doi:10.1182/blood-2006-06-030833.
53. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004. doi:10.1101/gad.1212704.
54. Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006. doi:10.1016/j.cell.2006.01.016.
55. Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, et al. mSin1 Is Necessary for Akt/PKB Phosphorylation, and Its Isoforms Define Three Distinct mTORC2s. *Curr Biol*. 2006. doi:10.1016/j.cub.2006.08.001.
56. Pearce LR, Huang X, Boudeau J, et al. Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J*. 2007. doi:10.1042/BJ20070540.
57. Martin J, Masri J, Bernath A, Nishimura RN, Gera J. Hsp70 associates with Rictor and is required for mTORC2 formation and activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008. doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.086.
58. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, et al. @Mammalian@DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*. 2009. doi:10.1016/j.cell.2009.03.046.
59. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, et al. Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*. 2006. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.029.
60. Zhou H HS. Role of mTOR Signaling in Tumor Cell Motility, Invasion and Metastasis. *Curr Protein Pept Sci*. 2011. doi:10.1016/j.cmet.2011.03.023.Ouimet.
61. Julien L-A, Carriere A, Moreau J, Roux PP. mTORC1-Activated S6K1 Phosphorylates Rictor on Threonine 1135 and Regulates mTORC2 Signaling. *Mol Cell Biol*. 2010. doi:10.1128/MCB.00601-09.

62. Harrington LS, Findlay GM, Gray A, et al. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol.* 2004;166(2):213-223. doi:10.1083/jcb.200403069.
63. VÉZINA C, KUDELSKI A, SEHGAL SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo).* 1975. doi:10.7164/antibiotics.28.721.
64. Martel RR, Klicius J, Galet S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol.* 1977. doi:10.1139/y77-007.
65. Houchens DP, Ovejera AA, Riblet SM, Slagel DE. Human brain tumor xenografts in nude mice as a chemotherapy model. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1983;19(6):799-805. doi:10.1016/0277-5379(83)90012-3.
66. Rosner D, McCarthy N, Bennett M. Rapamycin inhibits human in stent restenosis vascular smooth muscle cells independently of pRB phosphorylation and p53. *Cardiovasc Res.* 2005;66(3):601-610. doi:10.1016/j.cardiores.2005.01.006.
67. Ballou LM, Lin RZ. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J Chem Biol.* 2008. doi:10.1007/s12154-008-0003-5.
68. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 1999.
69. Atkins MB, Hidalgo M, Stadler WM, et al. Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2004. doi:10.1200/jco.2004.08.185.
70. Tabernero J, Rojo F, Calvo E, et al. Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: A phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 2008. doi:10.1200/JCO.2007.14.5482.

71. Dowling RJO, Topisirovic I, Alain T, et al. mTORC1-Mediated Cell Proliferation, But Not Cell Growth, Controlled by the 4E-BPs. *Science* (80-). 2010. doi:10.1126/science.1187532.
72. Zaytseva YY, Valentino JD, Gulhati P, Mark Evers B. MTOR inhibitors in cancer therapy. *Cancer Lett.* 2012;319(1):1-7. doi:10.1016/j.canlet.2012.01.005.
73. Lorenz MC, Heitman J. TOR mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with FKBP12-rapamycin. *J Biol Chem.* 1995. doi:10.1074/jbc.270.46.27531.
74. Burger MT, Pecchi S, Wagman A, et al. Identification of NVP-BKM120 as a Potent, Selective, Orally Bioavailable Class I PI3 Kinase Inhibitor for Treating Cancer. *ACS Med Chem Lett.* 2011;2(10):774-779. doi:10.1021/ml200156t.
75. Chresta CM, Davies BR, Hickson I, et al. AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res.* 2010;70(1):288-298. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1751.
76. Taylor B, Schultz N, Hieronymus H. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell.* 2010. doi:10.1016/j.ccr.2010.05.026.Integrative.
77. Carver BS, Chapinski C, Wongvipat J, et al. Reciprocal Feedback Regulation of PI3K and Androgen Receptor Signaling in PTEN-Deficient Prostate Cancer. *Cancer Cell.* 2011. doi:10.1016/j.ccr.2011.04.008.
78. Dubrovskaya A, Kim S, Salamone RJ, et al. The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. *Proc Natl Acad Sci.* 2009. doi:10.1073/pnas.0810956106.
79. Villanueva A, Chiang DY, Newell P, et al. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2008. doi:10.1053/j.gastro.2008.08.008.
80. Chen JS, Wang Q, Fu XH, et al. Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in

- invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: Association with MMP-9. *Hepatol Res.* 2009. doi:10.1111/j.1872-034X.2008.00449.x.
81. Saidel MÉ, dos Santos KC, Nagano LFP, Montanari CA, Leitão A. Novel anti-prostate cancer scaffold identified by the combination of in silico and cell-based assays targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2017;27(17):4001-4006. doi:10.1016/j.bmcl.2017.07.061.
 82. McKim Jr. J. Building a Tiered Approach to In Vitro Predictive Toxicity Screening: A Focus on Assays with In Vivo Relevance. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2010;13(2):188-206. doi:10.2174/138620710790596736.
 83. Unger C, Kramer N, Walzl A, Scherzer M, Hengstschlager M, Dolznig H. Modeling human carcinomas: physiologically relevant 3D models to improve anti-cancer drug development. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014. doi:10.1016/j.addr.2014.10.015.
 84. Caie PD, Walls RE, Ingleston-Orme A, et al. High-Content Phenotypic Profiling of Drug Response Signatures across Distinct Cancer Cells. *Mol Cancer Ther.* 2010. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-1148.
 85. Tanner K, Gottesman MM, Gillet JP, et al. Beyond 3D culture models of cancer. *Sci Transl Med.* 2015. doi:10.1126/scitranslmed.3009367.
 86. Chatzinikolaïdou M. Cell spheroids: the new frontiers in in vitro models for cancer drug validation. *Drug Discov Today.* 2016;21(9):1553-1560. doi:10.1016/j.drudis.2016.06.024.
 87. Genée Y, Lee, Paraic A, Kenny EHL & MJB. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *NatMethods.* 2007. doi:nmeth1015 [pii]10.1038/nmeth1015.
 88. Santo VE, Rebelo SP, Estrada MF, Alves PM, Boghaert E, Brito C. Drug screening in 3D in vitro tumor models: overcoming current pitfalls of efficacy read-outs. *Biotechnol J.* 2017;12(1). doi:10.1002/biot.201600505.

89. Nath S, Devi GR. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther.* 2016;163:94-108. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.03.013.
90. Costăchel O, Fadei L, Badea E. Tumor cell suspension culture on non adhesive substratum. *Z Krebsforsch.* 1969. doi:10.1007/BF00524788.
91. Sutherland RM, Durand RE. Radiation response of multicell spheroids--an in vitro tumour model. *Curr Top Radiat Res Q.* 1976.
92. Mehta G, Hsiao AY, Ingram M, Luker GD, Takayama S. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Drug Deliv Cancer Today's Challenges, Tomorrow's Dir.* 2012. doi:10.1016/j.jconrel.2012.04.045.
93. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol.* 2010;148(1):3-15. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.01.012.
94. Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. *Drug Discov Today.* 2013;18(5-6):240-249. doi:10.1016/j.drudis.2012.10.003.
95. Timmins NE, Nielsen LK. Generation of Multicellular Tumor Spheroids by the Hanging-Drop Method. 2007:141-151. doi:10.1007/978-1-59745-443-8_8.
96. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng.* 2003. doi:10.1002/bit.10655.
97. Bissell MJ, Rizki A, Mian IS. Tissue architecture: The ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr Opin Cell Biol.* 2003. doi:10.1016/j.ceb.2003.10.016.
98. Weaver VM. Reversion of the Malignant Phenotype of Human Breast Cells in Three-Dimensional Culture and In Vivo by Integrin Blocking Antibodies. *J Cell Biol.* 1997. doi:10.1083/jcb.137.1.231.

99. Shelper TB, Lovitt CJ, Avery VM. Assessing Drug Efficacy in a Miniaturized Pancreatic Cancer *In Vitro* 3D Cell Culture Model. *Assay Drug Dev Technol.* 2016;14(7):367-380. doi:10.1089/adt.2016.737.
100. McMillian MK, Li L, Parker JB, et al. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biol Toxicol.* 2002;18(3):157-173. doi:10.1023/A:1015559603643.
101. Walzl A, Unger C, Kramer N, et al. The Resazurin Reduction Assay Can Distinguish Cytotoxic from Cytostatic Compounds in Spheroid Screening Assays. *J Biomol Screen.* 2014;19(7):1047-1059. doi:10.1177/1087057114532352.
102. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000;267(17):5421-5426. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.
103. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, et al. Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics.* 2011. doi:10.1097/FPC.0b013e32833ffb56.
104. Senchenkov A, Litvak DA, Cabot MC. Targeting Ceramide Metabolism—a Strategy for Overcoming Drug Resistance. *J Natl Cancer Inst.* 2001. doi:10.1093/jnci/93.5.347.
105. Strigun A, Wahrheit J, Niklas J, Heinzle E, Noor F. Doxorubicin increases oxidative metabolism in HL-1 cardiomyocytes as shown by ¹³C metabolic flux analysis. *Toxicol Sci.* 2012. doi:10.1093/toxsci/kfr298.
106. Baek N, Seo OW, Kim M, Hulme J, An SSA. Monitoring the effects of doxorubicin on 3D-spheroid tumor cells in real-time. *Onco Targets Ther.* 2016;Volume 9:7207-7218. doi:10.2147/OTT.S112566.
107. Gambari R, Hau DKP, Wong WY, Chui CH. Sensitization of Hep3B hepatoma cells to cisplatin and doxorubicin by corilagin. *Phyther Res.* 2014. doi:10.1002/ptr.5049.
108. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Paul Solomon FD. 3D cell culture systems: Advantages and applications. *J Cell Physiol.* 2015. doi:10.1002/jcp.24683.

109. Rimann M, Laternser S, Gvozdenovic A, et al. An in vitro osteosarcoma 3D microtissue model for drug development. *J Biotechnol.* 2014. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.09.005.
110. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.* 1997. doi:10.1038/nm0897-917.
111. Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, et al. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res.* 2002. doi:10.1158/0008-5472.can-07-1343.
112. O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, et al. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000. doi:10.1073/pnas.240390697.
113. Fukuda S, Pelus LM. Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34(+) cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood.* 2001. doi:10.1182/blood.V98.7.2091.
114. McEleny KR, Watson RWG, Coffey RNT, O'Neill AJ, Fitzpatrick JM. Inhibitors of apoptosis proteins in prostate cancer cell lines. *Prostate.* 2002. doi:10.1002/pros.10061.
115. Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2000.
116. Shariat SF, Lotan Y, Saboorian H, et al. Survivin Expression Is Associated with Features of Biologically Aggressive Prostate Carcinoma. *Cancer.* 2004. doi:10.1002/cncr.20039.
117. Nakahara T, Takeuchi M, Kinoyama I, et al. YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. *Cancer Res.* 2007;67(17):8014-8021. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1343.

118. Kelly RJ, Thomas A, Rajan A, et al. A phase I/II study of sepantronium bromide (YM155, survivin suppressor) with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-Small-Cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2013. doi:10.1093/annonc/mdt249.
119. MORDECAI S. a Biomathematical Approach T O Clinical. 1961.
120. Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. Evaluation of chemotherapeutics in a three-dimensional breast cancer model. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015;141(5):951-959. doi:10.1007/s00432-015-1950-1.
121. Härmä V, Virtanen J, Mäkelä R, et al. A comprehensive panel of three-dimensional models for studies of prostate cancer growth, invasion and drug responses. *PLoS One*. 2010;5(5). doi:10.1371/journal.pone.0010431.
122. Ware MJ, Colbert K, Keshishian V, et al. Generation of Homogenous Three-Dimensional Pancreatic Cancer Cell Spheroids Using an Improved Hanging Drop Technique. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016;22(4):312-321. doi:10.1089/ten.tec.2015.0280.
123. Sherley JL, Stadler PB, Stadler JS. A quantitative method for the analysis of mammalian cell proliferation in culture in terms of dividing and non-dividing cells. *Cell Prolif*. 1995;28(3):137-144. doi:10.1111/j.1365-2184.1995.tb00062.x.
124. Carlsson J, Nilsson K, Westermarck B, et al. Formation and growth of multicellular spheroids of human origin. *Int J Cancer*. 1983;31(5):523-533. doi:10.1002/ijc.2910310502.
125. Norouzzadeh M, Kalikias Y, Mohamadpur Z, Sharifi L. Determining population doubling time and the appropriate number of HepG2 cells for culturing in 6- well plate. *Int Res J Appl Basic Sci*. 2016;10(3):299-303.
126. Cunningham D, You Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *J Biol Methods*. 2015;2(1):17. doi:10.14440/jbm.2015.63.
127. Chitcholtan K, Asselin E, Parent S, Sykes PH, Evans JJ. Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer. *Exp Cell Res*. 2013;319(1):75-87. doi:10.1016/j.yexcr.2012.09.012.

128. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207-218. doi:10.1089/adt.2014.573.
129. Hongisto V, Jernström S, Fey V, et al. High-Throughput 3D Screening Reveals Differences in Drug Sensitivities between Culture Models of JIMT1 Breast Cancer Cells. *PLoS One*. 2013;8(10):1-16. doi:10.1371/journal.pone.0077232.
130. Gurski L a, Petrelli NJ, Jia X, Farach-carson MC. 3D Matrices for Anti-Cancer Drug Testing and Development. *Oncol Issues*. 2010.
131. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J*. 2008;3(9-10):1172-1184. doi:10.1002/biot.200700228.
132. Ramaiahgari SC, Den Braver MW, Herpers B, et al. A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies. *Arch Toxicol*. 2014;88(5):1083-1095. doi:10.1007/s00204-014-1215-9.
133. Grimes DR, Kelly C, Bloch K, Partridge M. A method for estimating the oxygen consumption rate in multicellular tumour spheroids. *J R Soc Interface*. 2014. doi:10.1098/rsif.2013.1124.
134. Laurent J, Frongia C, Cazales M, Mondesert O, Ducommun B, Lobjois V. Multicellular tumor spheroid models to explore cell cycle checkpoints in 3D. *BMC Cancer*. 2013. doi:10.1186/1471-2407-13-73.
135. Easwaran H, Tsai HC, Baylin SB. Cancer Epigenetics: Tumor Heterogeneity, Plasticity of Stem-like States, and Drug Resistance. *Mol Cell*. 2014. doi:10.1016/j.molcel.2014.05.015.
136. Wilkerson J, Abdallah K, Hugh-Jones C, et al. Estimation of tumour regression and growth rates during treatment in patients with advanced prostate cancer: a retrospective analysis. *Lancet Oncol*. 2017. doi:10.1016/S1470-2045(16)30633-7.

137. Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. Miniaturized three-dimensional cancer model for drug evaluation. *Assay Drug Dev Technol.* 2013;11(7):435-448. doi:10.1089/adt.2012.483.
138. Clyburn RD, Reid P, Evans CA, Lefley D V., Holen I. Increased anti-tumour effects of doxorubicin and zoledronic acid in prostate cancer cells in vitro: Supporting the benefits of combination therapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;65(5):969-978. doi:10.1007/s00280-009-1106-6.
139. Yao W, Yue P, Zhang G, Owonikoko TK, Khuri FR, Sun SY. Enhancing therapeutic efficacy of the MEK inhibitor, MEK162, by blocking autophagy or inhibiting PI3K/Akt signaling in human lung cancer cells. *Cancer Lett.* 2015;364(1):70-78. doi:10.1016/j.canlet.2015.04.028.
140. Bonelli MA, Cavazzoni A, Saccani F, et al. Inhibition of PI3K Pathway Reduces Invasiveness and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Squamous Lung Cancer Cell Lines Harboring PIK3CA Gene Alterations. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(8):1916-1927. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0892.
141. Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(19):1441-1454. doi:10.1093/jnci/djm135.
142. Kim JW, Ho WJ, Wu BM. The role of the 3D environment in hypoxia-induced drug and apoptosis resistance. *Anticancer Res.* 2011.
143. Pickl M, Ries CH. Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene.* 2009;28(3):461-468. doi:10.1038/onc.2008.394.
144. Grabinski N, Ewald F, Hofmann BT, et al. Combined targeting of AKT and mTOR synergistically inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer.* 2012;11:1-14. doi:10.1186/1476-4598-11-85.
145. Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev.* 2002. doi:10.1101/gad.995802.

146. Riedl A, Schlederer M, Pudelko K, et al. Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT–mTOR–S6K signaling and drug responses. *J Cell Sci.* 2017;130(1):203-218. doi:10.1242/jcs.188102.
147. Breslin S, O'Driscoll L, Breslin S, O'Driscoll L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget.* 2016. doi:10.18632/oncotarget.9935.
148. Schmid K, Bago-Horvath Z, Berger W, et al. Dual inhibition of EGFR and mTOR pathways in small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2010. doi:10.1038/sj.bjc.6605761.
149. Liu T, Yacoub R, Taliaferro-Smith LD, et al. Combinatorial Effects of Lapatinib and Rapamycin in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Ther.* 2011. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0925.
150. Buck E, Eyzaguirre A, Brown E, et al. Rapamycin synergizes with the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in non-small-cell lung, pancreatic, colon, and breast tumors. *Mol Cancer Ther.* 2006. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0166.
151. Ekert JE, Johnson K, Strake B, et al. Three-dimensional lung tumor microenvironment modulates therapeutic compound responsiveness in vitro - Implication for drug development. *PLoS One.* 2014. doi:10.1371/journal.pone.0092248.
152. Luca AC, Mersch S, Deenen R, et al. Impact of the 3D Microenvironment on Phenotype, Gene Expression, and EGFR Inhibition of Colorectal Cancer Cell Lines. *PLoS One.* 2013. doi:10.1371/journal.pone.0059689.
153. Li L, Zhao GD, Shi Z, Qi LL, Zhou LY, Fu ZX. The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC (Review). *Oncol Lett.* 2016;12(5):3045-3050. doi:10.3892/ol.2016.5110.
154. Butler DE, Marlein C, Walker HF, et al. Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway activates autophagy and compensatory Ras/Raf/MEK/ERK signalling in prostate cancer. *Oncotarget.* 2017;8(34):56698-56713. doi:10.18632/oncotarget.18082.

155. Oikonomou E, Koustas E, Goulielmaki M, Pintzas A. BRAF vs RAS oncogenes: Are mutations of the same pathway equal? Differential signalling and therapeutic implications. *Oncotarget*. 2014. doi:10.18632/oncotarget.2555.
156. Persad S, Dedhar S. The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2003. doi:10.1023/A:1023777013659.
157. Muranen T, Selfors LM, Worster DT, et al. Inhibition of PI3K/mTOR Leads to Adaptive Resistance in Matrix-Attached Cancer Cells. *Cancer Cell*. 2012;21(2):227-239. doi:10.1016/j.ccr.2011.12.024.
158. Isakoff SJ, Engelman JA, Irie HY, et al. Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 2005. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2612.
159. Schafer ZT, Grassian AR, Song L, et al. Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature*. 2009. doi:10.1038/nature08268.