Marta Érica Saidel

Ensaios celulares para a determinação da atividade citotóxica de moléculas antineoplásicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Química Orgânica e Biológica.
Orientador: Prof. Dr. Andrei Leitão

São Carlos
2016

Dedico este trabalho aos meus pais
Ademir e Edir e aos meus irmãos Paula e Ricardo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Andrei Leitão, meu orientador, por ter me dado a oportunidade e confiança de exercer esse trabalho em seu laboratório. Por sua paciência, sabedoria, acolhimento e amizade, o meu muito obrigada pelos anos em que podemos compartilhar experiências diversas.

A Deus por me permitir que no caminho por mais estreito e com várias adversidades, nunca deixou de me mostrar que no fim sempre há uma luz que brilha.

A minha família que tanto amo e estimo, muito obrigado pela paciência e amor que vocês dedicam por mim a cada dia. Com vocês sei o que é o amor, principalmente quando falamos do nosso pequeno Luiz, meu sobrinho-afilhado tão amado e desejado.

Ao meu amigo, namorado, noivo, futuro marido (risos) Carlos (CA) pelos anos ao meu lado sempre me apoiando e acreditando que eu posso e consigo. Pela paciência, pelo amor e amizade.

Aos amigos do laboratório... Fá, Dai, Fer, Júnior... e ao pessoal novo que tem um monte rs Ariel, Samelyn, Marcela, João, Camila, Murilo, Monique, Pedro, Thiago e a todos do Nequimed, meu muito obrigado por todos que contribuíram de uma forma direta ou indireta.

Finalmente agradeço a CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

A pesquisa de substâncias bioativas apresenta diversas etapas de grande complexidade técnico-científica e envolve uma atividade multidisciplinar. No estudo de antineoplásicos, dentre outros candidatos a fármacos, a determinação do perfil de atividade biológica é um ponto essencial para a determinação da potência, toxidez e o índice de seletividade. Neste projeto, os ensaios *in vitro* de compostos inibidores de catepsinas serão realizados usando células de câncer de próstata resistentes à quimioterapia (DU 145 e PC-3). Os estudos envolverão análises fenotípicas da resposta celular para determinar a viabilidade e o tipo de perturbação do ciclo celular utilizando técnicas colorimétricas e citometria de fluxo, juntamente com o estudo de sinalização celular PI3K-Akt-mTOR. Os testes de atividade citotóxica serão realizados com as células de fibroblasto de camundongo (Balb-c 3T3). Os resultados levarão a caracterização do tipo de resposta biológica e também da citotoxidez das substâncias de interesse.

ABSTRACT

The search for bioactive substances leads to molecules that need to be qualified throughout many complex steps, involving multidisciplinary activities. For antineoplastic molecules, among other classes of candidate drugs, the determination of the biological activity is the core of the whole process with the aim of determining the potency, toxicity and the selectivity index. In this project, in vitro cell-based bioassays of cathepsin inhibitors are going to be performed using prostate cancer cells resistant to chemotherapy (DU 145 and PC-3). Phenotypic studies are going to be used as end-points to observe the cell viability and the perturbation of the cell cycle by means of colorimetric, flow cytometry, coupled with the study of PI3K-Akt-mTOR signaling pathway. Cytotoxic assays are going to be performed in mouse fibroblasts (Balb-c 3T3). As a result, the biological outcome and the cytotoxic profile of the compounds of interest will be addressed.

Lista de Figuras

Figura 1 Evolução de uma célula cancerígena 2
Figura 2 Taxas de mortalidade anual de diferentes tipos de câncer nos Estados Unidos (1930-2012) 4
Figura 3 Hormônio masculino testosterona e substâncias supressoras da atividade androgênica 7
Figura 4 Estruturas químicas da testosterona e seu metabólito di-idrotestosterona 8
Figura 5 Etapas para a produção do Andrógeno 9
Figura 6 Representação dos inibidores de catepsina 13
Figura 7 Representação das estruturas pertencentes na formação da mTOR 14
Figura 8 Representação das três classes presentes na estrutura PI3K 15
Figura 9 Estrutura da mTORC1 e mTORC2 sinalizando a estrutura RAPTOR e RICTOR 16
Figura 10 Sinalização da via mTOR para início de transdução proteica 18
Figura 11 Estrutura química do composto rapamicina 19
Figura 12 Representação química de diversos inibidores da mTOR 20
Figura 13 Reação de metabolismo do MTT 23
Figura 14 Demonstração da inibição da via de inibição da PI3K-Akt-mTOR frente ao uso de compostos de referência 29
Figura 15 Procedimento da realização do teste da cascata de sinalização PI3K-Akt-mTOR 30
Figura 16 Triagem de compostos testados na célula de fibroblasto (não cancerígena de Balb c 3T3 clone A31) 32
Figura 17 Triagem de compostos testados na célula de câncer de próstata DU 145 que não apresentaram citotoxicidade nas células de Balb c 3T3 clone A31 33
Figura 18 Triagem de compostos testados na célula de câncer de próstata PC-3 que não apresentaram citotoxicidade nas células de Balb c 3T3 clone A31 34
Figura 19 Resposta da célula de câncer de próstata DU 145 para os compostos com tempos de incubação de 24 e 72 horas (esquerda e direita, respectivamente) 36
Figura 20 Resposta da célula de câncer de próstata PC-3 para os compostos com tempos de incubação de 24 e 72 horas (esquerda e direita, respectivamente) 38
Figura 21 Padronização da cascata de sinalização mTOR com a células de câncer DU 145 e PC-3 com diversas concentrações da rapamicina 41
Figura 22 Teste da sinalização da cascata PI3K-Akt-mTOR com a célula DU-145 .. 42
Figura 23 Teste da sinalização da cascata PI3K-Akt-mTOR com a célula PC-3 43

Sumário

INTRODUÇÃO 1
Câncer 1
Câncer de Próstata (CaP) 4
Fatores de Riscos 5
Terapias 6
Síntese de produção de Andrógenos 7
Ensaios Celulares 10
Catepsinas 11
Inibidores de Catepsinas 12
Alvos de Rapamicina em Mamíferos - mTOR 13
Transdução de sinal da mTOR e funções celulares 15
Inibidores da cascata mTOR 18
Ensaios Celulares 23
Método Colorimétrico 23
OBJETIVOS 24
Objetivo Geral 24
Objetivos Específicos 24
MATERIAIS E MÉTODOS 25
Materiais 25
Método 26
Crescimento Celular 26
Ensaios Celulares 26
Método Colorimétrico 27
RESULTADOS E DISCUSSÕES 31
Determinação da concentração de trabalho 31
Triagem dos Compostos 31
Via de sinalização 40
CONCLUSÃO 45
Referências 46
ANEXOS 49

Índice de Abreviaturas

Ácido Desoxirribonucleico – DNA

Ácido etilenodiaminotetracético – EDTA

Ácido fosfatídico – PA

Antes de Cristo – a. C.

Brometo de 3-(4,5-dimetil-2tiazol)-2,5-difeniltetrazólio – MTT

Câncer – Ca

Câncer de Próstata – CaP

Catepsina – Cat

Depois de Cristo – d. C.

Di-idroxiandrostenediona – DHA

Dimetil sulfóxido – DMSO

Dodecilsulfato de sódio – SDS

Doença Sexualmente Transmissíveis – DST´s

Força Centrífuga Relativa – g

Fosfatase D – PLD

Fosfatidilinositol-*3*-quinase – PI3K

Fosfato de Salina tamponado – PBS

Graus Celsius – ˚C

Hora – h

Hormônio estimulante da célula intersticial – ICSH

Hormônio Folículo Estimulante – FSH

Hormônio liberador de gonadotrofinas – GnRH

Hormônio Luteinizante – LH

Instituto Nacional do Câncer – INCA

Mammalian target of rapamycin (Alvos de Rapamicina em Mamíferos) – mTOR

Matriz Metaloproteases – MMPs

Meio Dulbecco MEM – meio DMEM

Microlitro – µL

Micromolar – µM

Mililitro – mL

Modificação do meio de Ham´s F12 – meio F12K

mTOR Complexo 1 ou 2 – mTORC 1 ou mTORC2

Nanomêtro – nm

Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase – NADPH

Organização Mundial da Saúde – OMS

Prostate-Specific Antigen (Antígeno específico da próstata) – PSA

Prostatic acid phosphatase (fosfatase ácida prostática) – PAP

Proteina quinase B – Akt

Rotação por minuto – RPM

Serina 473 – Ser473

Soro de feto bovino – FBS

Treonina 389 – Thr 389

INTRODUÇÃO

Câncer

As primeiras descrições referentes ao câncer apareceram por volta de 1.600 a.C. em vários papiros egípcios. O papiro de Edwin Smith contém uma descrição de câncer e também o procedimento de remoção realizado na mama seguido de cauterização, pois a doença não respondia a nenhum tratamento. (Hajdu, 2010)

Entre 460 a.C. a 370 a.C., Hipócrates descreveu vários tipos de câncer e utilizava o termo *karkinos*, palavra grega para caranguejo, que se deve a sua aparência na superfície após realizar o corte transversal. A tradição grega ficou contra a tradição de abrir os corpos para estudo após a morte do indivíduo. Dessa forma, Hipócrates começou a descrever e desenhar tumores visíveis em pele, nariz e seios. Assim, o tratamento baseava-se na teoria do humor de quatro fluidos corporais: bile amarela e preta, sangue e muco. Segundo o humor do paciente o tratamento poderia consistir em dieta, derramamento de sangue e laxantes. Entre 25 a.C. e 50 d.C., Aulus Celsus traduziu a palavra *karkinos* para câncer. (Hajdu, 2010)

No século 2 d.C., o médico grego Claudius Galen utilizava a palavra *oncos*, palavra grega para inchaço, para descrever os tumores. Galen também utilizou o sufixo *oma* para indicar lesões cancerosas. Foi a partir do uso das palavras de Galen que surgiu o nome oncologia. (Hajdu, 2010)

Com o passar do tempo, pode-se descobrir que o câncer ocorre em qualquer parte do corpo, mas o tratamento segundo a teoria de Hipócrates (tratamento com base humor) permaneceu popular até o século 19 com a descrição das células.

A mais famosa, e talvez a mais antiga, dessas descobertas foi feita em 1775 por um médico de Londres, Percival Pott, que descreveu cânceres escrotais em homens que haviam trabalhado como limpadores de chaminé na juventude. A descrição de Pott representou a primeira ocasião em que um agente ou um tipo de exposição específica foi estreitamente relacionado com o aparecimento de um câncer. Pouco depois, também em Londres, um cirurgião relatou taxas

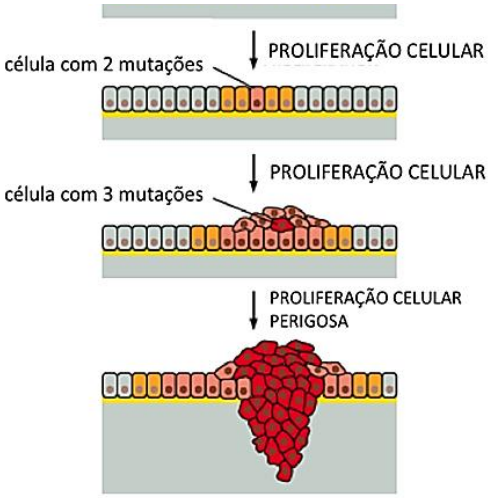
inusitadamente elevadas de cânceres nasais em cavalheiros que costumavam cheirar rapé. (Weinberg, 2000)

Com a invenção do microscópio do século 18, foi descoberto que o câncer espalha a partir de um tumor primário através dos nódulos linfáticos para outros lugares, posteriormente denominada de metástase, descrita pelo cirurgião inglês Campbell de Morgan entre 1871 a 1874. (Hajdu, 2012)

O uso de cirurgia na prática de tratamento de câncer não obteve sucesso devido da falta de higiene em seus primórdios. O cirurgião escocês Alexandre Monro acompanhou somente 2 pacientes de 60 dos quais sobreviveram a cirurgia. No século 19, a assepsia foi implantada e as estatísticas de sobrevivência pós-cirúrgica aumentaram, tornando a técnica de remoção cirúrgica a principal para tratamento para o câncer. O primeiro tratamento eficaz de câncer não cirúrgico surgiu no final do século 19 quando Marie Curie e Pierre Curie descobriram a radiação. (Hajdu, 2012)

Com estudos relevantes e investimentos na pesquisa e na saúde, hoje podemos dizer que o câncer é um termo designado para descrever um conjunto de doenças caracterizadas pela proliferação descontrolada das células levando a formação de um tecido anormal, o tumor. Esse tumor pode se disseminar em outras regiões do corpo através da corrente sanguínea ou canais linfáticos, por exemplo, e obter a formação de outros tumores secundários, conhecidos por metastáticos (Figura 1). (Sudhakar, 2009)

Figura 1 Evolução de uma célula cancerígena

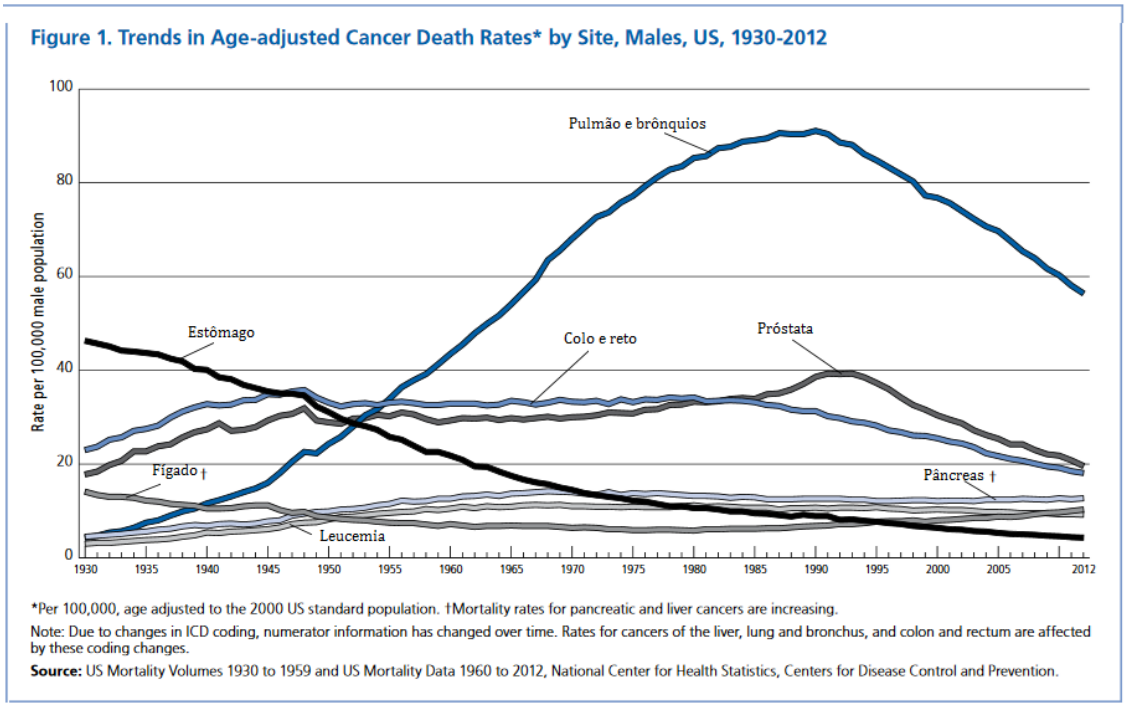


Fonte: Alberts, B. et al. Molecular biology of the cell, Capítulo 20 – Câncer. 6ed, 2015

Células cancerosas podem ser desenvolvidas a partir de células normais devido ao dano ocorrido no DNA. A maioria desses danos é corrigida por diversas enzimas envolvidas no processo de replicação e análise do material genético. Quando isso não ocorre, o DNA não é reparado e possivelmente essa célula será uma formadora de algum tipo de câncer. Cada formação de tumor é individual e cada uma segue um padrão de comportamento e propagação, no caso de metástase. A metástase óssea, por exemplo, é muito comum em cânceres de próstata, mama, brônquios, tireoide e rim. (Weinberg, 2000)

O câncer é considerado um problema de saúde pública mundial. Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) estima-se que dentro de 15 anos sejam detectados 27 milhões de novos casos, com 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas com câncer anualmente. Dados da Sociedade Americana de Câncer (EUA) demonstram que o câncer de próstata é um dos mais prevalentes na população masculina (Figura 2). Segundo estimativas do INCA (Instituto Nacional de Câncer) e Ministério da Saúde para o ano de 2014 no Brasil (válidas também em 2015), o câncer de próstata é a segunda neoplasia mais recorrente em homens, seguindo a mesma tendência mundial. (Oncoguia, 2015) (INCA, 2013)

Figura 2 Taxas de mortalidade anual de diferentes tipos de câncer nos Estados Unidos (1930-2012)



Fonte: Cancer Facts & Figures, American Cancer Society, 2016.

Câncer de Próstata (CaP)

O câncer de próstata é uma patologia desenvolvida a partir de uma glândula sexual masculina, a próstata.

A próstata é um órgão de reprodução que é responsável pela produção do líquido seminal, que é um líquido espesso que contém os espermatozoides. É também dentro da próstata que ocorre a transformação do principal hormônio masculino – a testosterona – em di-idrotestosterona, responsável pelo controle de crescimento da glândula. (Longo, 2015)

Huggins e Hodges em 1941 descobriram que o crescimento do câncer prostático dependia da estimulação produzida a partir do hormônio masculino, testosterona. Após essa descoberta, eles apresentaram valores distintos de fosfatases no soro de homens saudáveis e em doentes com câncer de próstata. Foi possível demonstrar que os níveis séricos de fosfatase ácida eram reduzidos a partir da diminuição da atividade de andrógenos e tornou-se relevante após a injeção de andrógenos. Devido à fosfatase ácida ser uma enzima sintetizada na

próstata (prostatic acid phosphatase - PAP), eles propuseram a extirpação de ambos os testículos (castração) como o primeiro método afim de diminuir os níveis de testosterona no soro e tendo como finalidade a desaceleração do crescimento do câncer. (Glina, Rivero, Morales, & Morgentaler, 2010) (Longo, 2015)

Na década de 80, a descoberta de um antígeno se mostrou mais sensível a PAP para a detecção do câncer de próstata. O uso do antígeno prostático específico (PSA) teve efeitos sob o diagnóstico e tratamento do câncer de próstata. PSA é um marcador tumoral de grande importância na avaliação de homens referente à possibilidade de expressar o CaP. Apresentando alteração (aumento) na produção em mais de 99% de todos os tipos de cânceres de próstata, o PSA é confiável para o monitoramento da doença em resposta a terapia escolhida. (Oh & Kantoff, 1998) (Seamonds B, 1986) (Stenman U. H., Leinonen, Zhang, & Finne, 1999)

Fatores de Riscos

Chama-se fator de risco a qualquer situação que aumente a probabilidade de ocorrência de uma doença ou agravo à saúde. (Dicionário de Sinônimos, s.d.)

Ter um fator de risco ou vários não significa que a pessoa necessariamente desenvolverá a doença ou que poderá contrair outros tipos de doenças, mas apresentará uma probabilidade estatística maior para que esta se manifeste. Se uma pessoa com câncer de próstata tem um fator de risco, é difícil estimar quanto esse fator pode ter contribuído para o desenvolvimento da doença (Oncoguia, 2015). Dentre esses fatores podemos citar (Medeiros, Menezes, & Napoleão, 2010) (Saman, et al., 2014) (Mottet, et al., 2014):

- ◊ Idade: o câncer prostático é muito raro em homens acima de 40 anos, mas a chance do surgimento de algum tipo de câncer aumenta rapidamente a partir dos 50 anos.
- ◊ Obesidade: acredita-se que homens obesos têm maior chance de ter câncer prostático mais agressivo.
- ◊ Histórico Familiar: parentes de primeiro grau diagnosticados com câncer de próstata duplicam a possibilidade do desenvolvimento da doença.

- ◊ Dieta: homens que consomem grande quantidade de cálcio através de alimentos ou suplementos ou até mesmo carne vermelha e laticínios podem ter um maior risco de câncer de próstata.
- ◊ Genes: alterações genéticas podem aumentar o risco do desenvolvimento de mais de um tipo de câncer. Mutações como BRCA-1 ou BRCA-2 podem aumentar a probabilidade de risco de câncer em ovários e mama.
- ◊ Exposição ocupacional: exposição a produtos de combustão tóxicos leva a um risco aumentado de câncer prostático.
- ◊ Tabagismo: estudos recentes mostraram um possível aumento no risco de morte por câncer de próstata.
- ◊ Inflamação na Próstata: a prostatite pode estar associada a um risco aumentado de câncer de próstata. A inflamação é muitas vezes detectada em amostras de tecidos que contêm câncer.
- ◊ Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs): doenças como gonorreia e clamídia podem aumentar o risco de câncer de próstata.

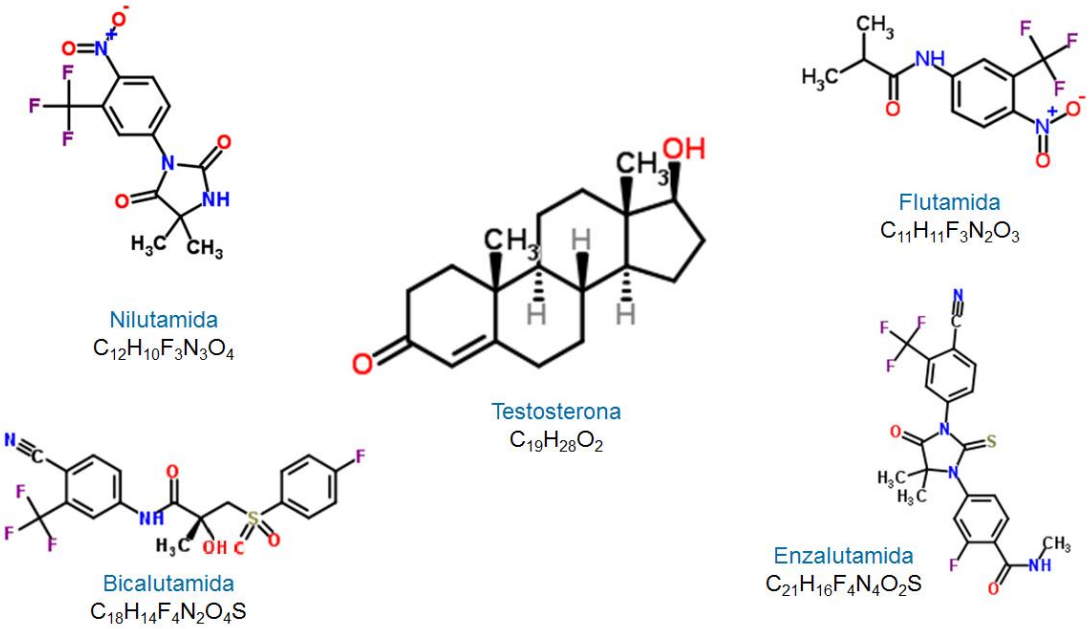
Terapias

O câncer de próstata pode ser tratado das seguintes maneiras (Madureira, 2015):

- Terapia de Supressão Androgênica
  1ª linha de tratamento conhecida como hormônio sensível
- Orquidectomia (ablação do testículo bilateral)
  Antagonista de liberação de hormônio luteinizante (LH)
  Hormônio de liberação de Gonadotrofina coriônica (GnRH)
- Terapia Antiandrogênica (esteroides e não esteroides)
- Inibidores de síntese de esteroides
- Terapia hormonal com estrogênio
- Quimioterapia
- Imunoterapia
- Prostatectomia radical e/ou parcial

A neoplasia prostática, inicialmente, é hormônio dependente, ou seja, o câncer se desenvolve a partir da estimulação dos receptores andrógeno a partir da interação do hormônio testosterona ou di-idrotestosterona levando a uma multiplicação celular. Atualmente, a terapia é baseada no uso de compostos antagonistas do receptor andrógeno, como nilutamida, bicalutamida, flutamida e enzalutamida (Figura 3). Estes fármacos interagem no domínio de ligação do receptor de andrógeno e competem com os hormônios para interromper a proliferação celular. (Dossetter, 2012)

Figura 3 Hormônio masculino testosterona e substâncias supressoras da atividade androgênica



Fonte: Representações das estruturas obtidas do site http://www.chemspider.com

Síntese de produção de Andrógenos

Em 1935 Ernet Laqueur, isolou e identificou quimicamente a testosterona. (Taylor, 2002). Esta foi uma etapa essencial para todos os estudos posteriores que relacionaram sua produção com o câncer de próstata

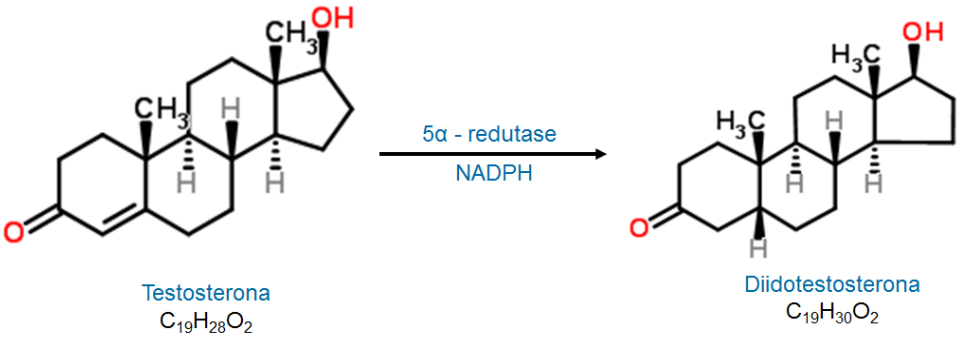
O termo andrógeno é usado para qualquer composto natural ou sintético, geralmente hormônio, que estimula e controla o desenvolvimento e manutenção de características masculinas de vertebrados ao ligar-se com um receptor

andrógeno. Inclui dessa forma a atividade dos órgãos e o desenvolvimento de características sexuais secundárias masculinas. (Taylor, 2002)

Nos homens, o principal andrógeno circulante é a testosterona e sua produção é realizada pelas células de Leydig localizadas nos testículos. (Taylor, 2002) (H. P. Rang, 2007)

Na maioria das células alvos a testosterona atua através de um metabólito ativo, a di-idrotestosterona, cuja conversão ocorre na enzima 5α-redutase (Figura 4). Em contraste, a testosterona sozinha, causa virilização, ou seja, desenvolvimento diferenciado corpo da mulher e do homem, no trato genital no embrião masculino e a regularização do hormônio luteinizante/hormônio estimulante de células intersticiais (LH/ICSH) pelas células da hipófise anterior. A testosterona e a di-idrotestosterona modificam e transformam a transcrição gênica a partir da interação nos receptores nucleares, conhecidos como receptores andrógenos. (H. P. Rang, 2007)

Figura 4 Estruturas químicas da testosterona e seu metabólito di-idrotestosterona

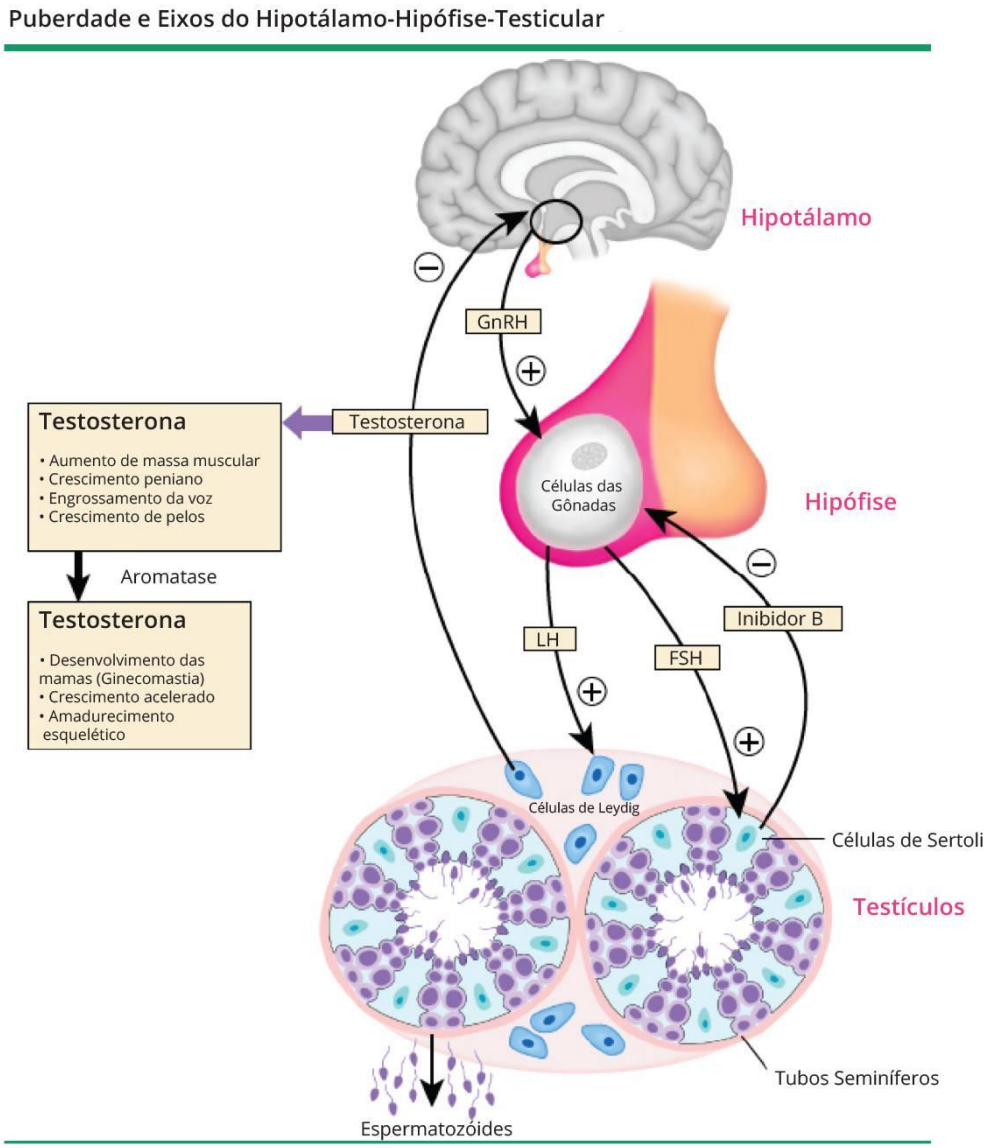


Fonte: Representações das estruturas obtidas do site http://www.chemspider.com

O controle neuro-hormonal do sistema reprodutor masculino se deve a partir das secreções endócrinas do hipotálamo, hipófise anterior e gônadas. Assim, o hormônio da gonadotrofina coriônica (GnRH) é responsável por controlar as secreções da gonodotrofina pela hipófise anterior. O hormônio folículo estimulante (FSH) é responsável pela proteção dos túbulos seminíferos que, por sua vez, são importantes na gametogênese através das células de Sertoli que cuidam do desenvolvimento dos espermatozoides. O LH que também chamado por ICSH,

estimula as células de Leydig a secretar andrógenos, sendo nesse caso a testosterona propriamente. A secreção LH/ICSH iniciada na puberdade tem por função levar a maturação dos órgãos masculinos reprodutores e em consequência suas características secundárias. Assim, a testosterona é secretada pelos testículos em conjunto com os demais andrógenos como a di-idroxiandrostenediona (DHA), androstenediona e sulfato DHA, que são sintetizados a partir do colesterol (Figura 5). (H. P. Rang, 2007) (Abraham & Staffurth, 2008)

Figura 5 Etapas para a produção do Andrógeno



Fonte: Imagem adaptada

http://www.smarthormonebalance.com/testosterone-in-men/

Todos estes andrógenos mencionados são metabolizados mediante a enzima 5α-redutase, como dito anteriormente, dentro da próstata levando a formação de 5α-dihidrotestosterona (DHT). Este andrógeno é biologicamente mais potente, pois sua afinidade pelo receptor andrógeno é 3 a 5 vezes maior do que a testosterona. (Abraham & Staffurth, 2008)

A função principal da testosterona, após esse ciclo, é a manutenção da espermatogênese e, consequentemente, a fertilidade – ação mediada pelas células de Sertoli. A testosterona é também importante na manutenção dos espermatozoides, quando ocorre sua passagem pelo epidídimo e pelo ducto deferente. Além disso, a testosterona exerce efeitos anabólicos levando ao desenvolvimento de musculatura e ao crescimento ósseo. (H. P. Rang, 2007)

A secreção da testosterona é controlada pela LH/ICSH, mas o FSH tem como papel de liberação de um fator similar ao GnRH pelas células de Sertoli – seus alvos primários. As células intersticiais que sintetizam a testosterona também possuem receptores para prolactina, que por sua vez podem influenciar na produção de testosterona pelo aumento dos números de receptores pela LH/ICSH. (H. P. Rang, 2007) Desta forma, a testosterona é o hormônio responsável pela fisiologia da próstata, onde sua desregulação poderá levar a processos patológicos distintos.

Ensaios Celulares

O cultivo celular foi datado no início do século XX por Harrison em 1907 e Carrel em 1912. Essa técnica teve por finalidade um inovador método para estudar o comportamento das células animais fora do organismo e em um ambiente controlado. Os primeiros estudos consistiam em cultivos de tecidos fragmentados mecanicamente em um frasco contendo o fluido do animal de onde provinha o material. (Molinaro, 2010)

Harrison foi o pioneiro no uso de cultura de células e conseguiu provar que as fibras nervosas eram formadas a partir de células nervosas a partir de um tubo medular de um embrião de sapo. (Maramorosch, 1987) Carrel em 1912 utilizou as informações de Harrison e desenvolveu um modelo a partir de células cardíacas de embrião de galinha. A partir do seu experimento, descobriu-se a necessidade de

realizar a troca de nutrientes constante. Em 1951, George Gey cultivou célula de tecido tumoral humano estabelecendo a linhagem celular HeLa, utilizada até os dias de hoje. (Molinaro, 2010)

Em 1955, Harry Eagle decidiu estudar o metabolismo e o crescimento das células *in vitro*. Insatisfeito com os meios utilizados na época, ele elaborou melhores condições de meio e desenvolveu o clássico, meio de crescimento essencial mínimo quimicamente definido (MEM) que se tornou uma ferramenta essencial para os experimentos. Em 1958, Harry Eagle e George Foley propuseram o uso de cultura de células para o rastreio de agentes antitumorais, (Maramorosch, 1987) seguido de outro avanço descrito por Hayflick e Moorhead em 1961, quando começaram a utilizar células de vida finita. (Maramorosch, 1987)

Como observado em todos os modelos, há uma limitação em termos da sua capacidade biomimética quando comparada com o estudo em animal. As células utilizadas em cultivos celulares não condizem fielmente com a sua função fisiológica devido à perda de características durante sua adaptação *in vitro*. A proliferação *in vitro* difere da *in vivo*, mesmo sendo o modelo mais próximo da realidade. O processo *in vitro* ainda tem problemas em seu desenvolvimento celular, como a adesão célula-célula e célula-matriz reduzida e não possuem as mesmas características tridimensionais que uma célula *in vivo*. (Molinaro, 2010)

Catepsinas

Catepsinas são peptidases comumente expressa em diversos tipos de células e organismos vivos. Dentre elas existem as cisteínos proteases, ou seja, são responsáveis por degradarem proteínas por meio do grupo reativo tiolato. Essas proteases partilham de uma tríade catalítica. Juntamente com as metaloproteases de matriz (MMPs) e a serina protease, as cisteíno proteases são responsáveis por degradarem a matriz extracelular facilitando a migração e invasão do tecido neoplásico. (Nelson, Cox, & Lehningher, 2006)

Dentre as catepsinas mais estudadas, destacamos as cisteínos proteases da subfamília da papaína (catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, X, W) que predominam em vesículas endolisossomais. As catepsinas B e L são de grande importância para a regulação da síntese e degradação de proteínas. (Mostafa & Sloane, 2006)

Há também a expressão de algumas cisteíno proteases em grande quantidade especificamente em algumas células, como a catepsina K, que é responsável pela remodelação óssea no osteoclasto; a catepsina S presente no sistema imunológico. A catepsina B foi a primeira a ser relacionada com o câncer e a sua participação se deve ao crescimento e invasão tumoral. (Mostafa & Sloane, 2006) (Turk & Kos, 2004)

Descobriu-se que uma das classes das catepsinas tem como potencial alvo no tratamento de câncer. (Palermo & Joyce, 2008). Sabendo-se que elas são altamente expressas em tumores malignos e tem vários papeis na progressão cancerígena gerando a desregulação de catepsinas e a progressão da doença. (Mostafa & Sloane, 2006) (Brubaker, Vessella, True, Thomas, & Corey, 2003) (Lankelma, et al., 2010)

O aumento da catepsina L tem envolvimento na progressão tumoral e pode ser utilizada como marcador para algumas neoplasias quando atribuídas a um processo: angiogênese, proliferação celular, invasão e metástase. A expressão de várias catepsinas tem sido relatada em câncer de próstata e na progressão da doença e metástase óssea. (Gocheva & Joyce, 2007) (Goulet, et al., 2007) (Colella, Jackson, & Goodwyn, 2004) (Brubaker, Vessella, True, Thomas, & Corey, 2003) Desta forma, estas enzimas são importantes alvos macromoleculares para serem estudados por meio de substâncias com atividade moduladora com a finalidade de obter novos compostos com atividade antineoplásica.

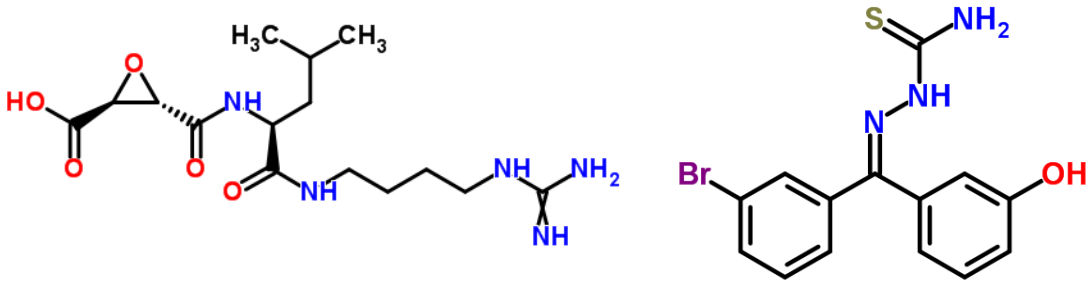
Inibidores de Catepsinas

Peptideomiméticos como epóxidos leupeptina e peptidil, além do E-64, são usados como inibidores de catepsinas. O E-64 é um inibidor de cisteíno protease lisossomal que tem uma baixa degradação e foi testado para distrofia muscular em animais, mas falhou em triagens humanas. Um dos principais problemas relacionados a vários desses inibidores é a baixa seletividade por causa do baixo reconhecimento intermolecular para as catepsinas de interesse (Figura 6). (Romme & Wilson, 2011) Já KGP94 atua como inibidora da catepsina L. Sua função

é suprir a metástase tumoral associada às células do câncer de próstata e mama (Figura 6). (Sudhan, 2013)

As serpinas (*serine protease or peptidase inhibitors*) estão incorporadas a alpha-1-antitripsina (AAT) que são responsáveis por inibir a tripsina, a elastase neutrofílica e a protease-3. Outras serpinas são o complemento 1-inibidor, a antitrombina, plasminogênio e coagulação fibrinólise. (Stoller & Aboussouan, 2012) (DeMeo & Silverman, 2004)

Figura 6 Representação dos inibidores de catepsina



E-64 **KGP94**

Fonte: Representações das estruturas obtidas do site http://www.chemspider.com

Alvos de Rapamicina em Mamíferos - mTOR

Mammalian target of rapamycin (mTOR) é uma serina/treonina quinase responsável por controlar o crescimento celular, proliferação e a sobrevivência (Figura 7).

mTOR contêm um domínio catalítico semelhante ao encontrado em quinases de lipídios de fosfatidilinositol (PI) 3-kinase (PI3K), Figura 7. A família da PI3K é responsável por fosforilar o anel inositol no qual são divididas em 3 classes de estruturas de especificidade de substrato. Figura 8. (Ballou, 2008)

Figura 7 Representação das estruturas pertencentes na formação da mTOR

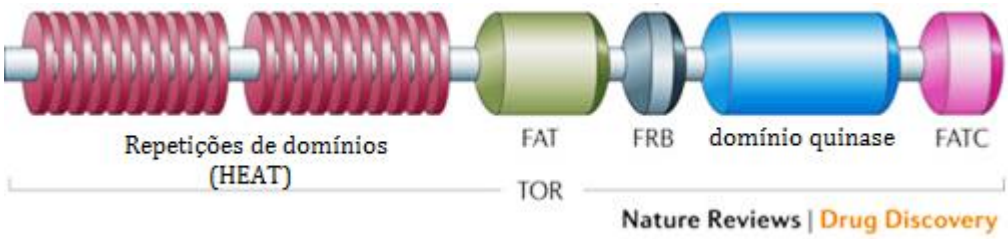


Figura adaptada de Don Benjamin, D. et al. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. (2011) *Nat. Rev. Drug Discov.*, 10, 868-880

A classe I é subdividida em IA e IB. Ambas estão presentes as isoformas p110 que são altamente homólogas e partilham de quatro domínios (p110α, p110β, p110δ e p110γ) que são heterodímeros com uma variedade de subunidade reguladora. Estas enzimas são responsáveis por fosforilar a PI 4,5-bisfosfato (PI (4,5) P2) *in vivo*. A estrutura p110γ abriga o ATP e vários inibidores e têm sido fundamentais para determinar relações estrutura-atividade para inibidores de PI3K. A estrutura de p110α ligado a um fragmento de uma das suas subunidades reguladoras. (Ballou, 2008)

As isoformas p85 possuem 3 subunidades (p85α, p85β e p85γ) que são responsáveis pelo domínio de regulação e se ligam ao N-terminal da subunidade p110 através de seu domínio iSH2 inibindo a atividade catalítica. (Ballou, 2008)

A classe II é composta de um monômero de uma única subunidade catalítica que é formado pela PI3KC (PI3K C2α, C2β e C2γ) e cada um tem seu divergente terminal N que é responsável por fosforilar PI e é onde contêm um domínio C2 (terminal C) que é encontrado somente nessa classe. (Ballou, 2008)

A classe III é composta de uma única subunidade catalítica (domínio catalítico) formado pela VPS34 que é um homólogo de levedura da proteína vascular 34. Ela é responsável por fosforilar PI e desempenha um papel na regulação da mTOR por aminoácidos. O tipo III PI-4-quinase (PI4K) fosforila 4'-anel do inositol do hidroxilo e está relacionado diretamente com a PI3K. (Ballou, 2008)

Figura 8 Representação das três classes presentes na estrutura PI3K

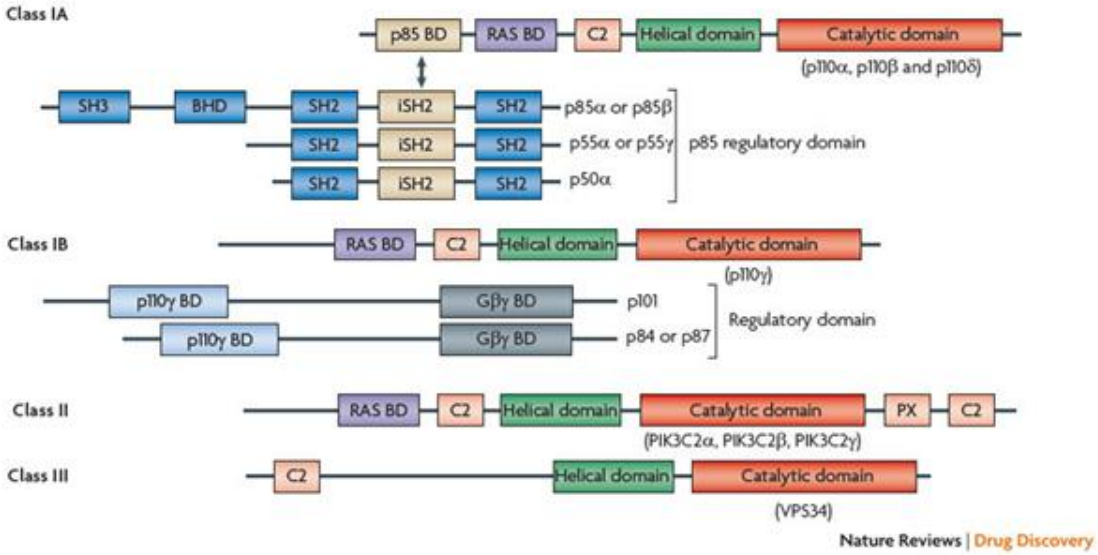


Figura adaptada de Lui, P. et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer (2009) *Nat. Rev. Drug Discov.*, 8, 627-644

Transdução de sinal da mTOR e funções celulares

A rapamicina foi identificada pela primeira vez após o isolamento da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*. Inicialmente, esse composto foi utilizado principalmente por suas características antifúngicas e, anos mais tarde, a sua ação contra fungos foi abandonada e seu uso foi preconizado em tratamentos de câncer devido sua forte ação imunossupressora. A ação antiproliferativa da rapamicina se mostrou de grande relevância como substância antineoplásica devido à capacidade de modular vias de transdução de sinal a partir de estímulos para a síntese de proteínas presentes no ciclo celular das fases G1 e S. (Magnuson, 2012)

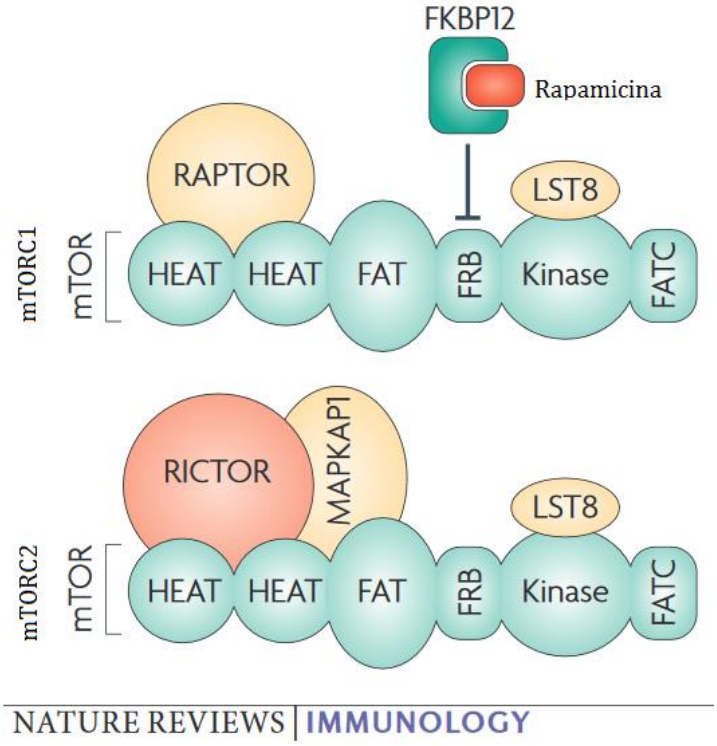
Como descrito anteriormente, mTOR é responsável por regular a via de transdução de sinal e está envolvida no acoplamento de estímulos de crescimento de progressão do ciclo celular. A enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e a proteína quinase B (Akt) formam um complexo PI3K/Akt que são responsáveis pelo estado de fosforilação da mTOR. Desta forma, a mTOR ativada regula diferentes subunidades para produzir complexos de sinalização, função e sensibilidade da rapamicina. (Ballou, 2008)

O complexo mTORC1 (contendo mTOR, Raptor e mLST8) é responsável por fosforilar a proteína ribossomal S6 quinase (S6K) em Thr389 e o repressor 4EBP1 tradução e é sensível à rapamicina. Os processos biológicos regulados pela mTORC1 incluem tradução, biogênese ribossomal, autofagia, metabolismo da glicose e resposta celular à hipóxia, Figura 9. (Ballou, 2008) (Zhou, 2010)

O complexo mTORC2 (contendo mTOR, Rictor, mLST8 e mSin1) é responsável por fosforilar a proteína quinase Akt em Ser473 e é insensível à rapamicina, Figura 9. (Ballou, 2008) (Zhou, 2010)

Em comparação com a mTORC1, a função da mTORC2 é menos clara e sua resposta não é de alta eficiência. Entretanto, dados sugerem que mTORC2 é importante para a sobrevivência das células e organização da actina no citoesqueleto. (Zhou, 2010)

Figura 9 Estrutura da mTORC1 e mTORC2 sinalizando a estrutura RAPTOR e RICTOR



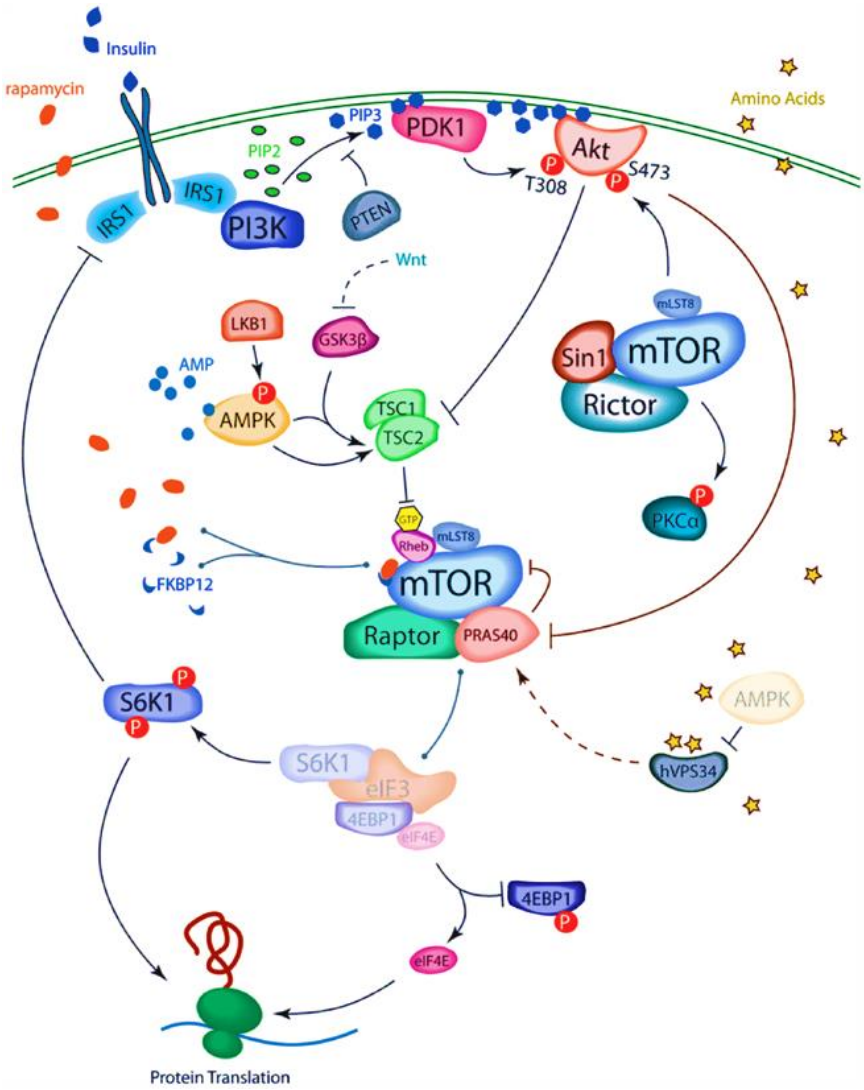
Fonte: imagem adaptada de Thomson, A.W; Turnquist, H.R. & Raimondi, G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. 2009. Nat. Rev. Immunol., 9, 324-337

Akt é responsável por controlar mTORC1 em parte através da esclerose tuberosa complexo (TSC). TSC2 forma um complexo com TSC1 e a atividade da GAP (GTPase-ativador de proteínas) TSC1/TSC2 converte Rheb em um estado ligado GDP inativo suprindo a atividade da mTOR. A presença de fatores de crescimento faz com que ocorra a ativação da Akt, sendo que Akt fosforila TSC2 em Ser939 e Thr1462 inibindo sua atividade GAP. Dessa forma, Rheb mantem uma "forma ligada" a GTP ativa (que irá ativar mTORC1) e será responsável por sinalizar S6K e 4EBP1. (Ballou, 2008) (Faivre, 2006)

Uma via de detecção de energia também regula a atividade da mTOR. A inibição da mTOR em resposta a baixos níveis de energia é medido pela quinase AMP ativa (AMPK) e seu ativador de proteína quinase LKB1. Quando ATP intracelular é reduzido, o nível de AMP é aumentado, AMP se liga a AMPK permitindo que LKB1 fosforile Thr172 na subunidade catalítica α para ativar AMPK. Após, AMPK fosforila TSC2 na Ser1345 para posterior fosforilação de Ser1341 e Ser1337 no glicogênio sintase. (Zhou, Luo, & Huang, 2010) (Faivre, 2006)

Dessa forma, aumentando a atividade de GAP TSC2, inativando Rheb ocorre o desligamento da sinalização de mTORC1. Hipóxia e níveis baixos de aminoácidos regulam a atividade da mTOR. (Figura 10)

Figura 10 Sinalização da via mTOR para início de transdução proteica



Fonte: imagem adaptada de Yang, Q. and Liang, K. Expanding mTOR signaling (2007) *Cell Res.* 17(8):666-81.

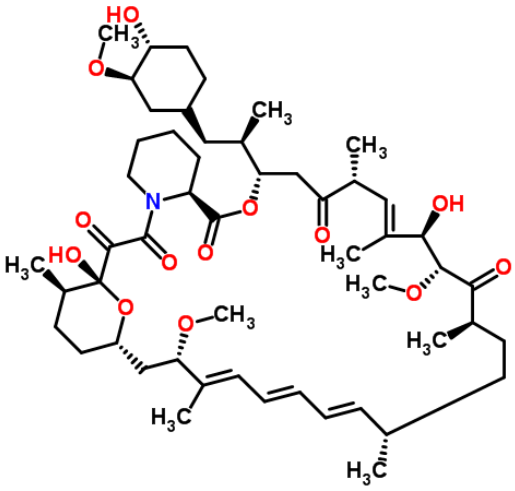
Inibidores da cascata mTOR

Rapamicina e seus análogos

A rapamicina foi encontrada pela primeira vez a partir de uma amostra de solo da Ilha de Páscoa (Rapa Nui) durante um programa de descoberta de agentes antimicrobianos em 1975. Trata-se uma lactona macrocíclica produzido por *Streptomyces hygroscopicus* e inicialmente teve seu desenvolvimento como um agente antifúngico; subsequentemente descobriu-se suas propriedades potentes

imunossopressoras. A partir desses estudos, a rapamicina foi descrita como o primeiro inibidor de mTOR descoberto, cuja estrutura química está representada na Figura 11. (Ballou, 2008)

Figura 11 Estrutura química do composto rapamicina



Fonte: http://www.chemspider.com/

Estudos pré-clínicos sobre o efeito imunossopressor da rapamicina foram realizados desde sua descoberta como agente antifúngico em 1972 e, em 1999, foi aprovado como um fármaco imunossupressor pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA. (Huang & Houghton, 2010)

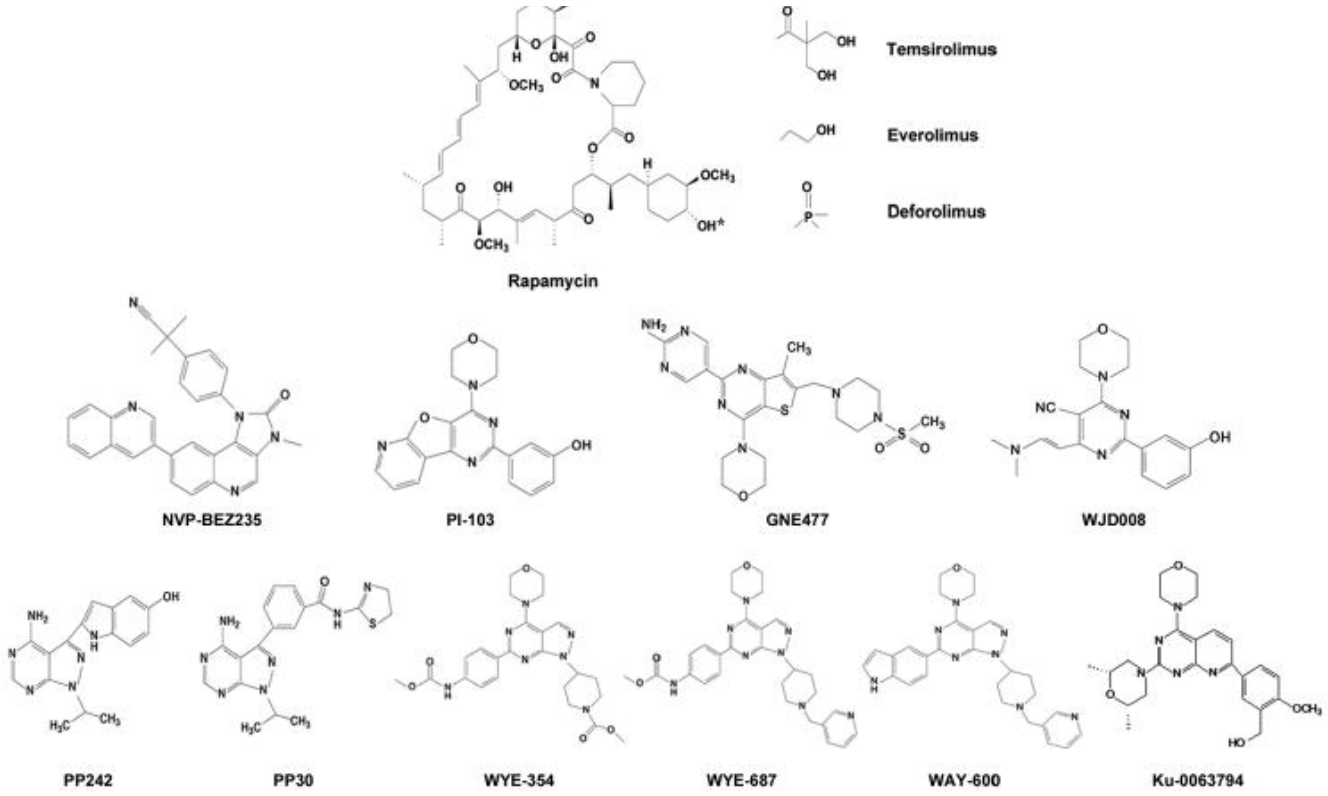
Amplos estudos revelaram o mecanismo de ação da rapamicina, desde ao entrar na célula e ligar-se à FKBP12 (receptor intracelular), formando um complexo inibidor e juntas ligam-se na região C-terminal da proteína TOR denominada FRB (FKB12-rapamicina-domínio de ligação) exercendo assim efeitos inibidores de crescimento da célula e inibindo os efeitos citotóxicos por funções de sinalização da TOR, inibindo consequentemente o acoplamento de mTORC1 com seus substratos. Tem sido descrito que o ácido fosfatídico (PA) e o metabólito de fosfolipase D (PLD) são necessários para a estabilização da mTORC1 e mTORC2 podendo dessa forma explicar o diferencial de sensibilidade frente à rapamicina e revelar o mecanismo pelo qual a rapamicina inibe a mTOR. (Faivre, 2006)

A rapamicina inibe potencialmente a proliferação celular em linhagens celulares derivados de neuroblastoma, glioblastoma, cancro de pulmão, câncer

pancreático, câncer de mama, câncer de próstata, melanoma e linfoma de células B. (Faivre, 2006) (Huang, 2010)

Devido a sua alta estabilidade e baixa solubilidade em água, rapalogs foram criados para melhorar a farmacocinética e reduzir efeitos imunossupressores analisados em ensaios clínicos. Esses rapalogs incluem o temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD001) e deforolimus (AP23573), mostrados na Figura 12. Além disso, outros rapalogs, tais como a 32 desoxi-rapamicina (SAR943) ou zotarolimus (ABT-578), foram desenvolvidos para evitar alergia crônica. (Ballou, 2008)

Figura 12 Representação química de diversos inibidores da mTOR



Fonte: Figura adaptada de (Ballou, 2008)

Rapalogs são responsáveis por compartilharem o mesmo mecanismo de ação da rapamicina. Primeiramente formam um complexo FKBP12 seguindo na presença do complexo FRB no domínio da mTOR para inibir sua função. (Ballou, 2008)

Temsirolimus (Figura 12), por exemplo, é um éster de ácido propiônico de di-idroximetil de rapamicina concebido para aumentar a solubilidade de rapamicina e pode ser administrado tanto oralmente quanto por via intravenosa. Assim, temsirolimus suprime a atividade da mTOR e inibe a fosforilação mediada por mTOR de S6K1 e 4E-BP1, com expressão decrescente de várias proteínas-chave envolvidas na regulação do ciclo celular. (Ballou, 2008)

Inibidores de dupla especificidade de mTOR e PI3K

Têm-se uma pequena classe de moléculas correlacionadas para a inibição de quinase de mTOR e inibidores de especificidade de PI3K que são GNE477, NVP-BEZ235, PI-103, XL765 e WJD008 (Figura 12). Elas são utilizadas como ferramentas de pesquisa para estudo de regulação ou função de mTOR. Assim suas vantagens sobre os inibidores de alvo único dependem do tipo de doença, porque elas podem atingir pelo menos 3 enzimas chaves na via PI3K (PI3K, Akt e mTOR). (Zhou, 2010)

A atividade de inibição da mTORC1 juntamente com rapalogs pode resultar na melhora do eixo PI3K devido ao ciclo de feedback negativo mTOR-S6K-IRS1. Portanto, inibidores da mTOR e PI3K possuem dupla seletividade podendo ser suficientemente potente para evitar a via de reativação PI3K. (Zhou, 2010)

NVP-BEZ235 (Figura 12), por exemplo, é um novo inibidor para a classe I de PI3K/mTOR. É uma imidazoquinolina que ainda está em estudos clínicos nas fases I/II. Sabe-se que NVP-BEZ235 liga-se no ATP interagindo com PI3K e mTOR, ocorrendo dessa forma a inibição de sua atividade. (Zhou, 2010) (Serra, Di Cosimo, Maira, 2008)

PI-103 é outro inibidor de dupla seletividade. É uma molécula pequena da classe dos piridofuropirimidina. Os recombinantes de PI-103 inibiram as isoformas de PI3K, p110α, p110β, e p110δ, bem como suprimiu mTOR e DNA-PK. Esse composto apresentou efeitos inibitórios sobre a proliferação celular e a invasão de uma ampla variedade de células de cancro humano *in vitro*. Em modelos de xenoenxerto (um enxerto cirúrgico de tecido de uma espécie para outra distinta), PI-103 inibiu o crescimento tumoral, invasão e angiogênese. PI-103 demonstrou

melhora e eficácia em tratamentos com radioterapia e tornou sensível a apoptose induzida por quimioterapia. (Zhou, Luo, & Huang, 2010)

Seletividade de inibidores mTORC1/ 2

Uma nova geração de inibidores de mTOR que compete com o ATP no sítio catalítico mostrou uma potente inibição e seletividade frente a mTOR. Essas moléculas são: PP242, PP30, Torin1, Ku-0063794, WAY-600, WYE-687 e WYE-354 (Figura 12).

Ao contrário da via de inibição PI3K/mTOR, elas inibem seletivamente mTORc1 e/ou mTORC2 sem inibir outras quinases. Foi demonstrado que estes compostos inibem potencialmente tanto mTORC1 e mTORC2 em concentrações nanomolares, conforme determinado pela fosforilação da S6K1 e da fosforilação do Akt em S473, respectivamente. (Feldman, 2009)

Comparado com a rapamicina, PP242 e Torin1 prejudicam a proliferação de células primárias de um grau muito maior. Supõe-se que a capacidade de inibidores de PP242 e Torin1 para bloquear a proliferação de células seja mais eficiente do que a rapamicina, provavelmente como resultado da capacidade de inibir a mTORC2, além da mTORC1. (Feldman, 2009)

Ku-0063794, WAY-600, WYE-687 e WYE-354 (Figura 12), os quais são os mais recentes inibidores de mTOR ATP competitivos, também inibiram de forma eficaz mTORC1 e mTORC2, bem como suprimiram a proliferação celular e induzam uma parada no ciclo celular em G1 para diversas linhagens celulares de câncer. (Zhou, 2010)

No entanto, estudos são necessários para compreender os efeitos distintos e os mecanismos entre esses agentes farmacológicos e a rapamicina em segmentação do crescimento de células de cancro e a sua sobrevivência para avaliar a sua eficácia no tratamento de câncer e outras doenças em que há ativação da cascata PI3K-Akt-mTOR. (Zhou, 2010)

Ensaios Celulares

Método Colorimétrico

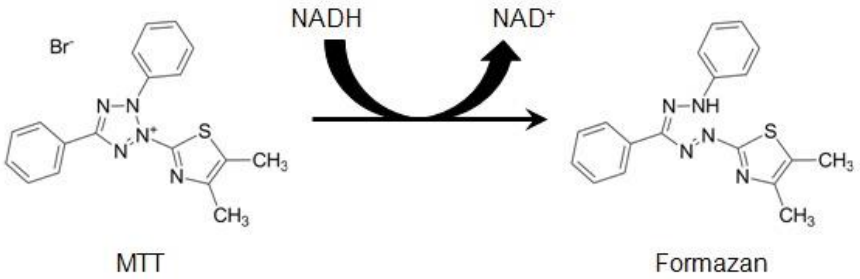
Segundo Mosmann, MTT é um método colorimétrico rápido com a finalidade de medir a proliferação celular e citotoxicidade. (Mosmann, 1983)

A viabilidade celular pode ser obtida mediante o uso de diferentes métodos colorimétricos. Estes são de grande utilidade para a triagem dos compostos com potencial de atividade biológica de interesse. Neste ensaio, o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico (sal) resulta a formação de cristais de formazan de cor roxa que acumulam nos compartimentos lisossomais sendo depois transportados para fora por exocitose. (Liu, 1997)

Idealmente o ensaio colorimétrico deve utilizar um substrato incolor (ou com coloração bem distinta do produto de metabolismo) que é modificado para um produto colorido somente pelas células vivas, evitando a interferência das células mortas ou o meio de cultura.

Os sais de tetrazólio são candidatos atrativos para este propósito, como o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2tiazol)-2,5-difeniltetrazólio). O formazan (produto de metabolismo) é solubilizado por meio de um agente solubilizante que é adicionado após a incubação do MTT nas células (Figura 13).

Figura 13 Reação de metabolismo do MTT



Fonte: G. Sitta Sittampalam. Assay Guidance Manual – Capítulo 2: Cell Viability Assay. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O projeto de pesquisa tem como objetivo principal a identificação de novas substâncias bioativas para o câncer de próstata através de ensaios celulares. Além disso, os ensaios de citotoxicidade também serão realizados para inibidores de cisteíno proteases e de quinases de interesse no grupo.

Objetivos Específicos

O objetivo geral deste projeto será alcançado por meio dos objetivos específicos mostrados a seguir:

- Compreensão das propriedades biológicas do sistema (célula) a partir da sua perturbação por agentes químicos;
- Avaliação da atividade farmacológica das substâncias de interesse em células de câncer de próstata resistentes (DU 145 e PC-3);
- Realização de estudos celulares *in vitro* para determinar o índice de seletividade (SI) usando a linhagem de fibroblasto de camundongo Balb-c 3T3;
- Estudos de sinalização PI3K-Akt-mTOR por meio da citometria de fluxo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

- As células Balb-c 3T3 clone A31 (*fibroblasto de camundongo – célula sem câncer*), PC - 3 (*Célula Metastática de Câncer de Próstata Presente em Osso*) e DU 145 (*Célula Metastática de Câncer de Próstata Presente no Cérebro*) foram obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) – Anexo;
- Soro Fetal Bovino (FBS), glicose, bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), solução 0,25% de tripsina com EDTA, dimetilsulfóxido, azul de tripan, dodecilsulfato de sódio (SDS), ácido acético (99,7%), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), benzonidazol e posaconazol foram adquirido da Sigma-Aldrich;
- Os compostos de referência (bicalutamida, enzalutamida, rapamicina, YM-155, doxorrubicina foram obtidos da Selleckchem LLC, EUA;
- Tampão Fosfato Dubelco (PBS) e meios de cultura F12K e DMEM foram obtidos pela Cultilab Mat. Cultura Celular Ltda, Campinas SP;
- Kit FlowCellect™ PI3K-mTOR Signaling Cascade Mapping da Merck-Millipore Corporation, Billerica, MA, USA.
- As linhagens Balb-c 3T3 clone A31 e DU 145 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 3,5 g/L de glicose e 1,5 g/L de NaHCO3,
- A linhagem PC-3 foi cultivada em meio Han F12K suplementado com 1,5 g/L de $NaHCO_3$;
- Todos os meios contêm 10% de soro de feto bovino (FBS), solução de penicilina/estreptomicina (1%) e foram utilizados em incubadora sob uma atmosfera de 5% de CO_2 e 90% de umidade a 37°C.
- Agente solubilizante usado no método colorimétrico: DMSO, SDS (10% m/v), ácido acético glacial (0,6% v/v).

Método

Crescimento Celular

Os meios de trabalho são: DMEM e F12K para as linhagens DU 145 e PC-3 respectivamente, suplementados com 10% FBS.

Para o cultivo celular houve o descongelamento das células seguido das passagens para a manutenção das células.

Descongelamento: foi descongelado 1 mL de células em uma concentração de $1x10^6$ células/mL (contidas em um tubo criogênico e armazenadas a -75°C), aquecidas em um banho a 37°C. Após esse processo, o conteúdo do tubo criogênico foi transferido a um tubo de centrífuga de 15 mL e adicionados 7 mL de meio, centrifugado durante 5 minutos a 300g para ambas as linhagens. Em seguida foi retirado o sobrenadante e as células foram ressuspendidas com 2 mL de meio e transferidas a um frasco para cultura celular T25 adicionando meio até um volume final de 5 mL. Cada frasco de cultura foi incubado durante o tempo suficiente para obter uma confluência de 75-80% de células em uma temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO_2. Diariamente o crescimento celular foi seguido mediante observação no microscópio trocando o meio cada dois dias até que atingisse a confluência desejada.

Passagem: Uma vez atingida a confluência celular, o meio foi extraído e adicionou-se 2 ou 4 mL de tripsina (para os frascos T25 ou T75, respectivamente), com incubação por 6 minutos a 37°C. Em seguida foi homogeneizado com meio (no mesmo volume utilizado de tripsina) e o volume total foi transferido a um tubo e centrifugado a 300g por 5 min. Após retirado o sobrenadante, as células foram ressuspendidas e transferidas em um novo frasco de cultura (T75) contendo um volume final de 10 mL.

Ensaios Celulares

Para a realização dos ensaios celulares com os compostos foram estabelecidas as condições iniciais de trabalho para cada linhagem. Ensaios

anteriores realizados pelo laboratório foram realizados para determinar a concentração celular de trabalho.

Tanto para os ensaios de crescimento e para os ensaios das triagens das moléculas, foi utilizado o método colorimétrico de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).

Método Colorimétrico

Curva de Crescimento

Primeiramente realizou-se o processo de incubação e crescimento de células nos frascos de cultura como descrito anteriormente. Após a última centrifugação, a solução sobrenadante foi retirada, e as células foram ressuspendidas em 2 mL de meio para a realização da contagem manual afim de determinar o número de células por mililitro com auxílio de uma câmara de Neubauer e o microscópio. A suspensão foi diluída até $1x10^6$ células/mL.

Em diferentes tubos foram preparadas 6 diferentes concentrações [C] para o teste: $3x10^5$; $2x10^5$; $1x10^5$; $7,5x10^4$; 5x104; $2,5x10^4$; $1x10^4$; $5x10^3$; $1x10^3$ células/mL.

Para realizar a curva de crescimento durante 7 dias, utiliza-se placas de 96 poços adicionando (uma concentração por fila) 100 µL de células nos poços desde a coluna 2 a 11 e desde a fila B a G e 100 µL de meio de cultura sem células aos poços que ficam nos extremos da placa (coluna 1 a 12 e filas A e H). Foram preenchidas de esse modo outras 6 placas.

Depois de preenchidas, as placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO_2. A primeira placa foi tratada após 24 horas de incubação, retirando-se o sobrenadante por aspiração (uso de agulha hipodérmica acoplado em uma bomba a vácuo) e adicionando 100 µL de solução MTT (5 mg de MTT por mL de PBS). Esta foi incubada por um período de 3 horas. Em seguida o sobrenadante contido nos poços foi retirado por meio de aspiração e foi adicionado 100 µL de agente solubilizante (10 g SDS, 100 mL DMSO e 0,6 mL de ácido acético glacial) em todos os poços e deixou-se em repouso por 1 hora.

Finalmente a leitura da placa foi feita no comprimento de onda de 570 nm no fluorímetro.

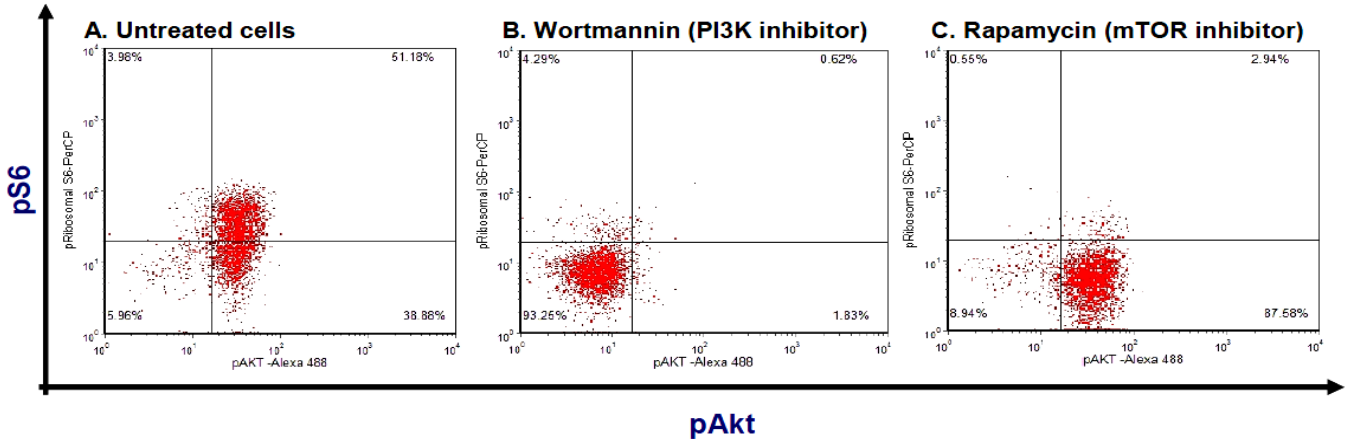
Triagem de compostos

Uma vez obtida a concentração ideal de crescimento, o seguinte passo foi determinar os valores de viabilidade ou citotoxicidade em ambas as linhagens frente às moléculas propostas. Inicialmente as células foram plaqueadas (placas de 96 poços de fundo chato) na concentração de $1x10^5$ células/mL e incubadas. Após 24 horas, o sobrenadante foi removido e os compostos de interesse foram adicionados. Os testes foram realizados a partir de 24 horas, 48 horas e 72 horas da incubação com os compostos. O sobrenadante foi removido dos poços, com adição de MTT e incubação por 3 horas. Após esta etapa, o sobrenadante foi removido e o agente solubilizante foi adicionado, seguido de nova incubação por 1 hora. A leitura foi realizada com o uso de um fluorímetro (Biotek Synergy HT) em 570 nm. Os testes foram realizados em quadruplicatas (4x) e em dois ensaios independentes.

Ensaio de citometria de fluxo - mTOR

O procedimento para os estudos de citometria de fluxo foi realizado utilizando placas de 96 poços de fundo redondo, seguindo o protocolo da Merk.-Millipore (*FlowCellect™ PI3K-mTOR Signaling Cascade Mapping*) modificando somente o volume final de células para ajustar a placa. Esse teste foi realizado a partir de várias lavagens, incubações com o padrão de interesse e com os anticorpos anti-pAKT e anti-pS6 que possuem fluoróforos ligados em sua estrutura. Após essas etapas, a leitura é realizada com o uso de um citômetro de fluxo, de acordo com o procedimento do fabricante do reagente. Caso AKT e S6 estejam fosforiladas, há uma grande intensidade de fluorescência (Figura 14).

Figura 14 Demonstração da inibição da via de inibição da PI3K-Akt-mTOR frente ao uso de compostos de referência



Fonte: Imagem adaptada do Kit Merck-Millipore FlowCellect™ PI3K-mTOR Signaling Cascade Mapping.

A adição de inibidores em diferentes pontos desta via de sinalização leva a alterações no perfil de fosforilação das proteínas. A rapamicina é um inibidor da mTOR e inibe somente a fosforilação da S6, que se situa ao final da via, enquanto que a wortmanina inibe a PI3K, levando a inibição da fosforilação de Akt e S6 (Figura 14).

Podemos observar que quando é utilizada a wortmanina, a intensidade do sinal de fluorescência é reduzida tanto para Akt quanto para S6. Com isto há um deslocamento para valores negativos nos dois quadrantes, ou seja, as células praticamente não possuem Akt ou S6 fosforiladas (Figura 14). Quando a rapamicina é incubada com as células, há somente fosforilação para Akt (que se encontra na via antes da mTOR e não é afetada por ela). No entanto S6 não está fosforilada, pois depende da ativação da mTOR para tal. Assim, é possível determinar em qual etapa as novas substâncias bioativas atuam.

Procedimento

Inicialmente é realizada a preparação dos reagentes: tampão de lavagem, tampão de fixação e tampão de ensaio.

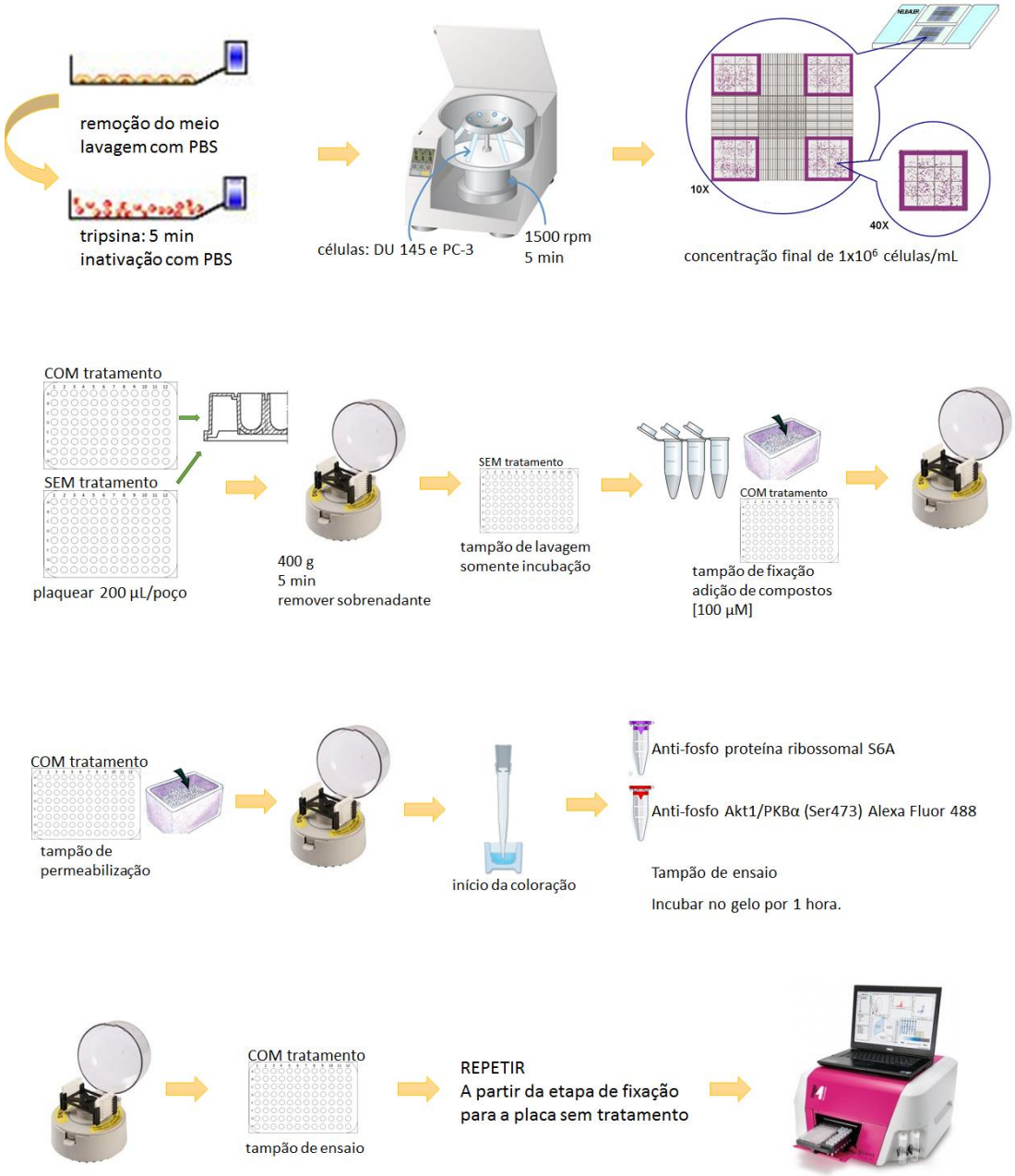
Tampão de lavagem: adicionar 1 mL o tampão de lavagem 10X para um recipiente adequado e ajustar o volume para 10 mL com água deionizada.

Tampão de fixação: para cada $1x10^6$ células adicionar 250 µL de tampão de fixação a 250 µL de 1X tampão de lavagem para fazer um volume final de 500 µL.

Tampão de ensaio: adicionar 50 µL de 5X Tampão de Ensaio para um recipiente apropriado, e ajustar o volume para 250 µL com água deionizada.

O procedimento se encontra na figura 15.

Figura 15 Procedimento da realização do teste da cascata de sinalização PI3K-Akt-mTOR



RESULTADOS E DISCUSSÕES

Determinação da concentração de trabalho

Foi seguida a determinação de concentração de célula estimada para o estudo *in vitro* já realizada pelo grupo. Nessa etapa utilizamos uma concentração de $1x10^{-5}$ células/mL no volume de 100 µL depositados em poço da placa de 96 poços.

Triagem dos Compostos

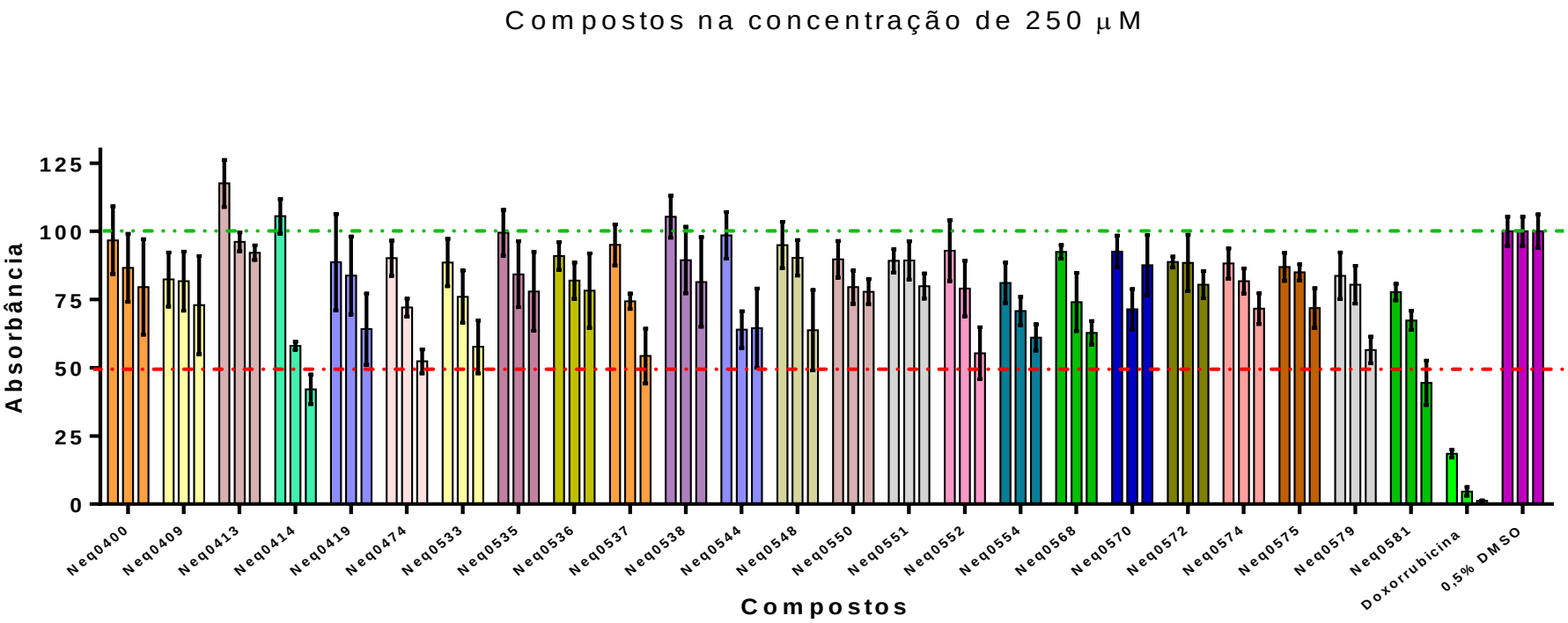
A triagem foi realizada a partir de testes de 24, 48 e 72 horas de incubação após a adição do composto para ambas as linhagens.

Na seleção da triagem para a linhagem de célula de fibroblasto (não cancerígena), a concentração escolhida foi de 250 µM uma vez que os compostos não podem apresentar toxicidade a essa etapa. Tendo seu resultado negativo, esse composto é descartado e não é passado para a seguinte fase, que são testes com as células de câncer de próstata (DU145 e PC – 3).

Nesta seleção realizada com a célula de fibroblasto Balb c 3T3 clone A31, foram usadas as moléculas do grupo NEQUIMED obtidas a partir de estudos computacionais prévios baseados em inibidores de cisteíno proteases e também em inibidores de mTOR. Como substância referência, utilizamos a doxorrubicina. Figura 16.

Para as células DU145 e PC-3 foram testados os compostos que não causaram toxicidade ao teste anterior e, como referência, utilizamos o composto rapamicina. Figura 17 e 18.

Figura 16 Triagem de compostos testados na célula de fibroblasto (não cancerígena de Balb c 3T3 clone A31)



Os resultados acima fazem parte de um artigo publicado na PlOS NTD. (Avelar, 2015)

Figura 17 Triagem de compostos testados na célula de câncer de próstata DU 145 que não apresentaram citotoxicidade nas células de Balb c 3T3 clone A31

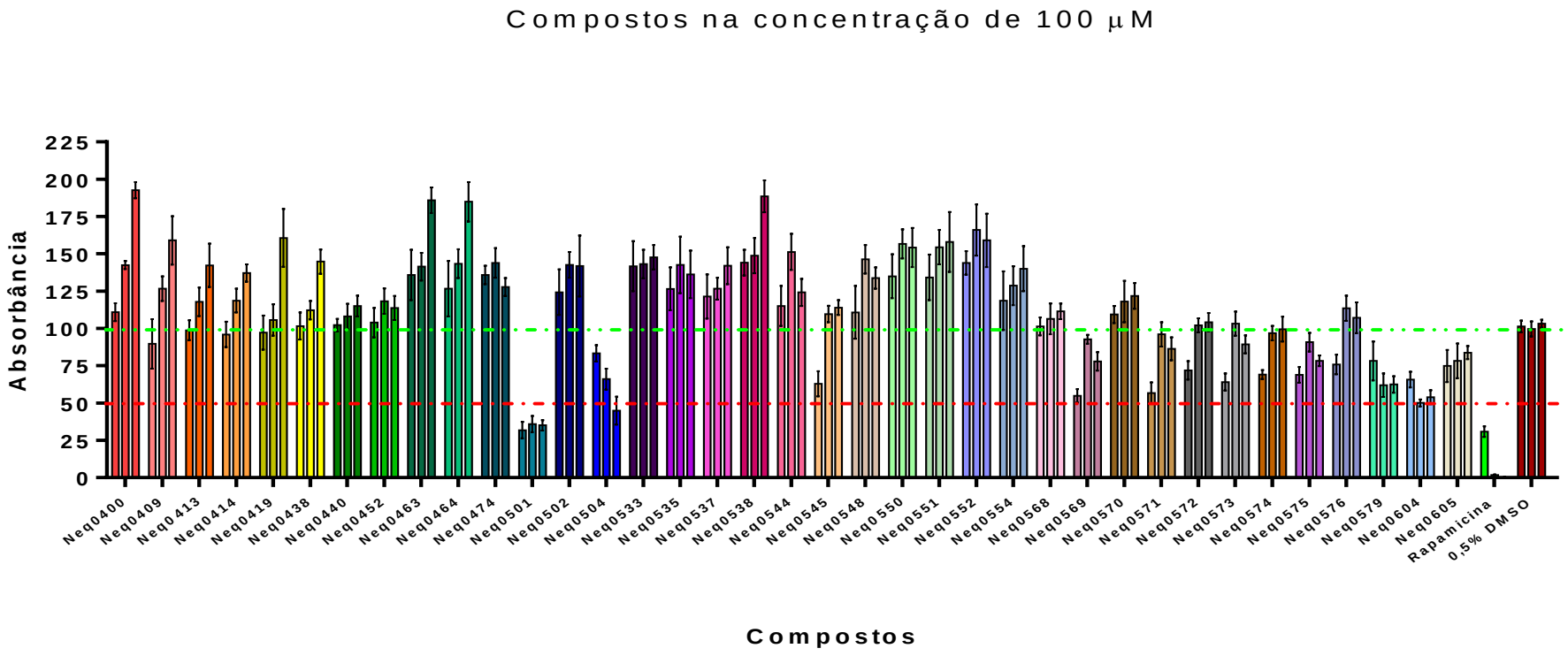
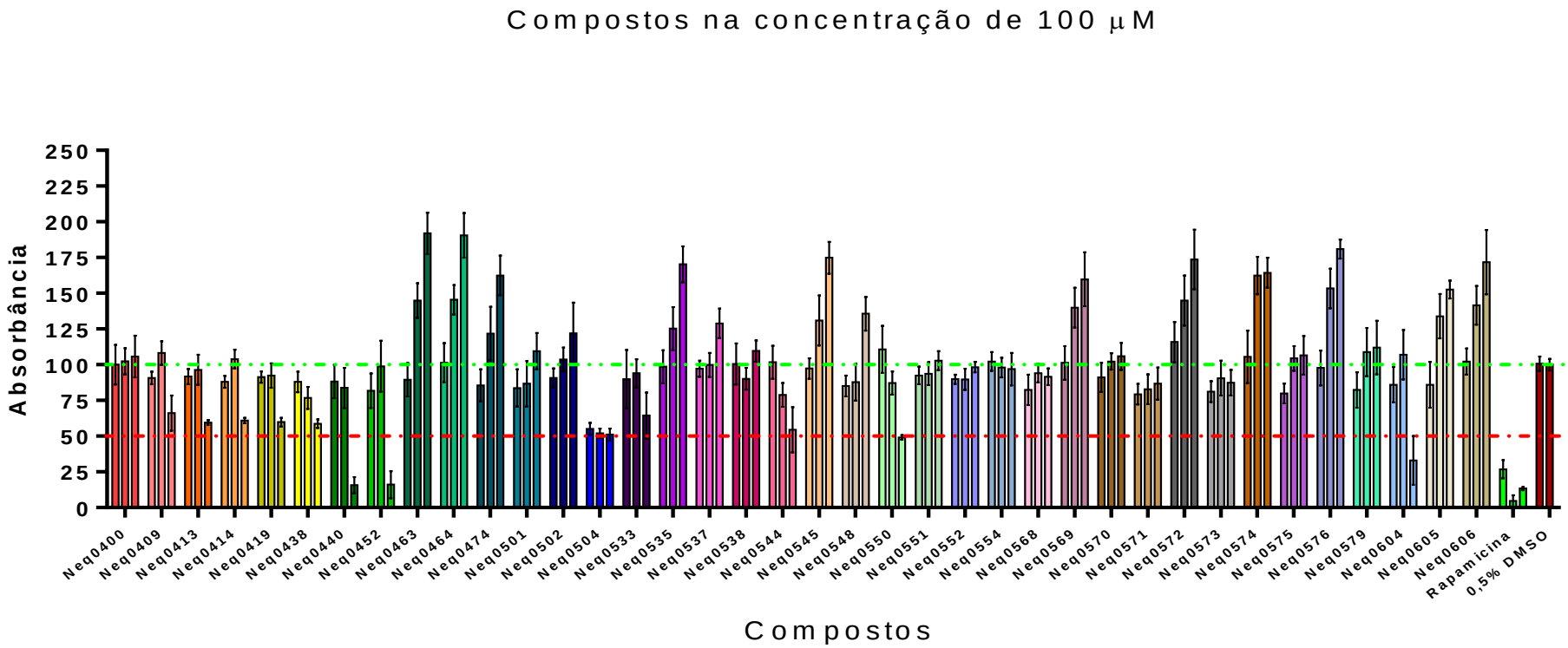


Figura 18 Triagem de compostos testados na célula de câncer de próstata PC-3 que não apresentaram citotoxicidade nas células de Balb c 3T3 clone A31



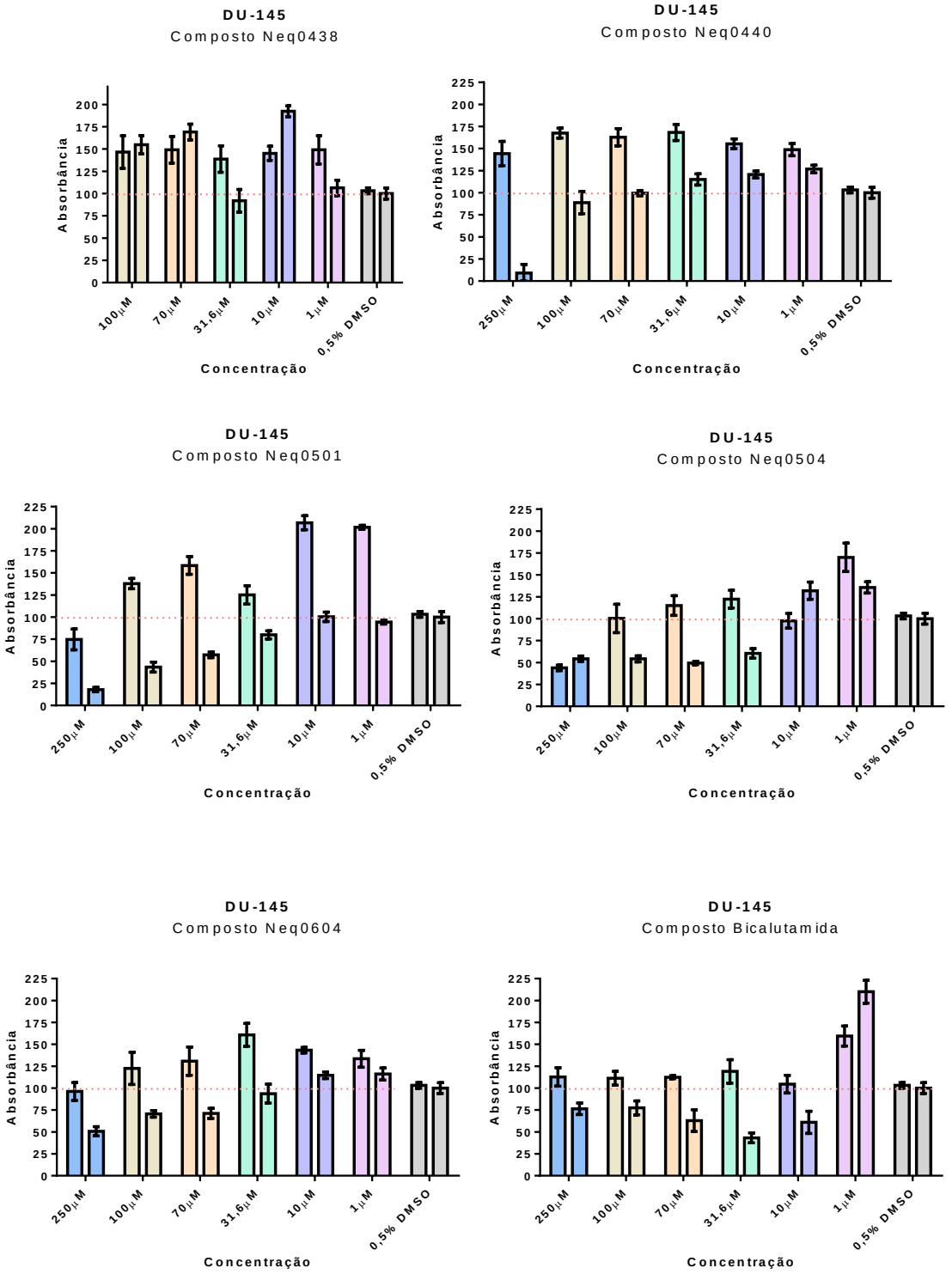
Dentre os compostos testados nas células de fibroblastos (Balb c 3T3 clone A31) Neq0414, Neq0474 e Neq0581 foram os mais tóxicos, mas ainda podem ser considerados em estudos subsequentes porque estão dentro do valor de corte usado na triagem. A partir do momento em que o composto causa a morte do fibroblasto superior a 50%, significa que este é muito citotóxico e que não é aconselhado seguir adiante o estudo com as demais células, assim sendo descartado e dando continuidade ao processo somente com os compostos que não são muito citotóxicos.

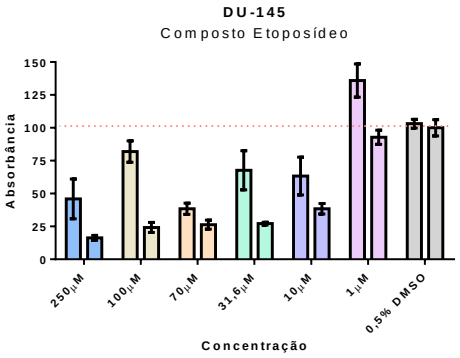
Quanto ao teste realizado com a célula de câncer DU 145, os compostos que melhores responderam ao teste colorimétrico foram Neq0501, Neq0504 e Neq0604. Os demais não levaram a morte das células de câncer de próstata. Em comparação com a célula PC-3, os compostos Neq0413, Neq0414, Neq0419, Neq0438, Neq0440, Neq0452, Neq0502, Neq0544, Neq0550 e Neq0604 responderam ao teste colorimétrico levando à morte das células.

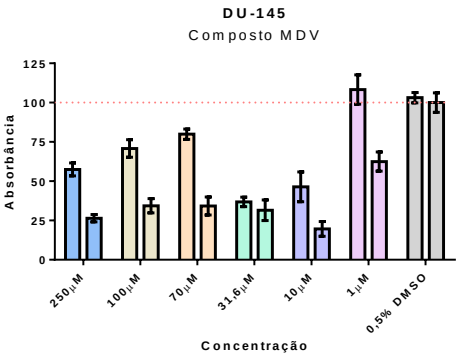
Deve-se notar que as moléculas apresentaram seletividade em termos de atividade de acordo com a linhagem celular cancerígena. Somente Neq0604 foi ativa nas duas linhagens estudadas.

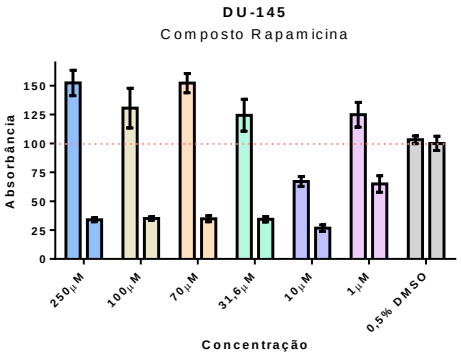
Com base nesta triagem inicial, realizou-se um estudo com alguns dos compostos de interesse para as células de câncer de próstata DU145 e PC3 tendo o tempo de incubação dos compostos de 24 horas e 72 horas (Figuras 19 e 20).

Figura 19 Resposta da célula de câncer de próstata DU 145 para os compostos com tempos de incubação de 24 e 72 horas (esquerda e direita, respectivamente)




DU-145
Composto Etoposídeo
Absorbância
150
125
100
75
50
25
0
250µM
100µM
70µM
31,6µM
10µM
1µM
0,5% DMSO
Concentração


DU-145
Composto MDV
Absorbância
125
100
75
50
25
0
250µM
100µM
70µM
31,6µM
10µM
1µM
0,5% DMSO
Concentração


DU-145
Composto Rapamicina
Absorbância
150
125
100
75
50
25
0
250µM
100µM
70µM
31,6µM
10µM
1µM
0,5% DMSO
Concentração

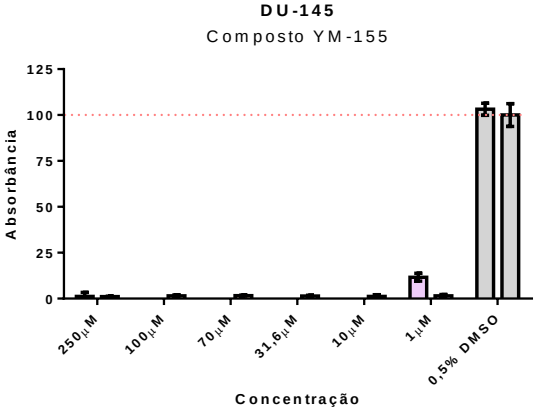
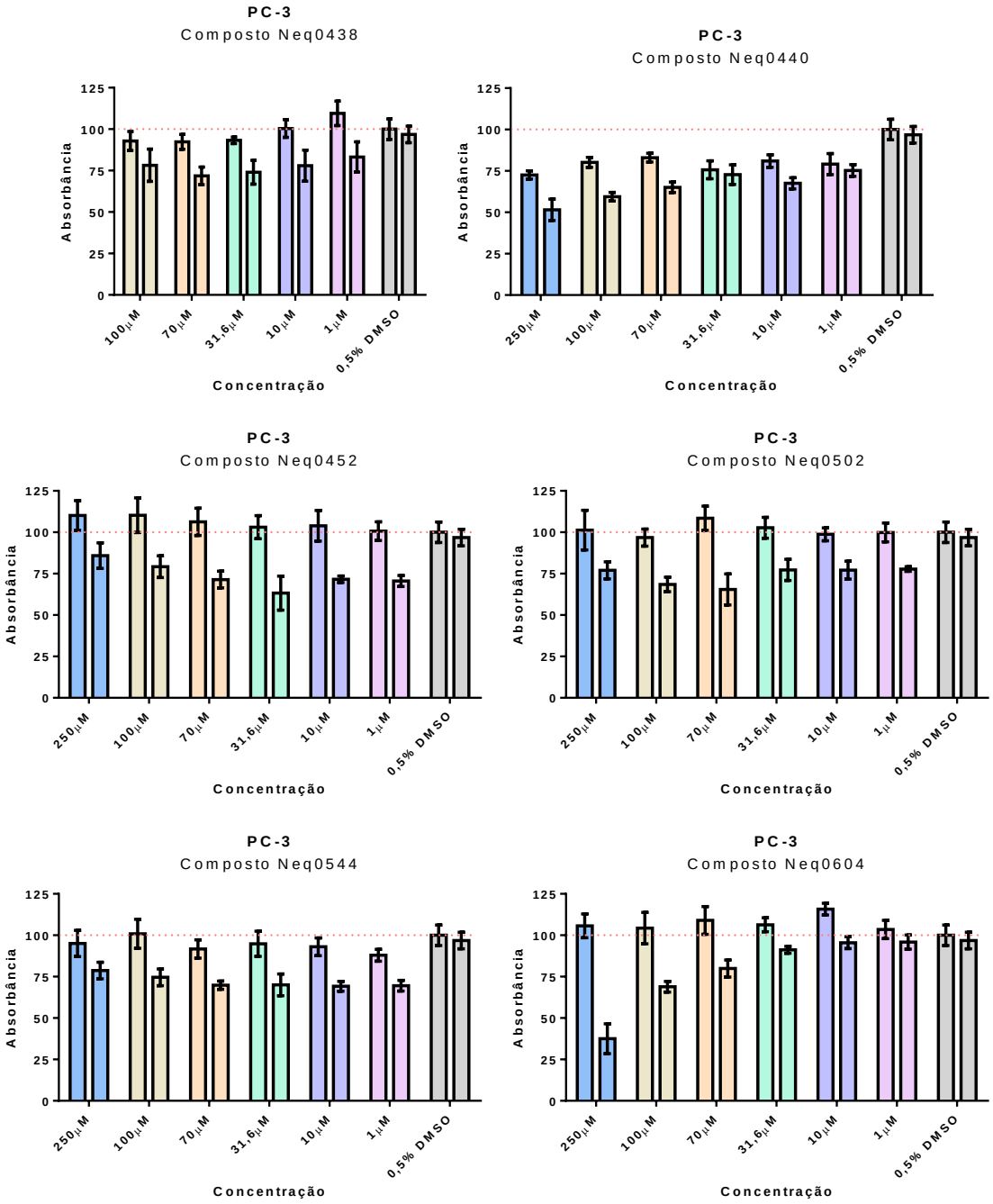
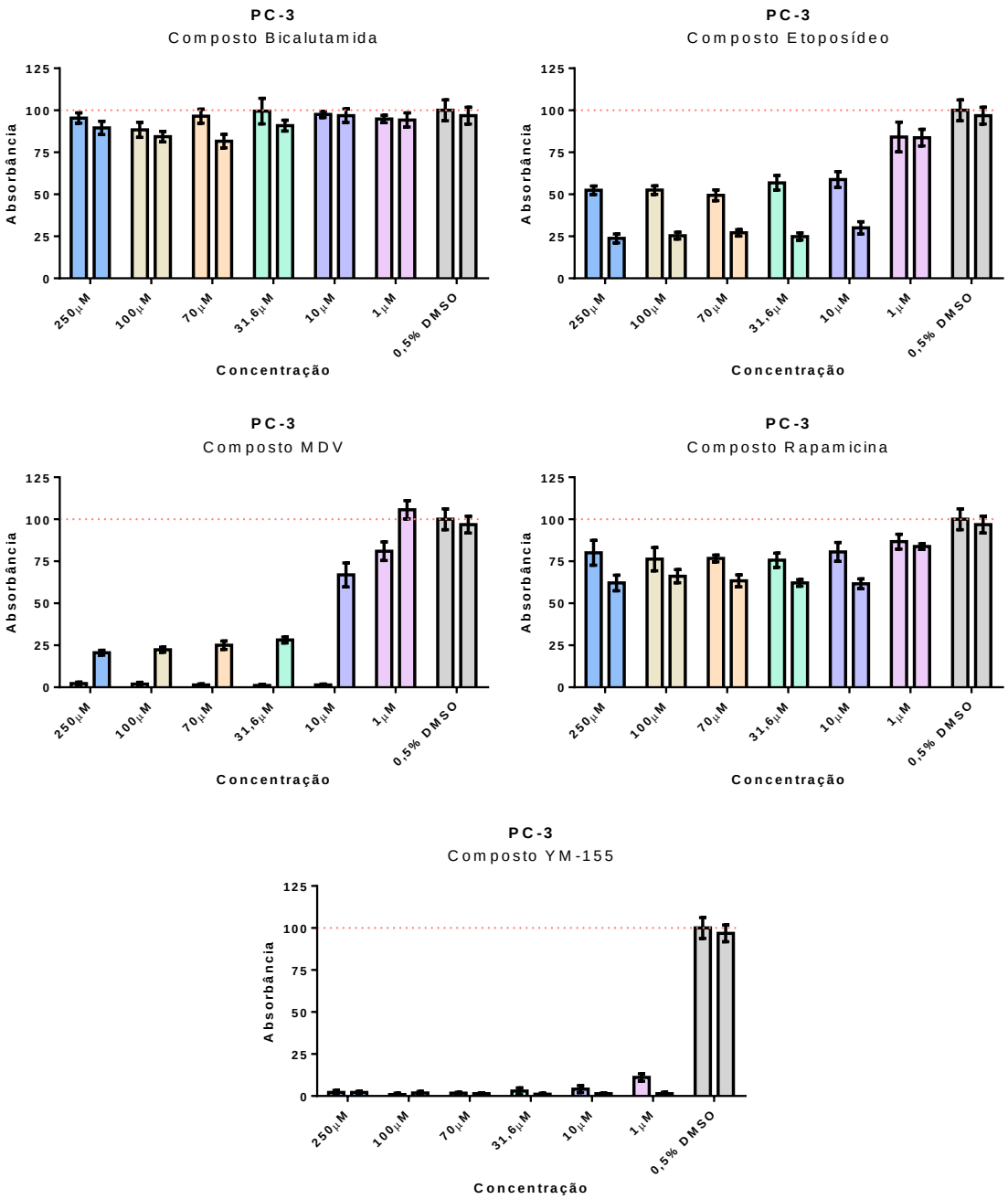

DU-145
Composto YM-155
Absorbância
125
100
75
50
25
0
250µM
100µM
70µM
31,6µM
10µM
1µM
0,5% DMSO
Concentração

Figura 20 Resposta da célula de câncer de próstata PC-3 para os compostos com tempos de incubação de 24 e 72 horas (esquerda e direita, respectivamente)





Pode-se observar que o composto Neq0438 na célula de DU145 teve sua melhor resposta na concentração de 31,6µM enquanto que os outros compostos do grupo obtiveram respostas de imediato ou a partir da concentração de 100 µM. Em comparação com os compostos testados na célula PC-3, eles responderam desde a primeira concentração testada, porém suas melhores respostas foram a partir de 72 horas de incubação.

Após essa triagem, esses compostos foram selecionados para o teste mTOR que foi realizado em citometria de fluxo afim de determinar se esses compostos poderiam inibir a via de sinalização Akt-S6-mTOR.

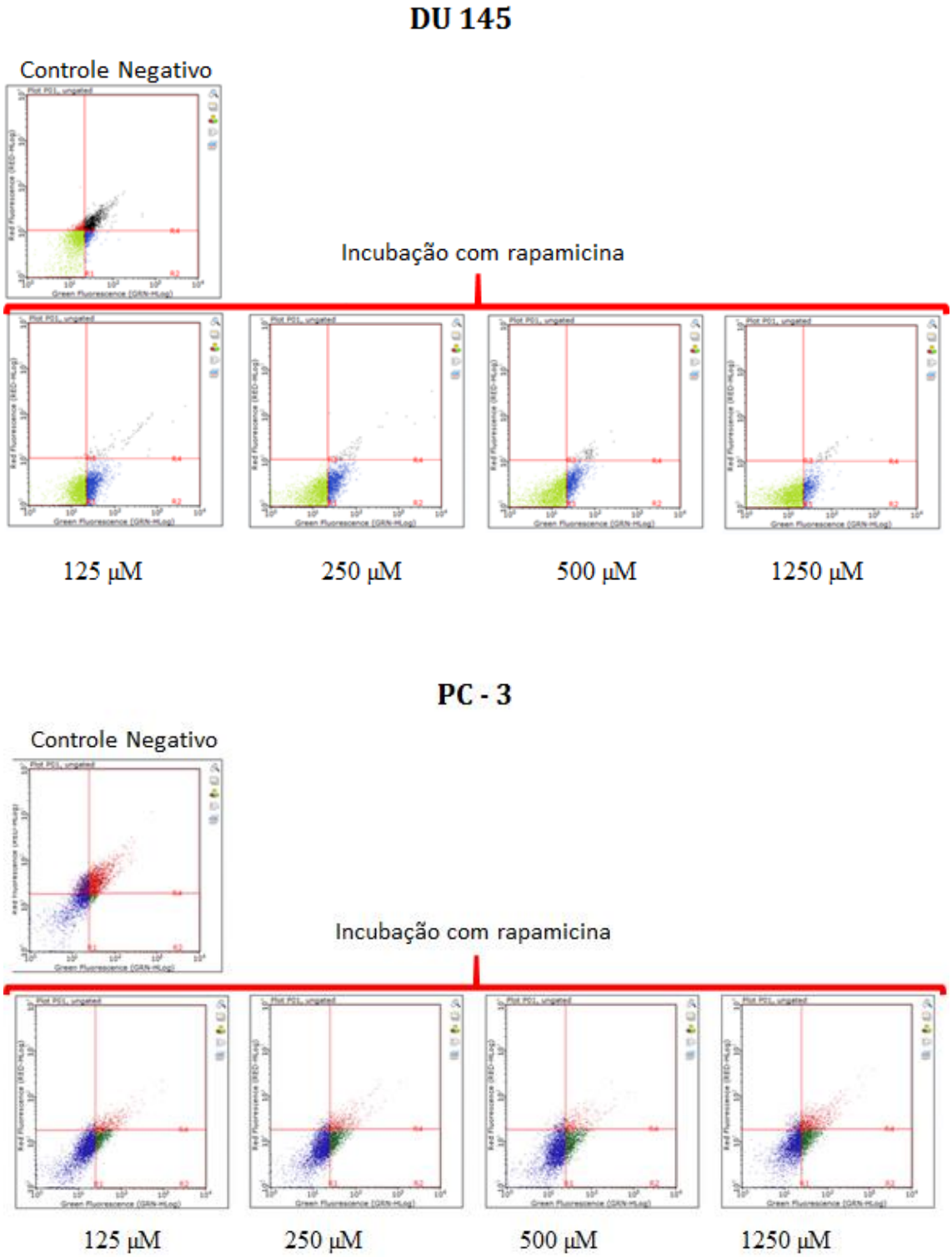
Via de sinalização

Foi seguida a determinação de contração de célula estimada para o estudo *in vivo* já realizado o teste da cascata de sinalização PI3K-Akt-mTOR.

Como descrito, a via de sinalização tem por finalidade inibir a via PI3K ou mTOR da célula que por sua vez cessará a produção de células cancerígenas, pois ocorrerá a regulação da síntese proteica e a tradução da proteína ribossômica.

Inicialmente foi realizado um estudo para saber qual a concentração de rapamicina seria mais adequada para estar realizando o teste e a partir desse resultado estaríamos utilizando como padrão para os outros compostos também (Figura 21).

Figura 21 Padronização da cascata de sinalização mTOR com a células de câncer DU 145 e PC-3 com diversas concentrações da rapamicina



Podemos observar que os testes realizados, tanto nas células DU 145 e PC-3 tiveram resultado de inibição da S6 (eixo Y) e não da Akt (eixo X) como esperado, figura B. Esse dado pode ser observado a partir da presença de um controle

negativo, ou seja, sem a adição do composto rapamicina é possível observar que há fosforilação para Akt e S6. Isto demonstra que o ensaio está funcionando adequadamente e que os próximos testes foram realizados já com os compostos de interesse. Assim, em virtude da mínima concentração estar respondendo, foi selecionada para a realização dos outros testes.

Com relação ao estudo de viabilidade celular frente aos compostos testados, foi realizado teste com os compostos de interesse em relação ao estudo da via de sinalização PI3K-Akt-mTOR. Figura 22 e 23.

Figura 22 Teste da sinalização da cascata PI3K-Akt-mTOR com a célula DU-145

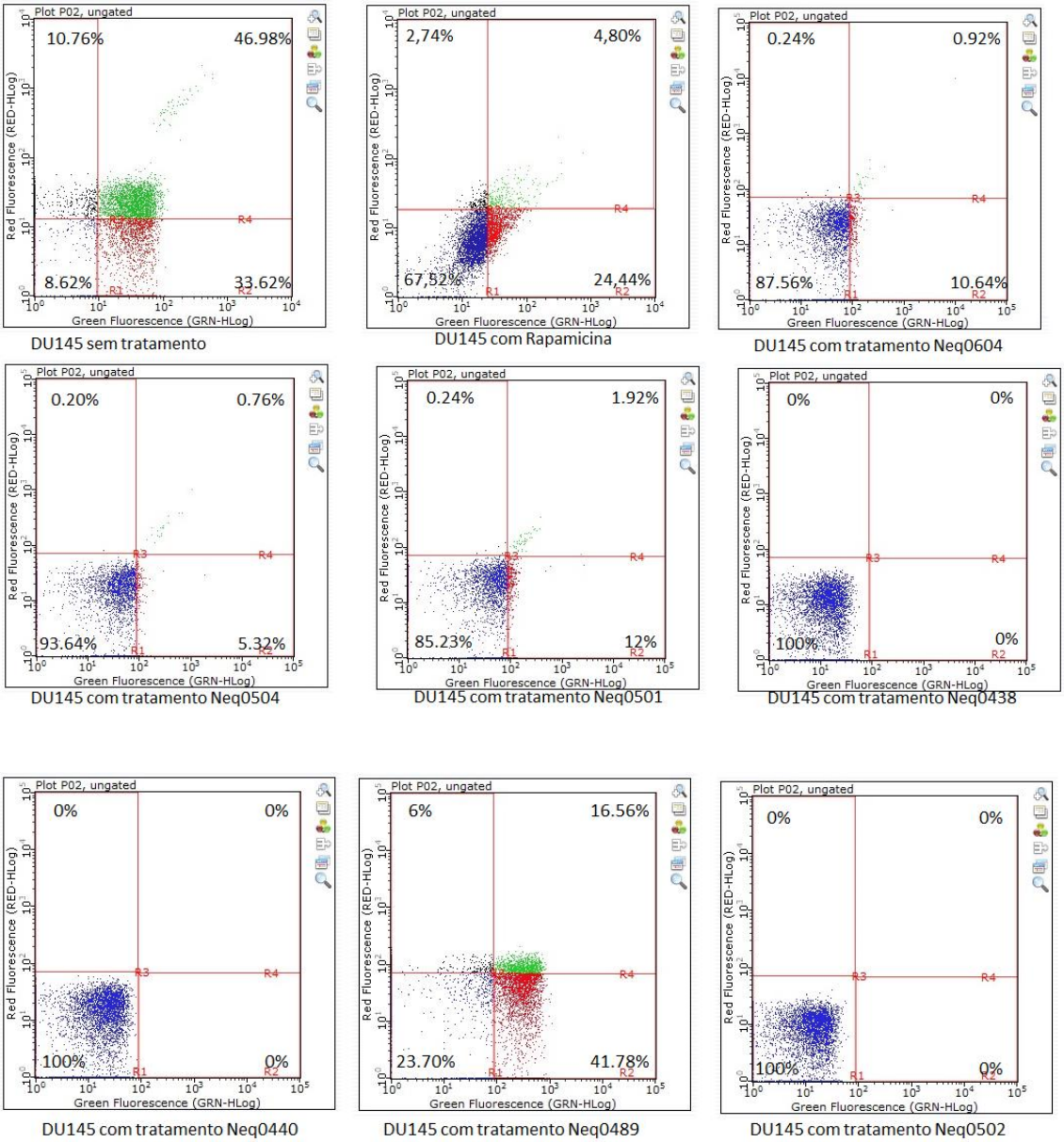
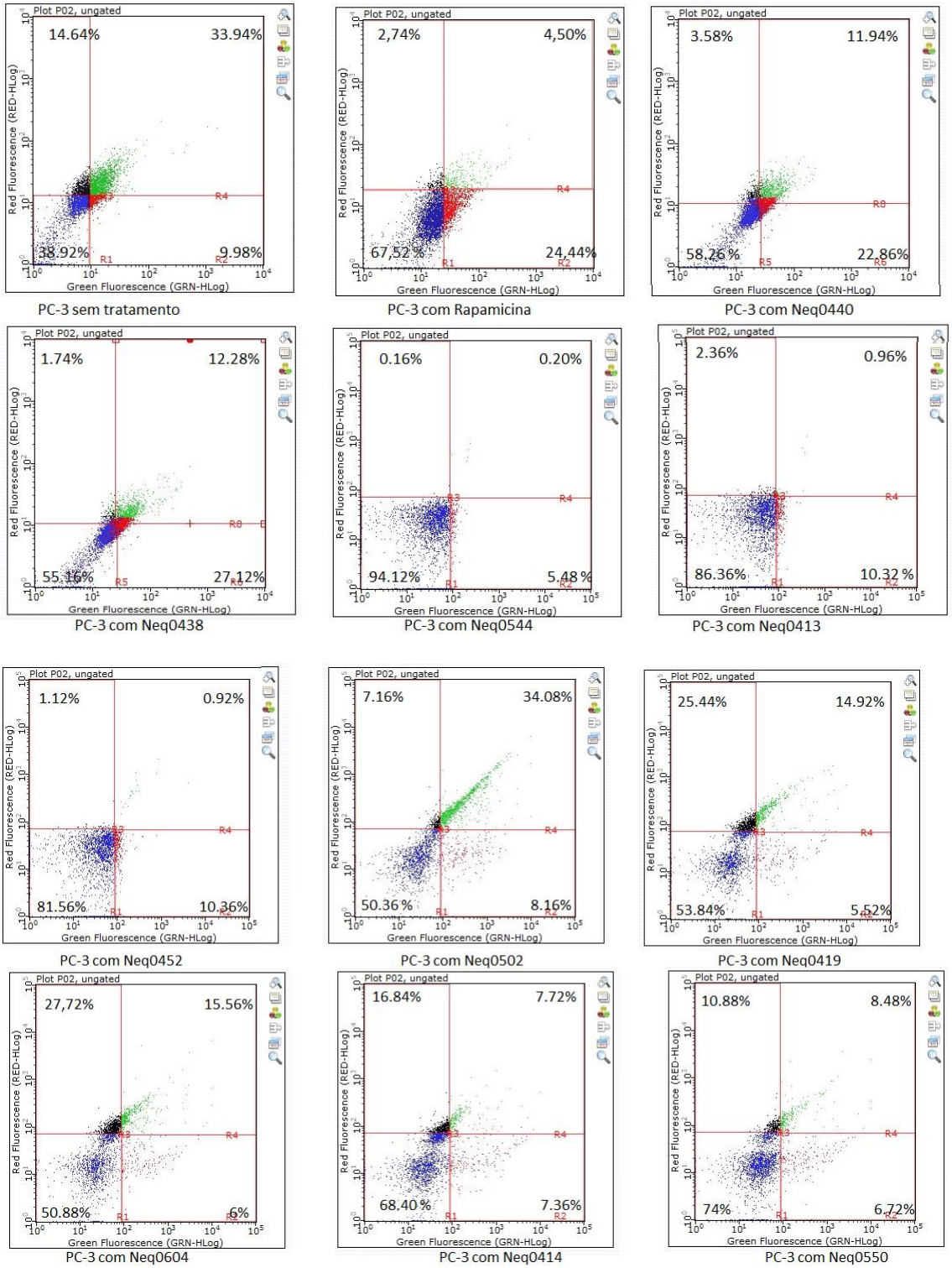


Figura 23 Teste da sinalização da cascata PI3K-Akt-mTOR com a célula PC-3



Dentre os resultados apresentados acima, os que melhores se destacaram na inibição da via da cascata mTOR para a célula DU145 foram os

compostos Neq0438, Neq0440, Neq0501, Neq0502, Neq0504 e Neq0604. Para a célula PC-3 foram os compostos Neq0413, Neq0452, Neq0544 e Neq0550. Observamos nitidamente que há um deslocamento do eixo Y e alguns possuem deslocamento tanto do eixo Y quanto do eixo X, sendo necessário futuros estudos para a pradonização da Wortimanina afim de possíveis comparações com esses compostos.

Podemos considerar que esses compostos são futuros alvos a serem estudados para a via da cascata de sinalização PI3K-Akt-mTOR.

CONCLUSÃO

Essa dissertação tem como objetivo principal a realização de estudo de novas moléculas e observar o quanto elas podem ser citotóxica ou levar a morte celular de duas linhagens do câncer de próstata (DU 145 e PC-3). Diversos compostos sintetizados pelo grupo NEQUIMED foram investigados para tal aplicação e os que apresentaram melhor seletividade foram selecionados para os testes posteriores para a sinalização da cascata PI3K-Akt-mTOR.

A cascata PI3K-Akt-mTOR foi padronizada com o uso do composto rapamicina. Os compostos Neq0438 e Neq0440 apresentaram uma boa seletividade para as células testadas e também obtiveram uma resposta positiva quando testados com o kit da mTOR.

Estudos futuros serão necessários para a padronização da wortimanina e para comparação de resultados e futuros testes. Quanto aos testes de concentração de 24 horas e 72 horas dos compostos, será necessário realizar testes com concentrações mais baixas para identificar se os compostos continuam respondendo ativamente.

Referências

Abraham, J., & Staffurth, J. (janeiro de 2008). Hormonal therapy for cancer. *36*, pp. 29 - 32. doi:10.1016/j.mp.med.2007.10.010

Bromme, D., & Wilson, S. (2011). Role of Cysteine Cathepsins in Extracellular Proteolysis. *Extracellular matrix degradation. Biologu of Extracellular Matrix, 2*, 23-51.

Brubaker, K., Vessella, R., True, L., Thomas, R., & Corey, E. (2003). Cathepsin K mRNA and protein expression in prostate cancer progression. *J. Bone Miner. Res., 18*, 222-230.

Colella, R., Jackson, T., & Goodwyn, E. (2004). Matrigel invasion by the prostate cancer cell lines, PC3 and DU145, and cathepsin L + B activity. *Biotech. Histochem, 79*, 121-127.

Darzynkiewicz, Z., & Zhao, H. (2001). Flow cytometry in analysys of cell cycle and apoptosis. *Science Direct, 38*(2), 179-193.

Dicionário de Sinônimos. (s.d.). Acesso em maio de 2016, disponível em http://dicionario.sensagent.com/fator%20de%20risco/pt-pt/

Dossetter, A. B. (14 de 3 de 2012). (1R,2R)-N-(1-cyanocyclopropyl)-2-(6-methoxy-1,3,4,5-tetrahydropyrido[4,3-b]indole-2-carbonyl)cyclohexanecarboxamide (AZD4996): a potent and highly selective cathepsin K inhibitor for the treatment of osteoarthritis. *55*, pp. 6363 - 6374. doi:10.1021/jm3007257

Etelcia Moraes Molinaro, L. F. (2010). *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde - Vol. 2* (Vol. 2). Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz.

Glina, S., Rivero, M. A., Morales, A., & Morgentaler, A. (7 de 2 de 2010). Studies on prostatic cancer I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate by Charles Huggins and Clarence V. Hodges. *7*(2), pp. 640 - 644. doi:10.1111/j.1743-6109.2009.01680.x

Gocheva, V., & Joyce, J. (2007). Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle*(6), 60-64.

Goulet, B., Sansregret, L., Leduy, L., Bogyo, M., Weber, E., Chauhan, S., & Nepveu, A. (2007). Increased expression and activity of nuclear cathepsin L in cancer cells suggests a novel mechanism of cell transformation. *Mol. Cancer Res., 5*, 899-907.

H. P. Rang, M. M. (2007). *Rang and Dale's Pharmacology* (6ª ed.). Rio de Janeiro: Elsevier Brasil.

Hajdu, S. I. (19 de 10 de 2010). A note from History:. *Landmarks in History of Cancer, part 1, 5*, pp. 1097-1102. doi:10.1002/cncr.25553

Hajdu, S. I. (13 de 3 de 2012). A note from History:. *Landmarks in History of Cancer, part 4, 20*, pp. 4914 - 4928.

Imming, P. (2008). Medicinal chemistry: definitions and objectives, drug activity phases, drug classification systems. Em C. Wermnuth, *The practice of medicinal chemistry* (3 ed., pp. 63-71). Elsevier.

INCA. (27 de 11 de 2013). *INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014*. Acesso em 15 de abril de 2016, disponível em http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014

Lankelma, J., Voorend, D., Barwari, T., Koetsveld, J., Van der Spek, A., De Porto, A., . . . Van Noorden, C. (2010). Cathepsin L, target in cancer treatment? *Life Sci, 86*, 225-233.

Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., & Schubert, D. (2 de 4 de 1997). Mechanism of Cellular 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5- Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *69*, p. 13.

Longo, D. L. (2015). *Hematologia e Oncologia de Harrison* (2ª ed.). AMGH .

Longobardi, A. (2001). *Flow Citometry: fist principles* (2 ed.). New York: Wiley-Liss.

Madureira, T. S. (2015). Influência dos Níveis de Testosterona no. *Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina Submetido ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar*. Porto, Portugal. Fonte: https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/81942/2/129504.pdf

Maramorosch, K. (1987). *Advances in Cell Culture* (Vol. 5). Orlando, Flórida, Estados Unidos: Academic Press.

Martin, E. (2010). Concise medical dictionary. Oxford University press.

Medeiros, A. P., Menezes, M. F., & Napoleão, A. A. (25 de 2 de 2010). Fatores de risco e medidas de prevenção do câncer de próstata: subsídios para a enfermagem. *64*, pp. 385 - 388. doi:21755228

Mosmann, T. (16 de December de 1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *65*(1), pp. 55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity. *Journal of immunological methods*, 55-63.

Mostafa, M., & Sloane, B. (2006). Cysteine cathepsins: multifuntional enzymes in cancer. *Tumor Microenviroment, 6*, 764-775.

Mottet, N., Bastian, P. J., Bellmunt, J., Bergh, R. C., Bolla, M., van Casteren, N. J., . . . al, e. (2014). *Guidelines on Prostate Cancer.* European Association of Urology . Fonte: https://uroweb.org/wp-content/uploads/1607-Prostate-Cancer_LRV3.pdf

Nelson, D. L., Cox, M. M., & Lehningher, A. L. (2006). *Lehninger Princípios de Bioquímica* (4ª ed.). São Paulo: Sarvier.

Offermanns, S., & Rosenthali, W. (2008). *Encyclopedia of molecular pharmacology* (2 ed., Vol. 2). Springer.

Oh, W. K., & Kantoff, P. W. (10 de 1998). Management of hormone refractory prostate cancer: current standards and future prospects. *160*, pp. 1220–1229 . doi:9751323

OH, W., & KANTOFF, P. (1998). Management of hormone refractory prostate cancer: current standards and future prospects. *J. Urol, 160*, 1220-1229.

Oncoguia, I. (24 de 4 de 2015). *Estimativas do Mundo*. Acesso em 25 de abril de 2016, disponível em http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estimativas-no-mundo/1706/1/

Palermo, C., & Joyce, J. (2008). Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends Pharmacol. Sci., 29*, 22-28.

Romme, D., & Wilson, S. (2011). Role of Cysteine Cathepsins in Extracellular Proteolysis: Extracellular matrix degradation. *Biology of Extracellular Matrix*, 23-51.

Saman, D. M., Lemieux, A. M., Nawal Lutfiyya, M., & Lipsky, M. S. (4 de 2014). A review of the current epidemiology and treatment options for prostate cancer. *60*, pp. 150 - 154. doi:10.1016/j.disamonth.2014.02.003

Seadmonds, B., Yang, N., Anderson, K., Wirhaker, B., Shaw, L., & Bollinger, J. (1986). Evaluation of prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase as prostate cancer markers. *Urology, 28*(6), 472-479.

Seamonds B, Y. N. (10 de 1986). Evaluation of prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase as prostate cancer markers. *28*, pp. 472 - 479. doi:2431533

Stenman, U. H., Leinonen, J., Zhang, W. M., & Finne, P. (1999). Prostate-specific antigen. *9*, pp. 83 - 93. doi: 10.1006/scbi.1998.0086

Stenman, U., Leinonen, J., Zhang, W., & Finne, P. (1999). Prostate specific antigen. *Cancer Biology, 9*, 83-93.

Stockert, J., & Castro, A. (2012). MTT assay for cell viability: intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 785-796.

Sudhakar, A. (1 de 12 de 2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *2*, pp. 1 - 7. doi:10.4172/1948-5956.100000e2

Sudhakar, A. (2010). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *J. Cancer Sci. Ther., 1*(2), 1-4.

Sudhan, D. (2013). Cathepsin L inhibition by the small molecule KGP94 suppresses tumor microenviroment enhanced methastasis associated cell functions of prostate and breast cancer cells. *Clinical and Experimental Metastasis*, 891-902.

Taylor, W. N. (2002). *Anabolic Steroids and the Athlete* (Vol. 2ª edição). McFarland.

Turk, V., & Kos, J. (2004). Cysteine cathepsins (proteases) - on the main stage of cancer? *Cancer Cell, 5*, 409-410.

Weinberg, R. A. (2000). *Uma célula regenerada: Como o câncer começa.* Rio de Janeiro: Ciência Atual Rocco.

Wermuth, C., Ganellin, C., Lindberg, P., & Mitscher, L. (1998). *Glossary of therms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations, 1997).* Annual Reports in Medicinal Chemistry.

ANEXOS