

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

RENILTON AIRES LIMA

Efeito citotóxico do ibuprofeno e paracetamol sobre uma linhagem de
células de câncer epitelial de ovário *in vitro*

Belo Horizonte
2011

RENILTON AIRES LIMA

Efeito citotóxico do ibuprofeno e paracetamol sobre uma linhagem de células de câncer epitelial de ovário *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher– área de concentração: Patologia Ginecológica e Reprodução da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do Título de Mestre em Saúde da Mulher

Orientador: Professor Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho
Co-orientadora: Professora Dr^a Luciana Maria Silva

Belo Horizonte
2011

É autorizada a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

L732e Lima, Renilton Aires.
Efeito citotóxico do ibuprofeno e paracetamol sobre uma linhagem de células de câncer epitelial de ovário in vitro [manuscrito]. / Renilton Aires Lima. -- Belo Horizonte: 2011.
36f.: il.
Orientador: Agnaldo Lopes da Silva Filho.
Co-Orientadora: Luciana Maria Silva.
Área de concentração: Saúde da Mulher.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Neoplasias Ovarianas/quimioterapia. 2. Sobrevivência Celular. 3. Transportadores de Cassetes de Ligação de ATP. 4. Acetaminofen/toxicidade. 5. Ibuprofeno/toxicidade. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Silva Filho, Agnaldo Lopes da. II. Silva, Luciana Maria. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.
NLM: WP 145

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos...

À Deus pela vida e pelas pessoas maravilhosas que tem colocado em meu caminho,

Ao meu orientador professor Agnaldo Lopes da Silva Filho, pela orientação, apoio e confiança na realização deste trabalho, mas principalmente, pelo privilégio de seu convívio. Seus ensinamentos foram muito além da ciência. Serei eternamente grato pela oportunidade,

À minha co-orientadora professora Luciana Maria Silva, pela valiosa colaboração, incentivo e paciência que muito contribuíram na realização deste trabalho,

A todos do laboratório de biologia celular da Funed, em especial a Flávia, pela ajuda incansável,

À minha querida esposa, Renata, que sempre esteve presente com seu carinho e apoio. Por compreender o tempo de convívio muitas vezes sacrificado para a realização deste trabalho,

Aos meus pais, José e Maristela, por sempre me ensinarem o caminho a seguir,

À minha irmã, Cátia que me ajudou e apoiou nas horas mais difíceis,

E a todos os amigos que torceram por mim.

"O que chamamos de inspiração é a capacidade de reter e ampliar, com um toque próprio e único, um flash ou insight, uma coisinha de nada que atravessa o nosso pensamento e pode fugir. Porém, boa parte dessa inspiração é fruto da nossa capacidade de concentração, de disciplina, de esforço mental e até de teimosia. Precisamos não de um dia bonito de céu azul, mas de uma boa dose de paciência para produzir alguma coisa interessante, para organizar raciocínios, transformar barro em tijolos e tijolos em casas."

(Maria Ester de Freitas)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar se o acetaminofen (paracetamol) e o ibuprofeno em baixas concentrações são capazes de inibir o crescimento de uma linhagem celular de carcinoma epitelial de ovário (CEO) *in vitro* e determinar a expressão gênica dos transportadores ABC nesta linhagem celular. Foi utilizada a linhagem celular TOV 21G exposta a diferentes concentrações de paracetamol (1,5-15 µg/mL) e ibuprofeno (2,0 a 20 µg/mL), durante 24 e 48 horas. O crescimento celular foi avaliado utilizando um ensaio de viabilidade celular. A morfologia celular foi determinada por microscopia de fluorescência. O perfil de expressão gênica foi determinado por um painel de 42 genes da super família de transportadores ABC. Foi observado um decréscimo significativo no crescimento das células TOV 21G expostas a 15 µg/mL de paracetamol durante 24 horas ($p = 0.02$) e 48 horas ($p = 0.01$) e com 20 µg/mL de ibuprofeno por 48 horas ($p = 0.04$). Ao avaliar a morfologia das células cultivadas, não foi observada evidência de apoptose significativa. A linhagem de células estudada subexpressa os genes de ABCA1, ABCC3, ABCC4, ABCD3, ABCD4 e ABCE1 da super família de transportadores ABC. O presente estudo fornece evidências do efeito inibidor do crescimento de concentrações terapêuticas do paracetamol e do ibuprofeno na linhagem celular testada *in vitro*. TOV 21G subexpressa os genes dos transportadores ABCA1, ABCC3, ABCC4, ABCD3, ABCD4 e ABCE1.

Palavras-chave: Acetaminofen, Apoptose; Ibuprofeno; Neoplasia de Ovário; Proliferação Celular; Quimioprofilaxia; Quimioterapia; Transportadores de Cassetes de Ligação de ATP.

ABSTRACT

The purposes of this study was investigated whether low concentrations of acetaminophen (paracetamol) and ibuprofen inhibited the growth of this cell line *in vitro* and determined a basic expression of ABC transporters in an EOC cell line. TOV 21G cells were exposed to different concentrations of paracetamol (1.5 to 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and ibuprofen (2.0 to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 e 48 hours. Cellular growth was assessed using a cell viability assay. Cellular morphology was determined by fluorescence microscopy. The gene expression profile of ABC transporters was determined by assessing a panel of 42 genes of the ABC transporter superfamily. We observed a significant decrease in TOV 21G cell growth after exposure to 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of paracetamol for 24 hours ($p=0.02$) and 48 hours ($p=0.01$) or to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ibuprofen for 48 hours ($p=0.04$). Assessing the morphology of TOV 21G cells did not reveal evidence of extensive apoptosis. TOV 21G cell shad reduced expression of the genes ABCA1, ABCC3, ABCC4, ABCD3, ABCD4 and ABCE1 within the ABC transporter superfamily. The current study provides *in vitro* evidence of growth inhibitory effects of therapeutic concentrations of paracetamol and ibuprofen on TOV 21G cells. Additionally, TOV 21G cells had reduced expression of the ABCA1, ABCC3, ABCC4, ABCD3, ABCD4 and ABCE1 transporters.

Key Words: Acetaminophen, Apoptosis; ATP-binding cassette transporters; Cell proliferation; Chemoprevention; Drug therapy, Ibuprofen; Ovarian neoplasms.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Carcinoma epitelial de ovário	8
1.2 Inflamação e carcinoma epitelial de ovário	10
1.3 Ciclooxygenase e carcinoma epitelial de ovário	11
1.4 Anti-inflamatórios não-esteroidais e carcinoma epitelial de ovário	12
1.5 Ibuprofeno	12
1.6 Paracetamol	13
1.7 Transportadores de cassetes de ligação de ATP	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Cultura celular	16
3.2 Citotoxicidade	16
3.3 Coloração por fluorescência	16
3.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa	17
3.5 Análise estatística	18
4 RESULTADOS	19
4.1 Proliferação celular	19
4.2 Alterações morfológicas	20
4.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa	22
5 DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÕES	27
REFERÊNCIAS	28
ANEXOS	35
Ata da defesa de dissertação de mestrado	35
Folha de aprovação	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma epitelial de ovário

O carcinoma epitelial de ovário (CEO) é o mais letal de todos os tumores ginecológicos, sendo responsável por 140.000 mortes ao ano em todo mundo [1]. Apesar dos avanços na tentativa de detecção precoce, na cirurgia oncológica radical, no desenvolvimento de novas drogas e vias de administração dos quimioterápicos a sobrevida global para pacientes com CEO não mudou nos últimos 50 anos [2, 3]. Entretanto, o risco de se ter câncer de ovário ao longo da vida aumentou de 1 caso para cada 70 mulheres em 1970 para 1 caso a cada 55 mulheres em 1995 [4].

Proposta no início de 1970, a hipótese da ovulação incessante atribui a formação do CEO a erros na replicação do ácido desoxirribonucléico (DNA) consequentes ao dano e reparo contínuos do epitélio de revestimento do ovário durante o ciclo ovulatório [5]. Em 1983 surgiu a hipótese das gonadotrofinas, sugerindo que a exposição excessiva do epitélio de superfície do ovário às gonadotrofinas pode resultar em maior proliferação de células epiteliais e transformação maligna [6]. Uma terceira teoria, a hipótese hormonal, proposta no final dos anos 1990, sugere que influências hormonais, incluindo androgênios e progesterona, têm um impacto importante sobre a proliferação do epitélio de superfície ovariano e, portanto, CEO [7].

O CEO é uma doença heterogênea composta por diferentes tipos de tumores [2]. Com base em características clínicas, patológicas, genéticas e moleculares foi proposto um modelo no qual o CEO pode ser dividido em duas grandes categorias designadas tipo I e II que correspondem a duas vias principais de carcinogênese [8]. Os tumores de tipo II são de alto grau e raramente confinados ao ovário no momento do diagnóstico, sendo responsáveis por 90% das mortes por CEO [2]. Os tumores do tipo I correspondem a 25% dos casos e 10% das mortes por CEO, apresentam crescimento lento e podem atingir grande volume antes de se disseminarem [2].

O prognóstico para pacientes com CEO depende principalmente do estadiamento da doença no momento do diagnóstico e, em menor extensão, da idade do paciente, tipo e grau histológico [9].

A cirurgia citorrredutora primária seguida de quimioterapia é o tratamento padrão nas pacientes com CEO avançado [10]. Dados cumulativos de vários grandes estudos retrospectivos demonstram que a cirurgia citorrredutora ótima antes da quimioterapia está associada a uma melhoria na sobrevida [11]. A intervenção por um oncologista ginecológico experiente é crucial por permitir a obtenção de um estadiamento correto, conseguir citorrredução ótima e orientar as decisões sobre a terapia subsequente [12]. A quimioterapia neoadjuvante é uma alternativa para pacientes com massa tumoral irredutível, metástases à distância ou debilitadas [10, 13].

A quimioterapia para o CEO é geralmente dada como uma infusão intravenosa repetida ao longo de 5 a 8 ciclos [14]. A combinação de platina e paclitaxel é o tratamento estabelecido no cenário de primeira linha, com taxas de 40% a 60% de respostas completas [15, 16]. A quimioterapia intraperitoneal é administrada por infusão do agente quimioterápico diretamente na cavidade peritoneal e mostrou-se útil em pacientes com CEO avançado submetidas à citorrredução ótima [14, 17].

Mesmo após uma resposta completa ao tratamento inicial, 90% das pacientes com citorrredução subótima e 70% das pacientes com citorrredução ótima apresentam recaídas após 18 a 24 meses [11, 18]. As taxas de resposta caem com cada recorrência, como resultado de mecanismos de resistência cruzada aos quimioterápicos, determinando uma sobrevida em 5 anos para as mulheres com CEO de apenas 45% [18, 19].

Tendo em vista o resultado ruim das mulheres com CEO, há um interesse crescente em estudos, que além de identificar os mecanismos subjacentes do crescimento, metástase e desenvolvimento de quimiorresistência no CEO, busquem novas terapias e incorporem qualidade de vida aos seus resultados [11, 17].

Várias formas de tratamento têm sido testadas para melhorar os resultados da terapia primária e evitar as recorrências, como o aumento da intensidade da quimioterapia primária, continuação de terapia primária na forma de uma terapia de consolidação ou manutenção ou, a

adição de novos agentes para o regime padrão [20]. Uma estratégia que tem ganhado atenção nos últimos anos é o uso de terapias biológicas ou não-citotóxicas [21]. Como muitas destas terapias são mais toleráveis do que a terapia padrão, elas têm impacto positivo sobre a qualidade de vida das pacientes [21].

1.2 Inflamação e carcinoma epitelial de ovário

A presença de células e mediadores inflamatórios, remodelação e reparação tecidual, semelhante ao observado no processo inflamatório crônico são características da maioria, se não todos os tumores, mesmo daqueles que não são epidemiologicamente ligados a agentes infecciosos [22, 23].

Embora a inflamação atue como um processo autolimitado e sirva como mecanismo de defesa do hospedeiro, sua resolução inadequada pode associar-se com o câncer [24]. Em 1863, Rudolf Virchow propôs que a inflamação crônica está associada à carcinogênese [24]. A partir de então várias evidências com base em estudos epidemiológicos e moleculares levaram a aceitação de que inflamação e câncer estão ligados [22].

A inflamação contribui para o desenvolvimento do câncer através de diferentes mecanismos, incluindo a indução de instabilidade genômica, alteração em eventos epigenéticos e subsequente expressão gênica inadequada, proliferação aumentada e resistência a apoptose das células iniciadas, indução de angiogênese e remodelação tecidual com consequente promoção de invasão e metástase de células tumorais [24].

O processo de ovulação, juntamente com as etapas de reparo imediatamente após a liberação do óvulo, é marcado pela geração de uma enorme quantidade de citocinas, quimiocinas e enzimas de remodelação da matriz, tais como prostaglandinas, eicosanóides bioativos, ativadores de plasminogênio, collagenases, interleucinas, fatores de necrose tumoral e vários fatores de crescimento, bem como pelo recrutamento de células do sistema imunológico a superfície epitelial, o que implica a ocorrência de ativação global da rede pró-inflamatória [25-27]. Assim, os estímulos inflamatórios subprodutos da ovulação, podem causar danos adicionais à superfície do epitélio ovariano, que já está em estresse por causa da ruptura ovulatória das camadas de células epiteliais [27]. Da mesma forma, os estudos têm

demonstrado que a elevação de estrógenos e andrógenos, como proposto pela hipótese das gonadotrofinas e hormonal, amplifica as respostas imunes através do recrutamento de células pró-inflamatórias e efetores moleculares [27]. Coletivamente, hipóteses atribuindo o CEO à ovulação incessante, a liberação de gonadotrofinas, e as influências hormonais provavelmente não são mutuamente exclusivas e sim dão força para sugerir que as atividades fisiológicas do ovário são acompanhadas por ativação de mediadores inflamatórios, o que pode causar dano genômico para o epitélio da superfície do ovário e produzir diretamente o CEO [27].

Estudos epidemiológicos que tem implicado como fatores de risco, condições associadas à reação inflamatória ovariana tais como a exposição ao asbesto, presença de endometriose e doença inflamatória pélvica dão apoio ao papel da inflamação na origem do CEO [28-30]. Além disso, fatores que inibem a ovulação, incluindo o uso de contraceptivos orais, gravidez e lactação, e condições que podem limitar a transmissão de irritantes locais para o ovário como a ligadura tubária e histerectomia têm sido consistentemente associados com redução do risco do CEO [31]. As associações entre níveis séricos da proteína C reativa aumentados e o risco do CEO, também corroboram a hipótese de que a inflamação pode contribuir para o desenvolvimento do CEO [32, 33].

1.3 Ciclooxygenase e carcinoma epitelial de ovário

As ciclooxigenases (COXs) desempenham um papel fundamental na síntese de mediadores inflamatórios [24]. A ciclooxigenase 1 (COX-1), foi purificada em 1976 e clonada em 1988 [34]. Em 1991, vários laboratórios identificaram o produto de um segundo gene com atividade de ciclooxigenase chamada de ciclooxigenase 2 (COX-2) [34]. Enquanto a COX-1 é constitutivamente expressa na maioria dos tecidos e desempenha um papel em diversas funções fisiológicas, a COX-2 é transitoriamente induzível por estímulos como citocinas, fatores de crescimento, mitógenos, promotores de tumor e hormônios, e atua regulando a inflamação, diferenciação, mitose e angiogênese [35].

O status de expressão das isoformas das COXs no CEO permanece confuso [36]. O aumento da expressão da COX-2 foi significativamente correlacionado com a angiogênese tumoral, com a resistência aos quimioterápicos e com o prognóstico de mulheres com CEO avançado por alguns autores [9, 37-41]. Entretanto, outros autores demonstraram que a expressão da

COX-1 está aumentada no CEO e que regiões focais dentro do tumor com alta expressão de COX-1 apresentaram níveis elevados de proteínas pró-angiogênicas e sugerem que a COX-1 ao invés da COX-2 é a reguladora principal da produção de prostaglandina no CEO [42-44]. Outros autores demonstraram que a COX-1 e COX-2 foram expressas no CEO, sugerindo que as duas isoformas podem contribuir para a progressão maligna [45, 46].

1.4 Anti-inflamatórios não-esteroidais e carcinoma epitelial de ovário

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) atuam inibindo as COXs [47]. Pesquisas que demonstraram que os AINEs podem ser úteis na prevenção e no tratamento do câncer, levaram ao início de uma série de estudos clínicos e experimentais para avaliar a eficácia dos inibidores das COXs na prevenção primária e/ou secundária ou como parte de um esquema na terapia combinada do câncer em diversas localizações [35].

Em consonância com o papel pró-tumoral da inflamação crônica, estudos epidemiológicos evidenciaram que o tratamento com AINEs podem reduzir o risco de desenvolver câncer em várias localizações como: estômago, esôfago, mama, bexiga, pulmão e próstata [48-60]. A aspirina também se mostrou eficaz na prevenção do adenoma colorretal o precursor para a maioria dos cânceres colorretais [61].

Os resultados de vários estudos sobre o uso de AINEs e do paracetamol e a incidência do CEO, são inconclusivos [62]. Vários estudos epidemiológicos encontraram evidência de que os AINEs e o paracetamol podem reduzir a incidência do CEO [62-73]. Entretanto, outros estudos não confirmaram essa relação [74-78]. Essa falta de consistência pode refletir a heterogeneidade entre as populações dos estudos [62].

1.5 Ibuprofeno

O ibuprofeno foi sintetizado pela primeira vez em 1961 como um medicamento seguro e com excepcional tolerabilidade gastrointestinal [79]. Como a maioria dos outros AINEs convencionais, o ibuprofeno inibe de maneira eficaz a COX-1 e a COX-2, na mesma proporção [80]. É classificado como um dos AINEs com menos efeitos colaterais em uso

clínico, sendo raramente associado com reações adversas graves ou com morte por ingestão acidental ou deliberada [81].

Utilizado em condições como febre, dismenorréia, enxaquecas, dor pós-operatória e lesões músculo-esqueléticas e articulares, como espondilite anquilosante, osteoartrite e artrite reumatóide, o ibuprofeno é um dos AINEs mais utilizados no mundo [79, 81]. A dose oral usual em adultos é de 400 a 800 mg por dia para analgesia e até 1600 a 2400 mg por dia para sua ação anti-inflamatória [79].

As propriedades cinéticas do ibuprofeno são, em geral, previsíveis e confiáveis [81]. A concentração plasmática está relacionada às doses utilizadas e há pouca variação deste parâmetro com dosagens repetidas [81]. A concentração sérica máxima após ingestão de doses de 200, 400, 600 e 800 mg é de 8.1, 15.4, 17.1 e 24.2 µg/mL, respectivamente [81].

1.6 Paracetamol

O paracetamol foi sintetizado em 1878 e a partir da década de 1970 tornou-se uma das drogas mais utilizadas no mundo para o tratamento da dor e febre [82]. Ao contrário dos AINEs, o paracetamol é considerado ineficaz em doenças inflamatórias e na dor intensa, não produz danos gastrintestinais ou efeitos indesejáveis cardíacos e renais, e também não apresenta efeito depressor sobre a respiração como opiáceos [82]. O mecanismo de ação do paracetamol permanece desconhecido [82]. A inibição de uma terceira forma de ciclooxigenase, a COX-3, é uma das propostas mais recentes para explicar os efeitos incomuns do paracetamol [82]. Estudos *in vitro* e com animais sugerem que o paracetamol possui propriedades antioxidantes notáveis quando usado em doses terapêuticas [83].

A dose oral de paracetamol para tratamento da dor ou febre em adultos é de 650 a 1000 mg a cada 4 a 6 horas até uma dose máxima diária recomendada de 4 g [82]. Os níveis terapêuticos variam de 10 to 20 µg/mL [84].

1.7 Transportadores de cassetes de ligação de ATP

Grande número de pacientes irá desenvolver resistência às drogas durante o curso do tratamento e deixará de ser sensível a múltiplos fármacos quimioterápicos, que são funcionalmente e estruturalmente independentes, um fenômeno chamado resistência a múltiplas drogas [85]. O desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas é uma etapa crucial na progressão do CEO recorrente [86]. Apesar da presença de múltiplos mecanismos de resistência, um sistema de transporte de drogas dependente de energia conhecido como transportadores de cassetes de ligação de ATP (transportadores ABC), provavelmente é a causa mais eficiente e comum para a resistência adquirida aos quimioterápicos [85].

A superfamília de transportadores ABC contém proteínas da membrana que translocam uma ampla variedade de substratos, incluindo produtos metabólicos, lipídios, esteróides e drogas através das membranas extras e intracelulares [86]. Até o momento, 48 genes subdivididos em sete famílias, de A a G, de transportadores ABC foram identificados no genoma humano [87]. Pelo menos 15 transportadores ABC que conferem resistência a praticamente todo o espectro de drogas contra o câncer foram caracterizados [85].

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a ação citotóxica do paracetamol e do ibuprofeno sobre uma linhagem celular de CEO.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar ensaios de citotoxicidade em uma linhagem celular de CEO;
- Analisar a morfologia celular após exposição ao paracetamol e ao ibuprofeno em uma linhagem celular de CEO;
- Analisar o perfil de expressão gênica de genes da superfamília de transportadores ABC em uma linhagem celular de CEO.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura celular

A linhagem celular de adenocarcinoma ovariano humano TOV 21G foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC # CRL-11730) e propagada de acordo com as suas recomendações. Estas células foram mantidas numa mistura 1: 1 de meio de cultura 199 (Sigma # M2520) e MCDB 131 (sigma # M8537), contendo 10% de soro fetal bovino a 37 ° C numa atmosfera umidificada de 5% de CO₂.

3.2 Citotoxicidade

A viabilidade celular foi determinada utilizando o ensaio colorimétrico de brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,55-difeniltetrazólio (MTT), em que MTT, um substrato amarelo pálido não tóxico, é convertido num produto formazan azul escuro por células vivas. O acúmulo de formazan pode ser medido espectrofotometricamente e é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata. As células foram semeadas em placas de 96 poços a 1×10^5 células/poço e incubadas a 37 ° C durante 24 horas. No dia seguinte, as células foram lavadas com soro fetal bovino e tratadas com paracetamol em concentrações variando entre 1,5 a 15 µg/mL ou ibuprofeno em concentrações que variam de 2,0 a 20 µg/mL. Os poços de controle não continham nenhum fármaco. Após períodos de 24 e 48 horas de incubação, foram adicionados 10 µL de uma solução de MTT a cada poço e as células foram incubadas a 37°C durante 3 horas. As placas foram então centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Solubilizou-se o formazan com 50 µL de dimetilsulfóxido e mediu-se a absorvância a 550 nm. Os resultados das culturas tratadas são expressos como porcentagem de células viáveis em comparação com os controles não tratados.

3.3 Coloração por fluorescência

A morfologia celular foi determinada por coloração com DAPI, MitoTracker Orange e LIVE / DEAD usando fluorescência microscópica (Axiovert 200, Zeiss) após exposição durante 48 horas a concentrações de 1,5, 7,5 e 15 µg/mL de paracetamol ou 2, 10 e 20 µg/mL de ibuprofeno.

As células TOV 21G foram tratadas com paracetamol e ibuprofeno, como descrito anteriormente, fixadas durante 1 hora com paraformaldeído a 4% em soro fetal bovino e depois coradas com solução DAPI durante 5 minutos. DAPI é um marcador fluorescente que se liga fortemente ao DNA. Quando corada com DAPI, o DNA pode ser visualizado com uma fluorescência branco azulada. As células foram avaliadas visualmente para quaisquer características morfológicas de apoptose, tais como retração celular, condensação de cromatina e a formação de corpos apoptóticos. Para marcar as mitocôndrias, as células foram incubadas com o corante MitoTracker Orange em meio pré-aquecido por 60 minutos a 37 ° C Este corante difunde passivamente através da membrana plasmática e acumula em mitocôndrias ativas. As células foram consideradas positivas para MitoTracker Orange se uma fluorescência laranja pontilhada brilhante da mitocôndria foi observada e MitoTracker Orange negativo se as células exibissem uma coloração difusa laranja citoplasmática. A coloração com LIVE / DEAD promove duas cores fluorescentes e proporciona um ensaio de viabilidade celular que se baseia na marcação simultânea de células vivas e mortas com dois marcadores. As células foram lavadas com solução salina equilibrada de Hanks e coradas com solução LIVE / DEAD (1 µM de calceína AM e 2 µM de homodímero de etídio-1 em solução salina tamponada com fosfato) durante 10 minutos à temperatura ambiente no escuro. Estes marcadores permitem a visualização de dois parâmetros reconhecidos de viabilidade celular - atividade esterase intracelular e integridade da membrana plasmática. A célula deve ser viável e funcional para que esta fluorescência ocorra. As células vivas são distinguidas pela presença de atividade de esterase intracelular ubíqua, determinada pela conversão enzimática da calceína AM, praticamente não fluorescente à calceína intensamente fluorescente. O corante polianiônico calceína é retido dentro de células vivas, produzindo uma intensa fluorescência verde. O etídio-1 entra em células com membranas danificadas e sofre um aumento de 40 vezes da fluorescência após ligação a ácidos nucleicos, produzindo assim uma fluorescência vermelha brilhante em células mortas.

3.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa

A reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction – qRT-PCR) foi utilizada para medir o nível de expressão de genes de superfamília de transportadores ABC humano em células TOV 21G utilizando um painel pré-fabricado da Roche Applied Science. Cada placa contém ensaios para 42 genes de transportadores ABC diferentes, em duplicata. Sete genes de referência serviram como controles de qRT-PCR e também permitiram a quantificação da expressão relativa dos genes alvo. Os ensaios foram realizados utilizando um instrumento LightCycler 480 e 96 placas contendo iniciadores específicos para o alvo e uma sonda de hidrólise da Universal Probes Library. O ácido ribonucleico (RNA) total foi isolado a partir de células TOV 21G utilizando o reagente TRIzol. Foram utilizados dois microgramas de RNA total para gerar o ácido desoxirribonucleico codificante (DNAc) por transcrição reversa.

3.5 Análise estatística

Para comparar a expressão de mRNA de diferentes transportadores ABC, os resultados da expressão genética foram analisados com base nos valores de ciclo limiar (em inglês cycle threshold - Ct) normalizados para a beta-2-microglobulina (B2M) e 18S RNA ribossomal (rRNA). Os valores de Ct dos genes de controle foram subtraídos daqueles dos transportadores para calcular um valor de Ct (por exemplo, Ct de transportador - CtB2M). Realizou-se um teste t de Student para analisar a significância estatística dos valores de MTT e ANOVA para comparações por pares. As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Software, Prism 4.0 (Software GraphPad, San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Proliferação celular

O paracetamol em concentrações de 1,5, 7,5 e 15 $\mu\text{g/L}$ diminuiu a proliferação de células TOV 21G em 3,5% ($p = 0,10$), 3,5% ($p = 0,08$) e 7,2% ($p = 0,02$), respectivamente, às 24 horas em comparação com células de controle não tratadas consideradas 100% de proliferação (Gráfico 1A). Após 48 horas, o paracetamol diminuiu a proliferação celular em 7,6% ($p = 0,12$), 5,2% ($p = 0,43$) e 12,3% ($p = 0,01$) (Gráfico 1B).

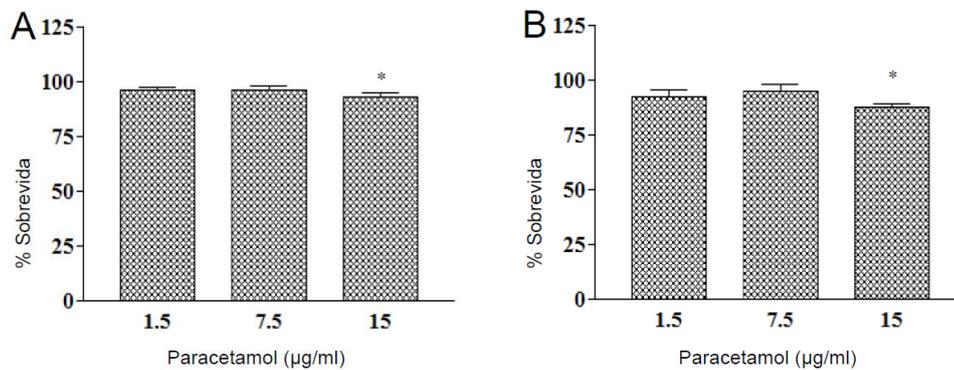


Gráfico 1. Viabilidade celular na linhagem de células TOV 21G expostas ao paracetamol em diferentes concentrações e intervalos de tempo. As colunas representam as médias dos experimentos realizados em quadruplicata. As barras de erro representam o desvio padrão. O crescimento celular é expresso como uma porcentagem do controle. As células TOV 21G mostraram uma diminuição na viabilidade celular com concentrações de 1,5, 7,5 e 15 $\mu\text{g/ml}$ de paracetamol após 24 horas (A) e 48 horas (B) de exposição ao fármaco. * $P < 0,05$.

Quando analisamos a resposta celular a 2, 10 e 20 $\mu\text{g/L}$ de ibuprofeno às 24 horas, observamos diminuição do crescimento celular de 0,3% ($p = 0,96$), 4,9% e 3,9% ($p = 0,05$), respectivamente, comparados com os controles (Gráfico 2A). Estas diminuições foram mais evidentes após 48 horas de exposição ao ibuprofeno, quando o crescimento celular foi diminuído em 7,8% ($p = 0,16$), 9,52% ($p = 0,12$) e 9,5% ($p = 0,04$), em comparação com os controles (Gráfico 2B).

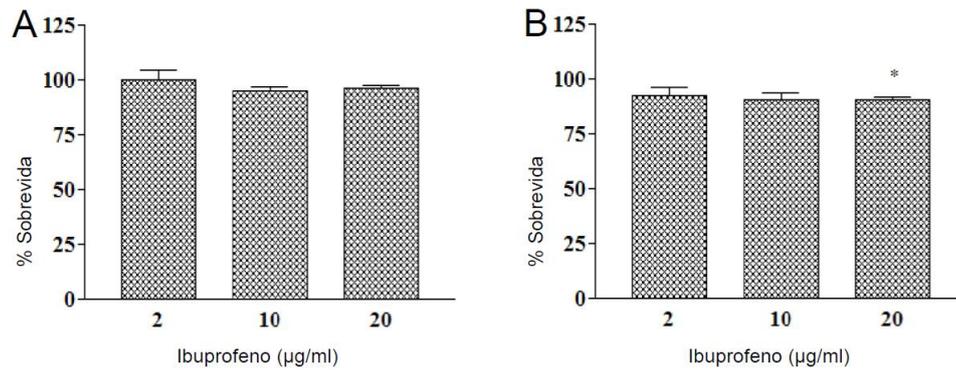


Gráfico 2. Viabilidade celular na linhagem de células TOV 21G expostas ao ibuprofeno em diferentes concentrações e intervalos de tempo. As colunas representam as médias dos experimentos realizados em quadruplicata. As barras de erro representam o desvio padrão. O crescimento celular é expresso como uma porcentagem do controle. As células TOV 21G mostraram uma diminuição na viabilidade celular com concentrações de 2, 10 e 20 µg/ml de ibuprofeno após 24 horas (A) e 48 horas (B) de exposição ao fármaco. * P < 0,05.

4.2 Alterações morfológicas

Não foram identificados, por meio da coloração com DAPI, mais sinais morfológicos de apoptose nas células que foram tratadas com paracetamol e ibuprofeno por 48 horas do que os controles (Figura 1 e 2 - A, B, C, D).

O ensaio LIVE / DEAD revelou que 48 horas de tratamento com paracetamol ou ibuprofeno não aumentou o número de células mortas, quando comparado com aos controles (Figura 1 e 2 - E, F, G, H).

Após 48 horas, as células tratadas com paracetamol ou ibuprofeno não apresentaram mais alterações morfológicas nas suas mitocôndrias pela coloração com MitoTracker Orange do que os controles (Figura 1 e 2 - I, J, K, L).

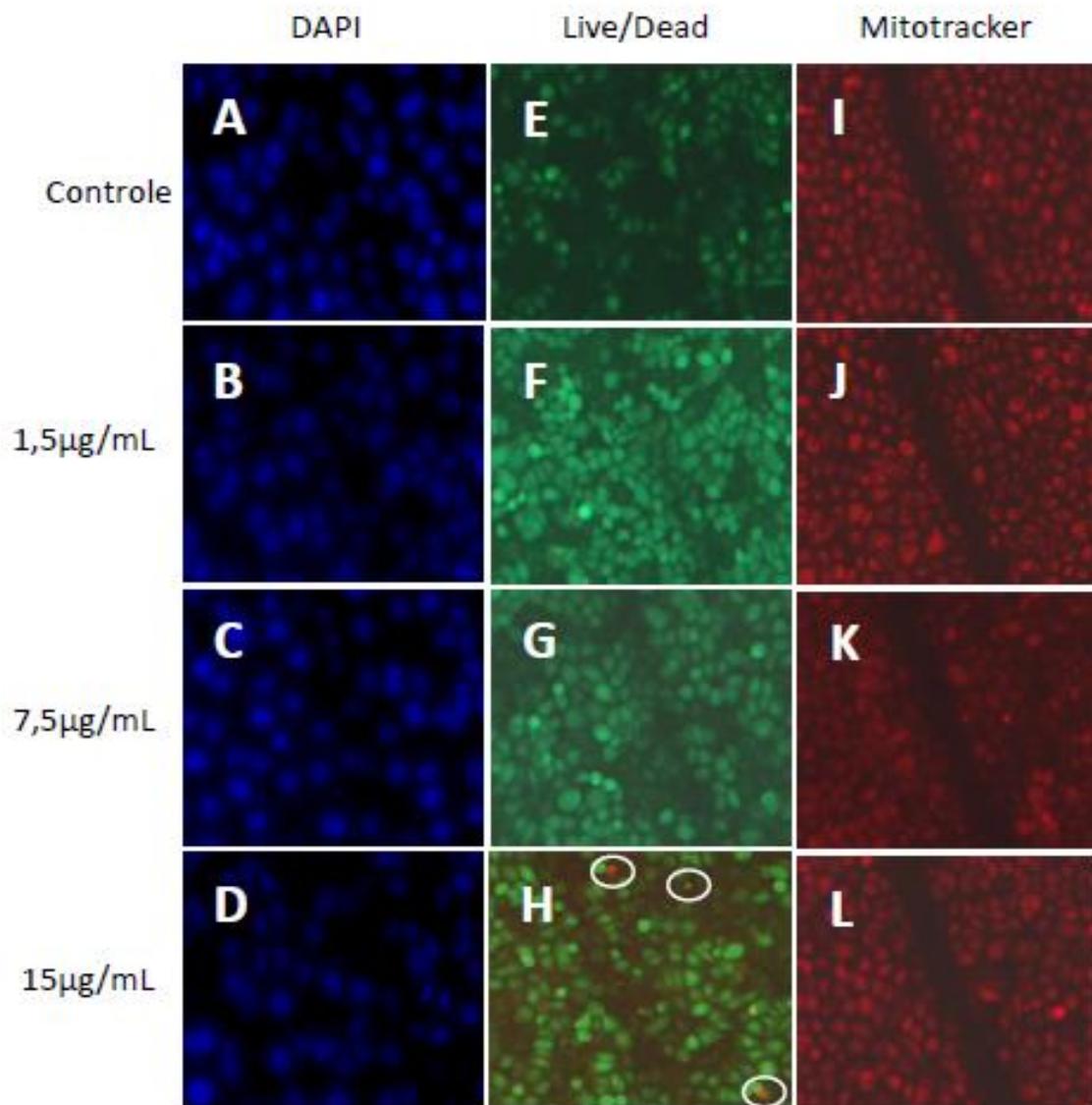


Figura 1. Imagem microscópica de células TOV 21G tratadas por 48 horas com 1,5 μ g/mL, 7,5 μ g/mL e 15 μ g/mL de paracetamol após marcação com DAPI (A a D), LIVE / DEAD (E a H) e mitotracker (I a L). Os círculos brancos indicam células mortas.

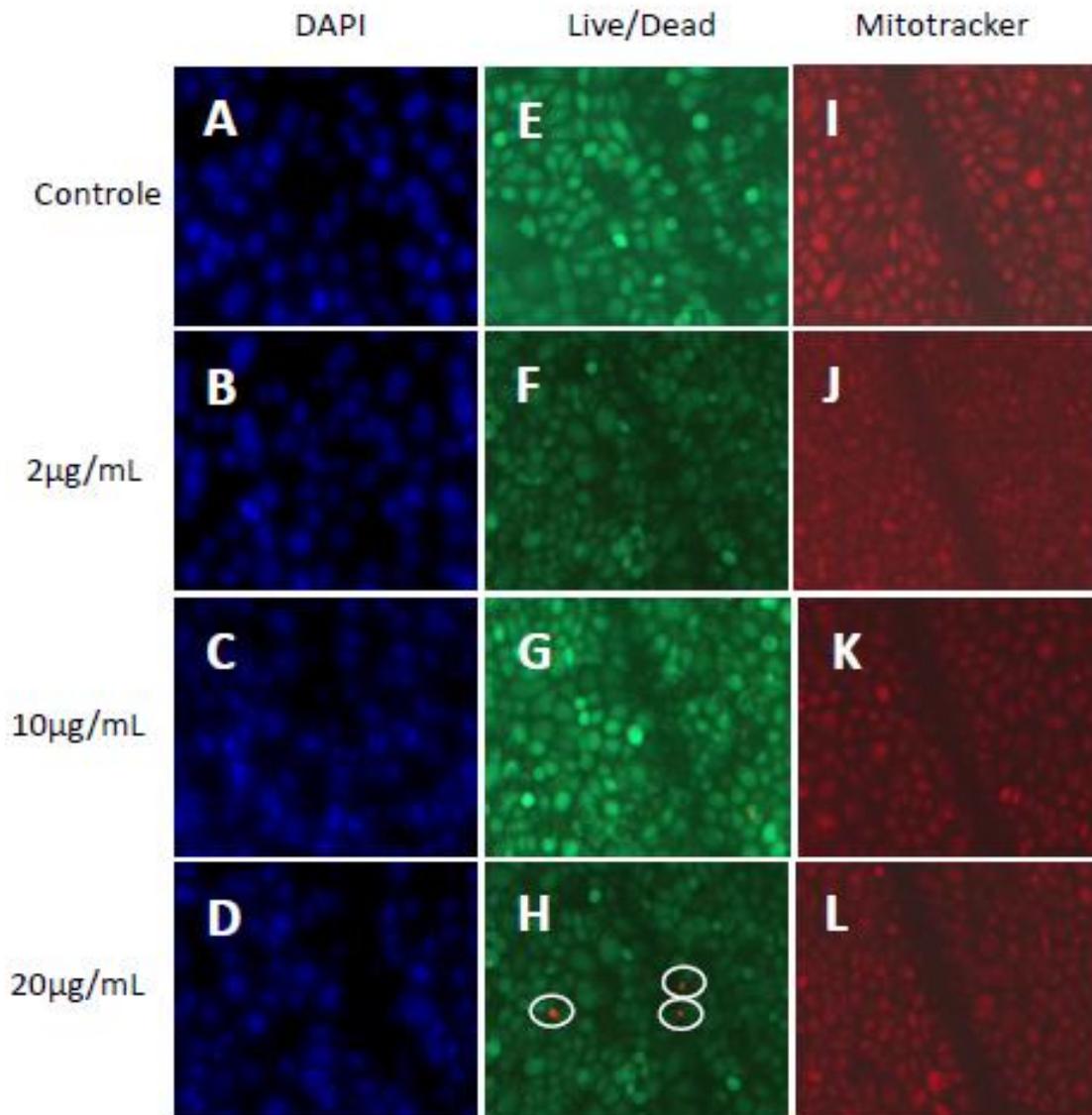


Figura 2. Imagem microscópica de células TOV 21G tratadas por 48 horas com 2 μ g/mL, 10 μ g/mL e 20 μ g/mL de ibuprofeno após marcação com DAPI (A a D), LIVE / DEAD (E a H) e mitotracker (I a L). Os círculos brancos indicam células mortas.

4.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa

As células TOV 21G tinham expressão reduzida dos genes transportadores ABCA1, ABCC3, ABCC4, ABCD3, ABCD4 e ABCE1. A expressão de ABCC4 (Δ CtB2M = - 0,77 e Δ Ct18S = -10,48) foi a menos subexpressa enquanto a de ABCA1 (Δ CtB2M = -10,73 e Δ Ct18S = -24,43), foi a mais subexpressa (Gráfico 3).

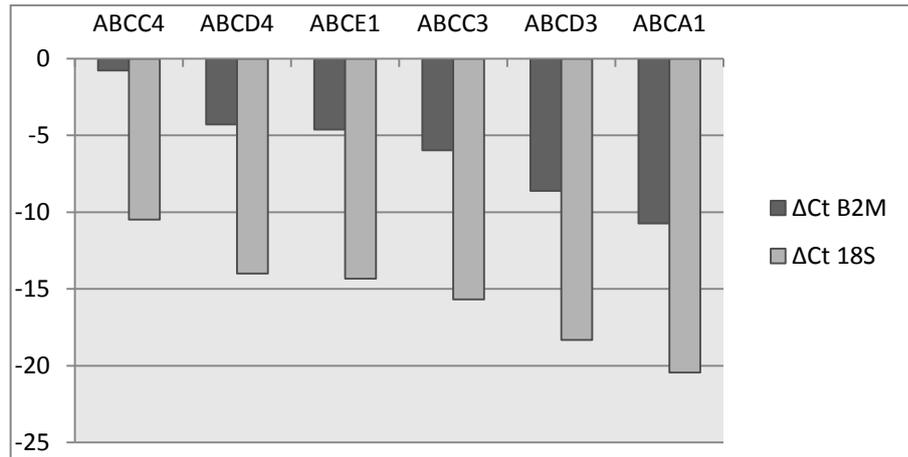


Gráfico 3. Expressão gênica de diferentes transportadores ABC normalizados por um gene precursor de beta-2-microglobulina (ΔCt B2M = Ct transportador - Ct B2M) e 18S RNAr (ΔCt 18S = Ct transportador - Ct18S).

5 DISCUSSÃO

Testar diferentes fármacos em linhagens celulares é um componente crítico do desenvolvimento de drogas antineoplásicas. Os ensaios MTT permitem testar diferentes concentrações e durações de exposição aos fármacos. Há dados limitados sobre os efeitos dos AINEs nas linhagens celulares de CEO. A literatura disponível inclui uma ampla gama de medicamentos, doses e horários, tornando desafiador reconciliar as diferenças e entender o quanto pode ser útil uma droga na prática clínica.

De uma perspectiva clinicamente relevante, o ibuprofeno é um dos fármacos analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios mais utilizados [81]. O ibuprofeno tem pequenos riscos de reações adversas gastrointestinais, hepatorreais e outras reações adversas em comparação com outros AINEs [81]. Foi descrito como "o anti-inflamatório não esteroideal com o menor número de efeitos colaterais em uso clínico por um longo tempo" [81]. Os doentes foram mantidos em doses elevadas de ibuprofeno durante anos sem efeitos adversos graves [88]. A idade avançada tem uma influência mínima na farmacocinética do ibuprofeno, e a dosagem aparentemente não necessita de ser ajustada para a idade [89]. O ibuprofeno tem, em geral, propriedades cinéticas previsíveis e confiáveis [81]. A concentração sérica máxima após a ingestão de doses de 400, 600 e 800 mg é de 15,4, 17,1 e 24,2 µg/mL, respectivamente [81]. O paracetamol é uma das drogas mais populares e amplamente utilizadas para o tratamento da dor e da febre e não produz danos gastrointestinais ou efeitos cardiorrenais adversos [82]. Apesar de muita pesquisa, não existem provas definitivas de que os efeitos analgésicos e antipiréticos do paracetamol são dependentes da inibição da COX [82]. A inibição de uma terceira forma de COX, COX-3, é uma das propostas mais recentes que foram apresentadas para explicar os efeitos incomuns do paracetamol [82]. As concentrações plasmáticas de 10 a 20 µg/mL são terapêuticas para o paracetamol [84].

No nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que descreve o efeito do ibuprofeno e do paracetamol no crescimento de uma linhagem de células de CEO *in vitro* utilizando concentrações de fármacos terapeuticamente relevantes. O paracetamol em uma concentração de 15 µg/mL mostrou uma inibição significativa da linhagem TOV 21G após 24 e 48 horas de tratamento. O ibuprofeno inibiu o crescimento a 20 µg/mL, mas apenas 48 horas após a exposição. O efeito antiproliferativo exercido pelo ibuprofeno na linha celular de CEO estudada aqui está de acordo com observações anteriores [90]. A descoberta de que os níveis

terapêuticos de paracetamol e ibuprofeno têm efeitos sobre as células de CEO sugere a possibilidade de uma estratégia quimiopreventiva / quimioterapêutica utilizando estes agentes em dosagens e horários que irão minimizar os efeitos secundários enquanto produzem uma prevenção / tratamento do CEO.

O presente estudo demonstra que o paracetamol e o ibuprofeno em níveis terapêuticos não ativam a apoptose em células de CEO [91]. O (s) mecanismo (s) subjacente (s) à diminuição da proliferação celular continua a ser elucidado. Foi previamente proposto que as ações antiproliferativas do ibuprofeno são independentes da COX e que o p75NTR, um supressor tumoral recentemente identificado, pode ser parcialmente responsável pelas propriedades anticancerígenas do ibuprofeno [90, 92, 93]. Estudos anteriores sugerem que o paracetamol é um substrato de tirosina quinase e que a depleção intracelular de glutatona, a formação de espécies reativas de oxigênio e a toxicidade mitocondrial contribuíram para a toxicidade seletiva do paracetamol em linhagens celulares de melanoma [94].

A medição da expressão dos genes dos transportadores ABC pode ser útil na predição da resposta a fármacos anticancerígenos. A qRT-PCR é a mais confiável e sensível tecnologia de perfil de expressão genética para analisar um painel de genes. Muitos estudos têm sido realizados avaliando o perfil de expressão de transportadores ABC. Até agora, a maioria destes estudos analisam um ou um pequeno grupo de transportadores ABC. Em contraste, nosso método permitiu a análise completa de 42 transportadores ABC. Neste estudo, nós nos concentramos na determinação de um perfil de expressão básica de transportadores ABC em células TOV 21G, uma linhagem de células de CEO. Nossos resultados demonstraram que ABCA1, ABCC3, ABCC4, ABCD3, ABCD4 e ABCE1 estavam subexpressas. Yasui et al. encontraram amplificação dos genes de ABCC4, ABCD3, ABCD4 e ABCE1 entre 19 das linhagens celulares resistentes examinadas [91]. ABCA1 é dos principais reguladores do metabolismo da lipoproteína de alta densidade (HDL), contudo seu mecanismo na proliferação e na progressão do câncer é incerto [95]. Dados sugerem que o ABCC4, que não foi alterado em grande proporção no presente estudo, assim como alguns AINEs pode libertar prostaglandinas das células [96]. Assim, um efeito sobre ABCC4 pode estar subjacente aos efeitos potencialmente benéficos dos AINEs.

Uma maior compreensão dos mecanismos subjacentes à resistência aos medicamentos pode levar ao desenvolvimento de protocolos terapêuticos mais bem sucedidos [91]. Deste modo, o

perfil de expressão de genes transportadores ABC em linhagens celulares utilizadas para rastreio de fármacos é muito importante para a descoberta de drogas antineoplásicas.

Estes achados justificam estudos adicionais sobre o papel fisiológico, relevância clínica e potencial uso de ABCC4 como alvo terapêutico. Devido às limitações dos testes *in vitro*, estes resultados devem ser confirmados em modelos animais para segurança e eficácia. Usar mais de um tipo celular pode prevenir que decisões sejam tomadas com base em respostas específicas de algum tecido.

6 CONCLUSÕES

A utilização de ensaios *in vitro* para análise de atividade antitumoral é uma importante ferramenta para descoberta de novos fármacos e alvos terapêuticos e diminui o uso de animais de experimentação.

Concentrações terapêuticas de paracetamol e ibuprofeno mostraram-se efetivas em diminuir a viabilidade da linhagem de CEO utilizada *in vitro*.

A citotoxicidade do ibuprofeno, um eficiente inibidor da COX e de potente ação anti-inflamatória, pode ser um potencial adjuvante na terapia para o CEO.

A citotoxicidade do paracetamol, considerado um fraco inibidor da COX e de ação anti-inflamatória fraca, pode indicar que outras vias de sinalização celular foram ativadas para indução da morte das células da linhagem de CEO utilizada.

A subexpressão de genes da superfamília de transportadores ABC relacionados à multirresistência a drogas pode ter sido o indicativo da susceptibilidade destas células aos fármacos testados.

A análise preliminar do perfil gênico de linhagens utilizadas em ensaios não clínicos *in vitro* pode ser uma importante estratégia na definição ou descoberta de alvos terapêuticos.

Mais estudos deverão ser realizados para descobertas de novas estratégias terapêuticas anti-inflamatórias para o tratamento do CEO.

REFERÊNCIAS

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
- [2] Kurman RJ, Shih Ie M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *The American journal of surgical pathology*. 2010 Mar;34(3):433-43.
- [3] Kurman RJ, Shih Ie M. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Human pathology*. 2011 Jul;42(7):918-31.
- [4] Piver MS. Prophylactic Oophorectomy: Reducing the U.S. Death Rate from Epithelial Ovarian Cancer. *A Continuing Debate. The oncologist*. 1996;1(5):326-30.
- [5] Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet (London, England)*. 1971 Jul 17;2(7716):163.
- [6] Cramer DW, Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*. 1983 Oct;71(4):717-21.
- [7] Risch HA. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998 Dec 02;90(23):1774-86.
- [8] Shih Ie M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *The American journal of pathology*. 2004 May;164(5):1511-8.
- [9] Ali-Fehmi R, Che M, Khalifeh I, Malone JM, Morris R, Lawrence WD, et al. The effect of cyclooxygenase-2 expression on tumor vascularity in advanced stage ovarian serous carcinoma. *Cancer*. 2003 Oct 01;98(7):1423-9.
- [10] Kang S, Nam BH. Does neoadjuvant chemotherapy increase optimal cytoreduction rate in advanced ovarian cancer? Meta-analysis of 21 studies. *Annals of surgical oncology*. 2009 Aug;16(8):2315-20.
- [11] Gardner GJ, Jewell EL. Current and future directions of clinical trials for ovarian cancer. *Cancer Control*. 2011 Jan;18(1):44-51.
- [12] Earle CC, Schrag D, Neville BA, Yabroff KR, Topor M, Fahey A, et al. Effect of surgeon specialty on processes of care and outcomes for ovarian cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006 Feb 01;98(3):172-80.
- [13] Rauh-Hain JA, Rodriguez N, Growdon WB, Goodman AK, Boruta DM, 2nd, Horowitz NS, et al. Primary debulking surgery versus neoadjuvant chemotherapy in stage IV ovarian cancer. *Annals of surgical oncology*. 2011 Mar;19(3):959-65.
- [14] Jaaback K, Johnson N, Lawrie TA. Intraperitoneal chemotherapy for the initial management of primary epithelial ovarian cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2011 Nov 09(11):CD005340.

- [15] Aabo K, Adams M, Adnitt P, Alberts DS, Athanazziou A, Barley V, et al. Chemotherapy in advanced ovarian cancer: four systematic meta-analyses of individual patient data from 37 randomized trials. Advanced Ovarian Cancer Trialists' Group. *British journal of cancer*. 1998 Dec;78(11):1479-87.
- [16] Markman M, Sehouli J, Levenback CF, Chi DS. Epithelial ovarian cancer: focus on targeted therapy. *Journal of oncology*. 2010;2010:171425.
- [17] Elit L, Oliver TK, Covens A, Kwon J, Fung MF, Hirte HW, et al. Intraperitoneal chemotherapy in the first-line treatment of women with stage III epithelial ovarian cancer: a systematic review with metaanalyses. *Cancer*. 2007 Feb 15;109(4):692-702.
- [18] Hope JM, Blank SV. Current status of maintenance therapy for advanced ovarian cancer. *International journal of women's health*. 2010 Aug 09;1:173-80.
- [19] Cannistra SA. Evaluating new regimens in recurrent ovarian cancer: how much evidence is good enough? *J Clin Oncol*. 2010 Jul 01;28(19):3101-3.
- [20] Hess LM, Rong N, Monahan PO, Gupta P, Thomaskutty C, Matei D. Continued chemotherapy after complete response to primary therapy among women with advanced ovarian cancer: a meta-analysis. *Cancer*. 2010 Nov 15;116(22):5251-60.
- [21] Foster T, Brown TM, Chang J, Menssen HD, Blieden MB, Herzog TJ. A review of the current evidence for maintenance therapy in ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2009 Nov;115(2):290-301.
- [22] Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436-44.
- [23] Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Current opinion in genetics & development*. 2008 Feb;18(1):3-10.
- [24] Porta C, Larghi P, Rimoldi M, Totaro MG, Allavena P, Mantovani A, et al. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology*. 2009;214(9-10):761-77.
- [25] Espey LL. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biology of reproduction*. 1994 Feb;50(2):233-8.
- [26] Espey LL. Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis. *Biology of reproduction*. 1980 Feb;22(1):73-106.
- [27] Shan W, Liu J. Inflammation: a hidden path to breaking the spell of ovarian cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2009 Oct 1;8(19):3107-11.
- [28] Camargo MC, Stayner LT, Straif K, Reina M, Al-Alem U, Demers PA, et al. Occupational exposure to asbestos and ovarian cancer: a meta-analysis. *Environmental health perspectives*. 2011 Sep;119(9):1211-7.
- [29] Sayasneh A, Tsivos D, Crawford R. Endometriosis and ovarian cancer: a systematic review. *ISRN obstetrics and gynecology*. 2011;2011:140310.

- [30] Lin HW, Tu YY, Lin SY, Su WJ, Lin WL, Lin WZ, et al. Risk of ovarian cancer in women with pelvic inflammatory disease: a population-based study. *The Lancet*. 2011 Sep;12(9):900-4.
- [31] Ness RB, Cottreau C. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999 Sep 01;91(17):1459-67.
- [32] McSorley MA, Alberg AJ, Allen DS, Allen NE, Brinton LA, Dorgan JF, et al. C-reactive protein concentrations and subsequent ovarian cancer risk. *Obstetrics and gynecology*. 2007 Apr;109(4):933-41.
- [33] Toriola AT, Grankvist K, Agborsangaya CB, Lukanova A, Lehtinen M, Surcel HM. Changes in pre-diagnostic serum C-reactive protein concentrations and ovarian cancer risk: a longitudinal study. *Ann Oncol*. 2011 Aug;22(8):1916-21.
- [34] Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1998;38:97-120.
- [35] Li W, Wang J, Jiang HR, Xu XL, Zhang J, Liu ML, et al. Combined effects of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selective inhibitors on ovarian carcinoma in vivo. *International journal of molecular sciences*. 2011;12(1):668-81.
- [36] Daikoku T, Wang D, Tranguch S, Morrow JD, Orsulic S, DuBois RN, et al. Cyclooxygenase-1 is a potential target for prevention and treatment of ovarian epithelial cancer. *Cancer research*. 2005 May 01;65(9):3735-44.
- [37] Denkert C, Kobel M, Pest S, Koch I, Berger S, Schwabe M, et al. Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma. *The American journal of pathology*. 2002 Mar;160(3):893-903.
- [38] Ali-Fehmi R, Morris RT, Bandyopadhyay S, Che M, Schimp V, Malone JM, Jr., et al. Expression of cyclooxygenase-2 in advanced stage ovarian serous carcinoma: correlation with tumor cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, and survival. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2005 Mar;192(3):819-25.
- [39] Seo SS, Song YS, Kang DH, Park IA, Bang YJ, Kang SB, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in association with clinicopathological prognostic factors and molecular markers in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2004 Mar;92(3):927-35.
- [40] Fujimoto J, Toyoki H, Sakaguchi H, Jahan I, Alam SM, Tamaya T. Clinical implications of expression of cyclooxygenase-2 related to angiogenesis in ovarian cancer. *Oncology reports*. 2006 Jan;15(1):21-5.
- [41] Ferrandina G, Ranelletti FO, Martinelli E, Paglia A, Zannoni GF, Scambia G. Cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression and resistance to platinum versus platinum/paclitaxel containing chemotherapy in advanced ovarian cancer. *BMC cancer*. 2006 Jul 11;6:182.
- [42] Gupta RA, Tejada LV, Tong BJ, Das SK, Morrow JD, Dey SK, et al. Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer research*. 2003 Mar 01;63(5):906-11.

- [43] Khunnarong J, Tangjitgamol S, Manusirivithaya S, Suekwattana P, Leelahakorn S. Expression of cyclooxygenase-1 in epithelial ovarian cancer: a clinicopathological study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2008 Oct-Dec;9(4):757-62.
- [44] Kino Y, Kojima F, Kiguchi K, Igarashi R, Ishizuka B, Kawai S. Prostaglandin E2 production in ovarian cancer cell lines is regulated by cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. 2005 Aug;73(2):103-11.
- [45] Li S, Miner K, Fannin R, Carl Barrett J, Davis BJ. Cyclooxygenase-1 and 2 in normal and malignant human ovarian epithelium. *Gynecologic oncology*. 2004 Feb;92(2):622-7.
- [46] Rask K, Zhu Y, Wang W, Hedin L, Sundfeldt K. Ovarian epithelial cancer: a role for PGE2-synthesis and signalling in malignant transformation and progression. *Molecular cancer*. 2006 Nov 16;5:62.
- [47] Smith ER, Daly MB, Xu XX. A mechanism for cox-2 inhibitor anti-inflammatory activity in chemoprevention of epithelial cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Jan;13(1):144-5.
- [48] Tian W, Zhao Y, Liu S, Li X. Meta-analysis on the relationship between nonsteroidal anti-inflammatory drug use and gastric cancer. *Eur J Cancer Prev*. 2010 Jul;19(4):288-98.
- [49] Abnet CC, Freedman ND, Kamangar F, Leitzmann MF, Hollenbeck AR, Schatzkin A. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of gastric and oesophageal adenocarcinomas: results from a cohort study and a meta-analysis. *British journal of cancer*. 2009 Feb 10;100(3):551-7.
- [50] Yang P, Zhou Y, Chen B, Wan HW, Jia GQ, Bai HL, et al. Aspirin use and the risk of gastric cancer: a meta-analysis. *Digestive diseases and sciences*. 2010 Jun;55(6):1533-9.
- [51] Wang WH, Huang JQ, Zheng GF, Lam SK, Karlberg J, Wong BC. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003 Dec 03;95(23):1784-91.
- [52] Corley DA, Kerlikowske K, Verma R, Buffler P. Protective association of aspirin/NSAIDs and esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 2003 Jan;124(1):47-56.
- [53] Khuder SA, Mutgi AB. Breast cancer and NSAID use: a meta-analysis. *British journal of cancer*. 2001 May 04;84(9):1188-92.
- [54] Mangiapane S, Blettner M, Schlattmann P. Aspirin use and breast cancer risk: a meta-analysis and meta-regression of observational studies from 2001 to 2005. *Pharmacoepidemiology and drug safety*. 2008 Feb;17(2):115-24.
- [55] Takkouche B, Regueira-Mendez C, Etminan M. Breast cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008 Oct 15;100(20):1439-47.
- [56] Zhao YS, Zhu S, Li XW, Wang F, Hu FL, Li DD, et al. Association between NSAIDs use and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*. 2009 Sep;117(1):141-50.

- [57] Daugherty SE, Pfeiffer RM, Sigurdson AJ, Hayes RB, Leitzmann M, Schatzkin A, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and bladder cancer: a pooled analysis. *American journal of epidemiology*. 2011 Apr 01;173(7):721-30.
- [58] Khuder SA, Herial NA, Mutgi AB, Federman DJ. Nonsteroidal antiinflammatory drug use and lung cancer: a metaanalysis. *Chest*. 2005 Mar;127(3):748-54.
- [59] Mahmud SM, Franco EL, Aprikian AG. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer risk: a meta-analysis. *International journal of cancer*. 2010 Oct 01;127(7):1680-91.
- [60] Mahmud S, Franco E, Aprikian A. Prostate cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: systematic review and meta-analysis. *British journal of cancer*. 2004 Jan 12;90(1):93-9.
- [61] Cole BF, Logan RF, Halabi S, Benamouzig R, Sandler RS, Grainge MJ, et al. Aspirin for the chemoprevention of colorectal adenomas: meta-analysis of the randomized trials. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009 Feb 18;101(4):256-66.
- [62] Prizment AE, Folsom AR, Anderson KE. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk for ovarian and endometrial cancers in the Iowa Women's Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Feb;19(2):435-42.
- [63] Sorensen HT, Friis S, Norgard B, Mellekjaer L, Blot WJ, McLaughlin JK, et al. Risk of cancer in a large cohort of nonaspirin NSAID users: a population-based study. *British journal of cancer*. 2003 Jun 02;88(11):1687-92.
- [64] Fairfield KM, Hunter DJ, Fuchs CS, Colditz GA, Hankinson SE. Aspirin, other NSAIDs, and ovarian cancer risk (United States). *Cancer Causes Control*. 2002 Aug;13(6):535-42.
- [65] Wernli KJ, Newcomb PA, Hampton JM, Trentham-Dietz A, Egan KM. Inverse association of NSAID use and ovarian cancer in relation to oral contraceptive use and parity. *British journal of cancer*. 2008 Jun 03;98(11):1781-3.
- [66] Hannibal CG, Rossing MA, Wicklund KG, Cushing-Haugen KL. Analgesic drug use and risk of epithelial ovarian cancer. *American journal of epidemiology*. 2008 Jun 15;167(12):1430-7.
- [67] Schildkraut JM, Moorman PG, Halabi S, Calingaert B, Marks JR, Berchuck A. Analgesic drug use and risk of ovarian cancer. *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 2006 Jan;17(1):104-7.
- [68] Akhmedkhanov A, Toniolo P, Zeleniuch-Jacquotte A, Kato I, Koenig KL, Shore RE. Aspirin and epithelial ovarian cancer. *Preventive medicine*. 2001 Dec;33(6):682-7.
- [69] Lacey JV, Jr., Sherman ME, Hartge P, Schatzkin A, Schairer C. Medication use and risk of ovarian carcinoma: a prospective study. *International journal of cancer*. 2004 Jan 10;108(2):281-6.

- [70] Bonovas S, Filioussi K, Sitaras NM. Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect the risk of developing ovarian cancer? A meta-analysis. *British journal of clinical pharmacology*. 2005 Aug;60(2):194-203.
- [71] Bonovas S, Filioussi K, Sitaras NM. Paracetamol use and risk of ovarian cancer: a meta-analysis. *British journal of clinical pharmacology*. 2006 Jul;62(1):113-21.
- [72] Cramer DW, Harlow BL, Titus-Ernstoff L, Bohlke K, Welch WR, Greenberg ER. Over-the-counter analgesics and risk of ovarian cancer. *Lancet (London, England)*. 1998 Jan 10;351(9096):104-7.
- [73] Moysich KB, Mettlin C, Piver MS, Natarajan N, Menezes RJ, Swede H. Regular use of analgesic drugs and ovarian cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001 Aug;10(8):903-6.
- [74] Tavani A, Gallus S, La Vecchia C, Conti E, Montella M, Franceschi S. Aspirin and ovarian cancer: an Italian case-control study. *Ann Oncol*. 2000 Sep;11(9):1171-3.
- [75] Friis S, Nielsen GL, Mellekjaer L, McLaughlin JK, Thulstrup AM, Blot WJ, et al. Cancer risk in persons receiving prescriptions for paracetamol: a Danish cohort study. *International journal of cancer*. 2002 Jan 01;97(1):96-101.
- [76] Rosenberg L, Palmer JR, Rao RS, Coogan PF, Strom BL, Zauber AG, et al. A case-control study of analgesic use and ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Sep;9(9):933-7.
- [77] Meier CR, Schmitz S, Jick H. Association between acetaminophen or nonsteroidal antiinflammatory drugs and risk of developing ovarian, breast, or colon cancer. *Pharmacotherapy*. 2002 Mar;22(3):303-9.
- [78] Pinheiro SP, Tworoger SS, Cramer DW, Rosner BA, Hankinson SE. Use of nonsteroidal antiinflammatory agents and incidence of ovarian cancer in 2 large prospective cohorts. *American journal of epidemiology*. 2009 Jun 01;169(11):1378-87.
- [79] Bramlage P, Goldis A. Bioequivalence study of three ibuprofen formulations after single dose administration in healthy volunteers. *BMC pharmacology*. 2008 Oct 29;8:18.
- [80] Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002 Feb 20;94(4):252-66.
- [81] Rainsford KD. Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacology*. 2009 Dec;17(6):275-342.
- [82] Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S. Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS drug reviews*. 2006 Fall-Winter;12(3-4):250-75.
- [83] Blough ER, Wu M. Acetaminophen: beyond pain and Fever-relieving. *Frontiers in pharmacology*. 2011;2:72.
- [84] Stocker ME, Montgomery JE. Serum paracetamol concentrations in adult volunteers following rectal administration. *British journal of anaesthesia*. 2001 Oct;87(4):638-40.

- [85] Wu CP, Hsieh CH, Wu YS. The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy. *Molecular pharmaceutics*. 2011 Dec 5;8(6):1996-2011.
- [86] Auner V, Sehouli J, Oskay-Oezcelik G, Horvat R, Speiser P, Zeillinger R. ABC transporter gene expression in benign and malignant ovarian tissue. *Gynecologic oncology*. 2010 May;117(2):198-201.
- [87] Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *The oncologist*. 2003;8(5):411-24.
- [88] Konstan MW, Byard PJ, Hoppel CL, Davis PB. Effect of high-dose ibuprofen in patients with cystic fibrosis. *The New England journal of medicine*. 1995 Mar 30;332(13):848-54.
- [89] Albert KS, Gillespie WR, Wagner JG, Pau A, Lockwood GF. Effects of age on the clinical pharmacokinetics of ibuprofen. *The American journal of medicine*. 1984 Jul 13;77(1A):47-50.
- [90] Andrews P, Zhao X, Allen J, Li F, Chang M. A comparison of the effectiveness of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs and their derivatives against cancer cells in vitro. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2008 Feb;61(2):203-14.
- [91] Yasui K, Mihara S, Zhao C, Okamoto H, Saito-Ohara F, Tomida A, et al. Alteration in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance. *Cancer research*. 2004 Feb 15;64(4):1403-10.
- [92] Khwaja F, Allen J, Lynch J, Andrews P, Djakiew D. Ibuprofen inhibits survival of bladder cancer cells by induced expression of the p75NTR tumor suppressor protein. *Cancer research*. 2004 Sep 1;64(17):6207-13.
- [93] Quann EJ, Khwaja F, Zavitz KH, Djakiew D. The aryl propionic acid R-flurbiprofen selectively induces p75NTR-dependent decreased survival of prostate tumor cells. *Cancer research*. 2007 Apr 1;67(7):3254-62.
- [94] Vad NM, Yount G, Moore D, Weidanz J, Moridani MY. Biochemical mechanism of acetaminophen (APAP) induced toxicity in melanoma cell lines. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2009 Apr;98(4):1409-25.
- [95] Fukuchi J, Hiipakka RA, Kokontis JM, Hsu S, Ko AL, Fitzgerald ML, et al. Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer research*. 2004 Nov 1;64(21):7682-5.
- [96] Reid G, Wielinga P, Zelcer N, van der Heijden I, Kuil A, de Haas M, et al. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Aug 5;100(16):9244-9.

ANEXOS

Ata da defesa de dissertação de mestrado



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpq@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de RENILTON AIRES LIMA, nº de registro 2009658560. No dia vinte e nove de dezembro de dois mil e onze, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "EFEITO CITOTÓXICO DO IBUPROFENO E PARACETAMOL SOBRE UMA LINHAGEM DE CÉLULAS DE CÂNCER DE OVÁRIO *IN VITRO*", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração em Patologia Ginecológica e Reprodução. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Agnaldo Lopes da Silva Filho, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Agnaldo Lopes da Silva Filho /Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovad</u>
Profa. Luciana Maria Silva /Coorientadora	Instituição: UFTM	Indicação: <u>Aprovado</u>
Profa. Andrea Moura Rodrigues Maciel Fonseca	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Eduardo Batista Cândido	Instituição: UFSJR	Indicação: <u>Aprovado</u>

Pelas indicações o candidato foi considerado aprovad.

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de dezembro de 2011.

Prof. Agnaldo Lopes da Silva Filho Agnaldo Lopes da Silva
 Profa. Luciana Maria Silva Luciana Maria Silva
 Profa. Andréa Moura Rodrigues Maciel da Fonseca Andréa Moura Rodrigues Maciel da Fonseca
 Prof. Eduardo Batista Cândido Eduardo B. Cândido
 Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral/Coordenador Antônio Carlos Vieira Cabral

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Saúde da Mulher
Faculdade de Medicina - UFMG

Folha de aprovação

**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640
cpg@medicina.ufmg.br



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores Agnaldo Lopes da Silva Filho, Luciana Maria Silva, Andréa Moura Rodrigues Maciel da Fonseca e Eduardo Batista Cândido, aprovou a defesa da dissertação intitulada **“EFEITO CITOTÓXICO DO IBUPROFENO E PARACETAMOL SOBRE UMA LINHAGEM DE CÉLULAS DE CÂNCER DE OVÁRIO *IN VITRO*”** apresentada pelo mestrando **RENILTON AIRES LIMA**, para obtenção do título de mestre em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração em Patologia Ginecológica e Reprodução da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 29 de dezembro de 2011.

Prof. Agnaldo Lopes da Silva Filho
Orientador

Profa. Luciana Maria Silva
Coorientadora

Profa. Andréa Moura Rodrigues Maciel da Fonseca

Prof. Eduardo Batista Cândido