

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL EM
BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

ELISA FELLER GONÇALVES DA SILVA

**RAPAMICINA E FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO DIMINUEM A PROLIFERAÇÃO DE
CÉLULAS HEP/HEPG2 VIA AUMENTO DE RADICAIS LIVRES E APOPTOSE**

Porto Alegre

2015

ELISA FELLER GONÇALVES DA SILVA

**RAPAMICINA E FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO DIMINUEM A PROLIFERAÇÃO DE
CÉLULAS HEP/HEPG2 VIA AUMENTO DE RADICAIS LIVRES E APOPTOSE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Co-orientador: Profa. Dra. Fernanda Bordignon Nunes

Porto Alegre

2015

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.”

Dalai Lama

RESUMO

O carcinoma hepatocelular é o tipo de tumor mais prevalente entre os tumores primários que atingem o fígado. Seu desenvolvimento está geralmente relacionado a uma doença hepática crônica, a qual pode ser originada por uma infecção viral (hepatite B e C), alcoolismo, cirrose criptogênica, doenças biliares e hemocromatose primária. A rapamicina, um agente imunossupressor, é atualmente utilizada como base na quimioterapia no tratamento de diversos tipos de câncer, inclusive nos hepáticos. Por apresentar diversos efeitos adversos graves nos pacientes em tratamento, inclusive nefrotoxicidade, é evidente a importância de minimizar estes efeitos sem comprometimento da eficácia, neste sentido outras drogas podem ser utilizadas concomitantemente. Uma destas drogas é a frutose-1,6-bisfosfato (FBP) que tem demonstrado efeito terapêutico em várias situações patológicas. Também foram documentados efeitos benéficos da FBP em deficiências orgânicas, renais e hepáticas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade da rapamicina em conjunto com a FBP na proliferação celular, estresse oxidativo e processo inflamatório de células HepG2, analisando os efeitos citotóxicos, na tentativa de minimizar os efeitos adversos e aumentar a eficácia e segurança para os pacientes em tratamento. Os resultados demonstraram que a combinação de rapamicina e FBP é mais eficiente do que no uso isolado das mesmas, pois doses subterapêuticas de rapamicina, quando associadas à FBP, tornaram-se eficazes, não sendo esta inibição da proliferação celular ocasionada por necrose. Em 72h de tratamento, não foram observadas alterações na rota inflamatória ou na autofagia das células, porém a combinação rapamicina e FBP aumentou significativamente a produção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a apoptose celular, processo que pode inibir a proliferação do tumor. Estes resultados demonstram que esta associação pode ser uma escolha promissora para o tratamento de hepatocarcinoma.

Palavras-chave: Rapamicina. Frutose-1,6-bisfosfato. Células HepG2. Carcinoma Hepatocelular. Radicais livres. Apoptose.

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma is the most prevalent type of tumor among primary tumors affecting the liver. Its development is usually related to a chronic liver disease, which can be caused by a viral infection (hepatitis B and C), alcoholism, cryptogenic cirrhosis, biliary disease and primary hemochromatosis. Rapamycin, an immunosuppressant agent, is currently used as the basis of chemotherapy in the treatment of various cancers, including the liver. By presenting several serious adverse effects in patients undergoing treatment, including nephrotoxicity, it is clear the importance of minimizing these effects without compromising efficacy. In this sense, other drugs may be used concomitantly. One of these drugs is fructose-1,6-bisphosphate (FBP), which has shown therapeutic effect in various pathological situations. Beneficial effects of FBP in organic, liver and kidney deficiencies were also documented. The objective of this study was to evaluate the activity of rapamycin in combination with the FBP in cell proliferation, oxidative stress and inflammation of hepatocellular carcinoma HepG2 cells, analyzing the cytotoxic effects in an attempt to minimize adverse effects and increase the efficacy and safety for patients undergoing treatment. The results demonstrated that the combination of rapamycin and FBP is more efficient than the single use of them, because subtherapeutic doses of rapamycin, when associated to FBP become effective, and this inhibition in cell proliferation is not caused by necrosis. In 72 hours of treatment, there was no change in the inflammatory route or in autophagy of cells, but the combination of rapamycin and FBP significantly increased the production of Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and the cellular apoptosis, a process that can inhibit tumor proliferation. These results demonstrate that this association may be a promising choice for hepatocarcinoma treatment.

Keywords: Rapamycin. Fructose-1,6-bisphosphate. HepG2 Cells. Hepatocellular Carcinoma. Free radicals. Apoptosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

FBP – Frutose-1,6-bisfosfato

HCC – Carcinoma Hepatocelular

HCV – Vírus da Hepatite C

ATCC - American Type Culture Collection

EROS - Espécies reativas de oxigênio

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

COX -2 - Ciclooxigenase 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

PGE-2 – Prostaglandina E2

DANEs - Drogas antiinflamatórias não esteroidais

ATP- Adenosina trifosfato

O₂ - Oxigênio

NADP – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

mTOR - alvo da rapamicina em mamíferos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Hepatocarcinoma.....	7
1.2 Células de hepatocarcinoma – HEPG2.....	7
1.3 Inflamação e câncer.....	8
1.4 Terapias antineoplásicas convencionais.....	9
1.5 Inovações na terapia antineoplásica.....	9
1.6 Rapamicina.....	11
1.7 Frutose-1,6-bisfosfato (FBP).....	12
2 JUSTIFICATIVA.....	14
3 OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	16
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
6 REFERÊNCIAS.....	40
7 ANEXO.....	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hepatocarcinoma

Os tumores malignos do fígado podem ser divididos em dois tipos: primários (que tem origem no próprio órgão) e secundários ou metastáticos (originados em outros órgãos). Dentre os tumores originados no fígado, o hepatocarcinoma, ou carcinoma hepatocelular, é o mais frequente¹.

O carcinoma hepatocelular (HCC), está entre as principais doenças no mundo atualmente, sendo o quinto tumor maligno mais freqüente, representando 85% dos tumores hepáticos primários e é responsável por quase dois terços da morte entre os cânceres. O prognóstico geralmente é ruim, devido ao rápido crescimento tumoral e a ausência de sintomas no início da doença^{2; 3}.

O desenvolvimento da maioria dos hepatocarcinomas relaciona-se com complicações decorrentes de quadros de cirrose (caracterizada pela fibrose progressiva e a reorganização da microarquitetura vascular). A presença de algumas doenças de base, como a hepatite B e C, são uma das principais causas do tumor⁴. Outro fator de risco para o hepatocarcinoma é a ingestão de grãos ou cereais contaminados com *Aspergillus flavus*, que produz a substância cancerígena aflatoxina¹.

O HCC está entre as dez principais neoplasias que afetam a população mundial. Sua incidência tem aumentado nos últimos anos, principalmente pela infecção do vírus da Hepatite C (HCV). O aumento da incidência gera aumento de custos com a saúde, demonstrando a necessidade de desenvolvimento de terapias mais acessíveis⁵.

1.2 Células de hepatocarcinoma – HEPG2

HepG2, é uma linhagem de células do fígado provenientes de um hepatoblastoma humano, é utilizada como modelo de tumores de células hepáticas, visto que mantêm funções metabólicas semelhantes aos hepatócitos⁶.

Segundo dados do protocolo da linhagem celular HepG2, comercializada pela American Type Culture Collection (ATCC), a linhagem é derivada de carcinoma hepatocelular, apresenta morfologia epitelial, crescimento aderente e não é tumorigênica em camundongos imunossuprimidos. Por tanto, essa linhagem é utilizada apenas em estudos “in vitro”, não sendo recomendado para estudos “in vivo” com o objetivo de desenvolver tumores em animais⁷.

1.3 Inflamação e Câncer

Estudos recentes mostram que há uma íntima relação entre inflamação e câncer. Evidências epidemiológicas e experimentais suportam o conceito que o processo inflamatório crônico promove o desenvolvimento e proliferação dos tumores. Há uma forte associação entre inflamação crônica de um órgão em particular e um específico câncer para este órgão. Esta associação envolve o fator tempo, ou seja, quanto mais tempo esta inflamação persiste maior será o risco de desenvolver uma neoplasia⁸.

Mediadores inflamatórios, como por exemplo, as citocinas, os radicais livres, prostaglandinas e fatores de crescimento podem induzir a alterações na homeostase celular, resultando no desenvolvimento e progressão do câncer. Vários mecanismos inflamatórios estão envolvidos no câncer. Um dos mais importantes é a instabilidade genômica causada pela inflamação. A ativação de leucócitos, principalmente macrófagos e granulócitos, leva à síntese de espécies reativas de oxigênio (EROS) e nitrogênio (ERN) que podem provocar dano ao DNA, proteínas e lipídeos, podendo gerar mutações nas células. As lesões por radicais livres podem ser causadas por uma enzima pró-inflamatória, a ciclooxigenase 2 (COX-2), que leva a produção de altos níveis de peróxidos no interior das células^{8;9}.

Além da produção aumentada dos radicais livres pelo processo inflamatório, outras situações podem alterar o meio celular e promover câncer:

- a. O aumento de citocinas inflamatórias pode aumentar o sinal proliferativo, que por sua vez pode potencialmente aumentar o número de células com risco de sofrerem mutação;
- b. Produtos da inflamação podem alterar eventos celulares e provocar expressão gênica inapropriada;

c. Diminuição em substâncias supressoras de tumor e de células T regulatórias que podem contribuir para o efeito antitumoral da célula.

Além desses fatores, recentemente se descobriu que tumores provocados por células-tronco mostram estrita relação com citocinas inflamatórias. A interleucina 6 (IL-6) possui um papel preponderante no câncer de mama por sustentar a sobrevivência e a capacidade proliferativa das células-tronco. Além disso, estudos preliminares mostraram que níveis elevados de IL-6 estão associados a uma alta taxa de expressão de metástases e mau prognóstico no HCC. Também foi evidenciado o papel da interleucina 4 (IL-4), no desenvolvimento do câncer de cólon^{9; 10}.

1.4 Terapias Antineoplásicas Convencionais

Dentre os vários tipos de terapias contra o câncer, as terapias tradicionais são a ressecção cirúrgica, a radioterapia e a quimioterapia, sendo esta última a modalidade mais amplamente empregada. As terapias podem ser utilizadas isoladamente ou em associação⁸. Apesar das distintas opções de tratamento, a terapia do câncer apresenta grande dificuldade de manejo, principalmente devido à baixa especificidade de alguns fármacos e a estreita janela terapêutica, as quais estão intimamente relacionadas à toxicidade. Dessa forma a busca pelo desenvolvimento de novas terapias mais específicas torna-se necessária¹¹.

O tratamento do HCC varia de acordo com o estágio em que o tumor se encontra, assim como em outros tipos de câncer. No estágio inicial, no qual o tumor está localizado somente no fígado e não há metástases, a cirurgia de ressecção do tumor é geralmente recomendada. Em alguns casos, o transplante de fígado pode ser indicado, sendo essas duas opções terapêuticas (ressecção cirúrgica e transplante) as únicas consideradas atualmente como curativas. Outras terapias têm sido utilizadas de forma paliativa, como embolização, ablação por radiofrequência (destruição das células tumorais por calor ou frio) e injeção com etanol⁵.

1.5 Inovações na Terapia Antineoplásica

A imunoprevenção e a imunoterapia pertencem a um novo campo de estudos contra o câncer. Por haver uma correlação estrita entre câncer e inflamação, terapias que diminuem a inflamação antes da imunização podem aumentar a eficácia da imunoterapia.

A ciclooxigenase 2 (COX-2) é uma isoforma de COX que catalisa a etapa chave do metabolismo do ácido araquidônico e a produção de prostaglandinas. As prostaglandinas, notadamente a PGE-2, podem aumentar a produção de tumores. Uma elevação da COX-2 é frequentemente citada em uma variedade de tumores localizados em células epiteliais de estroma.

Estudos em humanos e em animais têm mostrado que drogas antiinflamatórias não esteroidais (DANEs) são quimioprotetoras para o câncer de cólon e adenoma. Drogas que seletivamente inibem a COX-2, incluindo DANEs, estão sendo usadas em estudos para tratamento de câncer. Estudos recentes estão determinando o efeito de inibidores da COX-2 sobre o desenvolvimento de câncer de mama e câncer colorretal. Também tem sido observado que pessoas que fazem uso corrente de DANEs têm baixo risco de desenvolverem câncer. Outras drogas que tem como base a inibição da COX-2 reduziram significativamente a progressão de melanoma em camundongos¹².

Apesar de não haver evidências em estudos de imunização, antagonistas do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) representam uma boa opção para potencializar vacinas contra o câncer. Antagonistas TNF (etanercept, infliximab, adalimumab) que foram licenciados para estudos epidemiológicos para Artrite Reumatóide e Doença de Crohn têm demonstrado várias ações que podem ser úteis para terapia contra o câncer, porque eles podem diminuir a produção de citocinas, reduzir a angiogênese, prevenir a infiltração de leucócitos e melhorar as funções da medula óssea. Atualmente, muitos inibidores da produção de TNF- α têm sido usados no tratamento do câncer, incluindo numerosos produtos originados de frutas, vegetais e de plantas medicinais, que são testados em modelos de câncer. Entre os produtos naturais que podem ter impacto na imunização contra o câncer, destaca-se a vitamina E, que possui dois mecanismos distintos: efeito direto sobre as células e ação indireta, através de suas propriedades antiinflamatórias, principalmente relacionada com redução da produção de PGE-2^{13; 14}.

Outra inovação nas terapias anticâncer é inibição da via mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos), que tem demonstrado suprimir o crescimento de tumores hepáticos e a formação de metástases^{15; 16}. Apesar desses resultados animadores, o HCC frequentemente demonstra posterior resistência à rapamicina quando utilizada

isoladamente. Dessa forma, novos estudos têm pesquisado a associação da rapamicina com outras drogas antitumorais para diminuir ou evitar a resistência terapêutica^{17; 18}.

1.6 Rapamicina:

A rapamicina, uma lactona macrocíclica produzida pelo *Streptomyces hygroscopicus*, de fórmula molecular C₅₁ H₇₉ NO₁₃ e peso molecular de 914,2, é um quimioterápico altamente eficaz, tendo como mecanismo de ação a inibição da mTORC1. Desde sua aprovação pela US Food and Drug Administration, em 1999, a rapamicina, foi administrada em vários pacientes que receberam transplante de rim devido a sua atividade imunossupressora. Na década de 80, cientistas também descobriram que a droga inibe o crescimento de tumores e, desde 2007, dois derivados dela: o Temsirolimus da Pfizer e o Everolimus da Novartis foram aprovados contra vários tipos de câncer, inclusive o de fígado, administrado isoladamente ou em combinação com outras drogas¹⁹.

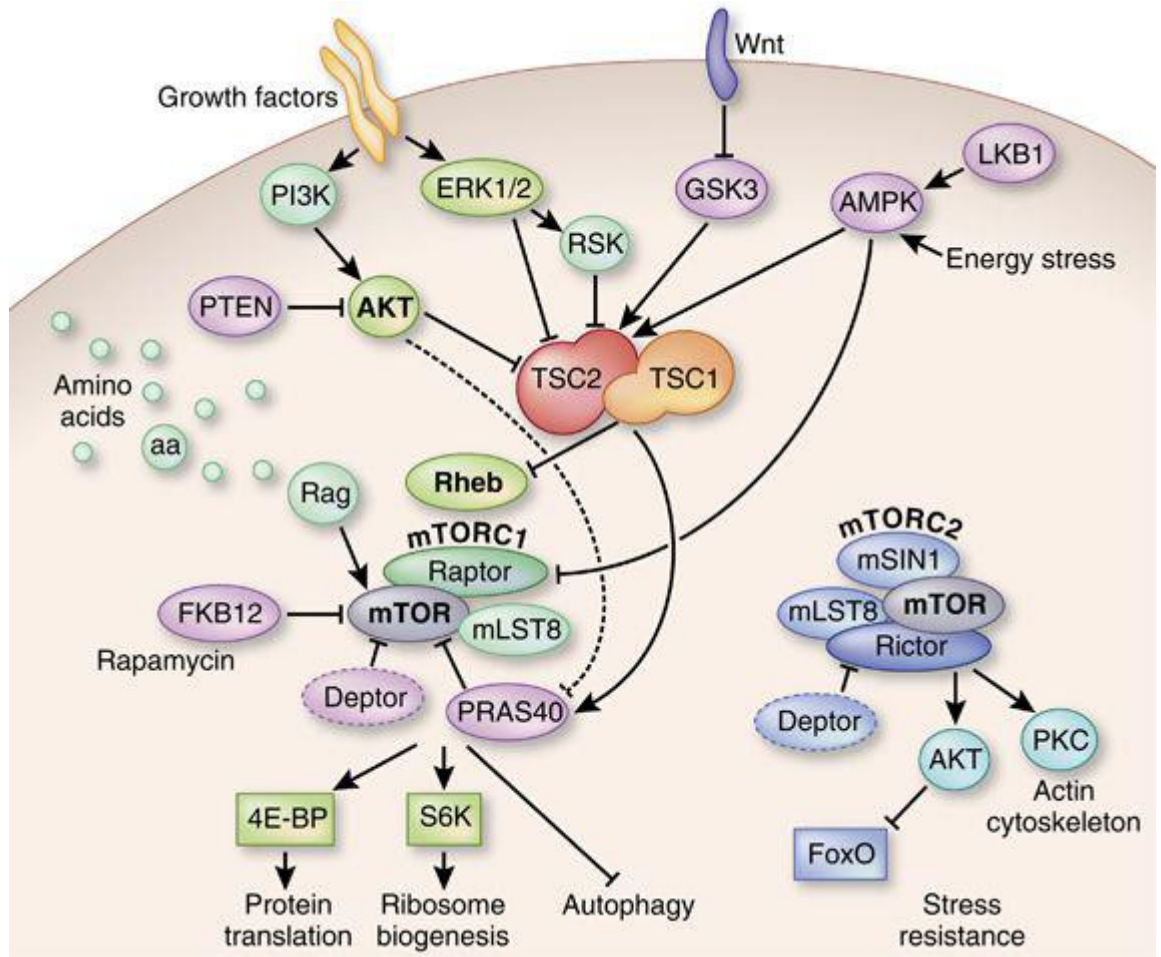
O mecanismo de ação da rapamicina ocorre intracelularmente, onde esses inibidores formam um complexo com a proteína 12 ligada a FK506 (FKBP-12) que é reconhecida pelo alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). A formação do complexo resulta na inibição da atividade do mTOR e da expressão da proteína S6K, como consequência haverá inibição da progressão do ciclo celular, sobrevivência e angiogênese (Figura 1)^{20; 21; 22}.

Evidências clínicas e experimentais mostram forte correlação entre a dosagem e eficácia. Os efeitos secundários induzidos por rapamicina como náusea, vômito, anemia, hiperlipidemia, toxicidade respiratória, cardio, e nefrotoxicidade são dependentes da dose e limitam a administração de dosagens mais altas, comprometendo assim a eficácia terapêutica. Sendo a nefrotoxicidade uma das principais limitações, o monitoramento da função renal torna-se obrigatório durante o tratamento^{19; 20}.

Isto torna as doses inadequadas o obstáculo mais significativo na definição exata do papel clínico da rapamicina, e, provavelmente, na expansão da sua atividade. Portanto, quando altas doses de rapamicina são administradas, é essencial identificar drogas eficazes de suporte que podem impedir ou contrariar os

efeitos secundários sérios da rapamicina. Uma delas é a frutose-1,6-bisfosfato (FBP), um açúcar que possui mecanismos que promovem proteção renal²³.

Figura 1- Mecanismo da rapamicina



Fonte: <http://www.bioss.uni-freiburg.de/>²²

1.7 Frutose-1,6-bisfosfato (FBP)

A frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é um dos metabólitos encontrados na rota glicolítica, apresentando estruturas estáveis anoméricas: α e β furanose. Este açúcar bisfosforilado, além de ser um subproduto da via glicolítica também exerce papel importante junto a diversas rotas metabólicas do organismo. Entre suas ações regulatórias aparece a sua capacidade de alterar o metabolismo de carboidratos estimulando a glicólise e inibindo a gliconeogênese²³.

A FBP tem demonstrado efeitos terapêuticos em várias situações patológicas como: isquemia, choque e lesões tóxicas. Também foram documentados os efeitos

benéficos de FBP em deficiências orgânicas cardíacas, renais, cerebrais, intestinais e hepáticas^{24; 25}.

Os mecanismos pelos quais a FBP protege células e tecidos ainda não são claros. Um possível mecanismo de proteção inclui o metabolismo anaeróbico da FBP para gerar adenosina trifosfato (ATP)²⁶ ou reduzir a sua perda²⁷, e/ou pela sua propriedade quelante de cálcio²⁸. Esta capacidade da FBP em diminuir a quantidade de cálcio extracelular, melhora o rendimento mecânico e respiratório do coração isquêmico²⁵, sendo este mediado pela ativação de fosfoquinase-C, que modula a atividade intracelular do cálcio²⁹. Este açúcar também aumenta a captação celular de potássio, que resulta em uma diminuição intracelular da concentração de sódio, reduzindo assim, o edema celular citotóxico³⁰.

Além disto, o aumento dos níveis de ATP pela FBP pode reduzir a formação de O₂, tendo em vista de que este pode ser o regulador fisiológico da atividade catalítica da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) oxidase, uma das enzimas responsáveis pela produção destes radicais. A FBP inibe a formação de espécies reativas de oxigênio e a ativação de neutrófilos, reduz a proliferação e a viabilidade de linfócitos T e também inibe a apoptose em hepatócitos^{24; 26; 31; 32}.

A fim de evidenciar um destes mecanismos de proteção, o estudo de Azambuja et al, utilizou a FBP em conjunto a cisplatina, um quimioterápico de estreita janela terapêutica, com nefrotoxicidade similar à rapamicina. Esta associação diminuiu significativamente os níveis de creatinina e uréia em comparação com o grupo de cisplatina. Além disso, a necrose tubular aguda também foi menos severa nos animais que receberam cisplatina com FBP do que nos animais que receberam apenas cisplatina. Este fato demonstrou que a FBP tem um efeito protetor sobre a função e parênquima renais em ratos de que tiveram nefrotoxicidade induzida pela cisplatina. O efeito anti-inflamatório da frutose-1,6-bisfosfato confirma o seu efeito protetor em casos de lesão celular³¹.

2 JUSTIFICATIVA

O difícil manejo da resistência de células neoplásicas, alta toxicidade e consequentes efeitos adversos têm impulsionado as pesquisas para o desenvolvimento de novas terapias antineoplásicas. Os tratamentos do hepatocarcinoma são em sua maioria paliativos, exceto a ressecção cirúrgica e o transplante (terapias curativas); porém ainda com possibilidade de recidiva. Dessa maneira, a busca de novas alternativas terapêuticas para a doença torna-se um campo de pesquisa em expansão. Dentre os tratamentos, a rapamicina está sendo largamente utilizada, porém as altas doses utilizadas nas quimioterapias atualmente provocam vários efeitos secundários, principalmente nefrotoxicidade. Na tentativa de utilizar subdoses da rapamicina, sem comprometimento da eficácia, a usaremos em combinação com a FBP. Este açúcar vem demonstrando propriedades terapêuticas antioxidantes e antiinflamatórias além de um efeito nefroprotetor em diversos estudos envolvendo modelos animais. Sabendo que o processo de carcinogênese envolve mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio, acreditamos que a FBP possa ser útil na manutenção do efeito terapêutico da rapamicina e inibição dos eventos de adversos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito da rapamicina isolada e em conjunto com a frutose-1,6-bisfosfato sobre a proliferação, parâmetros inflamatórios e estresse oxidativo em células de carcinoma hepático (HepG2).

3.2 Específicos

- Verificar se dose subterapêutica da rapamicina em conjunto com a FBP mantêm o efeito na inibição do crescimento celular da linhagem celular HepG2;
- Avaliar marcadores para apoptose (DAPI) e autofagia (Laranja de Acridina);
- Verificar se a ação da combinação de rapamicina e frutose-1,6-bisfosfato pode alterar a síntese de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias nas culturas celulares;
- Avaliar a influência da associação da rapamicina e frutose-1,6-bisfosfato sobre estresse oxidativo em células HepG2.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados do presente trabalho foram submetidos ao periódico Cell Proliferation (fator de impacto: 3.28).

Rapamycin and fructose-1,6-bisphosphate reduce the HEP / HEPG2 cell proliferation via increase of free radicals and apoptosis

Running head: Action of rapamycin and FBP in HepG2 cells

Elisa Feller Gonçalves da Silva¹, Gabriele Catyana Krause¹, Gabriela Viegas Haute¹, Kelly Goulart Lima¹, Fernanda Cristina Mesquita¹, Leonardo Pedrazza¹, Bruno Souza Basso¹, Anderson Catarina Velasquez¹, Fernanda Bordignon Nunes¹, Jarbas Rodrigues de Oliveira*

¹Laboratory of Cellular Biophysics and Inflammation, Department of Cellular and Molecular Biology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Abstract: 208 words

Maintext: 3898 words

* To whom correspondences should be addressed at Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga 6681, prédio 12, bloco C, sala 221, CEP 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: jarbas@pucrs.br

ABSTRACT

Background: Hepatocellular carcinoma is the most prevalent type of tumor among primary tumors affecting the liver. Rapamycin is currently used as a basis for chemotherapy in the treatment of cancers, including the liver. Because it shows several adverse effects, it is clear the importance of minimizing these effects without compromising efficacy. In this sense other drugs may be used concomitantly. One of these drugs is fructose-1,6-bisphosphate (FBP), which has shown therapeutic effect in various pathological situations, having antioxidants and anti-inflammatory properties. The objective of this study was to evaluate the activity of rapamycin in combination with the FBP in HepG2 cell proliferation and others mechanisms involved. *Methods:* HepG2 cells were analyzed after 72 hours of treatment with both drugs. Cell proliferation, cytotoxicity, cytokines, apoptosis, senescence, autophagy and oxidative stress were accessed. *Results:* Was demonstrated that the combination is more efficient than the single use of substances, because subtherapeutic doses of rapamycin, when associated to FBP become effective, reducing cell proliferation, through a significant increase in the production of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS), suggesting that this might be the cause of death by apoptosis. *Conclusions:* According to these results, we believe that the association of both drugs may be a promising choice for the treatment of hepatocarcinoma.

Keywords: Rapamycin. Fructose-1,6-bisphosphate. HepG2 Cells. Hepatocellular Carcinoma. Free radicals. Apoptosis.

INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC), is among the leading diseases in the world today, being the fifth most common malignant tumor, representing 85% of primary liver tumors and accounts for nearly two thirds of death among cancers. The prognosis is generally poor due to rapid tumor growth and the absence of symptoms at the beginning of disease^{1; 2}.

The chronic inflammatory state appears to be necessary for the initiation and development of liver cancer and the HCC is an example of inflammation-related cancer^{3; 4}. The presence of some underlying disease, such as hepatitis B and C, is a major cause the tumor⁵. HCC is among the top ten cancers that affect the world population. Its incidence has increased in recent years, mainly by infection of hepatitis C virus⁶.

Among the various types of cancer therapies, appeared the surgical resection, radiotherapy and chemotherapy, the latter being the most widely used mode. Therapies may be used singly or in combination³. Even with different options, treatment against cancer has difficulty handling, mainly due to the low specificity of some drugs and the narrow therapeutic window, which are closely related to the toxicity. Thus, the search for the development of new therapies becomes extremely necessary⁷. A recent innovation in the anticancer therapy is inhibition of the mTOR (mammalian target of rapamycin), which has been shown to suppress the growth of liver tumors and metastasis^{8; 9}. These results are encouraging, but the HCC often shows higher resistance to rapamycin when used alone. Thus, new studies have investigated the association of rapamycin with other antitumor drugs to reduce or avoid treatment resistance^{10; 11}.

Rapamycin, a macrocyclic lactone produced by *Streptomyces hygroscopicus*, molecular formula C₅₁H₇₉NO₁₃ and molecular weight 914.2, is a highly effective chemotherapy, with the mechanism of action inhibition of mTORC1. Since its approval by the US Food and Drug Administration in 1999, rapamycin was administered in several patients who received kidney transplant due to its immunosuppressive activity. In the 80s, scientists also found that the drug inhibits the growth of tumors and, since 2007, two derivatives of it: the Temsirolimus (Pfizer) and Everolimus (Novartis) were approved against various cancers, including liver, administered alone or in combination with other drugs¹².

The mechanism of action of rapamycin occurs intracellularly where these inhibitors form a complex with the protein bound to FK506 12 (FKBP-12) that is recognized by mTOR. The formation of the complex results in inhibition of the activity of mTOR and S6K expression of the protein, will result in inhibition of cell cycle progression, survival and angiogenesis^{13; 14}.

Clinical and experimental evidences show strong correlation between dosage and toxicity. The rapamycin induced side effects such as nausea, vomiting, anemia, hyperlipidemia, respiratory toxicity, cardiovascular, and nephrotoxicity are dose-dependent and limited administration of higher dosages, thus compromising therapeutic efficacy. The nephrotoxicity is one of the major limitations, for this reason, the monitoring of the renal function becomes required during treatment^{15; 16}. This makes inadequate doses the most significant obstacle in the exact definition of the clinical role of rapamycin, and probably in expanding its activity. Therefore, when high doses are administered rapamycin is essential to identify effective drug carrier that can prevent or counteract the side effects of rapamycin¹⁵. One of them is the fructose-1,6-bisphosphate (FBP), a sugar which has mechanisms that promote renal protection¹⁷.

Previous studies reported the antioxidant and anti-inflammatory therapeutic properties plus a nephroprotecting effect in animal models of FBP. Knowing that the process of carcinogenesis involves inflammatory mediators such as cytokines, chemokines, reactive oxygen species, we believe that the FBP can be helpful in maintaining the therapeutic effect of rapamycin and inhibition of adverse effects. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of rapamycin alone and in combination with fructose-1,6-bisphosphate on cell death and proliferation, inflammation and oxidative stress parameters in liver carcinoma cells (HepG2).

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Human hepatocarcinoma cell line (HepG2) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The medium used for the culture of cells was Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with fetal bovine serum (FBS 10%) under a humidified atmosphere containing 5% CO₂. HepG2 cells after being cultured and present approximately 70% confluence were detached from culture bottles and transferred to 96-well culture plates at a uniform cell density.

Treatment with rapamycin and fructose-1,6-bisphosphate

The plates were incubated at 37 ° C in a humidified incubator with 5% CO₂ at 72 hours treatment time with rapamycin (Wyeth Pharmaceuticals Co., USA), tested in different concentrations of 10, 20, 30, 40 and 50 nM^{18; 19} and fructose 1,6 bisphosphate (Sigma Chemical Co., USA) at doses of 5 and 10 mM, and in the DMEM medium in order to perform a curve correlating doses cell growth and proliferation. The FBP concentrations were in agreement with experiments performed in our laboratory on HepG2 cells and rapamycin on impact articles.

Evaluation of cellular proliferation

The assessment of the viability and cellular growth/proliferation was performed by cell counting in a Neubauer chamber. The experiments were performed in triplicate and repeated three times. After this evaluation the rapamycin doses of 10 nM and 10 mM FBP were selected.

Measurement of lactate dehydrogenase (LDH)

Cytotoxicity was assessed by the presence of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) in the supernatant of cell cultures using the UV kinetic method (Lactate-Pyruvate) using Labtest Diagnostic Kit SA.

The test LDH (lactate dehydrogenase) is a marker of membrane integrity. The enzyme lactate dehydrogenase is present throughout the cell cytoplasm, and when the membrane is damaged there is released to the external environment. The LDH allows to analyze the number of total inviable (dead) cells²⁰.

Quantification of cytokines

To determine the production of cytokines, the treated HepG2 cells were incubated for 72 hours, supernatants were collected and stored at -20 ° C for later analysis. Pro and anti-inflammatory cytokines were simultaneously measured by flow cytometry using Human Inflammatory Cytokine Kit - BD Biosciences.

Evaluation of Apoptosis, Senescence and Autophagy

HepG2 cells were treated in 24-well plates for a preview of apoptosis, senescence and autophagy. Apoptosis and senescence were evaluated by DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole), a fluorescent staining that binds strongly to regions rich in adenine and thymine in DNA sequences²¹. The evaluation of autophagy was by Acridine Orange (AO), a vital acidotropic fluorescent dye²². The results were visualized by fluorescent inverted microscope and the apoptotic and senescent nuclei were quantified using Image-Pro Plus software.

Evaluation of Oxidative Stress

Oxidative stress of liver carcinoma cells was measured by the method of thiobarbituric acid (TBARS) by fluorimetry.

Statistical Analysis

The results were presented using descriptive statistics (mean and standard deviation). For the comparison of means between groups analysis of variance (ANOVA) and post hoc Tukey Test for multiple comparisons were used. In the presence of asymmetry was used the corresponding nonparametric. The level of significance will be $p < 0.05$ with a 95% confidence interval and the data were analyzed by the SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows, version 15.0. (SPSS Inc. Ohio, USA).

RESULTS

The evaluation of cell proliferation of rapamycin (R) at concentrations of 10, 20, 30, 40 and 50 nM, FBP 5 and 10 mM and the association of the two substances was performed. In figure 1, it is observed that rapamycin (R) causes a significant decrease in concentrations of 40 and 50 nM and the FBP causes a reduction of cell growth at concentrations of 5 and 10 mM. In figure 2, it is evident that the association with FBP 10 mM makes effective the subtherapeutic doses of 10, 20 and 30 nM of rapamycin (R). Already in combination with 5 nM of FBP, rapamycin (R) did not decrease cell proliferation in any of the concentrations. For this reason, the doses of 10 mM FBP and 10 nM rapamycin (R) were selected for the following experiments.

The integrity of the membrane of HepG2 cells treated with rapamycin (R) and FBP, isolated and in combination, was evaluated through the measurement of LDH in the cell culture supernatant. There was a decrease in the percentage of LDH released when we join rapamycin (R) and FBP, demonstrating that there is a significant decrease in cell death associated with necrosis in this group in comparison to the others. For other parameters differences were not seen in relation to the control group (Figure 3).

Inflammation and cancer are associated, for this reason we evaluated the pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. We selected the Tumor necrosis factor alpha, TNF- α (Figure 4A) and the Interleukin 10, IL-10 (Figure 4B). The ratio between the cytokines was also done (Figure 4C). Was not observe changes of cytokines in relation to the control, and the ratio gave the balance between pro- and anti-inflammatory.

To see if the decreased of cellular proliferation was by apoptosis or senescence, DAPI staining was used. The figure 5A presents a picture of normal nuclei, in 5B, the apoptotic nuclei can be visualized and in figure 5C the senescent nuclei are represented. In the analyses of normal nuclei, rapamycin (R) and FBP had a significantly decreased (Figure 5D), while in figure E is demonstrated a significant increase of apoptotic nuclei percentage in the association of rapamycin (R) and FBP. In senescent nuclei analyses, rapamycin(R) and FBP isolated increased significantly in relation to the association group and the control group.

The autophagy, another cellular death mechanism that involves cell degradation of unnecessary or dysfunctional components²³, was analyzed in HepG2 cells through the use of Acridine Orange dye. No significant differences were found between the studies groups (Figure 6A, 6B, 6C and 6D).

The oxidative stress can provoke cellular damage, for this reason, we analyzed Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)²⁴. Our results showed an antioxidant effect of FBP, but in association to rapamycin (R), provoke a significant increase in the release of free radicals in relation to the other groups (Figure 7).

DISCUSSION

The HCC is closely linked with chronic inflammation. This association involves the time factor, the longer the inflammation persists, the greater is risk of developing cancer²⁵.

Rapamycin, a known immunosuppressant used in kidney transplant patients, also acts by inhibiting the complex of the mammalian target of rapamycin, mTOR. Also known as FKBP12-rapamycin associated protein (FRAP), mTOR is a serine/threonine protein kinase that promotes cell proliferation and differentiation²⁶, therefore, rapamycin is currently being used to treat certain types of cancer²⁷. However, its use is limited due to its toxicity and resistance to prolonged use that cause adverse events, mainly nephrotoxicity²⁸. For this reason, the association with other substances in order to avoid adverse events becomes essential. The FBP, a sugar belonging to glycolytic cellular route that has some therapeutic effects in inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis and septicemia²⁹, was chosen for the combination with rapamycin

Our first results showed that rapamycin and FBP singly decreases the proliferation of HepG2 cells, however when they were used in combination, rapamycin was effective at lower doses, suggesting a decrease in therapeutic dosage. This effect may have been caused by necrosis (cytotoxicity), apoptosis, autophagy, or senescence. For this, first, with the intention of proving that this association has no cytotoxicity, we done the measure of LDH that did not demonstrated correlation between the stop in cell proliferation and death due to necrosis. Also, we saw a significant increase in the preservation of cell membrane when we compared control and isolated drugs groups. These results demonstrate that the combination of substances decreased the cellular toxicity of rapamycin.

Inflammatory mediators, such as cytokines, free radicals, and growth factors prostalandinas can induce changes in cellular homeostasis, leading to the development and progression of cancer. Several inflammatory mechanisms are involved in cancer. One of the most important is the genomic instability caused by inflammation. The activation of leukocytes, especially macrophages and granulocytes, leads to the synthesis of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNS) that can cause damage to DNA, proteins and lipids, which may cause

mutations in the cells. The free radical damage can be caused by a proinflammatory enzyme, cyclooxygenase 2 (COX-2), which leads to production of high levels of peroxides within the cells. Therefore, therapies that reduce inflammation prior to immunization can increase the efficacy of immunotherapy^{30; 31}.

In the last two decades, emerged evidence that the molecular level of most chronic diseases, including cancer, are caused by a dysregulated inflammatory response. The Tumor necrosis factor α (TNF- α) exerts regulatory role, by stimulating the biosynthesis of growth factors. It is directly cytotoxic to endothelial cells and can induce the biosynthesis of collagenases, proteases, reactive oxygen intermediates and arachidonic acid metabolites. In other hand, interleukins with multifaceted anti-inflammatory properties, like interleukin-10 (IL-10), including inhibition of the prototypic inflammatory transcription factor nuclear factor kappa B, leading to suppressed cytokine production, reduction of tissue factor expression, inhibition of apoptosis of macrophages and monocytes after infection³².

To check if the decreased of cellular proliferation is occurring by the inflammatory rote, we analyzed pro-inflammatory cytokines TNF- α and anti-inflammatory IL-10, besides the ratio there between. None of parameters show changes in relation to the control and the ratio demonstrated the inflammatory balance between cytokines.

Apoptosis, a programmed cell death, is decreased in cancer cells. Many therapies try to increase apoptosis of these in order to reduce their proliferation¹⁸. Another way of cell death that is also reduced in cancer is senesce. Senescence is the aging of the cell that occurs when they stop dividing to replace other cells that, for some reason, failed to metabolize. On the other hand, cancer cells have an enzyme called telomerase that regenerates telomeres of the cell, allowing it to multiply indefinitely³³.

It then emerged, through the use of the fluorescent staining DAPI and quantification of the images generated by fluorescent inverted microscope, which did increase significantly the apoptosis in the association of rapamycin and FBP doses. Also, there was a significant increase in senescence of nuclei in the rapamycin and FBP isolated compared to the control group. By comparing the results of cell proliferation of the isolated drugs is concluded that, in spite of being a potential

anticancer factor, senescence did not seem to influence the decrease in cell proliferation.

The autophagy, a mechanism that may protect against cancer by isolating damaged organelles, allowing cell differentiation, increasing and promoting cell death of cancerous cells²³, was analyzed through the use of Acridine Orange staining. No difference was seen in autophagy between and the control and the treated groups.

The cytoperoxidation is a cell membrane damage caused by free radicals. This toxic effect can be assessed by the formation of Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), especially malondialdehyde (MDA)²⁴. Our results showed that, while FBP singly decreases the cytoperoxidation, the combination of the two drugs cause a significant injury provoked by free radicals, suggesting that this phenomenon might be the cause of cell death by apoptosis.

This study promotes for the first time the combination of these two drugs and addresses the importance of trying the combination of substances such as FBP, with other drugs commonly used to treat cancer such as rapamycin to a more effective result and the promotion of quality of life for patients in treatment.

CONCLUSION

From this study it is concluded that the concomitant use of rapamycin and FBP could be a promising treatment for patients with hepatocellular carcinoma, because the combination of rapamycin with fructose significantly reduces cell proliferation and most importantly, brings to reality the possibility of achieving the goal of making an effective subtherapeutic dose, minimizing the serious known reactions to drugs used in cancer therapy today by the increased of free radicals and apoptosis when the association is used.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- 1 ORGANIZATION, W. H. The top 10 causes of death. Geneva - Switzerland (2012). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>. Accessed 14 april 2015.
- 2 Gonzalez SA (2014). Novel biomarkers for hepatocellular carcinoma surveillance: has the future arrived? *Hepatobiliary Surg Nutr.* 6:410-4. doi: 10.3978/j.issn.2304-3881.2014.07.06.
- 3 Baird A, Lee J, Podvin S et al (2014). Esophageal cancer-related gene 4 at the interface of injury, inflammation, infection, and malignancy. *Gastrointest Cancer* 4:131-142.
- 4 Capece D, Fischietti M, Versela D et al (2013). The Inflammatory Microenvironment in Hepatocellular Carcinoma: A Pivotal Role for Tumor-Associated Macrophages. *Biomed Res Int.* 2013:187204. doi: 10.1155/2013/187204.
- 5 Bharadwaj S, Gohel TD (2015). Perspectives of physicians regarding screening patients at risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. pii: gou089.
- 6 Salhab M, Canelo R (2011). An overview of evidence-based management of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Cancer Res Ther* 4:463-75. doi: 10.4103/0973-1482.92023.
- 7 Almeida J R C D (2004). *Farmacêuticos em Oncologia: uma nova realidade.* São Paulo, pp 358.
- 8 Wang Z, Zhou J, Fan J et al (2009). Sirolimus inhibits the growth and metastatic progression of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 5:715-22. doi: 10.1007/s00432-008-0506-z.
- 9 Wang Z, Zhou J, Fan J et al (2008). Effect of rapamycin alone and in combination with sorafenib in an orthotopic model of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 16:5124-30. doi: 10.1158/1078-0432.
- 10 Wang C, Gao D, Guo K et al (2012). Novel synergistic antitumor effects of rapamycin with bortezomib on hepatocellular carcinoma cells and orthotopic tumor model. *BMC Cancer* 12:166. doi: 10.1186/1471-2407-12-166.
- 11 Wang Y, Speeg KV, Washburn WK, Halff G (2010). Sirolimus plus sorafenib in treating HCC recurrence after liver transplantation: a case report. *World J Gastroenterol* 43:5518-22.
- 12 U.S. Food and Drug Administration. 203985 Everolimus Clinpharm BPCA/22088 Temsirolimus Clinpharm BPCA. <http://www.fda.gov/Drugs/default.htmhtml>. Accessed 14 april 2015.
- 13 Porta C, Paglino C, Mosca A (2014). Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol* 4:64. doi: 10.3389/fonc.2014.00064.

- 14 Sahin F, Kannangai R, Adegbola O, Wang J, Su G, Torbenson M (2004). mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms. *Clin Cancer Res.* 24:8421-5.
- 15 Cuconati A, Mills C, Goddard C et al (2013). Suppression of AKT anti-apoptotic signaling by a novel drug candidate results in growth arrest and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One.* 1:e54595. doi: 10.1371/journal.pone.0054595.
- 16 Cendales L, Bray R, Gebel H et al (2015). Tacrolimus to Belatacept Conversion Following Hand Transplantation: A Case Report. Mar 13. doi: 10.1111/ajt.13217.
- 17 Seok SM, Park TY, Park HS, Baik EJ, Lee SH (2015). Fructose-1,6-bisphosphate suppresses lipopolysaccharide-induced expression of ICAM-1 through modulation of toll-like receptor-4 signaling in brain endothelial cells. *Int Immunopharmacol.* 1:203-211. doi: 10.1016/j.intimp.2015.03.029.
- 18 Zhang JF, Liu JJ, Lu MQ, Cai CJ, Yang Y, Li H, Xu C, Chen GH (2007). Rapamycin inhibits cell growth by induction of apoptosis on hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Transpl Immunol.* Apr;17(3):162-8.
- 19 Dai ZJ, Gao J, Ma XB et al (2012). Antitumor effects of rapamycin in pancreatic cancer cells by inducing apoptosis and autophagy. *Int J Mol Sci.* 1:273-85. doi: 10.3390/ijms14010273.
- 20 Philipp AB, Nagel D, Stieber P et al (2014). Circulating cell-free methylated DNA and lactate dehydrogenase release in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 14:245. doi: 10.1186/1471-2407-14-245.
- 21 Kim TM, Shin SK, Kim TW, Youm SY, Kim DJ, Ahn B (2012). Elm tree bark extract inhibits HepG2 hepatic cancer cell growth via pro-apoptotic activity. *J Vet Sci.* 1:7-13.
- 22 Eduardo C. F. Chiela. Protocol for measuring autophagy. <http://www.ufrgs.br/labsinal/autofagia.htm>. Accessed: 22 april 2015.
- 23 Nepal S, Park PH (2014). Regulatory role of autophagy in globular adiponection-induced apoptosis in cancer cells. *Biomol Ther (Seoul).* 5:384-9. doi: 10.4062/biomolther.2014.021.
- 24 Carlos SP, Dias AS, Forgiarini Junior LA, et al (2014). Oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in mice: impact on lung tissue and diaphragm muscle. *J Bras Pneumol.* 4:411-20.
- 25 Rutkowski MR, Conejo-Garcia JR (2015). Size does not matter: commensal microorganisms forge tumor-promoting inflammation and anti-tumor immunity. *Oncoscience.* 3:239-46.
- 26 Asnaghi L, Bruno P, Priulla M, Nicolin A (2004). mTOR: a protein kinase switching between life and death. *Pharmacol Res.* 6:545-9.
- 27 McGranahan N, Favero F, de Bruin EC, Birkbak NJ, Szallasi Z, Swanton C (2015). Clonal status of actionable driver events and the timing of mutational

- processes in cancer evolution. *Sci Transl Med.* 283:283ra54. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa1408.
- 28 Fervenza FC, Fitzpatrick PM, Mertz J, et al (2004). Acute rapamycin nephrotoxicity in native kidneys of patients with chronic glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplant.* 5:1288-92.
- 29 Azambuja AA, Lunardelli A, Nunes FB et al (2011). Effect of fructose-1,6-biphosphate on nephrotoxicity induced by cisplatin in rats. *Inflammation.* 1:67-71. doi: 10.1007/s10753-010-9212-5.
- 30 Seelaender M, Neto JC, Pimentel GD, Goldszmid RS, Lira FS (2015). Inflammation in the disease: mechanism and therapies 2014. *Mediators Inflamm.* 2015:169852. doi: 10.1155/2015/169852.
- 31 Raza H, John A, Benedict S (2011). Acetylsalicylic acid-induced oxidative stress, cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial dysfunction in human hepatoma HepG2 cells. *Eur J Pharmacol.* 1-2:15-24. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.06.016.
- 32 Goswami B, Rajappa M, Mallika V, Shukla DK, Kumar S (2009). TNF-alpha/IL-10 ratio and C-reactive protein as markers of the inflammatory response in CAD-prone North Indian patients with acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta.* 1-2:14-8.
- 33 Raouf S, Weston C, Yucel N (2015). Registered report: senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Elife* 26;4. doi: 10.7554/eLife.04105.

FIGURES

Figure 1:

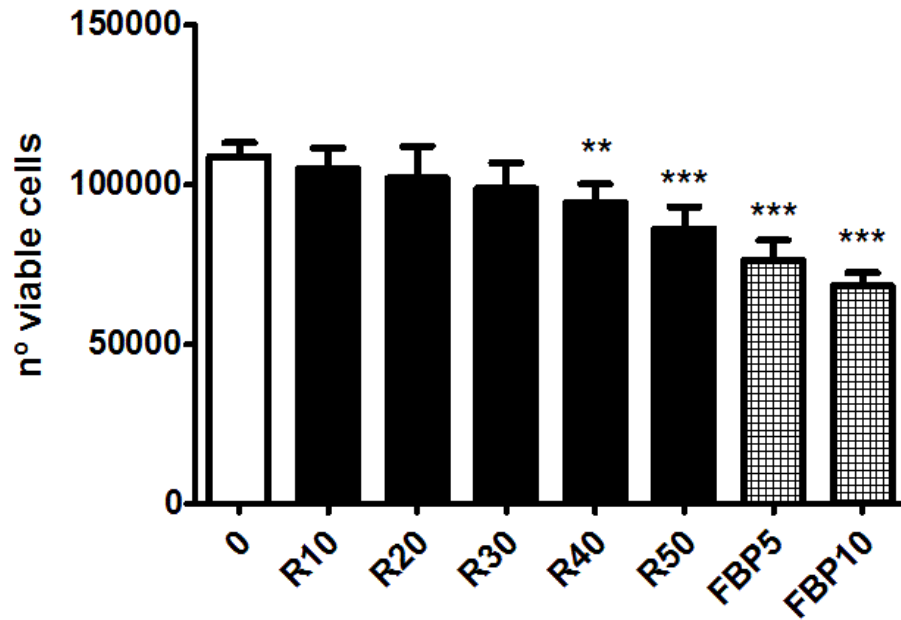


Figure 2:

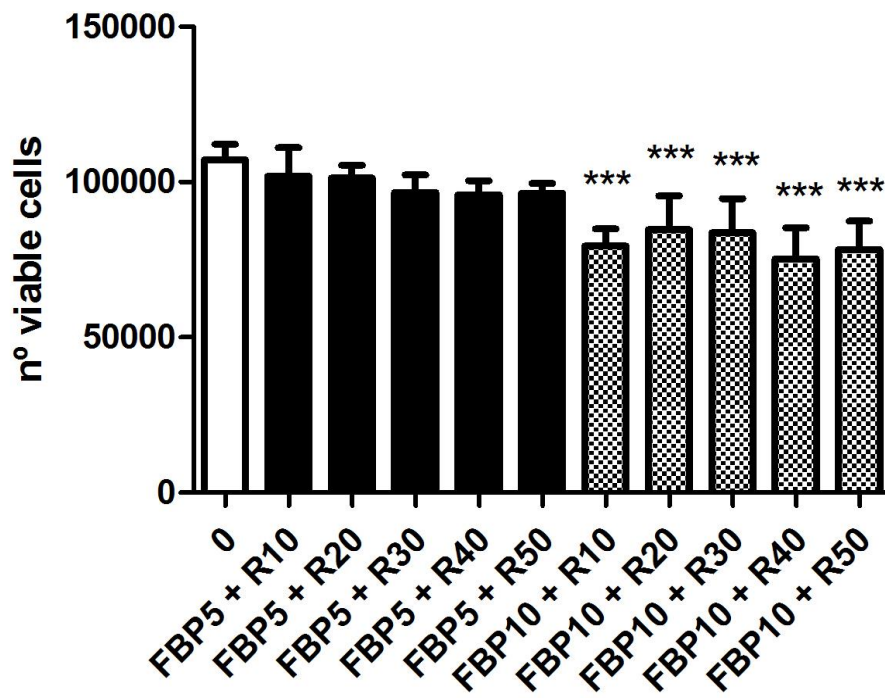


Figure 3:

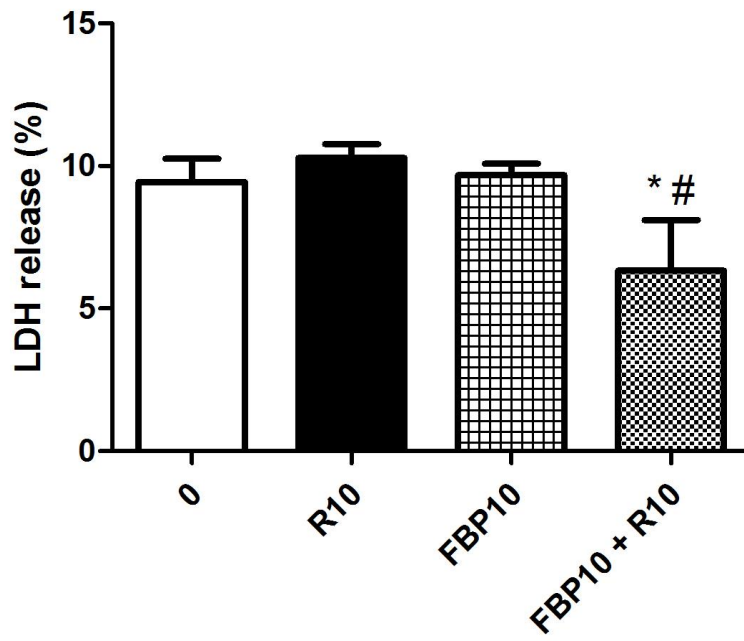
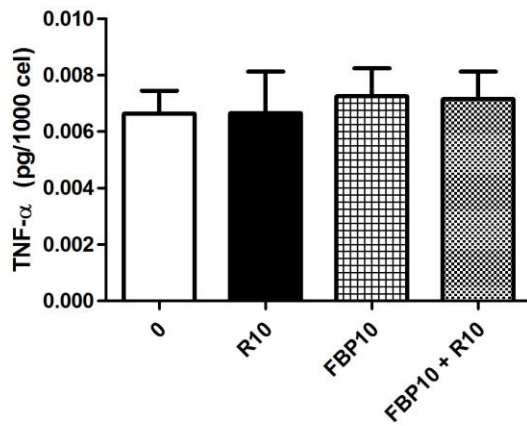
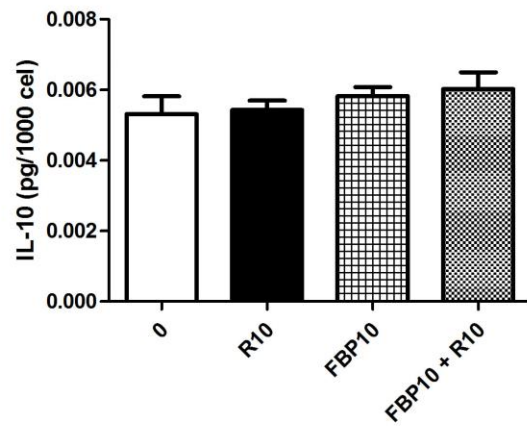


Figure 4:

A



B



C

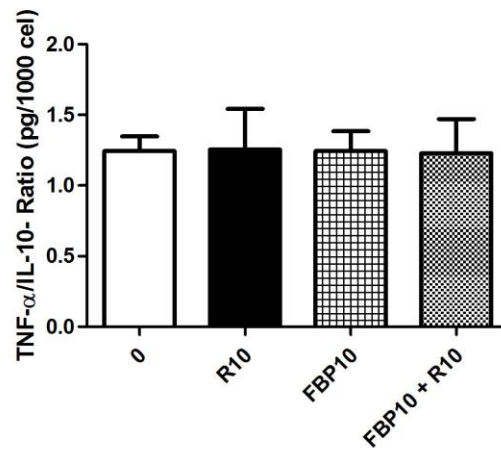
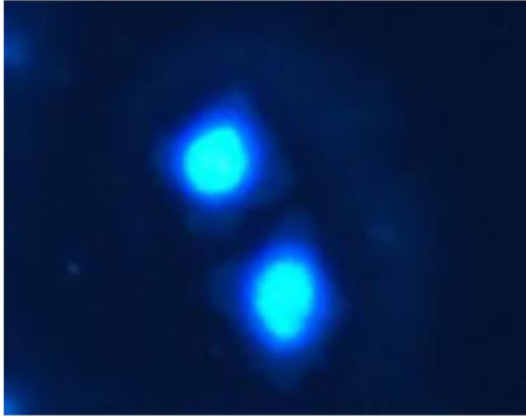
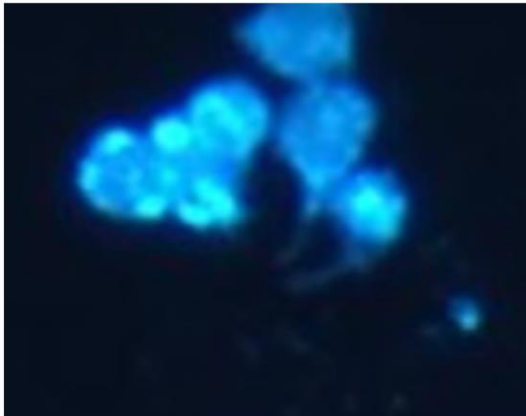


Figure 5:

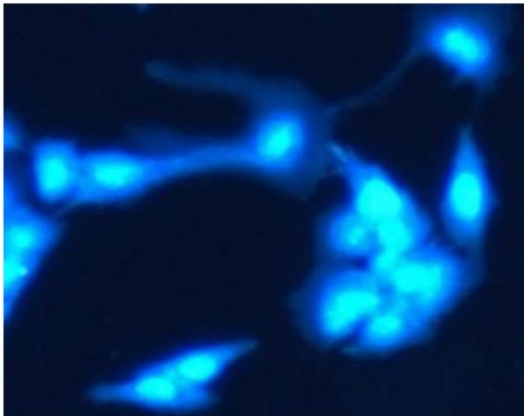
A



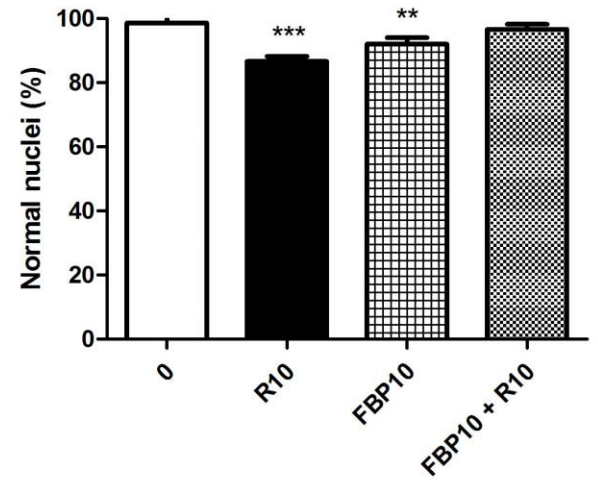
B



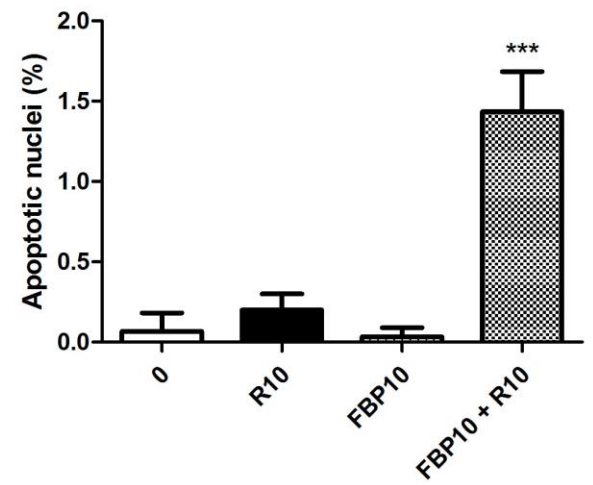
C



D



E



F

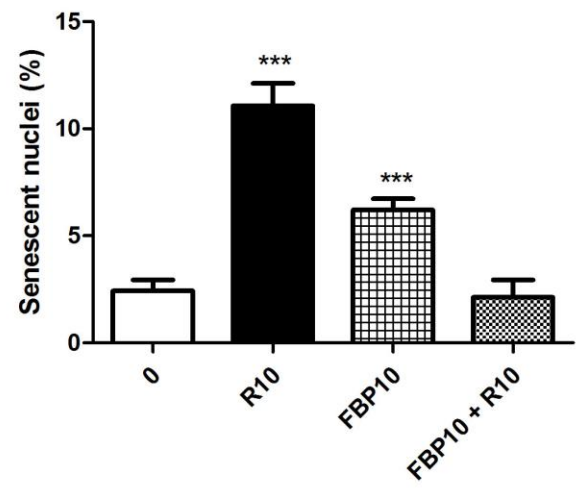


Figure 6:

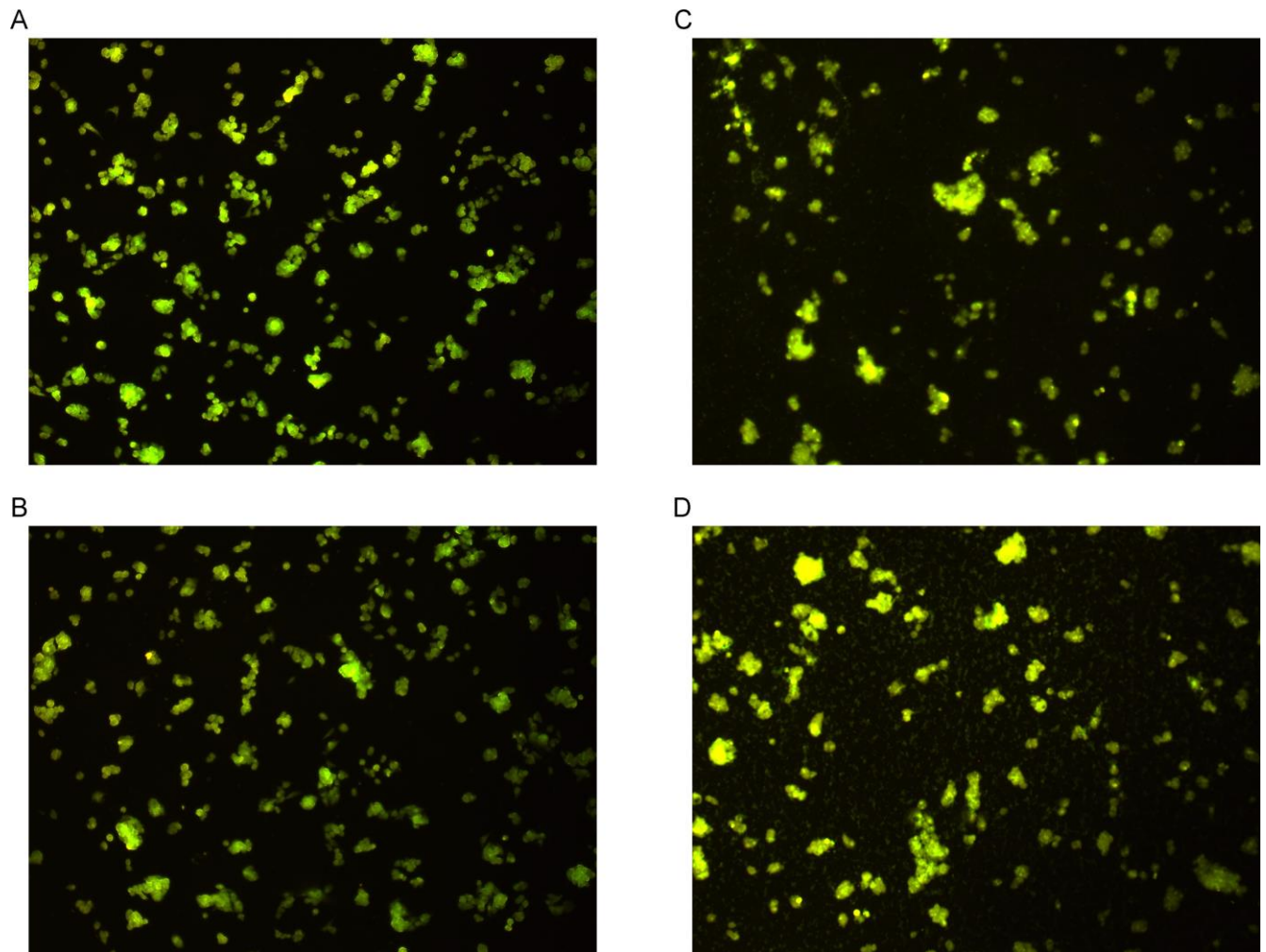


Figure 7:

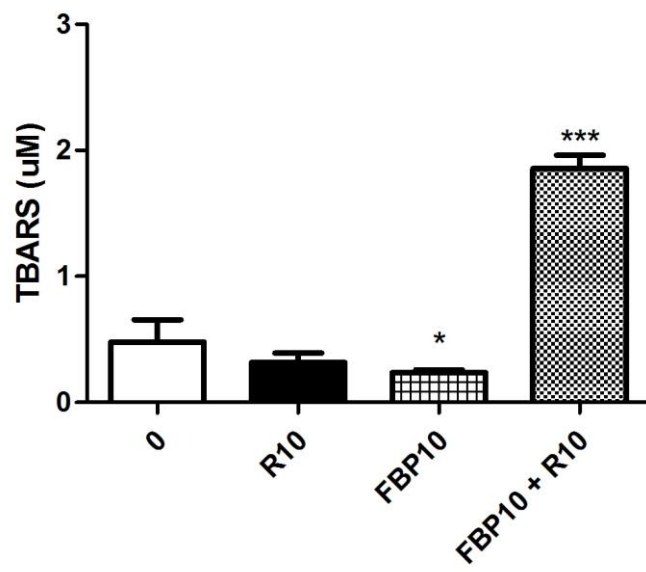


FIGURE LEGENDS

Fig. 1. The isolated effect of rapamycin (R) and fructose-1,6-bisphosphate (FBP) on HepG2 cells proliferation. Cells were treated with R (10-50nM) and FBP (5 and 10mM) for 72 h and cell viability assessed by direct cell count. Data represent the mean \pm SD. Results were expressed as cell number. (** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs control).

Fig. 2. The association effect of rapamycin (R) and fructose-1,6-bisphosphate (FBP) on HepG2 cells proliferation. Cells were treated with the combination of R (10-50nM) and FBP (5 and 10mM) for 72 h and cell viability assessed by direct cell count. Data represent the mean \pm SD. Results were expressed as cell number. (*** $p < 0,001$ vs control).

Fig. 3. Percent of release of lactate dehydrogenase of HepG2 cells after treatment with rapamycin (R) 10nM, fructose-1,6-bisphosphate (FBP) 10mM and rapamycin (R) + fructose-1,6-bisphosphate (FBP) 10mM. Results are expressed as mean data represent the mean \pm SD. Results of the association were * $p < 0,05$ vs control and # $p < 0,05$ vs R and FBP.

Fig. 4. Flow cytometric analyses of TNF α (A), IL-10 (B) and TNF α /IL-10- Ratio in cell supernatant (C) of HepG2 cells after 72h of treatment with rapamycin (R) 10nM, fructose-1,6-bisphosphate (FBP) 10mM and rapamycin (R) + fructose-1,6-bisphosphate (FBP) 10mM. Data represented the mean \pm SD. Cytokines levels were expressed as picograms per 1000 cells.

Fig. 5. Effects of rapamycin (R) 10nM, fructose-1,6-bisphosphate (FBP) 10mM and rapamycin (R) + fructose-1,6-bisphosphate (FBP) 10mM in HepG2 cell nuclei were visualized through images obtained by fluorescent inverted microscope. The figure A

presents normal nuclei, B apoptotic nuclei and C senescent nuclei. Figure D: Percent of normal nuclei. Results are expressed as mean data represent the mean \pm SD. Results were expressed as cell number. (** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs control). Figure E: Percent of apoptotic nuclei. Results are expressed as mean data represent the mean \pm SD. Results were expressed as cell number. (*** $p < 0,001$ vs control). Figure F: Percent of senescent nuclei. Results are expressed as mean data represent the mean \pm SD. Results were expressed as cell number. (*** $p < 0,001$ vs control).

Fig. 6. Effect of rapamycin (R) 10nM, fructose-1,6-bisphosphate (FBP) 10mM and rapamycin (R) + fructose-1,6-bisphosphate (FBP) 10mM on the autophagy of HepG2 cells. Images were obtained by fluorescent inverted microscope. Control (A), R (B), FBP (C) and R+FBP (D).

Fig. 7. Effect of rapamycin (R) 10nM, fructose-1,6-bisphosphate (FBP) 10mM and rapamycin (R) + fructose-1,6-bisphosphate (FBP) 10mM on oxidative stress measured by TBARS. Data represent as mean \pm SD (* $p < 0.05$ and *** $p < 0,001$ vs control).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a diminuição da proliferação em células HepG2 demonstrada no uso de subdoses da rapamicina em combinação com a FBP, sugere-se uma diminuição na dosagem terapêutica. Esta associação não apresentou citotoxicidade e a parada na proliferação não teve correlação com a morte celular por necrose. Além disso, observamos um aumento significativo na preservação da membrana celular quando comparamos o grupo controle aos grupos das drogas isoladas. Estes resultados demonstram que a combinação de rapamicina e FBP diminuiu a toxicidade celular de rapamicina.

Os mediadores inflamatórios tais como as citocinas, radicais livres, e fatores de crescimento prostaglandinas podem induzir alterações na homeostase celular, conduzindo ao desenvolvimento e progressão do câncer^{8; 9}. Por isto também analisamos a rota inflamatória através da citocina pró-inflamatórias TNF- α e a anti-inflamatória IL-10, além da razão entre as mesmas, verificamos que não há influencia destas citocinas no decréscimo da proliferação celular.

A apoptose, uma morte celular programada, é diminuída em células cancerosas. Muitas terapias tentam aumentar a apoptose destes, a fim de reduzir a sua proliferação³². Outra forma de morte celular que também é reduzida em câncer é a senescência. A senescência é o envelhecimento da célula que ocorre quando elas param de se dividir para substituir outras células que, por algum motivo, não conseguiram metabolizar. Por outro lado, as células cancerígenas têm uma enzima telomerase que regenera os telômeros da célula, permitindo-lhe multiplicar indefinidamente³³.

Verificou-se então, por meio da utilização de coloração fluorescente DAPI, que a apoptose aumentou significativamente na associação de rapamicina e FBP. Além disso, houve um aumento significativo da senescência dos núcleos em FBP a rapamicina e isolado em comparação com o grupo de controle. Ao verificar os resultados da proliferação celular das substâncias isolados conclui-se que, apesar de ser um fator potencial anticancerígeno, a senescência não pareceu influenciar na diminuição da proliferação de células.

A autofagia, um mecanismo de morte da célula que pode ser protetor contra o câncer³⁴, foi analisada através da utilização de coloração com Laranja de Acridina. Não foi visualizada diferença significativa entre os tratamentos e o grupo controle.

A citoperoxidação é um dano da membrana celular causada por radicais livres. Este efeito tóxico pode ser avaliado através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), especialmente o malondialdeído (MDA)³⁴. Os nossos resultados mostraram que, ao passo que a FBP isoladamente diminui a citoperoxidação, a combinação das duas drogas causou uma lesão significativa provocada por radicais livres, o que sugere que este fenómeno pode ser a causa de morte celular por apoptose.

Este estudo promove pela primeira vez, a combinação das duas drogas que demonstra a importância da tentativa de combinação de substâncias, tais como FBP, com outros medicamentos comumente utilizados no tratamento de câncer, tais como a rapamicina, para obtenção de um resultado mais eficaz e de uma melhora da qualidade de vida para pacientes em tratamento.

REFERÊNCIAS

- 1 INCA. Câncer de Fígado. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/figado> >. Acesso em: 14/01/2015.
- 2 ORGANIZATION, W. H. The top 10 causes of death. Genebra - Suíça, 2012. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html> >. Acesso em: 14/01/2015.
- 3 Gonzalez SA. Novel biomarkers for hepatocellular carcinoma surveillance: has the future arrived? *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2014 Dec;3(6):410-4.
- 4 Bharadwaj S, Gohel TD. Perspectives of physicians regarding screening patients at risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Rep (Oxf).* 2015 Jan 5.
- 5 Salhab M, Canelo R. An overview of evidence-based management of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Cancer Res Ther*, v. 7, n. 4, p. 463-75, 2011 Oct-Dec 2011. ISSN 1998-4138.
- 6 Tyakht AV et al. RNA-Seq gene expression profiling of HepG2 cells: the influence of experimental factors and comparison with liver tissue. *BMC Genomics.* 2014 Dec 15;15(1):1108.
- 7 (ATCC), A. T. C. C. Product Information Sheet for ATCC HB-8065. Manassas -USA 2012.
- 8 Baird A et al. Esophageal cancer-related gene 4 at the interface of injury, inflammation, infection, and malignancy. *Gastrointest Cancer.* 2014;2014(4):131-142.
- 9 Raza H, John A, Benedict S. Acetylsalicylic acid-induced oxidative stress, cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial dysfunction in human hepatoma HepG2 cells. *Eur J Pharmacol*, v. 668, n. 1-2, p. 15-24, Oct 2011.
- 10 Shi L, Feng Y, Lin H, Ma R, Cai X. Role of estrogen in hepatocellular carcinoma: is inflammation the key? *J Transl Med.* 2014 Apr 8;12:93.
- 11 ALMEIDA, J. R. C. D. *Farmacêuticos em Oncologia: uma nova realidade.* 1. São Paulo: 2004. 358
- 12 Contractor N et al. Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGFbeta, and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype. *J Immunol*, v. 179, n. 5, p. 2690-4, Sep 2007.
- 13 Fan He et al. Antitumor effects of dammarane-type saponins from steamed *Notoginseng*. *Pharmacogn Mag.* 2014 Jul-Sep; 10(39): 314–317.

- 14 Cao J, Yang X, Li WT, Zhao CL, Lv SJ. Silencing of COX-2 by RNAi Modulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells Partially Dependent on the PGE2 Cascade. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(22):9967-72.
- 15 Wang, Z. et al. Sirolimus inhibits the growth and metastatic progression of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, v. 135, n. 5, p. 715-22, May 2009. ISSN 1432-1335.
- 16 Wang, Z. et al. Effect of rapamycin alone and in combination with sorafenib in an orthotopic model of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, v. 14, n. 16, p. 5124-30, Aug 2008. ISSN 1078-0432.
- 17 WANG, C. et al. Novel synergistic antitumor effects of rapamycin with bortezomib on hepatocellular carcinoma cells and orthotopic tumor model. *BMC Cancer*, v. 12, p. 166, 2012. ISSN 1471-2407.
- 18 WANG, Y. et al. Sirolimus plus sorafenib in treating HCC recurrence after liver transplantation: a case report. *World J Gastroenterol*, v. 16, n. 43, p. 5518-22, Nov 2010. ISSN 2219-2840.
- 19 U.S. Food and Drug Administration. 203985 Everolimus Clinpharm BPCA/22088 Temsirolimus Clinpharm BPCA. Disponível em: < <http://www.fda.gov/Drugs/default.htmhtml>>. Acesso: 14/01/2015.
- 20 Yubao W et al. Sirolimus plus sorafenib in treating HCC recurrence after liver transplantation: A case report. *World J Gastroenterol*. Nov 21, 2010; 16(43): 5518–5522.
- 21 mTOR and rapamycin in the kidney: signaling and therapeutic implications beyond immunosuppression. Disponível em: < <http://www.bioss.uni-freiburg.de/cms/1245.html> >. Acesso em: 14/01/2015.
- 22 Kirtley ME, McKay M. Fructose-1,6-bisphosphate, a regulator of metabolism. *Mol Cell Biochem.* 1977 Dec 29;18(2-3):141-9.
- 23 Calafell R, Boada J et al. Fructose 1,6-bisphosphate reduced TNF-alpha-induced apoptosis in galactosamine sensitized rat hepatocytes through activation of nitric oxide and cGMP production. *Eur J Pharmacol.* 2009 May 21;610(1-3):128-33.
- 24 De Oliveira JR, Rosa JL, Ambrosio S, Bartrons R. Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism: protective role of fructose 1,6-bisphosphate. *Hepatology.* 1992 Jun;15(6):1147-53.
- 25 Nunes FB, Graziottin CM, Alves Filho JC, Lunardelli A, Pires MG, Wachter PH et al. An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol Res.* 2003 Jan;47(1):35-41.
- 26 Gregory GA, Welsh FA, Yu AC, Chan PH. Fructose-1,6-bisphosphate reduces ATP loss from hypoxic astrocytes. *Brain Res.* 1990 May 21;516(2):310-2.

- 27 Hassinen IE, Nuutinen EM, Ito K, Nioka S, Lazzarino G, Giardina B, et al. Mechanism of the effect of exogenous fructose 1,6-bisphosphate on myocardial energy metabolism. *Circulation*. 1991 Feb;83(2):584-93.
- 28 Donohoe PH, Fahlman CS, Bickler PE, Vexler ZS, Gregory GA. Neuroprotection and intracellular Ca²⁺ modulation with fructose-1,6-bisphosphate during in vitro hypoxia-ischemia involves phospholipase C-dependent signaling. *Brain Res*. 2001 Nov 2;917(2):158-66.
- 29 Santos RC, et al. Fructose-1,6-bisphosphate protects against Zymosan-induced acute lung injury in mice. *Inflammation*. 2012 Jun;35(3):1198-203.
- 30 Azambuja AA, et Al. Effect of fructose-1,6-biphosphate on nephrotoxicity induced by cysplatin in rats. *Inflammation*. 2011 Feb;34(1):67-71.
- 31 Sola A, Panes J, Xaus C, Hotter G. Fructose-1,6-biphosphate and nucleoside pool modifications prevent neutrophil accumulation in the reperfused intestine. *J Leukoc Biol*. 2003 Jan;73(1):74-81.
- 32 Zhang JF, Liu JJ, Lu MQ, Cai CJ, Yang Y, Li H, Xu C, Chen GH. Rapamycin inhibits cell growth by induction of apoptosis on hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Transpl Immunol*. 2007 Apr;17(3):162-8.
- 33 Raouf S, Weston C, Yucel N. Registered report: Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Elife*. 2015 Jan 26;4.
- 34 Nepal S, Park PH. Regulatory role of autophagy in globular adiponectin-induced apoptosis in cancer cells. *Biomol Ther (Seoul)*. 2014 Sep;22(5):384-9.

7 ANEXO

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Cell Proliferation*.

Manuscript ID: Cellprol-1735-15

Title: Rapamycin and fructose-1,6-bisphosphate reduce the HEP / HEPG2 cell proliferation via increase of free radicals and apoptosis

da Silva, Elisa
Krause, Gabriele
Haute, Gabriela
Lima, Kelly

Authors: Pedrazza, Leonardo
Mesquita, Fernanda
Velasquez, Anderson
Basso, Bruno
Nunes, Fernanda
Oliveira, Jarbas

Date Submitted: 29-Jan-2015