ELISA CASTAÑEDA SANTA CRUZ

**Estudo de novas moléculas antitumorais em linhagens
de células de câncer de próstata e mama hormônio-dependentes.**

Tese 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

2015

Dedico este trabalho aos meus pais
Edith Santa Cruz Villarreal e Jaime Castañeda Romero,
e aos meus irmãos Abel e Elías.

.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS por me permitir que chegasse este momento simbólico na minha vida. Pelos triunfos e momentos difíceis que me ensinaram apreciar ELE cada dia mais.

A minha família, a qual amo muito, pelo carinho e preocupação para comigo, além que me aconselharam nos momentos que necessitava.

Ao Prof. Dr. Andrei Leitão, meu orientador, por ter me acolhido em seu laboratório mesmo chegando sem me conhecer direito. Pela paciência e confiança em ter-me entregado este projeto. E o mais importante, por contribuir para o meu crescimento profissional.

Ao meu “monito” pelo apoio constante e sempre acreditar em mim, pelo amor e todos os anos de amizade.

Aos meus amigos Edson, Max, Charlie, Wilner, e Marco por todo o carinho e fazer meus finais de semana os mais divertidos.

Aos meus anjos Karla e Jesús, as pessoas mais otimistas que poderia ter conhecido. Apesar dos milhares de quilômetros que nos separam, eu sempre os senti ao meu lado.

Aos meus colegas de trabalho pela colaboração direta ou indireta Daiane, Martha, Julio, Lucas e especialmente ao José Carlos pela paciência nas pequenas aulas de português.

Finalmente agradeço à CNPq pelo apoio financeiro.

***"Não é gênio, nem glória, nem o amor que reflete
a grandeza da alma humana, é bondade."***

Lacordaire, Jean-Baptiste

RESUMO

Os cânceres de próstata e de mama estão entre as neoplasias mais comuns diagnosticadas na população ocidental. No Brasil, estes dois tipos de neoplasia são as principais causas de morte cuja incidência continua crescendo anualmente, sendo mais comum na população acima de 40 anos. As terapias utilizadas para os tratamentos de ambas as neoplasias estão baseadas principalmente nos receptores de hormônio (andrógeno e estrógeno). Embora muitos fármacos tenham sido desenvolvidos para os tratamentos destas patologias ao longo do tempo, eles perdem eficácia em caso de neoplasias resistentes, que apresentam mutações nas macromoléculas alvo. Assim, novas substâncias bioativas estão sendo investigadas a partir dos alvos biológicos consolidados e também para novos alvos, como o receptor andrógeno e o estrógeno, cisteíno proteases e quinases. Neste trabalho, ensaios *in vitro* foram utilizados para avaliar as atividades farmacológicas e citotóxica de novas substâncias bioativas desenvolvidas no Grupo de Química Medicinal (NEQUIMED), em duas linhagens celulares hormônio-dependentes para o estudo do câncer de próstata (LNCaP) e de mama (MCF-7). A partir das triagens realizadas, duas substâncias foram as mais potentes (Neq0502 e Neq0504) que levaram a morte das linhagens LNCaP e MCF-7 com IC_{50} na ordem de 20 a 30 μ M, respectivamente. No ensaio de ciclo celular, Neq0502 apresentou um perfil semelhante a enzalutamida (fármaco usado como referência), sem perturbações substanciais no ciclo da linhagem LNCaP. No entanto, Neq0504 teve um perfil bem distinto do raloxifeno (fármaco usado como referência) para a perturbação do ciclo celular da MCF-7. Finalmente, o índice de seletividade estabelecido a partir dos ensaios com as células de fibroblasto de camundongo (Balb/C 3T3 clone A31) demonstrou que Neq0502 foi uma substância com a maior seletividade e baixa citotoxicidade em relação à célula não tumoral dentre toda a série estudada. A partir destes dados as novas substâncias poderão ser otimizadas usando Neq0502 como matriz em estudos futuros.

ABSTRACT

Prostate and breast cancers are among the most common cancers diagnosed in the western population. These two types of cancer are the leading causes of death in Brazil, in which the incidence continues to increase annually, affecting more commonly the population over 40 years. The therapies currently in use for the treatment of both cancers are mainly based on the hormone receptors (androgen and estrogen). Although many drugs have been developed for the treatment of these pathologies over time, they lose efficacy in case of resistant cancers bearing mutations on the target macromolecules. Thus, new bioactive substances are being investigated based on stable biological targets and for new targets, including androgen and estrogen receptors, kinases and cysteine proteases. Here we performed *in vitro* assays to evaluate the pharmacological and cytotoxic activities of new bioactive substances developed in Medicinal Chemistry Group (NEQUIMED) from two hormone-dependent cancer cell lines: prostate (LNCaP) and breast (MCF-7). From the screenings carried out, two compounds were found to be the most potent (Neq0502 and Neq0504) leading to cell death of LNCaP and MCF-7 cell lines with IC_{50} in the range of 20 to 30 $\mu\text{mol/L}$, respectively. In the cell cycle assay, Neq0502 had a similar profile to enzalutamide (reference drug) without substantial disruption of the LNCaP cycle. On the other hand, Neq0504 had a very different profile from raloxifene (reference drug) to the perturbation of the MCF-7 cycle. Finally, the selectivity index established from tests with fibroblast cells (Balb/C 3T3 clone A31) showed that Neq0502 was the substance with highest selectivity and lowest cytotoxicity to non-tumor cells from all screened series. These data will allow us to optimize new substances based on the Neq0502 lead compound in future studies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Caminhos básicos da produção de andrógeno.	17
Figura 2 - Representação esquemática das alterações moleculares em câncer de próstata resistente à castração (CRPC)	19
Figura 3 - Síntese do andrógeno mediante a via clássica e <i>backdoor</i> dentro da mitocôndria	25
Figura 4 - Estruturas dos inibidores das enzimas envolvidas na biossíntese de andrógenos	26
Figura 5 - Estrutura esquemática do AR e o domínio de ligação ao ligando (LBD). (a) domínios funcionais do AR. (b) estrutura cristalina do AR-LBD ligado à testosterona.....	28
Figura 6 - Estruturas dos inibidores do domínio N-terminal (NTD) do AR	29
Figura 7 - Estruturas dos inibidores do domínio de ligação ao ligando (LBD) no AR	31
Figura 8 - Organização dos domínios do ER α e ER β humanos.	33
Figura 9 - Estruturas químicas dos SERMs.....	35
Figura 10 - Via de biossíntese de Estradiol a partir do colesterol e os sítios de ação dos inibidores de aromatase (AIs) de 1 ^{ra} , 2 ^{da} e 3 ^{ra} geração.....	37
Figura 11 - Estruturas químicas dos inibidores de aromatase (AIs)	38
Figura 12 - Estruturas químicas dos SERDs.....	39
Figura 13 - Três vias distintas de regulação do estrógeno na expressão do gene	41
Figura 14 - Inibidores de catepsinas	45
Figura 15 - Reação de metabolismo do MTT (conversão do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazólio em formazan)	46
Figura 16 - Distribuição das concentrações celulares de 96 poços no ensaio de crescimento celular para o ensaio colorimétrico com MTT	51
Figura 17 - Distribuição dos compostos e controles na placa de 96 poços no ensaio de triagem para o ensaio colorimétrico com MTT.....	54
Figura 18 - Curva de crescimento sem estimulação de hormônio para a linhagem LNCaP num período de 7 dias	57
Figura 19 - Curva de crescimento sem estimulação de hormônio para a linhagem MCF-7 num período de 7 dias	58
Figura 20 - Curvas de linearidade por MTT após 24 h de incubação das linhagens LNCaP e MCF-7 respectivamente	59
Figura 21 - Curva de crescimento de estimulação com testosterona na linhagem LNCaP durante 7 dias	60
Figura 22 - Curvas de estimulação comparativa para Testosterona Padrão e Testosterona Comercial	61
Figura 23 - Curva de crescimento de estimulação com Estradiol na linhagem MCF-7 durante 7 dias.....	62

Figura 24 - Estudo de controles positivos Bicalutamida e Enzalutamida sem estimulação de testosterona.....	63
Figura 25 - Estudo de controles positivos de estimulação com testosterona (T) 10 nmol/L.....	64
Figura 26 - Estudo do controle positivo raloxifeno sem estimulação com estradiol.....	65
Figura 27 - Estudo do controle positivo Raloxifeno no ensaio da curva de estimulação com estradiol (E ₂) a 10 nmol/L	66
Figura 28 - Estudo do raloxifeno na curva de estimulação com estradiol (E ₂) 10 nmol/L	67
Figura 29 - Triagem dos compostos com estimulação da LNCaP durante 6 dias pela testosterona (T) 10nmol/L	68
Figura 30 - Perfil comparativo de atividade biológica para substâncias relacionadas na linhagem LNCaP para o ensaio de estimulação com testosterona	69
Figura 31 - Triagem dos compostos para a linhagem LNCaP no ensaio sem estimulação de testosterona nos períodos de 24, 78 e 72 horas.....	71
Figura 32 - Triagem dos compostos para a linhagem MCF-7 no ensaio sem estimulação de estradiol nos períodos de 24 e 72horas.	72
Figura 33 - Triagem dos compostos Neq para a linhagem MCF-7 no ensaio de estimulação de estradiol 10 nmol/L no dia 6.....	73
Figura 34 - Triagem de inibidores de cisteíno proteases (nitrilas) para a linhagem MCF-7 sem estimulação pelo estradiol (10 nM) após 24 e 72 horas	75
Figura 35 - Triagem de inibidores de cisteíno proteases (nitrilas) para a linhagem MCF-7 com estimulação pelo estradiol (10 nM) após seis dias de incubação	75
Figura 36 - Relação da viabilidade celular determinada por citometria de fluxo em relação ao colorimétrico após 24 h de incubação.	76
Figura 37 - Curvas de concentração-resposta para a enzalutamida usando a linhagem LNCaP estimulada com testosterona obtidas pelo método colorimétrico (MTT) e citometria de fluxo (Cit)	77
Figura 38 - Curvas de concentração-resposta para Neq0502 usando linhagem LNCaP estimulada com testosterona obtidas pelo método colorimétrico (MTT) e citometria de fluxo (Cit)	78
Figura 39 - Curvas de concentração-resposta para o raloxifeno usando a linhagem MCF-7 estimulada com estradiol obtidas pelo método colorimétrico (MTT) e citometria de fluxo (Cit)	78
Figura 40 - Curvas de concentração-resposta para Neq0504 usando a linhagem MCF-7 estimulada com estradiol obtidas pelo método colorimétrico (MTT) e citometria de fluxo (Cit)	79
Figura 41 - Curvas de concentração-resposta para os compostos na linhagem Balb/c 3T3 clone A31 mediante o método colorimétrico (MTT)	830

Figura 42 - Ciclo celular para o composto enzalutamida; (A) sem tratamento (controle); (B) 7,95 μM e (C) 0,72 μM . Para o terceiro dia de incubação.	803
Figura 43 - Gráfica de barras do ciclo celular para os compostos enzalutamida e Neq0502.....	84
Figura 44 - Gráfica de barras do ciclo celular para os compostos raloxifeno e Neq0504.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Controle Positivo - Controle Negativo para as duas linhagens	54
Tabela 2 - Compostos Neq relevantes nas triagens para a linhagem LNCaP	70
Tabela 3 - Representação das estruturas químicas das substâncias bioativas	74
Tabela 4 - Valores estadísticos das concentração-resposta na linhagem Balb/c 3T3 e índices de seletividade (SI) calculados para os compostos.....	83
Tabela 5 - Porcentagens das fases do ciclo celular para a enzalutamida a 7,95 e 0,72 $\mu\text{mol/L}$ incubado na linhagem LNCaP	843
Tabela 6 - Porcentagens das fases do ciclo celular para o Neq0502 a 250 e 22,4 $\mu\text{mol/L}$ incubado na linhagem LNCaP	854
Tabela 7 - Porcentagens das fases do ciclo celular para o raloxifeno a 10 e 0,18 $\mu\text{mol/L}$ incubado na linhagem MCF-7	865
Tabela 8 - Porcentagens das fases do ciclo celular para o Neq0504 a 100 e 17,2 $\mu\text{mol/L}$ incubado na linhagem MCF-7	816

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Câncer	14
1.2	Câncer de próstata (PCa)	15
1.2.1	Terapia Hormonal	16
1.2.2	Câncer de Próstata Resistente à Castração (CRPC)	18
1.2.3	Síntese <i>de novo</i> de andrógeno em câncer de próstata resistente à castração (CRPC) 24	
1.2.4	O Receptor Andrógeno (AR) como alvo terapêutico.....	27
1.3	Câncer de mama	32
1.3.1	Receptor estrógeno (ER).....	33
1.3.2	Moduladores do receptor estrógeno seletivos (SERMs).....	34
1.3.3	Inibidores de Aromatase (AIs)	36
1.3.4	Reguladores negativos do receptor estrógeno seletivos (SERDs).....	38
1.3.5	Mecanismo de resistência à terapia endócrina	40
1.4	Química Medicinal	42
1.5	Estudos <i>in vitro</i> : Estudos celulares	43
1.6	Cisteíno Proteases.....	43
1.6.1	Inibidores de catepsinas	44
1.7	Ensaio celulares	45
1.7.1	Método colorimétrico	45
1.7.2	Citometria de fluxo	46
2	OBJETIVOS	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1	Materiais	48
3.2	Métodos.....	49
3.2.1	Crescimento celular (cultivo).....	49
3.2.2	Ensaio celulares.....	50

4	Resultados e Discussões	57
4.1	Determinação da concentração de trabalho:	57
4.2	Determinação da concentração de hormônio:	60
4.3	Ensaio dos controles positivos:	63
4.4	Triagem dos compostos:	67
4.5	Curva de Concentração - Resposta dos compostos bioativos	76
4.6	Ciclo Celular	82
5	Conclusões e perspectivas	88
6	Bibliografia	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é qualquer tumor maligno, a propagação das células cancerosas para outros tecidos (metástases) pode ocorrer por meio da corrente sanguínea ou dos canais linfáticos ou em cavidades corporais, tais como os espaços pleurais e peritoneais, assim estabelecendo tumores secundários em locais distantes do original. Por exemplo, quando uma célula de câncer de mama se propaga para o fígado através da circulação sanguínea, este ainda é considerado como proveniente da mama e então é caracterizado como metastático [1]. Geralmente são desenvolvidas células cancerosas a partir de células normais devido ao dano no DNA. A maioria dos danos no DNA é corrigida por meio de diversas enzimas envolvidas no processo de replicação e verificação do material genético. No entanto, quando o DNA não é reparado é que são desenvolvidas as células cancerosas [1].

Cada tumor primário individual tem seu próprio padrão de comportamento e propagação local, por exemplo, a metástase óssea é muito comum nos cânceres de mama, pulmão, tireoide, rim e próstata, mas menos comum em outros tumores. O tratamento do câncer depende do tipo de tumor, do local do tumor primário, e do grau de propagação [2].

Em 1878, Thomas Beatson descobriu que a produção de leite das mamas de coelhas parou depois de removidos os ovários. Cientistas posteriormente identificaram que a regressão do câncer de próstata metastático após a remoção dos testículos. Agora novas classes de fármacos (inibidores da aromatase, luteinizantes análogos de liberação do hormônio- LHR) estão sendo usados para tratar câncer de próstata e mama. Como os hormônios influenciam o crescimento do câncer, desde que eles estão envolvidos em processos como proliferação, sobrevivência e crescimento celular, há uma dependência destes hormônios para levar ao desenvolvimento dos cânceres de próstata e mama nas fases iniciais [1, 3].

O câncer é um problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que dentro de 15 anos sejam detectados 27 milhões de novos casos, com 17 milhões de mortes e 75 milhões de portadoras com câncer anualmente [3].

Segundo estimativas do INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) e do 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, enquanto que o câncer de mama o é para as mulheres [4].

1.2 Câncer de próstata (PCa)

O câncer de próstata é uma patologia da glândula sexual masculina responsável pela produção de parte do líquido seminal. Os locais mais comuns para a metástase do câncer de próstata são as vesículas seminais, os gânglios linfáticos, pulmões, e vários ossos ao redor dos quadris e da região pélvica [2].

Nos anos 40 Huggins e Hodges [5] descreveram valores normais de fosfatases no soro de homens saudáveis (0,2 – 3,5 UI/L) e em doentes com carcinoma da próstata (>3,5 UI/L). Além disso, eles demonstraram que os níveis séricos de fosfatase ácida foram reduzidos em PCa metastático através da diminuição da atividade de androgénios e aumentou após injeções de androgénios. Assim, devido à fosfatase ácida ser uma enzima sintetizada na próstata (PAP- *prostatic acid phosphatase*) eles propuseram a orquiectomia (remoção dos testículos) como o primeiro método para diminuir os níveis de testosterona no soro com a finalidade de desacelerar o crescimento tumoral.

O uso generalizado do antígeno prostático específico (PSA) teve profundos efeitos sobre o diagnóstico e tratamento de câncer de próstata desde a sua introdução na década de 80, pois se mostrou mais sensível do que PAP para a detecção do câncer de próstata [6, 7]. Assim, o PSA é o marcador tumoral mais importante na avaliação de homens sobre a possibilidade de câncer de próstata. Sendo expresso em mais de 99% de todos os tipos de câncers de próstata, o PSA é um marcador muito confiável para acompanhar a doença e resposta à terapia [8].

1.2.1 Terapia Hormonal

Em sua fase inicial, a neoplasia de próstata é hormônio dependente, isto é, multiplica-se a partir da ação dos hormônios testosterona e dihidrotestosterona (principalmente) no receptor andrógeno (AR), levando à multiplicação celular [9]. Dessa forma, a terapia inicial para o tratamento do câncer de próstata pode consistir na prostatectomia radical ou parcial, seguida da terapia de deprivação do andrógeno (ADT – *androgen deprivation therapy*) [10].

1.2.1.1 Síntese de substâncias Androgênicas

Nos homens, o andrógeno principal circulante é a testosterona, 90% do qual é produzido pelas células Leydig no testículo. Esta produção é controlada pelo hipotálamo e a glândula pituitária mediante o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH - *gonatrophin-release hormone*) controlando a liberação do hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) (Figura 1). Assim a testosterona é secretada pelos testículos em conjunto com os demais andrógenos como a dihidroxiandrostenediona (DHA), androstenediona e sulfato DHA que são sintetizados a partir do colesterol [11].

Todos estes andrógenos mencionados são metabolizados mediante a enzima 5 α redutase dentro da próstata em 5 α -dihidrotestosterona (DHT), que é o andrógeno mais potente biologicamente, pois interage com o receptor andrógeno com uma afinidade de entre três e cinco vezes maior do que a testosterona [12].

A glândula adrenal é outra importante fonte de andrógenos. O hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) é liberado pela glândula pituitária estimulando a mesma produzindo os andrógenos dehidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona (Andro) que, por sua vez, são metabolizados mediante hidrólise e isomerização respectivamente [13].

Figura 1 - Caminhos básicos da produção de andrógeno.

Fonte: Adaptação de ABRAHAM, J.; STAFFURTH, J., 2007, p. 30. [12]

1.2.1.2 Terapia de deprivação do andrógeno (ADT)

A terapia de deprivação do andrógeno (ADT) tem como objetivo reduzir a atividade da testosterona a níveis de castração, devido ao fator crítico que os andrógenos desempenham no crescimento do câncer de próstata. Esta supressão de andrógenos testiculares pode-se conseguir mediante a castração cirúrgica ou química.

Sendo conhecida a rota de produção dos andrógenos (Figura 1) foram elaborados diferentes métodos para este tratamento aplicáveis quando detectados na fase inicial da doença. Utilizando agonistas do GnRH (o LHRH – *Luteinizing hormone-releasing hormone*) como o goserelina, leuprolida, buserelina e histrelina; e antagonistas do GnRH, como o cetorelix, ganirelix, degarelix e abarelix, os quais diminuem a produção de testosterona. Antagonistas do

receptor andrógeno como o acetato ciproterona (esteroidal) e os fármacos flutamida, bicalutamida e nilutamida (não esteroidais ou anti-androgénicos) os quais modificam a estrutura do receptor inibindo a interação de ele com os hormônios. Além da finasterida e dutasterida como inibidores da 5 α -redutase, a qual é a enzima responsável pela transformação de testosterona a dihidrotestosterona. Em homens tratados com finasterida a concentração de DHT é muito baixa quando comparada com a testosterona, demonstrando regressão do câncer e inibição do crescimento celular. A última classe terapêutica é constituída dos inibidores de andrógenos adrenais como o cetoconazol, o acetato de abiraterona e aminoglutemida [14, 15].

A ADT possui efeitos secundários como afrontamentos, perda da libido, anemia, ginecomastia, instabilidade emocional ou fadiga. Paralelamente é associada com o incremento de massa gordurosa, diabetes, incremento dos triglicerídeos, risco cardiovascular além de fraqueza muscular e perda da densidade mineral do osso, incrementando o risco de fratura óssea como de quadril e vértebras [16]. Para controlar estes efeitos são recomendadas modificações do estilo de vida (parar de fumar, evitando ganho de peso, etc.) e para as complicações cardiovasculares; exercícios regulares de treino resistido, restrição a ingestão de álcool, além de suplementos de cálcio e vitamina D para as complicações musculares e ósseas [17].

1.2.2 Câncer de Próstata Resistente à Castração (CRPC)

ADT não é curativa e após um período de dois a três anos de tratamento, as células de câncer de próstata reativam a sinalização do receptor andrógeno (AR), voltando para a proliferação celular apesar de níveis baixos de testosterona circulante. Desta forma, uma fase denominada Câncer de próstata resistente à castração (CRPC) ou câncer de próstata andrógeno independente (AIPC) é observada. Evidências experimentais têm demonstrado que a sinalização contínua de AR manteve-se importante para a progressão do CRPC. Atualmente, muitas das alterações moleculares e genéticas durante ADT foram identificadas e tornou-se claro que múltiplas vias intracelulares dependentes e independentes de AR são influenciadas na forma de resistência à castração. Estas acontecem mediante diferentes mecanismos como amplificação

ou superexpressão do AR, alterações nos corre reguladores, mecanismos de apoptose, entre outros (Figura 2), obtendo como resultado o incremento do crescimento, sobrevivência, proliferação, migração e invasão das células cancerígenas [18, 19]. Desse modo, novas alternativas terapêuticas são necessárias para cada uma de essas diferentes vias.

Figura 2 - Representação esquemática das alterações moleculares em câncer de próstata resistente à castração (CRPC)

Fonte: KATZENWADEL, A.; WOLF, P., 2015, p. 13. [19]

1.2.2.1 *Via AR dependente*

1.2.2.1.1 Sinalização do AR

Um aumento na expressão do AR (Figura 2-(1)) é detectado em uma grande parte dos tumores resistentes à castração, o qual pode ser resultado da reativação da atividade transcripcional do AR (apesar de ter níveis de andrógeno baixos) aumentando a expressão do mRNA do AR. Estudos em modelos pré-clínicos têm demonstrado que a expressão aumentada do AR é suficiente para induzir CRPC [20]. O incremento do mRNA do AR é a única variação consistentemente associada com o desenvolvimento da resistência à terapia antiandrogênica e é suficiente para converter o crescimento do câncer de hormônio sensível a hormônio refratário [21]. Assim, foi aplicado o tratamento de bloqueio de andrógeno combinado (CAB), também conhecido como bloqueio máximo de andrógenos (MAB), baseado na combinação da castração e antiandrógenos como a flutamida, que mostrou uma melhor eficácia comparada quando é utilizada na primeira fase do tratamento. A nilutamida apresentou uma resposta de PSA diminuída a valores menores de 50% [22]. A bicalutamida possui uma afinidade de ligação quatro vezes maior do que a flutamida ao AR, adicionalmente seu uso é mais seguro, pois apresenta efeitos colaterais menores em comparação como os gerados da flutamida e nilutamida [23, 24]. Quando comparados os níveis de sobrevivência após CAB em relação a ADT em câncer de próstata avançado, não apresentaram diferença significativa em um período de dois anos, mas sim em um período de tratamento de cinco anos, favorecendo o CAB [22].

Mutações no AR são pouco comuns na etapa inicial do PCa mas são muito comuns em CRPCs, onde estão presentes em aproximadamente 10-30% dos casos. Essas mutações identificadas em tumores que alteram a especificidade de ligação, incrementando a sensibilidade a níveis baixos de andrógenos ou permitindo ativações, tornando-se independentes de ativadores como mecanismo de resistência [25]. Essas mutações no AR são apresentadas majoritariamente nos pacientes que foram tratados com flutamida e bicalutamida, reportados numa frequência de até 30%, quando comparados em pacientes tratados com castração que representam o 5% [26, 27]. A primeira mutação identificada no

códon 877, de treonina a alanina, em células LNCaP, derivada da lesão metastática do linfonodo de um paciente com PCa [28]. Este AR mutado é fortemente estimulado tanto pela 4-hidroxiflutamida (metabólito ativo da flutamida) como os estrógenos e a progesterona [29]. Assim, a atividade do AR mutado pode aumentar mediante andrógenos adrenais e produtos do metabolismo da dihidrotestosterona (Figura 2-(2)), os quais são hormônios fracos [30]. Muitas outras mutações no domínio de ligação ao ligante (LBD) do AR (por exemplo, L701H, V715M, V730M e H874Y) os quais modificam a estrutura no AR alterando a especificidade da ligação ao ligante. Além disso, aumentam a expressão da transcrição do AR por outros esteroides incluindo andrógenos adrenais e/ou antiandrógenos [26, 31].

A atividade de transcrição do AR pode ser alterada também por uma variação na regulação na expressão das proteínas coativadoras e correpessoras (Figura 2-(3)), as quais aumentam ou diminuem a atividade do AR, respectivamente. É conhecida uma ampla gama de proteínas correguladoras com um ou mais domínios no AR. Várias das proteínas identificadas como coativadoras do AR (como as ciclinas e β -cateninas) são proteínas com funções estabelecidas independente da ativação do AR influenciando em diferentes funções celulares, como migração e invasão [32]. O primeiro corregulador detectado no câncer de próstata é ARA70, o qual tem sido investigado extensivamente como responsável pela inibição do crescimento das células de PCa, e potencializa várias ativações do AR na presença de antiandrógenos e esteroides (estradiol ou Δ -5-androstanediol) [33, 34]. O coativador p160 é composto por três membros: coativador do receptor esteroide-1 (SRC-1), SRC-2 (TIF2/GRIP-1), e SRC-3 (AIB1/RAC3) os quais são encarregados das funções de transcrição de receptores nucleares e outros fatores de transcrição [35]. Em células tumorais nas quais superexpressam SRC-1 e TIF2, altas atividades do AR são verificadas após o tratamento com andrógenos adrenais. Assim, uma incrementada ativação dos AR mutados causada por esteroides adrenais (dehidroepiandrosterona e androstenediona) poderia ser um outro mecanismo que explica o crescimento tumoral [34]. Outro coativador de importância é o Tip60, específico para os receptores nucleares hormonais (receptores de estrógeno e progesterona), que pode modular a resposta do crescimento do PCa aos antiandrógenos ou andrógenos. Poderia prever-se que as mudanças nos níveis de expressão e/ou de localização pode desempenhar um papel essencial

para o desenvolvimento e progressão do PCa. Portanto, Tip60 poderia constituir um alvo terapêutico crucial para o PCa [36]. As proteínas correpessoras fazem uma contribuição importante na biologia de múltiplos receptores nucleares (receptor do hormônio tireóide e receptores retinoidais) os correpessores mais conhecidos são o do receptor nuclear (NCoR) e o mediador dos receptores do hormônio retinóide e tireóide (SMRT) os quais reprimem a transcrição mediante o recrutamento de histonas desacetilases [29].

Um aumento na ativação do AR nas vias de sinalização celular é também possível mediante uma síntese intratumoral de testosterona durante ADT. Esta pode ser gerada mediante o aumento da expressão gênica de diferentes enzimas que mediam o metabolismo intracelular dos andrógenos adrenais dehidroepiandrosterona (DHEA) ou androstenediona a testosterona e dihidrotestosterona (DHT) (Figura 2-(4)) [37]. Desde os anos 40, a descoberta de um aumento de colesterol nas células tumorais de PCa foi reportado. Este aumento é originado a partir de proteínas envolvidas na homeostase do colesterol que são alteradas, crescem independentemente do andrógeno de uma forma que parece ser que a geração de colesterol livre pode ser usada para fornecer o precursor para a via esteroidogênica, estimulando a divisão celular [38]. Assim, a síntese de testosterona *de novo* a partir do colesterol pode acontecer em CRPC. Ensaios *in vivo* utilizando células LNCaP dependente do andrógeno sob as condições que geram o CRPC, demonstraram que enzimas envolvidas na síntese de colesterol foram alteradas, confirmando o já mencionado [39].

1.2.2.1.2 Sinalização do fator de crescimento

Uma superexpressão (Figura 2-(5)) de citocinas como a interleucina (IL-6 e IL8) e dos fatores de crescimento tais como, o fator de crescimento de queratinócito (KFG), fator de crescimento de transformação alfa (TGF α) ou o fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), com seus respectivos receptores, estão presentes no CRPC. IL-6 e IL-8 ativam a proteína quinase que é ativada por mitógeno (MAPK) fosforilando e ativando o domínio N-terminal do AR levando as vias de sinais de transdução ao núcleo [21]. Assim, terapias com dexametasona que diminui os níveis de IL-6 no sangue, embora não há supressão absoluta, são alternativas

utilizadas [40]. Além do anticorpo tocilizumab, utilizado como inibidor do receptor IL-6, que inibe o crescimento tumoral em células derivadas de tumor ósseo PC-3 [41].

1.2.2.2 Via AR independente

1.2.2.2.1 Sinalização apoptótica

Esta via de sinalização apoptótica (Figura 2-(6,7)) envolve a proteína proapoptótica PTEN (fosfatase homóloga a tensina) que é reguladora da via de sobrevivência celular mediante a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/Akt/mTOR. Ela é ativada mediante diferentes fatores de crescimento (GF) e o receptor tirosina quinase (RTK), ativando a PI3K a qual fosforila a AKT (serina/treonina quinase). Ativando diferentes moléculas envolvidas na proliferação e sobrevivência celular. O sunitinib é um inibidor de tirosina quinase que atua em diversos tipos de câncer. No entanto, em células de câncer de próstata com expressão reduzida de PTEN, há resistência a este inibidor [19]. Adicionalmente tem-se a família de genes antiapoptóticos bcl-2 (inclusive mcl-1) que durante a progressão no câncer encontram-se superexpressas promovendo a sobrevivência das células tumorais. Assim, é estudado como alvo, e foi desenvolvido um inibidor do gene Bcl-2 baseado em um oligonucleotídeo antisenso. O oblimersen é um oligodeoxinucleotídeo 18-mer desenhado para se ligar aos primeiros seis códons no mRNA do bcl-2 representando uma nova estratégia moduladora da apoptose com resultados encorajadores [42]. Outro alvo estudado é a proteína proapoptótica Bax, que ao ser regulada negativamente leva as células cancerígenas a desenvolverem uma motilidade e invasão potenciada. São conhecidas proteínas inibidoras de Bax, como o peptídeo antiapoptótico humanina (Hn), a proteína inibidora Ku70, e a proteína Bif-1 (fator-1 de interação do Bax) [43].

1.2.2.2.2 Intensificação da sinalização Wnt/ β -catenina

Esta via (Figura 2-(8)) é ativada mediante a interação do ligante wnt (Wnt) ao receptor LRP/Fz (proteína de baixa densidade/frizzled). A β -catenina está encarregada da regulação positiva de diferentes genes, que levam a angiogênese e a metástase. Na presença de andrógenos, a formação do complexo AR/ β -catenina é favorecida, conduzindo à síntese de receptor andrógeno. Porém, na ausência da ligação AR, a formação do complexo β -catenina com os fatores de transcrição de células T específicas e o potenciador do fator de ligação linfóide (TCF/LEF-1) é favorecida. Tratamentos com anticorpos monoclonais como o bevacizumab não tiveram efetividade [44, 45].

1.2.3 Síntese *de novo* de andrógeno em câncer de próstata resistente à castração (CRPC)

Um dos alvos mais atrativos é a via de biossíntese de andrógenos. Como mencionado previamente, as células de CRPC têm a habilidade de sintetizar andrógenos *de novo*. Tem-se demonstrado que os tumores com CRPC possuem as enzimas necessárias para produzir andrógenos a partir do colesterol intracelularmente [46]. Mediante diferentes estudos foram apresentadas enzimas na via clássica de síntese do andrógeno, incluindo CYP11A1, CYP17A1, AKR1C1, AKR1C3 (pertencentes à família aldo-ceto redutase), HSD17B3 (uma desidrogenase esteroide 17 β -hidróxi) e SRD5A1 (esteroide 5 α -redutase tipo 1), expressas em CRPC e também reguladas positivamente (Figura 3). CYP11A1 é a enzima responsável pela conversão do colesterol a pregnenolona, enquanto CYP17A1 modifica a pregnenolona a progesterona. Além disso, as enzimas encontradas na via *backdoor* facilita a criação de DHT sem requerer a testosterona como um precursor direto. Também foram relatadas regulações positivas em CRPC para as enzimas HSD17B3, SRD5A1 e AKR1C2 (família 1 das aldo-ceto redutase) [38].

Figura 3 - Síntese do andrógeno mediante a via clássica e *backdoor* dentro da mitocôndria

Fonte: Adaptação de TWIDDY, A.; LEON, C.; WASAN, K., 2011, p. 425. [38]

Na via *backdoor*, SRD5A1 converte a progesterona a pregnan-3,20-diona, a qual é convertida a pregnan-3α-ol-20-ona mediante AKR1C2, enquanto HSD17B3 é responsável pela conversão do androsterona a androstanediol [38].

Novos inibidores (antiandrógenos não esteroidais) têm sido desenvolvidos para atacar etapas cruciais na via de síntese. Desse modo estão sendo utilizados os compostos: cetoconazol, acetato de abiraterona, orteronel, geleterona e VT-464 [47].

O cetoconazol (Figura 4-A) é um imidazole sintético oral antifúngico planejado para romper membranas celulares no fungo mediante a inibição da síntese do ergosterol. Devido a essa homologia entre as enzimas específicas fúngicas e humanas, a síntese do andrógeno em humanos é prejudicada, especificamente mediante a inibição de CYP11A1 (de colesterol a

pregnenolona) (Figura 3), com atividade adicional nas enzimas CYP51A, CYP11B1, CYP11B2, CYP17 e CYP19 [47].

O acetato de abiraterona (AA) (Figura 4-B) é o pro-fármaco do abiraterona, um inibidor potente e seletivo do CYP17A1 que inibe tanto na via clássica (de progesterona a 17-OH-progesterona) como na *backdoor* (de pregnan-3 α -ol-20-ona a pregnan-3,17-diol-20-ona) (Figura 3), que foi aprovado pela FDA no ano 2011 [47].

A finasterida e dutasterida (Figura 4-C, D) são dois fármacos inibidores da enzima SRD5A2 que atua em duas vias, na clássica, inibindo a conversão de testosterona a DHT, e na *backdoor*; de progesterona a pregnan-3 α -ol-20-ona [48].

Figura 4 - Estruturas dos inibidores das enzimas envolvidas na biossíntese de andrógenos

Fonte: Autoria própria.

O orteronel (TAK-700) (Figura 4-E) similar ao acetato de abiraterona é também um inibidor do CYP17 com uma seletividade acrescentada na atividade da 17,20-liase sobre a atividade 17 α -hidroxilase da enzima [49].

A galeterona (Figura 4-F) é um novo inibidor CYP17 liase que é muito similar a abiraterona. Ele também bloqueia competitivamente a ligação do andrógeno ao AR e regula negativamente a expressão do AR em linhagens de LNCaP e VCaP. Adicionalmente prejudica a ligação do AR ao DNA e regula positivamente a degradação da proteína mutada do AR T878A.

O inibidor VT-464 (Figura 4-G), similar à galeterona, é também um inibidor CYP17 liase que se encontra em estudo clínico [49].

1.2.4 O Receptor Andrógeno (AR) como alvo terapêutico

O AR pertencente à superfamília de receptores nucleares, formada por domínios conservados de ligação ao DNA e ao ligante, além do domínio menos conservado N-terminal. O AR é transcrito a partir de 8 éxons e codificando aproximadamente 919 aminoácidos (Figura 5). O éxon 1 (aminoácidos 1-537) codifica o domínio amino terminal (NTD) o qual contém o domínio de transativação AF-1, e pode ativar a transcrição independentemente do estímulo androgênico em mutações no LBD. Os éxons 2 e 3 (responsáveis pela transcrição de 68 aminoácidos) codificam o domínio de ligação ao DNA (DBD) possui 2 dedos de zinco, cada um composto por 4 resíduos de cisteína ligado a cada íon de zinco. A 5' região do éxon 4 (sequência de 50 aminoácidos aproximadamente, 625-669) leva a produção da região dobradiça, a qual contém o sinal de localização nuclear. Finalmente a região 3' do éxon 4 e os éxons 5-8 (aminoácidos 669-919) codificam o domínio de interação do ligando (LBD) o qual contém o domínio de transativação AF-2 (Figura 5-a). O LBD é constituído por 12 α -hélices antiparalelas com o sitio de ligação ao andrógeno (ABS) incrustado no seu interior, que sofre um rearranjo significativo frente à ligação do agonista. Na Figura 5-b, pode-se observar as quatro hélices envolvidas na ligação da testosterona (H3, H4, H5 e H12) que delimitam o sítio de interação e do coativador [50, 51].

Figura 5 - Estrutura esquemática do AR e o domínio de ligação ao ligando (LBD). (a) domínios funcionais do AR. (b) estrutura cristalina do AR-LBD ligado à testosterona.

Fonte: BIRON, R.; BÉDARD, F. J., 2015, *In press*. [50]

1.2.4.1 Domínio N-terminal (NTD) como alvo

O domínio N-terminal do AR é importante para determinar extensão da atividade transcricional do receptor. Ele possui um número variável de repetições de poliglutaminas e poliglicinas e foi demonstrado em estudos experimentais que a diminuição do número dos trechos de poliglutaminas é associada com a atividade do receptor mais elevada [52]. Assim, o AR-NTD representa um alvo muito interessante para desenvolver inibidores que consigam bloquear as transativações dependentes do ligante e também independentes do AR e, por conseguinte, ser ativa em PCa hormônio sensível e resistente à castração.

Diversos peptídeos clorados provenientes da *Dysidea sp.* chamadas sintokamidas foram identificados e não apresentaram citotoxicidade em ensaio de viabilidade celular. Sintokamida A (Figura 6-A) demonstrou diminuir significativamente a expressão do PSA e bloquear a transativação do AR-NTD a uma concentração de $5\mu\text{L.mL}^{-1}$, e inibe a proliferação em células LNCaP AR-dependentes mas não em PC-3 AR-independentes [50].

A descoberta de nifateronas (provenientes de extratos de esponja marinha *Niphates digitalis*) levou ao composto nifaterona B (Figura 6-B), a qual reduz a produção do PSA e a transativação do AR-NTD e inibe o crescimento de células LNCaP a $14\mu\text{L.mL}^{-1}$, sem efeito em células de PC-3 [50].

Figura 6 - Estruturas dos inibidores do domínio N-terminal (NTD) do AR

Fonte: Autoria própria.

A partir da esponja marinha *Geodoia ligreni*, o composto EPI-001 foi descoberto (Figura 6-C). Ele é AR específico e não inibe os receptores de progesterona ou glucocorticoides. Um efeito especialmente importante observado é que ele não inibe o domínio de ligação ao ligante (LBD), sendo inibidor exclusivo para o domínio N-terminal (NTD) [47]. Em ensaios pré-clínicos, o composto inibiu a proliferação em células LNCaP AR-dependentes mas não em AR-independentes como PC-3 e DU-145 [53]. O EPI-001 possui quatro estereoisômeros, um de eles o EPI-002 (2R, 20S) (Figura 6-D), que tem demonstrado propriedades antitumorais tanto *in vitro* e *in vivo*. EPI-001 e EPI-002 bloqueiam a expressão de ambos os tipos de genes reguladores do AR-dependente e AR-independente e inibem seletivamente a proliferação dependente do andrógeno em uma variedade de células AR-dependentes de PCa, inclusive células 22RV1 [50].

1.2.4.2 Domínio de ligação ao ligando (LBD) como alvo

Os antiandrógenos não esteroidais bicalutamida, flutamida e nilutamida (Figura 7-A, B e C) bloqueiam os sinais mediados pelo andrógeno a partir da interação do LBD com o AR. A bicalutamida tem uma afinidade maior em ambos os AR (mutado e normal) e, por conseguinte pode atuar em casos no qual o antagonismo do AR com flutamida fracassou. Adicionalmente, a bicalutamida interrompe o recrutamento de cofatores, que suprimem a proliferação celular [54]. Similarmente a nilutamida tem demonstrado induzir uma baixa do PSA em homens que desenvolveram resistência à inibição do AR com flutamida ou bicalutamida [47].

Enzalutamida (Figura 7-D) é uma molécula planejada para inibir o AR em modelos pré-clínicos que são resistentes à terapia com bicalutamida [55]. Assim, a enzalutamida é um composto que apresenta uma afinidade ao AR 5 vezes maior de que bicalutamida. Ele reduz a translocação nuclear do AR e induz uma mudança conformacional do receptor que afeta o DBD e o recrutamento de cofatores [47]. Adicionalmente, a enzalutamida não apresenta efeitos agonistas detectáveis em células LNCaP, que apresentam superexpressão do AR em comparação com a bicalutamida [56].

Figura 7 - Estruturas dos inibidores do domínio de ligação ao ligando (LBD) no AR

Fonte: Autoria própria.

A molécula ARN-509 (Figura 7-E) é uma estrutura análoga à enzalutamida, a qual tem demonstrado potência similar *in vitro*, mas uma maior atividade *in vivo*. Ela apresenta uma potência antitumoral incrementada em amostras xenográficas de PCa, sugerindo que pode atingir a mesma eficácia com menores doses e menor toxicidade. Estudos pré-clínicos demonstraram que as concentrações do ARN-509 no sistema nervoso central foram quatro vezes menores aos apresentados com enzalutamida. Adicionalmente, similar à enzalutamida, ela inibe a localização do AR no núcleo. ARN-509 possui uma afinidade ao AR de sete a dez vezes maior do que a bicalutamida, sem apresentar atividade agonista ao AR [47, 53].

Finalmente, a molécula ODM-201 (Figura 7-F) que é outro antagonista do AR administrado oralmente, com estrutura química diferente da enzalutamida e ARN-509. Em

estudos pré-clínicos, demonstrou uma maior afinidade pelo AR quando comparada com a enzalutamida e ARN-509 sem atravessar a barreira hematoencefálica [57].

Embora estas estruturas apresentem diferenças químicas consideráveis, pode-se notar que estes inibidores apresentam uma nitrila ou um nitro aromático com algum tipo de eletroretirador em sua estrutura química. A nitrila e o nitro são responsáveis pelas interações por meio de ligação de hidrogênio com os aminoácidos Arg752 e Gln711 no LBD, sendo essencial este tipo de interação para obter potentes inibidores.

1.3 Câncer de mama

O câncer de mama é um tumor maligno da mama (um carcinoma). Segundo o INCA o câncer de mama é a doença com maior incidência (56% dos casos novos estimados para o 2014) na população feminina sem considerar o câncer de pele não melanoma [4]. É mais fortemente associado com a menarca precoce e menopausa tardia, ausência de filhos e idade tardia ao nascimento do primeiro filho, e, portanto, com um aumento do número total de ciclos menstruais na vida de uma mulher [2]. Dentro da terapia hormonal utilizada para o tratamento de câncer, que consiste na diminuição da produção do estradiol, é importante levar em consideração se o câncer é desenvolvido na etapa de pré-menopausa ou pós-menopausa. A remoção dos ovários é a primeira opção alternativa mediante a remoção cirúrgica além da castração química (usando agonistas do GnRH ou LHRH) ou irradiação [11]. No entanto é mais complexo o tratamento na etapa de pós-menopausa, que consiste em suprimir a influência do estradiol diretamente usando o receptor estrógeno (ER) como alvo mediante o uso de moduladores ER seletivos (SERMs), ou indiretamente mediante o bloqueio da conversão de andrógenos a estrógeno através do uso de inibidores de aromatase (AIs) e de reguladores negativos do ER seletivos (SERDs) [58].

1.3.1 Receptor estrógeno (ER)

A existência do ER foi demonstrada no ano 1958 por Elwood Jensen e pensava-se tratar somente um receptor até ER β ser clonado da próstata e ovário do rato em 1996. ER α principalmente expresso em tecidos reprodutivos (útero e ovário), mama, rins, osso, tecido adiposo branco e fígado, enquanto a expressão do ER β ocorre no ovário, sistema nervoso central (CNS), sistema cardiovascular, pulmão, órgãos reprodutivos masculinos e no sistema imune. Como membros da família de proteínas de receptores nucleares, ERs estão presentes nos núcleos, mas também no citoplasma e mitocôndria [59]. Assim como o AR, o ER também está constituído pelo domínio N-terminal (NTD), envolvido na transativação de genes alvos (domínio A/B e AF-1), o domínio de ligação ao DNA (DBD, domínio C), a região dobradiça envolvida na dimerização (domínio D) e a região C-terminal que contém o domínio de interação do ligante (LBD, domínio E/F e AF-2) e a função de ativação-2 (AF-2). (Figura 8). As porcentagens indicam a homologia entre o ER α e ER β , onde o DBD é altamente conservado (95%). ER α está constituída por 595 amino ácidos e ER β ; por 530 amino ácidos [60].

Figura 8 - Organização dos domínios do ER α e ER β humanos.

Fonte: MARINO *et al.*, 2006, p. 498 [60]

No caso do domínio N-terminal dos ERs há uma diferença considerável em sua resposta aos ligantes sintéticos inibidores do estrógeno (ex. 4-OH tamoxifeno, raloxifeno, e fulvestrant), devido a uma dissimilaridade na sequência de aminoácidos entre os receptores [61]. O domínio

de interação do ligante (LBD) é a segunda região mais conservada dos ERs. Na ausência de ligantes, o LBD forma complexo com as proteínas *heat-shock* (HSP) 70 e 90 mediante uma maquinaria de chaperonas proteicas presentes junto ao ER até que este interaja com o esteroide [62].

ER α é expresso em até 10% em tecido normal de mama, mas está presente em aproximadamente 50-80% em tumores de mama [59], foi demonstrado que este subtipo promove a tumorigênese e progressão do câncer de mama. Assim a terapia hormonal é comumente usada em pacientes que apresentam a expressão do ER α , incluindo os SERMs, SERDs, e AIs como mencionado previamente.

A análise imuno-histoquímica identificou ER β como a maior forma do ER em tecido normal de mama. Aproximadamente 58% do câncer de mama expressa ambos os ERs, 18% expressam só ER β e 14% expressam só ER α . Altos níveis de expressão do ER β , independentemente do estado do ER α , estão associados como uma melhor resposta ao tamoxifeno e um tempo de sobrevivência mais longa [63]. Várias evidências sugerem que ER β funciona como um supressor de tumor em modelos *in vitro*, onde a expressão do ER β em células de câncer de mama ER α -positivo diminui a invasão, a inibição da formação do tumor e angiogênese [64].

Em geral, a maioria dos estudos sugere que a presença do ER α é um bom marcador para o prognóstico de câncer de mama. No entanto, devem-se considerar as quantidades relativas do ER α e ER β . Como o tecido mamário torna-se tumorigênico, a quantidade de ER α aumenta enquanto que a quantidade do ER β diminui [65].

1.3.2 Moduladores do receptor estrógeno seletivos (SERMs)

Os ERs estão presentes em diferentes tecidos do corpo como no tecido ósseo, no útero (além de vaginal e endométrio), mama, sistema cardiovascular e fígado [66] e são modulados pelos SERMs a partir das interações intermoleculares. Os SERMs são uma classe de compostos que possui atividade agonistas ou antagonistas do estrógeno nos tecidos com efeitos seletivos. [67] Cada SERM possui propriedades físico-químicas e estruturais capazes de induzir

diferentes mudanças estruturais no receptor, influenciando a interação dos receptores com coativadores ou correpressores, envolvidos na regulação de transcrição do gene [68].

Os SERMs são classificados segundo suas estruturas químicas: os trifeniletileno, considerados de primeira geração (tamoxifeno e toremifeno), os benzotiofeno considerados de segunda geração (raloxifeno) e os naftalenol e derivado indol (lasofoxifeno e bazedoxifeno respectivamente) terceira geração (Figura 9) [69].

Figura 9 - Estruturas químicas dos SERMs

Fonte: Autoria própria.

O tamoxifeno compete com o estrógeno para se ligar ao ER. Ele atua como antagonista do estrógeno e é principalmente citostático para o crescimento *in vitro* de células de câncer de mama estrógeno-dependentes (MCF-7), inibindo sua progressão desde a fase G₁ do ciclo celular, induzindo adicionalmente a apoptose [70]. Em outros tecidos como o endométrio e

ósseo, atua como agonista do estrógeno induzindo a proliferação endometrial e preserva a massa óssea em mulheres na pós-menopausa [71], preservando a densidade óssea e reduzindo o risco de fraturas (embora não seja significativo) [72]. O toremifeno foi desenvolvido há mais de 20 anos obtendo similar eficácia ao tamoxifeno com um perfil melhorado em quanto à segurança [73].

O raloxifeno foi sintetizado inicialmente para a cura do câncer de mama, mas atua como agonista do ER nos ossos e possui efeitos como antiartrite e antiosteoporose quando é utilizado em tratamento de longo prazo. No câncer de mama estrógeno-dependente, o raloxifeno oferece resistência mediante a ligação ao ER bloqueando a transcrição induzida pelo estrógeno [74]. Os estudos de tamoxifeno e raloxifeno (STAR) têm demonstrado que o raloxifeno é tão eficaz como tamoxifeno em reduzir o risco de câncer de mama invasivo e tem baixo risco de eventos adversos, mostrando sua superioridade [70, 74].

O lasofoxifeno reduz significativamente o risco de câncer de mama estrógeno-dependente em 81% dos casos de câncer de mama invasivo, aumentando para 85% em um período de 5 anos [69]. O bazedoxifeno tem demonstrado prevenir a perda de massa óssea em mulheres na pós-menopausa com risco de osteoporose, com um perfil de segurança favorável no endométrio, ovário e mama. Ele também reduz significativamente o risco de novas fraturas vertebrais em mulheres com osteoporose. Adicionalmente estudos mostraram a inibição do crescimento celular em diversos tipos de linhagens de câncer de mama que expressam o receptor estrógeno (linhagens MCF-7:5C e MCF-7:2A, MCF-7 e T47D) [75].

1.3.3 Inibidores de Aromatase (AIs)

Em mulheres na pós-menopausa, os ovários não produzem estrógeno, em seu lugar baixos níveis de estrógeno são sintetizados em outros tecidos como adiposo, fígado, glândulas adrenais e na mama. A biossíntese do estrógeno desde os andrógenos (Figura 10) é catalisada pela aromatase, uma enzima do citocromo P450, produto do gene CYP19 [58].

Três gerações de AIs têm sido desenvolvidos e cada uma delas com maior especificidade pela enzima aromatase. O AI de primeira geração é a aminoglutetimida, que reduz a produção

de aldosterona e cortisol, além de estrona e estradiol. De segunda geração tem o fadrozol e vorozol, que reduzem a produção de aldosterona e cortisol, além de estrona e estradiol. E finalmente os de terceira geração (anastrozol, letrozol e o inativador exemestano) (Figura 11), os quais bloqueiam só a conversão de androstenediona e testosterona a estrona e estradiol [76]. Inibidores de aromatase estão substituindo o tamoxifeno como o agente hormonal mais amplamente usado no tratamento de câncer de mama. Eles são altamente efetivos em mulheres na pós-menopausa com câncer de mama avançado os quais falharam no tratamento prévio com tamoxifeno [77].

Figura 10 - Via de biossíntese de Estradiol a partir do colesterol e os sítios de ação dos inibidores de aromatase (AIs) de 1ra, 2da e 3ra geração.

Fonte: Adaptado desde FABIAN, C., 2007, p. 2053 [58]

Figura 11 - Estruturas químicas dos inibidores de aromatase (AIs)

As razões para explicar a superioridade dos AIs sobre o tamoxifeno são múltiplas. O grande número de interações potenciais dos ERs após a ligação do tamoxifeno e subsequente translocação ao núcleo, a atividade não genômica do ER, a interação com as vias ativadas mediante diferentes fatores de crescimento pode explicar a complexidade destacando o mecanismo de resistência ao tamoxifeno. Assim, com a inibição da aromatase, os níveis de estradiol são reduzidos e a dimerização e ativação do ER são suprimidas levando à anulação do crescimento de células tumorais [78].

1.3.4 Reguladores negativos do receptor estrógeno seletivos (SERDs)

Embora alguns SERMs sejam utilizados para a prevenção e tratamento do câncer de mama, eles apresentam atividade agonista parcial. Assim, são necessários novos ligantes do ER com a capacidade de superar a resistência endócrina em este tipo de câncer. É pensado que a atividade clínica melhorada dos SERDs se deve à habilidade de regular negativamente as proteínas do ER e bloquear a ação do estrógeno sem apresentar efeitos agonistas [78, 79]. A primeira característica é a que causa atividade não agonista em todos os tecidos. Os SERDs são

classificados em dois grupos, esteroidais e não esteroidais [80]. O fulvestrant (composto esteroidal) possui uma cadeia longa alquílica desde a posição 7 α do E₂ (estradiol) (Figura 12-A), em comparação com o tamoxifeno, os efeitos inibidores na atividade do ER não são específicos aos tecidos e a degradação do ER acontece tanto em tecidos de mama quanto do útero [68]. E o GW5638 (compostos não esteroidal) é similar ao tamoxifeno (Figura 12-B), onde o trifeniletileno contém uma cadeia lateral de ácido acrílico e apresentou efeitos não agonistas no útero devido à estabilidade diminuída do ER. Adicionalmente esta classe de composto é utilizada na inibição do crescimento de tumores de mama resistentes ao tamoxifeno [80].

Figura 12 - Estruturas químicas dos SERDs

A) Fulvestrant

B) GW5638

1.3.5 Mecanismo de resistência à terapia endócrina

Similarmente à neoplasia na próstata, o câncer de mama apresenta resistência ao tratamento endócrino conforme vão sendo administrados os tratamentos desde os SERMs até os SERDs tendo como reação uma insensibilidade à ação do estrógeno.

Assim, foram propostos mecanismos de ação do ER no câncer de mama principalmente baseado em duas vias, onde o estradiol tem atividade genômica (função nuclear) e não genômica (função não nuclear) [81]. A função clássica do ER é sua função nuclear (Figura 13-a) na qual o estrógeno se liga ao ER que se dimeriza com outro receptor e atrai coativadores e correpressores a sítios específicos no DNA. Como parte das funções não nucleares, a via de sinalização do ER é também regulada pelos receptores de membrana tirosina quinases, incluindo o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), HER2 (receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2) e o receptor de fator de crescimento insulina (IGF1-R) (Figura 13-b). Esta via gera a fosforilação tanto do ER quanto seus coativadores e correpressores em diversos sítios para influenciar suas funções específicas, sendo referida como ativação do receptor independente [82]. Esta via não genômica juntamente com moléculas coativadoras (ex. a quinase Src) (Figura 13-c) ativam diversas cascatas de sinalização de quinase (ex. SRC, PI3K/AKT e Ras/p42/p44/MAPK) que, por a sua vez, fosforilam vários fatores de transcrição (TFs) e correpressores. Finalmente a via de quinase mediante estímulos extracelulares (estresse) pode ser ativada mediante a p38 e JNK, as quais podem modular a função do ER a partir da fosforilação do ER e seus correpressores. Esses estímulos extracelulares também podem ativar aos membros da família integrinas a qual pode ativar outra via de quinase (ex. FAK - quinase de adesão focal) (Figura 13-d). Desta forma pode haver uma atividade semelhante às MAPKs (quinases ativadas por mitógenos) [81].

Figura 13 - Três vias distintas de regulação do estrógeno na expressão do gene

Fonte: Adaptado de OSBORNE, C.; SCHIFF, R. 2011, p. 236. [81]

Conhecendo as vias de ação do ER, foram propostos mecanismos de resistência associados aos tumores [81, 83, 84]. A primeira via é referente ao ER e os corretores do ER, onde a função do ER é regulada mediante modificações pós-translacionais (fosforilação, metilação) influenciando interações com outras proteínas incluindo corretores de transcrição e sinalizações de moléculas citoplasmáticas. Uma superexpressão e fosforilação incrementada dos coativadores do ER, particularmente o receptor nuclear coativador 3 (NCOA3) oferece resistência *in vitro* e também em modelos xenográficos referente à resistência ao tamoxifeno [85].

A segunda via é mediante as moléculas de sinalização do ciclo celular, em referência às substâncias que controlam a progressão da fase G1 do ciclo celular (como os coativadores MYC e ciclinas E1 e D1) e as envolvidas na indução da apoptose, como a família de genes anti-apoptótica Bcl-2, que foram associadas com a redução de resposta ao tamoxifeno [84].

A terceira é referente às vias do receptor do fator de crescimento, as quais proporcionam proliferação e sobrevivência alternativa na presença de inibição efetiva na via do ER, onde os níveis de expressão dos EGFR e HER2 são geralmente altos em câncer de mama estrógeno independente. Estes fatores de crescimento podem contribuir à repressão transcricional da expressão do ER, resultando uma resistência ao tratamento endócrino [86].

1.4 Química Medicinal

A definição de química medicinal foi proposta pela comissão especializada da IUPAC: "*Química medicinal* refere-se à descoberta, desenvolvimento, identificação e interpretação do modo de ação do composto biologicamente ativo a nível molecular. A ênfase é colocada em fármacos, mas os interesses do químico medicinal não são restringidos a fármacos, mas incluem compostos bioativos em geral. A química medicinal também está relacionada com o estudo, identificação e síntese dos produtos metabólicos desses medicamentos e compostos relacionados" [87].

Assim, o papel da química medicinal no desenvolvimento de novos fármacos é proeminente nas três etapas seguintes [88]:

1. O passo da descoberta, que consiste na escolha do alvo terapêutico (bioquímica, modelo celular ou *in vivo*) e a identificação ou descoberta e a produção de novas substâncias ativas que interagem com o alvo selecionado.
2. A etapa de otimização, que lida com a melhoria de uma substância ativa. O processo considera principalmente o aumento na potência, seletividade e diminuição da toxicidade. Suas características são o estabelecimento das relações estrutura-atividade, idealmente baseadas na compreensão do modo de ação molecular.
3. A etapa de desenvolvimento, cujo objetivo é a continuação da melhoria das propriedades farmacocinéticas (ADME: adsorção, distribuição, metabolismo e excreção) e o ajuste fino das propriedades farmacêuticas de substâncias ativas para torná-las adequadas para o uso clínico. Este pode consistir, por exemplo, na

preparação de compostos melhor absorvidos, de formulações de liberação sustentada e de derivados solúveis em água, ou na eliminação de propriedades relacionadas com a tolerância do paciente (irritação, injeção dolorosa, propriedades organolépticas indesejadas).

1.5 Estudos *in vitro*: Estudos celulares

Broadly definiu ensaios na descoberta de fármacos, os quais são classificados em duas categorias: bioquímicos e celulares. Os ensaios bioquímicos são baseados sobre preparações de proteínas isoladas, enquanto os ensaios celulares utilizam células intactas. Ensaios *in vitro* são muito utilizados, sendo os ensaios celulares úteis. Usualmente os ensaios celulares utilizam linhagens celulares de mamíferos e têm uma grande importância para a identificação de moduladores com diversos mecanismos de ação, assim como para proporcionar informação dos compostos em relação à permeabilidade celular, estabilidade e citotoxicidade [89].

Além dos receptores de hormônio mencionados anteriormente, são considerados outros alvos de interesse envolvidos nas duas neoplasias estudadas, como quinases e catepsinas, as quais quando inibidas podem levar à morte celular independentemente de a célula expressar receptor nuclear.

1.6 Cisteíno Proteases

As cisteíno proteases, juntamente com as metaloproteases de matriz (MMPs) e a serino protease, degradam a matriz extracelular, facilitando deste modo o crescimento e invasão do tecido neoplásico [90].

As 11 catepsinas presentes em animais pertencem às cisteíno proteases da subfamília da papaína (catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, X e W). Elas são predominantemente endopeptidases, localizadas intracelularmente em vesículas endolisossomais. Catepsinas como

a catepsina B e catepsina L são importantes na regulação da síntese de proteínas e na sua degradação [90].

As expressões de algumas cisteíno proteases estão presentes em grande quantidade em vários tipos de células específicas, como a catepsina K está presente em osteoclastos (remodelação óssea) e catepsina S no sistema imunológico.

A catepsina B foi a primeira relacionada com câncer, e está claro que as catepsinas têm uma participação no crescimento e invasão tumoral (os quais são sustentados sob vários trabalhos em modelos de câncer em camundongos). Experimentos *in vitro* mostraram a inibição de catepsinas específicas para diminuir a invasão de células tumorais em uma variedade de cânceres, incluindo melanoma, mama, cólon, próstata e pulmão [90, 91].

1.6.1 Inibidores de catepsinas

Exemplos clássicos de inibidores de catepsinas são os peptidomiméticos, como os epóxidos luepeptina e peptidil; além do E-64 (Figura 14) que é um inibidor de cisteíno proteases lisosomais, que mostrou uma degradação baixa, distrofia muscular em animais, mas falhou em triagens humanas. O principal problema identificado para vários inibidores foi a ausência de especificidade devido a seu baixo reconhecimento intermolecular necessário para as catepsinas de interesse [92].

Outro inibidor conhecido é a molécula KGP94 (Figura 14) que é inibidora da catepsina L, a qual suprime o microambiente da metástase tumoral avançada associada a funções das células de câncer de próstata e mama [93].

Figura 14 - Inibidores de catepsinas

Fonte: Autoria própria.

1.7 Ensaios celulares

1.7.1 Método colorimétrico

A viabilidade celular pode ser medida mediante o uso de diferentes métodos colorimétricos e são de grande utilidade para a triagem dos compostos com potencial atividade biológica de interesse.

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 do meio de cultura. Assim, os sais de tetrazólio são candidatos atrativos para este propósito, como o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazólio). Ele é um sólido amarelo solúvel em meio aquoso, é reduzido ao formazan que é principalmente reduzido por NADH no citoplasma como um sólido roxo insolúvel em meio aquoso,. O formazan é solubilizado por meio de um agente solubilizante que é adicionado após a incubação do MTT nas células (Figura 15) [94, 95].

Figura 15 - Reação de metabolismo do MTT (conversão do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazólio em formazan)

Fonte: autoria própria.

1.7.2 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo apresenta uma ampla aplicação na detecção da resposta biológica desejada nos ensaios celulares. Esta técnica consiste na análise individual das células em cultura para quantificar as alterações morfológicas de forma mais rápida. As alterações celulares que podem ser observadas por citometria de fluxo são: o conteúdo celular, as modificações morfológicas (como a granulação), perturbações no ciclo celular e apoptose [96].

O estudo do ciclo celular (por meio do iodeto de propídio) irá caracterizar as moléculas de acordo com o bloqueio na multiplicação destas, indicando em qual momento do ciclo houve uma interrupção devido à atividade do composto testado [97].

Estes ensaios são de grande valia como confirmatórios em relação ao estudo colorimétrico, além de fornecerem informações adicionais sobre a resposta biológica fenotípica aos compostos estudados.

2 OBJETIVOS

Este estudo visa a identificação de novas substâncias bioativas a partir de estudos *in vitro* usando modelos celulares para o câncer de próstata humana (LNCaP) e o de mama humana (MCF-7) dependentes de hormônio.

Objetivos específicos:

- Estabelecer as condições de trabalho para os ensaios com estimulação e sem estimulação de hormônio nas linhagens LNCaP (câncer de próstata) e MCF-7 (câncer de mama);
- Realizar a triagem dos compostos para cada linhagem celular;
- Determinar a potência (IC_{50}) para os compostos ativos;
- Realizar o estudo do ciclo celular;
- Determinar o índice de seletividade dos compostos ativos em células normais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

- As células LNCaP (*Lymph Node Carcinoma of the prostate*), MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) e Balb/c 3T3 clone A31 (fibroblasto de camundongo) foram obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ);
- Soro Fetal Bovino (FBS), carvão ativado, dextran (D4751), glicose, NaHCO_3 , solução 0,25% de tripsina com EDTA, dimetilsulfóxido, azul de tripan, dodecilsulfato de sódio (SDS), ácido acético (99,7%) e brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) foram adquiridos da Sigma-Aldrich;
- O soro de feto bovino tratado com carvão ativo (cs-FBS) foi preparado no laboratório a partir do FBS, dextran e carvão ativado;
- A testosterona (hormônio usado nas células LNCaP) como padrão de referência foi doada por pesquisadores do Laboratório Nacional Agropecuário LANAGRO-MG, enquanto que a testosterona analisada comparativamente foi adquirida comercialmente de farmácia de manipulação;
- Estradiol (hormônio usado nas células MCF-7) e hidrocloreto de raloxifeno foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil;
- Bicalutamida e enzalutamida (MDV3100) foram obtidos da Selleckchem LLC, EUA;
- Tampão Fosfato Dubelco (PBS) e meios de cultura RPMI e DMEM foram obtidos da Cultilab Mat. Cultura Celular Ltda, Campinas SP;
- Kits Guava® Via Count e Guava® Cell Cycle foram adquiridos da EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA.

Nos métodos a seguir descritos foram utilizadas as linhagens LNCaP (metástase originada do câncer de próstata) e MCF-7 (originada do câncer de mama).

As linhagens foram cultivadas em diferentes meios de cultura:

- A linhagem LNCaP foi cultivada em meio RPMI, suplementado com 1,5 g/L de NaHCO_3 ,

- A linhagem MCF-7 foi cultivada em meio DMEM suplementado com 3,5 g/L de glicose e 1,5 g/L de NaHCO₃,
- Todos os meios contêm uma solução de penicilina/estreptomicina (1%) e 10% de FBS (para a manutenção e o estudo sem estimulação de hormônio) ou cs-FBS (para os ensaios com estimulação e triagens).
- Os meios de trabalho são: DMEM e RPMI para as linhagens MCF-7 e LNCaP respectivamente, suplementados com 10% FBS.

3.2 Métodos

3.2.1 Crescimento celular (cultivo)

Para o cultivo celular iniciou-se com o descongelamento das células seguido das passagens para a manutenção das células.

Descongelamento: foi descongelado 1 mL de células em uma concentração aproximada de 1×10^6 células/mL (contidas em um tubo criogênico e armazenadas a -75°C), aquecidas em um banho a 37°C até descongelarem. Imediatamente o conteúdo do tubo criogênico foi transferido a um tubo de centrífuga de 15mL e adicionados 9mL de meio, centrifugado durante 5 minutos a 1500 rpm para a linhagem LNCaP (2000 rpm para a linhagem MCF-7). Em seguida foi retirado o meio sobrenadante e as células foram ressuspensas com 2mL de meio e transferidas a um frasco para cultura celular T25 adicionando meio até um volume final de 6 mL. Cada frasco de cultura foi incubado durante o tempo suficiente a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Diariamente o crescimento celular foi seguido mediante observação no microscópio trocando o meio cada dois dias até atingir uma confluência celular de 70-80% na superfície do frasco de cultura.

Passagem: Uma vez atingida a confluência celular mencionada, o meio foi removido e adicionou-se 6 ou 10 mL de tripsina (para os frascos T25 ou T75, respectivamente), com incubação por 9 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 que foi centrifugado a 1500 rpm (ou 2000 rpm dependendo da linhagem) durante 5 min. Finalmente foi retirado o sobrenadante e as células foram ressuspensas e transferidas a um frasco de cultura contendo um volume final de 10 mL.

3.2.2 Ensaios celulares

Para realizar os ensaios celulares com os compostos foram estabelecidas as condições iniciais de trabalho para cada linhagem. Assim, primeiro realizou-se um estudo de crescimento celular de 7 dias para determinar a concentração celular de trabalho.

Uma vez conhecida a concentração de células, foi realizado um segundo estudo de crescimento celular adicionando concentrações conhecidas de hormônio (testosterona para a linhagem LNCaP e estradiol, para MCF-7) usando cs-FBS, com a seleção da concentração que apresentou melhor estimulação no crescimento celular num período de 7 dias. Uma vez fixadas as condições de trabalho para ambas as linhagens, foram realizadas as triagens das moléculas.

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). Além disso, a contagem por citometria de fluxo foi utilizada para comparar com a contagem manual e o método indireto de MTT, bem como o ensaio de ciclo celular para observar as possíveis alterações no ciclo celular, usando os reagentes Guava® Via Count e Guava® Cell Cycle respectivamente.

3.2.2.1 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 ressuspensas com 2 ou 3 mL de meio para fazer a contagem manual determinando assim o número de células por mililitro com auxílio de uma câmara de Neubauer e o microscópio. Posteriormente, a suspensão foi diluída até 1×10^6 células/mL. Em diferentes tubos foram preparadas 6 diferentes concentrações (Cx) para o teste: 3×10^5 ; 2×10^5 ; 1×10^5 ; $7,5 \times 10^4$; 5×10^4 ; $2,5 \times 10^4$; 1×10^4 ; 5×10^3 ; 1×10^3 células/mL.

Para realizar a curva de crescimento durante 7 dias, foram utilizadas placas de 96 poços adicionando (uma concentração por linha) 100 μ L de células nos poços desde a coluna 2 a 11 e desde a linha B a G (Figura 16) e 100 μ L 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.

Figura 16 - Distribuição das concentrações celulares de 96 poços no ensaio de crescimento celular para o ensaio colorimétrico com MTT

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Concentração celular
A													
B													C1
C													C2
D													C3
E													C4
F													C5
G													C6
H

Poços tratados com MTT		Poços com PBS (branco)
---	------------------------	---	------------------------

Fonte: Autoria própria.

Depois de preenchidas, as placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. A primeira placa foi tratada após 24 h de incubação, retirando 20 µL de meio dos poços utilizando uma micropipeta multicanal e adicionando 20 µL de solução MTT (5 mg de MTT por mL de PBS) em 7 poços de cada linha e nos outros 3 adicionou-se 20 µL de PBS (ver Figura 16). Esta foi incubada por um período de 3 horas. Em seguida o sobrenadante contido nos poços foi retirado usando uma agulha hipodérmica com auxílio de bomba de vácuo. 100 µL de agente solubilizante (10 g SDS, 100 mL DMSO e 0,6 mL de ácido acético glacial) foram adicionados 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. Este procedimento foi realizado diariamente durante uma semana, trocando o meio dos poços das placas cada 48 horas.

Estimulação do crescimento com hormônio:

Para esta etapa o meio deve estar livre de hormônio. Assim, o FBS foi tratado para obter cs-FBS (adaptado a partir da metodologia fornecida pela Sigma-Aldrich).

Foram pesados em tubos de centrífuga de 50 mL uma mistura 1:10 de dextran (D4751) e carvão ativado, foram adicionados 50 mL de FBS a cada tubo, seguidamente foram agitados mediante 30 minutos em um banho de gelo e deixou-se repousar durante 15 minutos no banho de gelo. A seguir, os tubos foram colocados na centrífuga a 2500 rpm durante 15 minutos. O FBS foi transferido para outro tubo. Foram realizadas duas centrifugações adicionais com a finalidade de tirar todo o carvão possível. Finalmente o sobrenadante de todos os tubos foi filtrado usando um filtro com membrana de 0,22 µm na capela de fluxo laminar e foi armazenado em um frasco estéril.

- *Estimulação com Testosterona:* O meio de cultivo para a LNCaP (RPMI) foi suplementado com 10% de cs-FBS. Selecionada a concentração de trabalho para a linhagem (obtida da curva de crescimento no procedimento anterior) após as 24 h de incubação das placas, o meio foi sugado completamente e foi adicionada a testosterona nas concentrações de 100; 10; 1; 0,1 e 0,01 nmol/L no mesmo esquema da Figura 16 (deixando a C6 como controle negativo) e as 7 placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. O estudo foi

realizado ao longo de 7 dias, contados a partir da adição da testosterona, sendo o meio trocado a cada 48 h.

- *Estimulação com Estradiol*: O meio de cultivo para a MCF-7 (DMEM) foi suplementado com 10% de cs-FBS. Foi usada a concentração de trabalho obtida na curva de crescimento no procedimento anterior para esta linhagem. Após as 24 h de incubação das placas, o meio foi sugado completamente e foram adicionadas diferentes concentrações de estradiol (10; 1; 0,1; 0,01 e 0,001 nmol/L) seguindo o esquema da Figura 17 (deixando a C6 como controle negativo) para as 7 placas. O estudo foi realizado ao longo de 7 dias, contados a partir da adição do estradiol, sendo o meio trocado a cada 48 horas.

Triagem de compostos:

Uma vez obtidas as concentrações dos hormônios no processo anterior, o passo seguinte foi determinar os valores de viabilidade em ambas as linhagens frente às moléculas propostas.

O mesmo procedimento realizado nos estudos anteriores foi seguido, com a diferença que, após as primeiras 24 horas de incubação, o meio foi retirado totalmente de todas as placas, com adição de 100 µL de meio de cultura contendo as substâncias em uma concentração fixa de 100 µmol/L. As leituras, como realizadas na curva de crescimento, foram feitas sob o mesmo procedimento. Os compostos (Cpx) foram testados (Figura 17) em quintuplicata nas duas linhagens e em dois ensaios independentes para poder avaliar sua confiabilidade.

Ao mesmo tempo, moléculas controles utilizadas para comparar a seletividade nas linhagens (denominadas como controle positivo: moléculas que provocam a morte celular com atividade antineoplásica conhecida), enquanto controle negativo (células sem tratamento) foram usados para determinar as respostas celulares (Tabela 1). Essas moléculas têm diferentes características e já foram previamente mencionadas.

Tabela 1 - Controle Positivo - Controle Negativo para as duas linhagens

Linhagem	Controle Positivo	Controle Negativo
LNCaP	Enzalutamida, Bicalutamida	Células sem tratamento
MCF-7	Raloxifeno	Células sem tratamento

Figura 17 - Distribuição dos compostos e controles na placa de 96 poços no ensaio de triagem para o ensaio colorimétrico com MTT

Fonte: Autoria própria.

3.2.2.2 Citometria de Fluxo

O procedimento para os estudos de citometria de fluxo foi realizado utilizando placas de 96 poços, com incubação das células de ambas as linhagens nas concentrações indicadas e com os compostos que apresentaram bioatividade durante as triagens realizadas no método colorimétrico.

- Viabilidade celular:

As concentrações celulares utilizadas estão na faixa de 1×10^4 a 1×10^6 células/mL por um período de incubação de 24 h. Em seguida, foi retirado o meio dos poços e adicionado 100 µL de tripsina, incubando durante 20 minutos para suspendê-las, uma vez que as células estão em suspensão, a tripsina foi inativada com 20 µL de FBS, com posterior incubação por 6 min do reagente Guava Via Count para a contagem de células. A análise foi realizada em uma placa de 96 poços de fundo redondo no citômetro de fluxo Guava Merck-Millipore 8HT no módulo ViaCount.

- Curva de Concentração-Resposta (CR):

Após 24h de incubadas as células foram adicionados os compostos bioativos nas mesmas concentrações utilizadas para o método colorimétrico (MTT) e incubados por um período de 6 dias. No sexto dia foi retirado o meio dos poços e adicionado 100 µL de tripsina, incubando durante 20 minutos para suspendê-las, a tripsina foi inativada com 20 µL de FBS, com posterior incubação por 6 min do reagente ViaCount para a contagem de células. A análise foi realizada em uma placa de 96 poços de fundo redondo no citômetro de fluxo Guava Merck-Millipore 8HT no módulo ViaCount. O mesmo procedimento foi realizado na linhagem de Balb/c 3T3 para avaliar seletividade e citotoxicidade dos compostos.

- Ciclo celular:

Este ensaio foi realizado de acordo com as instruções do kit (Guava Cell Cycle) com algumas adaptações descritas brevemente a seguir.

Após 24h de incubadas as células foram adicionados os compostos bioativos nas concentrações próximas aos valores de 100% de morte celular e ao IC₅₀ obtidas nos ensaios anteriores e incubados por um período de 6 dias. No sexto dia foi retirado o meio dos poços e adicionado 100 µL de tripsina, incubando durante 20 minutos para suspendê-las, para inativar a tripsina, 100 µL de PBS (contendo 20% de FBS) foram adicionados. Imediatamente, o conteúdo de cada poço foi transferido para a placa de fundo redondo e foi centrifugado a 2000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante de cada poço foi sugado com auxílio de uma agulha hipodérmica e a bomba de vácuo e foi feita uma lavagem adicional com PBS. Centrifugado novamente, o sobrenadante foi retirado e o precipitado de 5 poços foi colocado em um poço só. As células foram ressuspensas com 200 µL de EtOH 70% gelado (gota a gota) agitando a placa em banho de gelo e foram mantidas sob incubação no refrigerador por 12 h.

Passado o período de incubação, a placa foi centrifugada a 2000 rpm durante 5 minutos. Uma vez removido o sobrenadante, 200 µL de PBS (20% FBS) foram adicionados. Centrifugou-se uma vez mais, o sobrenadante foi removido e 200 µL do reagente Guava Cell Cycle foram adicionados em cada poço. Deixou-se incubar durante 30 min e analisou-se a placa no citômetro de fluxo no módulo CellCycle.

4 Resultados e Discussões

4.1 Determinação da concentração de trabalho:

Seguindo o procedimento descrito na seção anterior, foram realizadas as leituras das placas utilizando o método colorimétrico (MTT) diariamente durante uma semana. Desse modo, foram elaboradas as Figura 18 e Figura 19 que apresentam uma relação do comportamento do crescimento celular nas diferentes concentrações celulares em função da absorbância.

Como critérios para determinar a concentração de trabalho nas duas linhagens, tem-se que considerar o método colorimétrico utilizado para apreciar o crescimento celular. Dentro do período de estudo, a replicação celular deve ter um incremento quase exponencial (fase log) e atingir a fase estacionária no final do tempo de estudo.

Figura 18 - Curva de crescimento sem estimulação de hormônio para a linhagem LNCaP num período de 7 dias

Fonte: autoria própria.

Segundo a Figura 18 pode-se observar que as concentrações de 3×10^5 e 2×10^5 células/mL apresentam crescimento celular elevado em curto período de tempo com valores de absorbâncias maiores, comparadas com as outras concentrações estudadas, estabilizando a leitura já no terceiro para o quarto dia não sendo consideradas como concentrações iniciais de trabalho seja para estimulação ou inibição da replicação. As concentrações de 5×10^4 e $2,5 \times 10^4$ células/mL não foram selecionadas, pois não atingiram a fase estacionária. As concentrações de

1×10^3 a 1×10^4 células/mL não são de interesse, pois não apresentaram crescimento nesse período de estudo.

As concentrações de 1×10^5 e $7,5 \times 10^4$ células/mL possuem uma melhor curva de crescimento, não tendo uma diferença considerável a partir do quarto dia. Assim, a concentração de trabalho selecionada para a linhagem LNCaP a partir deste primeiro ensaio que segue os critérios já mencionados é 1×10^5 células/mL, podendo ser utilizada para o seguinte estudo de estimulação com testosterona. Outras linhagens de células usadas por membros do grupo também são usadas em uma concentração de 1×10^5 células/mL, sendo esta uma razão preponderante para poder comparar os resultados entre os estudos, quando necessário.

Figura 19 - Curva de crescimento sem estimulação de hormônio para a linhagem MCF-7 num período de 7 dias

Fonte: autoria própria.

Segundo a Figura 19 pode-se observar que tanto as concentrações de 3, 2 e 1×10^5 células/mL têm elevados valores de absorbância inicial (aproximadamente 0,5), com altos valores de absorbância já no quarto dia, devido a esse motivo, elas não são consideradas por não ter o desenvolvimento esperado. Tanto as concentrações de $2,5 \times 10^4$; 1×10^4 e 5×10^3 células/mL não foram selecionadas, pois apesar de apresentar uma boa curva de crescimento

não são as concentrações que possuem os valores de absorbância mais próximos da unidade e as absorbâncias são baixas para a terceira concentração. A concentração de 1×10^3 células/mL não é de interesse, pois não apresentou crescimento nesse período de estudo.

As concentrações de $7,5 \times 10^4$ e 5×10^4 células/mL possuem uma melhor curva de crescimento, mas a concentração de $7,5 \times 10^4$ células/mL tem menor valor de absorbância no 5° e 6° dia, apresentando um incremento total de até três vezes (desde $\sim 0,2$ até $\sim 0,65$) em comparação à outra concentração que apresenta um incremento de até 4 vezes (desde $\sim 0,2$ até $\sim 0,8$). Assim, a concentração de trabalho selecionada para a linhagem MCF-7 a partir desta figura que segue os critérios já mencionados é 5×10^4 células/mL, podendo ser utilizada para o seguinte estudo de estimulação com estradiol.

Em seguida as curvas de linearidade foram estabelecidas para as linhagens supracitadas para conhecer a faixa na qual a concentração de células possui uma relação direta com a absorbância.

Figura 20 - Curvas de linearidade por MTT após 24 h de incubação das linhagens LNCaP e MCF-7 respectivamente

Fonte: autoria própria.

Conforme pode ser observado na Figura 20, foi possível estabelecer uma relação linear para a linhagem LNCaP até uma concentração de 3×10^5 células/mL, obtendo um coeficiente de correlação (R^2) 0,991 e um desvio padrão ($S_{y,x}$) 0,02; e enquanto para a linhagem MCF-7 obteve-se uma relação linear até uma concentração de 5×10^5 células/mL, obtendo um coeficiente de

correlação (R^2) 0,989 e um desvio padrão ($S_{y,x}$) 0,02. Ambos os estudos foram realizados em sextuplicata a partir de dois ensaios independentes ($n = 12$).

4.2 Determinação da concentração de hormônio:

Sendo ambas as linhagens de caráter hormônio dependente, o período de sete dias de estudos de estimulação das células adicionando os hormônios foi essencial para estabelecer as curvas de crescimento celular. Cinco concentrações dos hormônios foram testadas para cada linhagem. Assim, os mesmos critérios da seção anterior foram utilizados para a seleção da concentração do hormônio.

A Figura 21 mostra uma curva de crescimento de estimulação com testosterona a uma concentração de células inicial de 1×10^5 células/mL, pode-se observar que a leitura máxima é atingida desde o sexto dia. Desta forma, podem ser considerados os estudos de teste dos compostos de estimulação com testosterona até o sexto dia de incubação.

Figura 21 - Curva de crescimento de estimulação com testosterona na linhagem LNCaP durante 7 dias

Fonte: autoria própria.

A concentração de 0,01 nM apresentou o mesmo comportamento do controle negativo (não apresentou estimulação) não sendo de interesse. As concentrações de 100, 10, 1 e 0,1 nM estabilizaram a partir do dia 6, sendo a concentração de 0,1 nM com menor estimulação desse grupo. As concentrações de 100, 10 e 1 nM, não apresentaram diferença.

Paralelamente foi realizado um estudo para avaliar se a testosterona comercial adquirida em farmácia de manipulação tinha um perfil similar à testosterona padrão. Desse modo, a testosterona foi comparada em um ensaio de estimulação com uma testosterona padrão sob as mesmas condições do ensaio previamente descrito. Assim, a concentração de testosterona padrão (doadada pelos pesquisadores do LANAGRO-MG) selecionada para os seguintes estudos foi de 10 nM, pois está próximo do que é observado *in vivo* [98], [99].

A Figura 22 mostra que o desempenho da estimulação em todas as concentrações utilizadas com a testosterona padrão foi muito próximo ao da testosterona comercial utilizada no laboratório (encontra-se dentro da margem de erro dentro do experimento dado pelo desvio padrão). Podendo-se concluir que nossa testosterona comercial pode ser utilizada sem restrições para os estudos no laboratório, substituindo a testosterona padrão. Além disso, uma análise realizada anteriormente a este trabalho usando espectrometria de massas de alta resolução mostrou que esta testosterona comercial possuía alto grau de pureza (acima de 99%).

Figura 22 - Curvas de estimulação comparativa para Testosterona Padrão e Testosterona Comercial

Fonte: autoria própria.

A Figura 23 mostra uma curva de crescimento de estimulação com estradiol a uma concentração de células inicial de 5×10^4 células/mL. Pode-se observar que a leitura máxima é atingida no sexto dia.

As concentrações de 1, 0,1 e 0,01 nM apresentaram um crescimento exponencial até o terceiro dia. A concentração de 1 nM estabilizou a partir do dia 5, reduzindo a estimulação nos seguintes dias. As concentrações 0,1 e 0,01 nM atingiram a fase estacionária no terceiro dia e entraram na fase de morte celular a partir do quinto dia. A concentração de 0,001 nM estimulou até o dia 5, mas os valores de absorvância foram muito baixos. A concentração de 10 nM de estradiol apresentou maior estimulação no crescimento em relação à linha base do controle negativo e estabilizou no sexto dia, sendo a concentração selecionada para os estudos de triagem com os compostos com estimulação de testosterona. Isto está de acordo com trabalhos reportados na literatura [100], [101].

Figura 23 - Curva de crescimento de estimulação com Estradiol na linhagem MCF-7 durante 7 dias

Fonte: autoria própria.

4.3 Ensaios dos controles positivos:

Uma vez fixados o dia e as concentrações dos hormônios para os estudos de estimulação, foi necessário realizar estudos com os controles positivos que foram selecionados para os ensaios de triagem. O estudo consiste em obter informação destes controles nas condições com estimulação e sem estimulação para ambas as linhagens.

Os ensaios foram realizados com uma concentração de células inicial de 1×10^5 células/mL e uma concentração de testosterona de 10 nM para o ensaio de estimulação no caso da LNCaP (câncer de próstata). Pode-se observar na Figura 24 uma curva sem estimulação de testosterona na qual a bicalutamida (Bic), em uma concentração de 100 μ M, mata aproximadamente 50% de células nas primeiras 24 h em relação ao controle negativo, diminuindo o crescimento delas no 6º dia para 40%. A concentração de 10 μ M não se mostra muito potente.

Figura 24 - Estudo de controles positivos Bicalutamida e Enzalutamida sem estimulação de testosterona

Fonte: autoria própria.

Já o composto enzalutamida (Enz) apresenta uma diferença nas 48h de incubação para ambas as concentrações, mas não é tão potente como a bicalutamida. Às 48h e a uma

concentração de 100 μM , a enzalutamida mata 40% das células enquanto a bicalutamida, 70%. Adicionalmente pode-se apreciar que os controles não apresentam caráter de estimulação nessa faixa de concentrações num período de seis dias, além disso, eles ainda possuem atividade. É importante saber quais concentrações poderão ser usadas que não irão levar a morte celular, pois estudos de inibição de replicação celular estão voltados para a atividade citostática, ao invés da atividade citotóxica.

Na Figura 25 tem-se uma curva de estimulação utilizando testosterona 10 nM para determinar se a atividade desses compostos pode ser mediada pelo receptor andrógeno. Pode-se observar que o perfil bioativo da bicalutamida é muito semelhante da curva sem estimulação (Figura 24). Para a enzalutamida há uma potência maior, pois as curvas estão próximas da curva do controle negativo (sem estimulação) para ambas as concentrações testadas. Assim, pode-se considerar que a enzalutamida (a uma concentração de 10 μM) inibe a estimulação da testosterona no crescimento celular, com a atividade regulatória da sinalização via receptor andrógeno. A bicalutamida é um inibidor menos potente do que a enzalutamida, exceto pela concentração de 100 μM , que leva a morte celular sendo, portanto citotóxico. Assim, 10 μM de enzalutamida possui um perfil mais adequado como composto padrão para os estudos de inibição da estimulação androgênica pela testosterona. Estes resultados podem ser comparáveis com os já relatados na literatura [102].

Figura 25 - Estudo de controles positivos de estimulação com testosterona (T) 10 nM

Fonte: autoria própria.

Os ensaios com a linhagem MCF-7 foram realizados com uma concentração inicial de 5×10^4 células/mL e uma concentração de estradiol (E_2) de 10nM para o ensaio de estimulação.

No ensaio sem estimulação de estradiol (Figura 26) pode-se observar que as diferentes concentrações do raloxifeno não têm efeito considerável nos cinco primeiros dias, pois todas as concentrações estão próximas ao controle negativo, a exceção da concentração de 31,6 μ M (concentração: -4,5 correspondente na escala logarítmica) e 50 μ M. Como a concentração de 31,6 μ M teve valores próximos aos de 50 μ M, foi selecionada como a concentração mais alta para os ensaios sem estimulação. Além disso, o raloxifeno não apresenta caráter de estimulação nesse período estudado.

Figura 26 - Estudo do controle positivo raloxifeno sem estimulação com estradiol

Fonte: autoria própria.

O ensaio com a modulação da replicação da linhagem MCF-7 com adição de estradiol (Figura 27) mostra o efeito do raloxifeno em diferentes concentrações. Pode-se observar que as concentrações de 0,1; 0,01 e 0,001 μ M têm um desempenho semelhante ao controle negativo + E_2 (10 nM), o qual significa que essas concentrações do raloxifeno não possuem atividade sobre as células, com estimulação normal do estradiol. As concentrações de 10, 31,6 e 50 μ M estão abaixo do controle negativo, mostrando um desempenho semelhante do estudo sem

estimulação e confirmando a atividade citotóxica, pois apesar das células serem estimuladas, há morte das mesmas ao longo do período do ensaio.

A concentração de 1 μM está muito próxima à curva do controle negativo, o que podemos considerar que a essa concentração o raloxifeno possui atividade inibidora ao estradiol e modula a atividade do receptor estrógeno. Sendo este valor utilizado também em trabalhos publicados [103].

Figura 27 - Estudo do controle positivo Raloxifeno no ensaio da curva de estimulação com estradiol (E_2) a 10 nM

Fonte: autoria própria.

Como as referências usadas neste trabalho para auxiliar na determinação das condições experimentais não fazem menção na ordem de adição dos compostos nos casos de estimulação, e sendo em nossos estudos adicionados os compostos misturados desde o início com o estradiol, foram feitos dois estudos nos quais mostra-se a resposta do raloxifeno com diferença de tempo e ordem de adição. A concentração do raloxifeno utilizada foi de 10 μM e o estradiol de 10 nM, a diferença de tempo de adição foi de 30 minutos. Na Figura 28 pode-se apreciar claramente que ambas as variações têm o mesmo comportamento, estando próximas a partir do quarto dia. Assim, podemos concluir que a ordem de adição dos compostos é indiferente

para o sexto dia, sendo considerado para os ensaios de triagem para ambas as linhagens de trabalho.

Figura 28 - Estudo do raloxifeno na curva de estimulação com estradiol (E_2) 10 nM

Fonte: autoria própria.

4.4 Triagem dos compostos:

Os tempos de incubação para os ensaios posteriores foram selecionados em conjunto com os resultados das curvas de crescimento com estimulação. Para a linhagem LNCaP foi feito um estudo sem estimulação de hormônio durante 24, 48 e 72 h, enquanto que para a MCF-7, 24 e 72 h foram usadas. No caso dos estudos que envolviam a estimulação hormonal, foi observado que os melhores resultados seriam alcançados no sexto dia em ambos os casos.

Na seleção de substâncias para os ensaios celulares na linhagem LNCaP foram testadas 49 moléculas do grupo NEQUIMED, obtidas mediante estudos computacionais prévios baseados em inibidores de cisteína proteases e também de inibidores do receptor andrógeno. Além disso, dois fármacos antineoplásicos usados no câncer de próstata foram utilizados como referência (bicalutamida – Bic, e enzalutamida - Enz). Para a linhagem MCF-7 foram testadas 55 moléculas e o fármaco antineoplásico raloxifeno (Ral), utilizado como referência para os estudos com e sem estimulação pelo estradiol. Assim, foram obtidas as triagens das moléculas (Figura 29 a Figura 35).

No caso dos estudos com estimulação (Figura 29), Neq0502 (ver estrutura na Tabela 2) teve uma atividade inibitória, quando comparada com o composto de referência (enzalutamida), diminuindo a proliferação celular no sexto dia. Este resultado sugere que Neq0502 pode atuar na via do receptor andrógeno, uma vez que foi ativa somente quando da sua estimulação. O composto Neq0440 também apresentou atividade quando a célula foi estimulada por testosterona, mas não apresenta seletividade para este mecanismo, pois ele é também bioativo no estudo sem estimulação. No entanto, conforme observado na Figura 31, o composto Neq0440 (ver estrutura na Tabela 2) apresentou uma boa atividade nas células LNCaP sem estimulação pela testosterona, comparável aos controles (enzalutamida e bicalutamida) no terceiro dia de incubação, levando a uma citotoxicidade de 80%, aproximadamente. Desta forma, observa-se que Neq0440 deve atuar independentemente da via do receptor andrógeno demonstrando sua especificidade, pois, ele foi planejado como possível inibidor de quinase da via PI3K/Akt/mTOR cuja atividade já foi confirmada por outros integrantes do grupo nas linhagens de câncer de próstata hormônio-independentes PC-3 e DU145 (artigo por publicar).

Figura 29 - Triagem dos compostos com estimulação da LNCaP durante 6 dias pela testosterona (T) 10nmol/L

Fonte: autoria própria.

Outras substâncias, como Neq0477 Neq0479, Neq0483, Neq0484, Neq0485 e Neq0488 apresentaram resultados variáveis de redução da estimulação da LNCaP pela testosterona, sendo que Neq0488 foi a segunda melhor da série.

Para uma melhor compreensão da resposta biológica do composto Neq0502, elaborou-se a Figura 30 a partir da Figura 29, sendo selecionados os compostos Neq0463 e Neq0464 devido à alta similaridade estrutural que possuem estes três compostos. Pode-se observar que os compostos Neq0463 e Neq0464 (ver estrutura na Tabela 2) são isômeros estruturais, se diferenciando apenas na posição do flúor do grupo fluorbenzeno (posição para e meta respectivamente), enquanto ao composto Neq0502 o flúor é substituído por uma nitrila na posição meta e adicionalmente uma metila no outro extremo da estrutura. Os dois primeiros compostos mencionados não possuem atividade biológica ao contrário do terceiro composto, demonstrando que a benzonitrila ou a presença da nitrila na sua estrutura química é o responsável pela atividade biológica andrógeno-dependente observada na Figura 29. Isto está de acordo com o padrão estrutural observado para os inibidores do receptor andrógeno (Figura 7) que foi seguido para a seleção *in silico* de parte da série de moléculas ensaiada. Deve-se ressaltar que o perfil de atividade biológica também seguiu o observado para o fármaco enzalutamida, usada como referência no trabalho.

Figura 30 - Perfil comparativo de atividade biológica para substâncias relacionadas na linhagem LNCaP para o ensaio de estimulação com testosterona

Enz: enzalutamida. Cnt. Neg + T: controle negativo com adição de testosterona. Fonte: autoria própria.

Tabela 2 - Compostos Neq relevantes nas triagens para a linhagem LNCaP

Neq0440	Neq0502

Neq0463	Neq0464

As demais substâncias ensaiadas na linhagem LNCaP sem estimulação não apresentaram perfil inibitório de interesse para futuros estudos (Figura 31). O valor de inibição de pelo menos 50 % a 100 μ M foi usado como corte para determinar quais substâncias poderiam ser posteriormente analisadas.

Figura 31 - Triagem dos compostos para a linhagem LNCaP no ensaio sem estimulação de testosterona nos períodos de 24, 78 e 72 horas

Bic: bicalutamida. Enz: enzalutamida. Cnt. Neg: controle negativo. Fonte: autoria própria.

Figura 32 - Triagem dos compostos para a linhagem MCF-7 no ensaio sem estimulação de estradiol nos períodos de 24 e 72 horas.

Ral.: raloxifeno 31,6 μ M. Cnt. Neg: controle negativo. Fonte: autoria própria.

Figura 33 - Triagem dos compostos Neq para a linhagem MCF-7 no ensaio de estimulação de estradiol 10 nmol/L no dia 6

Ral: raloxifeno. Cnt. Neg -E₂: controle negativo sem adição de estradiol. Cnt. Neg +E₂: controle negativo com adição de estradiol. Fonte: autoria própria.

Na triagem para a linhagem MCF-7 para o estudo sem estimulação (Figura 32) a substância Neq0501 foi a única ativa. Esta substância é um nitroarômico (Tabela 3) e também foi ativa para o estudo com estimulação com estradiol (Figura 33), mostrando falta de seletividade, isto é, não apresenta perfil de inibição da via de sinalização do receptor estrógeno.

No estudo com estimulação pelo estradiol (Figura 33) dentre toda a série, tem-se o composto Neq0504 (Tabela 3), diminuindo consideravelmente a proliferação celular até o sexto dia em 80%, aproximadamente. Isto indica que a substância pode eventualmente atuar como possível inibidor da via de sinalização do receptor estrógeno, uma vez que foi bem mais potente para a inibição da estimulação da linhagem MCF-7 com estradiol, em relação ao estudo na mesma linhagem sem estimulação.

Tabela 3 - Representação das estruturas químicas das substâncias bioativas

Neq0501	Neq0504

Na triagem para os compostos inibidores de cisteíno proteases que contêm nitrilas não apresentaram atividade tanto no estudo sem estimulação (Figura 34), como com estimulação por estradiol (Figura 35). Outros ensaios poderão ser realizados futuramente para observar se os inibidores de cisteíno proteases terão atividade quanto à migração celular, com a finalidade de serem utilizados para inibir a invasão em outros tecidos ou metástase, ao invés de estudar a atividade citotóxica.

Figura 34 - Triagem de inibidores de cisteína proteases (nitrilas) para a linhagem MCF-7 sem estimulação após 24 e 72 horas

Ral*: raloxifeno testado em concentração de 31,6 μM. Cnt. Neg: controle negativo sem adição de estradiol. Fonte: autoria própria.

Figura 35 - Triagem de inibidores de cisteína proteases (nitrilas) para a linhagem MCF-7 com estimulação pelo estradiol (10 nM) após seis dias de incubação

Ral: raloxifeno. Cnt. Neg -E₂: controle negativo sem adição de estradiol. Cnt. Neg +E₂: controle negativo com adição de estradiol. Fonte: autoria própria.

4.5 Curva de Concentração - Resposta dos compostos bioativos

Com a finalidade de validar o método colorimétrico MTT (utilizado em todo o presente trabalho) foi realizado em conjunto o método de citometria de fluxo. A citometria de fluxo é quantitativa quando se trata de contagem de células, além de permitir a realização de análise das células individualmente em curto período de tempo.

Assim, previamente realizou-se um estudo de viabilidade celular após 24 h de incubação em diferentes concentrações celulares para ambas as linhagens, com leituras realizadas para o método colorimétrico (MTT) e citometria de fluxo. Podemos observar na Figura 36 que os métodos apresentam linearidade, com as equações de reta: $Y = 1.169 \cdot X + 16474$, para a linhagem LNCaP e $Y = 0.8284 \cdot X + 1991$, para MCF-7, demonstrando uma correspondência direta entre ambos os métodos. Desse modo, podemos considerar uma correlação na resposta celular entre métodos ortogonais.

Figura 36 - Relação da viabilidade celular determinada por citometria de fluxo em relação ao colorimétrico após 24 h de incubação.

Em seguida foram realizadas as curvas de concentração - resposta para obter o valor de IC₅₀ com a finalidade de caracterizar a potência desses compostos frente a cada linhagem. Os resultados obtidos neste estudo são inéditos, sendo confirmada a bioatividade das novas

substâncias nestas linhagens por meio de dois métodos distintos para a detecção da viabilidade celular (MTT e citometria de fluxo).

A inibição do crescimento das células foi determinada através de curvas concentração-resposta, em função de regressão não linear. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5 para obter o valor de IC_{50} . Segundo a Figura 37, as curvas de concentração - resposta da enzalutamida (Enz) para o método colorimétrico e citometria de fluxo levaram a valores de IC_{50} de $0,287(\pm 0,056) \mu M$ e $0,124(\pm 0,016) \mu M$, respectivamente. A potencia obtida é aproximadamente 15 vezes maior aos reportados na literatura em condições similares ($IC_{50} = 5,12 \mu M$) [104].

Figura 37 - Curvas de concentração-resposta para a enzalutamida usando a linhagem LNCaP estimulada com testosterona obtidas pelo método colorimétrico (MTT) e citometria de fluxo (Cit)

Fonte: autoria própria.

Conforme a Figura 38, as curvas de concentração-resposta do composto Neq0502 para o método colorimétrico e citometria de fluxo levaram a valores de IC_{50} de $22,4(\pm 1,4) \mu M$ e $22,6(\pm 2,4) \mu M$, respectivamente. Estes resultados demonstram que Neq0502 pode ser usado como um protótipo para que derivados sejam planejados e estudados visando aumentar a potência (atualmente 100 vezes menor do que o fármaco enzalutamida) e o estabelecimento das propriedades farmacocinéticas e tóxicas. Deve-se notar que esta linhagem de câncer de próstata (LNCaP) apresenta alta resistência a vários fármacos e estratégias terapêuticas, sendo uma substância promissora para estudos posteriores.

Figura 38 - Curvas de concentração-resposta para Neq0502 usando linhagem LNCaP estimulada com testosterona obtidas pelo método colorimétrico (MTT) e citometria de fluxo (Cit)

Fonte: autoria própria.

Na Figura 39, as curvas de concentração - resposta para o raloxifeno levaram a valores de IC_{50} de $0,37(\pm 0,051) \mu M$ e $0,181(\pm 0,043) \mu M$ para o método colorimétrico e citometria de fluxo. Estes dados demonstram a elevada potência do fármaco para esta linhagem hormônio-dependente e sua seletividade para a inibição da estimulação pelo estradiol a qual é aproximadamente quatro vezes maior da relatada em outros estudos ($IC_{50} = 1,2\mu M$) [105].

Figura 39 - Curvas de concentração-resposta para o raloxifeno usando a linhagem MCF-7 estimulada com estradiol obtida pelo método colorimétrico (MTT) e citometria de fluxo (Cit)

Fonte: autoria própria.

Finalmente, na Figura 40, as curvas concentração - resposta para o composto Neq0504 levaram a valores de IC_{50} de $31,8(\pm 0,914) \mu M$ e $17,2(\pm 1,69) \mu M$ para o método colorimétrico e citometria de fluxo, respectivamente. A substância também foi a única que apresentou atividade em relação a esta linhagem e um mecanismo de ação ainda deverá ser estudado.

Figura 40 - Curvas de concentração-resposta para Neq0504 usando a linhagem MCF-7 estimulada com estradiol obtida pelo método colorimétrico (MTT) e citometria de fluxo (Cit)

Fonte: autoria própria

Além dos valores de IC_{50} fornecidos pelas curvas de concentração - resposta obtidas, podemos considerar que a citometria de fluxo é mais sensível do método colorimétrico como é observado em todas as figuras (a exceção da Figura 38), devido aos valores de IC_{50} serem aproximadamente a metade dos obtidos no método colorimétrico. Como explicativa para esta diferença podemos dizer que ao ser o método colorimétrico um método indireto, o MTT foi metabolizado pelas células que podem estar no processo de morte celular, desde que as redutases ainda estejam ativas. Assim, uma concentração mais alta da substância deverá ser usada para levar a morte celular quando comparado com a citometria de fluxo, que trabalha com o feixe de luz não desviado (FSC) para determinar células vivas, além de um fluoróforo para determinar permeabilização da membrana, que ocorre na parte final do processo de morte celular programada.

O índice de seletividade (S.I.) foi obtido como a razão entre a viabilidade celular (IC_{50}) obtidas para as moléculas a partir das curvas concentração-resposta avaliadas em células não cancerígenas (fibroblasto de camundongo, Balb/c 3T3 clone A31) e nas células cancerígenas utilizadas (LNCaP ou MCF-7). Como consequência, foram feitas as análises para cada molécula na linhagem Balb/c 3T3 clone A31 (com resultados mostrados na Figura 41), enquanto que os resultados estatísticos e valores de IC_{50} e S.I. se encontram na Tabela 4.

Figura 41 - Curvas de concentração-resposta para os compostos na linhagem Balb/c 3T3 clone A31 mediante o método colorimétrico (MTT)

Fonte: autoria própria

Tabela 4 - Valores estadísticos das concentração-resposta na linhagem Balb/c 3T3 e índices de seletividade (SI) calculados para os compostos

	Enzalutamida	Neq0502	Raloxifeno	Neq0504
R²	0,965	-	0,981	0,984
S_{y,x}	7,51	-	4,12	4,30
IC₅₀ (µM)	27,5(±1,19)	> 250	34,3(±2,81)	17,7(±0,039)
S.I.	95,8	> 11	92,7	0,56

*calculado a partir de SI = (IC₅₀ Balb-c 3T3)/ (IC₅₀ LNCaP), ou então (IC₅₀ Balb-c 3T3)/ (IC₅₀ MCF-7)

A partir destes resultados pode-se observar que os dois controles utilizados possuem valores de S.I. próximos a 100 demonstrando sua alta seletividade para ambas as linhagens estudadas, enquanto ao composto Neq0502 apresentou boa seletividade para a linhagem LNCaP, uma vez que mesmo a 250 µM mostra uma atividade de aproximadamente 30% na linhagem Balb/C 3T3. Portanto, o índice de seletividade calculado para Neq0502 foi somente aproximado para a concentração mais alta utilizada (250 µM), desde que a concentrações próximas a 500 µM apresentam precipitação de cristais. Desde que o Neq0502 foi a substância mais seletiva testada em toda a série, o valor de S.I. poderia aumentar se fossem realizadas modificações na estrutura, novas moléculas apresentariam uma potencia maior do que o Neq0502. Já Neq0504 apresentou um valor menor à unidade o que significa que ele é mais potente nas células sadias que nas células tumorais, demonstrando citotoxicidade para Balb-c mais alta do que a potência para a linhagem MCF-7, o que inviabiliza estudos mais aprofundados para esta substância na via de receptor estrógeno.

4.6 Ciclo Celular

O ciclo celular é dividido em fases, descrita da seguinte forma simplificada. As células designadas pertencentes na fase G_0 não se encontram no ciclo e não estão em replicação. Células na fase G_1 estão se preparando para a divisão a partir da síntese de macromoléculas, exceto o DNA. Na fase S é quando realmente se encontram no processo de síntese de novo DNA, enquanto que a fase G_2 estão aquelas que finalizaram a síntese do DNA e, por conseguinte possuem o dobro da quantidade normal de material nuclear, com verificação deste. Na fase M a mitose ocorre com condensação cromossômica, separação da cromátide e citocinese (resultando na produção de duas células filhas, com a quantidade $2N$ de DNA para cada). Desta forma, a partir da detecção de cada fase no ciclo celular, pode-se estabelecer em qual fase há a retenção do ciclo quando da adição de um inibidor, sendo uma resposta fenotípica celular muito utilizada para observar a atividade biológica de interesse.

Para realizar este ensaio, foram selecionadas duas concentrações com a finalidade de obter as respostas celulares em condições distintas. A primeira selecionada foi a concentração que obteve uma potência próxima aos 100% (viabilidade celular zero ou a mínima que apresentou) e a segunda, a concentração próxima ao IC_{50} obtido das curvas de concentração-resposta para a citometria de fluxo.

Quatro ensaios foram realizados para cada molécula, cada leitura em um dia diferente, a partir do terceiro dia até o sexto dia de incubação. Assim, foram elaboradas as Tabela 4 a 7 destas 4 moléculas.

A Figura 42 mostra os gráficos obtidos no citômetro de fluxo para o fármaco enzalutamida nas duas concentrações selecionadas após três dias de incubação. Pode-se observar as 4 fases do ciclo celular: a parte marrom (4) é a fase G_0 , a rosa (1) é a fase G_1 , a verde (2) é a fase S; e a fase azul (3) a G_2/M . Adicionalmente o valor para o conteúdo $2N$ de DNA mencionado foi ajustado para 1024, sendo para $4N$ correspondente a 2048. Pode-se observar na Tabela 5, juntamente com a Figura 42 e Figura 43-A, que a enzalutamida não alterou as fases do ciclo celular nas primeiras análises. Para o quinto e sexto dias há uma redução no número de

células na fase G₂/M, com pequenos incrementos nas fases G₁ e S, esses comportamentos são confirmados na literatura [106, 107].

Figura 42 - Ciclo celular para o composto enzalutamida; (A) sem tratamento (controle); (B) 7,95 µM e (C) 0,72 µM. Para o terceiro dia de encubação.

Tabela 5 - Porcentagens das fases do ciclo celular para a enzalutamida a 0,72 e 7,95 µM incubado na linhagem LNCaP

		Controle	Enz - 0,72 µM	Enz - 7,95 µM
Dia 3	G ₀	3,9	1,5	2,7
	G ₁	73,8	72,8	73,0
	S	14,1	13,4	15,6
	G ₂ /M	8,2	12,3	8,7
Dia 4	G ₀		3,0	3,7
	G ₁	*	72,7	74,3
	S		14,2	13,6
	G ₂ /M		10,1	10,4
Dia 5	G ₀	8,2	3,8	6,9
	G ₁	63,4	76,6	64,0
	S	15,1	12,6	22,0
	G ₂ /M	13,3	7,0	7,1
Dia 6	G ₀	5,3	6,0	7,0
	G ₁	71,0	74,4	74,0
	S	10,8	12,6	11,6
	G ₂ /M	12,9	7,0	7,4

* Leitura não realizada devido a problema com o equipamento.

Figura 43 – Gráfica de barras do ciclo celular para os compostos enzalutamida e Neq0502

Tabela 6 - Porcentagens das fases do ciclo celular para o Neq0502 a 22,4 e 250 μM incubado na linhagem LNCaP

		Controle	Neq0502 - 22,4 μM	Neq0502 - 250 μM
Dia 3	G₀	3,9	1,9	2,2
	G₁	73,8	64,6	78,5
	S	14,1	18,4	13,7
	G₂/M	8,2	15,1	5,6
Dia 4	G₀		3,3	8,8
	G₁	*	66,5	63,4
	S		15,5	13,8
	G₂/M		17,2	14,0
Dia 5	G₀	8,2	6,3	9,0
	G₁	63,4	68,7	71,2
	S	15,1	15,7	13,5
	G₂/M	13,3	9,3	6,3
Dia 6	G₀	5,3	5,1	8,8
	G₁	71,0	68,8	70,5
	S	10,8	14,0	13,2
	G₂/M	12,9	12,1	7,5

* Leitura não realizada devido a problema com o equipamento.

Os valores do composto Neq0502 estão apresentados na Tabela 6 e Figura 43-B. Para o dia 3, podemos observar uma resposta variável entre as duas concentrações testadas. Para o

quinto dia de incubação, pode-se observar que há uma queda considerável na fase G₂/M para ambas as concentrações e retenção na fase G₁, sendo similar ao perfil observado para a enzalutamida. Já no dia 6, somente a concentração mais alta apresenta uma redução do número de células na fase G₂/M e um aumento na fase G₀.

No estudo com a MCF-7, o fármaco raloxifeno (Tabela 7 e Figura 44-A) apresenta um incremento de células na fase G₂/M nas concentrações usadas. No dia 4, ambas as concentrações apresentam uma queda na fase G₂/M, enquanto para o quinto dia a fase G₁ apresenta maior retenção para ambas as concentrações com uma queda na fase S como reportado na literatura [108, 109]. Deve-se notar, entretanto, que as alterações são pequenas em relação às concentrações testadas neste experimento, demonstrando que a perturbação no ciclo celular é bem baixa no geral.

Tabela 7 - Porcentagens das fases do ciclo celular para o raloxifeno a 0,18 e 10 µM incubado na linhagem MCF-7

		Controle	Ral – 0,18 µM	Ral - 10 µM
Dia 3	G₀	6,1	9,2	4,6
	G₁	58,5	50,8	57,8
	S	26,7	27,8	24,2
	G₂/M	8,7	12,2	13,4
Dia 4	G₀	1,0	1,7	2,0
	G₁	54,5	55,0	58,6
	S	27,0	28,8	27,4
	G₂/M	17,5	14,5	12,0
Dia 5	G₀	5,6	7,1	2,7
	G₁	44,2	51,8	66,5
	S	39,5	33,8	21,8
	G₂/M	10,7	7,3	9,0
Dia 6	G₀	0,9	2,5	1,7
	G₁	72,3	57,8	70,0
	S	19,3	26,9	20,3
	G₂/M	7,5	12,8	8,0

Figura 44 – Gráfica de barras do ciclo celular para os compostos raloxifeno e Neq0504

Tabela 8 - Porcentagens das fases do ciclo celular para o Neq0504 a 17,2 e 100 µM incubado na linhagem MCF-7

		Controle	Neq0504 – 17,2 µM	Neq0504 – 100µM
Dia 3	G ₀	6,1	22,9	33,6
	G ₁	58,5	51,1	20,1
	S	26,7	19,9	28,3
	G ₂ /M	8,7	6,1	18,0
Dia 4	G ₀	1,0	11,7	11,2
	G ₁	54,5	54,6	19,2
	S	27,0	23,9	23,5
	G ₂ /M	17,5	9,8	46,1
Dia 5	G ₀	5,6	8,6	9,2
	G ₁	44,2	51,2	34,8
	S	39,5	28,8	34,4
	G ₂ /M	10,7	11,4	21,6
Dia 6	G ₀	0,9	5,4	5,5
	G ₁	72,3	65,6	43,3
	S	19,3	16,4	32,3
	G ₂ /M	7,5	12,6	18,9

Para o composto Neq0504 (Tabela 8 e Figura 44-B) podemos observar um grande incremento da fase G_0 para ambas as concentrações durante todos os dias do experimento, o que significa que tem uma quantidade de células que estão fora do ciclo celular (e, eventualmente, mortas ou em processo de morte). Para a concentração de 100 μM é visualizado que a fase G_2/M está elevada em todos os dias, o que não ocorre para a concentração próxima ao IC_{50} .

O composto Neq0504 está envolvido na inibição do passo de síntese à mitose no ciclo celular. Embora seu mecanismo ainda não seja conhecido, o perfil fenotípico da perturbação do ciclo celular é bem distinto em relação ao fármaco raloxifeno.

5 Conclusões e perspectivas

A padronização e o estudo de novas moléculas bioativas foram realizados a contento, obtendo-se duas moléculas que apresentaram atividade para ambas as linhagens celulares. Tendo em consideração que a linhagem LNCaP é considerada como um modelo *in vitro* de célula resistente aos diferentes quimioterápicos em uso, Neq0502 apresentou uma boa potência nos ensaios. Esta molécula pode ser considerada como antiandrogênica pelos resultados até então obtidos, mas ainda necessita de ensaios específicos para determinar a interação com o receptor andrógeno isolado, além da identificação de uma possível atuação em alguma das vias de resistência que apresenta o câncer de próstata. Estudos computacionais realizados demonstraram uma boa probabilidade que esta molécula interaja com o receptor andrógeno. Além disso, dados obtidos em triagens com outras linhagens de células de câncer de próstata (DU-145 e PC3) que são consideradas andrógeno-independentes, também mostraram que Neq0502 é inativo, novamente confirmando nossos dados. Estes estudos computacionais e celulares foram realizados por outros integrantes do grupo.

Os resultados do ensaio de ciclo celular para a molécula Neq0502 não demonstraram perturbações consideráveis nas fases do ciclo, no entanto será necessário realizar outros ensaios de viabilidade celular para poder identificar o mecanismo de morte celular desta molécula. É interessante notar que a enzalutamida, fármaco de referência também não demonstrou o mesmo padrão de alterações no ciclo celular nos dias estudados.

Neq0502 é considerada uma substância inédita para estudos posteriores, devido a sua boa seletividade na linhagem LNCaP frente a PC-3, DU145, MCF-7 e Balb/c 3T3, com baixa citotoxicidade frente à linhagem não tumoral. Desta forma, Neq0502 poderá ser utilizada como base para o planejamento de novas estruturas visando o câncer de próstata hormônio-dependente com resistência aos fármacos em uso.

A molécula Neq0504 apresentou seletividade para linhagem MCF-7 em relação à LNCaP, podendo atuar mediante a via do receptor estrógeno e levou à perturbação do ciclo celular na fase de síntese de proteínas e mitose, mas lamentavelmente apresentou alta toxicidade na linhagem não tumoral Balb/c 3T3. Embora seja tóxico, ele e os outros cisteíno proteases podem ser avaliados em ensaios nos quais estejam envolvidos outros mecanismos de ação com o receptor estrógeno.

6 Bibliografía

1. SUDHAKAR, A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 1, n. 2, p. 1-4, 2010.
2. MARTIN, E. **Concise medical dictionary**. Oxford: Oxford University, 2010. 803 p.
3. INSTITUTO ONCOGUIA. **Estimativas do mundo**. Instituto Oncoguia, 2015. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estimativas-no-mundo/1706/1/>>. Acesso em: 25 jun 2015.
4. INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. **INCA e Ministerio de saude apresentam estimativas cancer**, 2014. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014>. Acesso em: 15 ago 2015.
5. GLINA, S., MORALES, A.; MORGENTALER, A. Studies in prostate cancer I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate by Charles Huggins and Clarence V. Hodges. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 7, p. 640-644, 2010.
6. OH, W. K.; KANTOFF, P. W. Management of hormone refractory prostate cancer: current standards and future prospects. **Journal of Urology**, v. 160, p. 1220-1229, 1998.
7. SEAMONDS, B.; YANG, N.; ANDERSON, K.; WITHAKER, B.; SHAW, L.; BOLLINGER, J. Evaluation of prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase as prostate cancer markers. **Urology**, v. 28, n. 6, p. 472-479, 1986.
8. STENMAN, U.; LEINONEN, J.; ZHANG, W.; FINNE, P. Prostate-specific antigen. **Cancer Biology**, v. 9, p. 83-93, 1999.
9. GAO, W.; BOHL, C.; DALTON, J. Chemistry and structural biology of androgen receptor. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 3352, 2005.
10. ATTARD, G.; PARKER, C.; EELES, R.; SCHRODER, F.; TOMLINS, S.; TANNOCK, I.; DRAKE, C.; BONO, J. Prostate cancer. **The lancet**, p. 1-13. 2015

11. ABRAHAM, J.; STAFFURTH, J. Hormonal therapy for cancer. **Medicine**, v. 36, n. 1, p. 29-32, 2007.
12. STAFFURTH, J.; ABRAHAM, J. Hormonal therapy for cancer. **Systemic Therapy**, v. 36, n. 1, p. 29-31, 2007.
13. LABRIE, F.; DUPONT, A.; BELANGER, A. Treatment of prostate cancer with gonadotrophin-releasing hormone agonist. **Endocrine Reviews**, v. 7, p. 67-74, 1986.
14. JOHNSON, M.; LOWE, G.; BAHNSON, R. Androgen deprivation therapy: a primer on concepts and therapeutic options. **Journal of Men's Health**, v. 7, n. 4, p. 358-367, 2010.
15. TRUMP, D.; WALDSTRICHER, A.; KOLVENBAG, G.; WISSEL, P.; NEUBAUER, B. Androgen antagonist: potential role in prostate cancer prevention. **Urology**, v. 57, n. 4, p. 64-67, 2001.
16. TOMBAL, B. Side effects of anti-androgen therapy. **Critical reviews in Oncology-Hematology**, v. 78, n. 1, p. S1, 2011.
17. GROSSMAN, M.; CHEUNG, A.; ZAJAC, J. Androgens and prostate cancer; pathogenesis and deprivation therapy. **Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 27, p. 603-616, 2013.
18. KNUDSEN, K. E.; SCHER, H. I. Starving the addiction: new opportunities for durable suppression of AR signaling in prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 138, p. 245-256, 2009.
19. KATZENWADEL, A.; WOLF, P. Androgen deprivation of prostate cancer: leading to a therapeutic dead end. **Cancer Letters**, v. 367, p. 12-17, 2015.
20. TRAN, C.; OUK, S.; CLEGG, N.; CHEN, Y.; WATSON, P.; ARORA, V.; WONQVIPAT, J.; SMITHE-JONES, P.; YOO, D.; WASIESEWSKA, T.; WELSBIE, D.; CHEN, C. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. **Science**, v. 324, p. 787-790, 2009.
21. ICHIKAWA, T.; SUZUKI, H.; UEDA, T. Hormone treatment for prostate cancer: current issues and future directions. **Cancer Chemotherapy & Pharmacology**, v. 56, n. 1, p. s58-s63, 2005.
22. SZMULEWITZ, R.; POSADAS, E. Antiandrogen therapy in prostate cancer. **Update on Cancer Therapeutics**, v. 2, p. 119-131, 2007.

23. SCHELLHAMMER, P.; DAVIS, J. An evaluation of bicalutamide in the treatment of prostate cancer. **Clinical Prostate Cancer**, v. 2, n. 4, p. 213-218, 2004.
24. KLOTZ, L.; SCHELLMAMMER, P. Combined androgen blockade: the case for bicalutamide. **Clinical Prostate Cancer**, v. 3, p. 215-220, 2005.
25. ROBINS, D. Androgen receptor gene polymorphisms and alterations in prostate cancer: of humanized mice and men. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 352, p. 26-33, 2012.
26. WALTERING, K.; URBANUCCI, A.; VISAKORPI, T. Androgen receptor (AR) aberration in castration-resistant prostate cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 360, p. 38-43, 2012.
27. TAPLIN, M.; BUBLEY, G.; KO, Y.; SMALLI, E.; UTON, M.; RAJESHKUMAR, B. Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen. **Cancer Research**, v. 59, p. 2511–2515, 1999.
28. VELDSCHOLTE, J.; RIS-STALPERS, C.; KUIPER, G.; BERREVOETS, C.; CLAASSEN, E.; TRAPMAN, J.; BRINKMANN, A.; MULDER, E. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. **Biochememical and Biophysical Research Communications**, v. 14, n. 173, p. 534-540, 1990.
29. BALK, S. Androgen receptor as target in androgen-independent prostate cancer. **Urology**, n. 3A, p. 132-139, 2002.
30. CULIG, Z.; BARTSCH, G. Androgen axis in prostate cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, n. 99, p. 373-381, 2006.
31. CARVER, B. Strategies for targeting the androgen receptor axis in prostate cancer. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 9, p. 1493-1497, 2014.
32. AGOULNIK, I.; WEIGEL, L. Androgen receptor action in hormone-dependent and recurrent prostate cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, n. 99, p. 362-372, 2006.
33. YEH, S.; CHANG, C. Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptort in human prostate cells. **Proceedings of the Natural Acadademy of Science of the USA**, n. 93, p. 5517-5521, 1996.

34. CULIG, Z.; COMUZZI, B.; STEINER, H.; BARTSCH, G.; HOBISCH, A. Expression and function of androgen receptor coactivators in prostate cancer. **Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, n. 92, p. 265-271, 2004.
35. XU, J.; WU, R.; O'MALLEY, B. Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 9, p. 615-630, 2009.
36. HALKIDO, K.; GNANAPRAGASAM, V.; MEHTA, P.; LOGAN, I.; EBRADY, M.; COOK, S.; LEUNG, H.; NEAL, D.; ROBSON, C. Expression of Tip60, an androgen receptor coactivator, and its role in prostate cancer development. **Oncogene**, n. 22, p. 2466-2477, 2003.
37. STANBROUGH, M., BUBLEY, G.; ROSS, K.; GOLUB, T.; RUBIN, M.; PENNING, T.; FEBBO, P. Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. **Cancer Research**, v. 66, n. 5, p. 2815-2825, 2006.
38. TWIDDY, A.; LEON, C.; WASAN, K. Cholesterol as a potential target for castration-resistant prostate cancer. **Pharmacology Research**, n. 28, p. 423-437, 2011.
39. SHAFI, A.; YEN, A.; WEIGEL, N. Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. **Pharmacology and Therapeutics**, n. 140, p. 223-238, 2013.
40. AKAKURA, K.; SUZUKI, H.; UEDA, T.; ITO, H. Possible mechanism of dexamethasone therapy for prostate cancer: suppression of circulating level of interleukin-6. **Prostate**, v. 56, p. 106-109, 2003.
41. ZHENG, Y.; BASEL, D.; CHONG, S.; KIM, S.; BUTTGEREIT, F.; DUNSTAN, C.; ZHOU, H.; SEIBEL, M. Targeting IL-6 and RANKL signaling inhibits prostate cancer growth in bone. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 31, n. 8, p. 921-933, 2014.
42. MOREIRA, J.; SANTOS, A.; SIMOES, S. Bcl-2 targeted antisense therapy (oblimersen sodium): towards clinical reality. **Reviews on Recent Clinical Trials**, v. 1, n. 3, p. 217-235, 2006.
43. EMINE, E., CARTRON, P.; JUIN, P.; MANON, S. Mitochondria as a target of the pro-apoptotic protein Bax. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 1301-1311, 2006.
44. TAILLE, A.; RUBIN, M.; VACHEROT, C.; MEDINA, S.; BURCHARDT, M. Beta catenin related anomalies in apoptosis resistant and hormone refractory prostate cancer cells. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 5, p. 1801-1807, 2003.

45. KYPTA, R.; WAXMAN, J. Wnt/beta catenin signaling in prostate cancer. **Nature Reviews Urology** v. 9, n. 8, p. 418-428, 2012.
46. LOKE, J.; GUNS, E.; LUBIK, A.; ADOMAT, H.; HENDY, S.; WOOD, C. Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. **Cancer Research**, n. 68, p. 6407-6415, 2008.
47. FRIEDLANDER, T.; RYAN, C. Targeting the androgen receptor. **Urologic Clinics of North America**, n. 39, p. 453-464, 2012.
48. DAS, K. ; LORENA, P.; KYAN, L.; LIM, D.; SHEN, L.; SIOW, W.; TEH, M.; REICHARDT, J.; SALTO-TELLEZ, M. Differential expression of steroid 5alpha-reductase isozymes and association with disease severity and angiogenic genes predict their biological role in prostate cancer. **Endocrine-related Cancer**, n. 17, p. 757-770, 2010.
49. MAITY, S.; TITUS, M.; WU, G.; LU, J.; RAMACHANDRAN, S.; EISNER, J. Efficacy of VT-464, a novel selective inhibitor of cytochrome P450 17, 20-lyase, in a castrate-resistant prostate cancer models. **Cancer Research**, n. 73, p. 4762, 2013.
50. BIRON, E.; BÉDARD, F. Recent progress in the development of protein-protein interaction inhibitors targeting androgen receptor-coactivator binding in prostate cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. Doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.07.006. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076015300170#> >. Acesso em: 10 ago 2015.
51. LONERGAN, P.; TINDALL, D. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. **Journal of Carcinogenesis**, v. 10, n. 20, 2010. Disponível em: <<http://www.carcinogenesis.com/text.asp?2011/10/1/20/83937>>. Acesso em: 10 ago 2015.
52. CILLIG, Z.; HELMUT, K.; BARTCSCH, G.; STEINER, H.; HOBISCH, A. Androgen receptors in prostate cancer. **The Journal of Urology**, v. 170, p. 1363-1369, 2003.
53. BAMBURRY, R.; RATHKOPF, D. Novel and next-generation androgen receptor-directed therapies for prostate cancer: beyond abiraterone and enzalutamide. **Urologic Oncology**. Doi:10.1016/J.Urolonc.2015.05.025. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1078143915002690> >. Acesso em: 10 ago 2015.

54. HODGSON, M. C.; ASTAPOVA, I. Activity of androgen receptor agonist bicalutamide in prostate cancer cells is independent of NCoR and SMRT corepressors. **Cancer Research**, v. 67, p. 8388-8395, 2007.
55. ATTARD, G. Anti-androgen monotherapy for metastatic prostate cancer. **Lancet Oncology**, v. 15, p. 543-544, 2014.
56. SCHER, H. I.; BEER, T. M. Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1-2 study. **Lancet**, v. 375, p. 1437-1446, 2010.
57. MASSARD, K.; BONO, P.; JONES, R.; KATAJA, V.; JAMES, N. Activity and safety of ODM-201 in patients with progressive metastatic castration-resistant prostate cancer (ARADES): an open label phase 1 dose-escalation and randomised phase 2 dose expansion trial. **Lancet Oncology**, v. 15, p. 975-985, 2014.
58. HISCOX, S.; DAVIES, E.; BARRETT-LEE, P. Aromatase inhibitors in breast cancer. **Maturitas**, v. 63, p. 275-278, 2009.
59. JIA, M.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; GUSTAFSSON, J. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n.4, p. 557-568, 2015.
60. MARINO, M.; GALLUZZO, P.; ASCENZI, P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. **Current Genomics**, v. 7, p. 497-508, 2006.
61. McDONNELL, D.; CLEMMER, D.; HERMANN, T.; GOLDMAN, M.; PIKE, J. Analysis of estrogen receptor functions in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. **Molecular Endocrinology**, v.9: p. 659-669. 1995
62. PRATT, W.; GALIGNANA, M.; MORISHIMA, Y.; MURPHY, T. Role of molecular chaperons in steroid receptor action. **Essays in Biochemistry**, v. 40, p. 41-58, 2004.
63. LEUNG, Y.; LEE, M.; LAM, H.; TARAPORE, P.; HO, S. Estrogen receptor beta and breast cancer: translating biology into clinical practice. **Steroids**, v. 77, p. 727-737, 2012.
64. HARTMAN, J.; LINDBERG, K.; MORANI, A.; INZUNZA, J.; STROM, A.; GUSTAFSSON, J. Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts. **Cancer Research**, v. 66, n. 23, p. 11207-11213, 2006.

65. LEYGUE, E.; DOTZLAW, H.; WATSON, P.; MURPHY, L. Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 58, p. 3197-3201, 1998.
66. PEARCE, S.; JORDAN, V. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. **Clinical Reviews in Oncology/ Hematology**, v. 50, p. 3-22, 2004.
67. MIRKIN, S.; PICKAR, J. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): a review of clinical data. **Maturitas**, v. 80, p. 52-57, 2015.
68. SHANLE, E.; XU, W. Selective targeting estrogen receptors for cancer treatment. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 1265-1276, 2010.
69. PINKERTON, J.; THOMAS, S. Use of SERMs for treatment in postmenopausal women. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 142, p. 142-154, 2014.
70. LEE, W.; CHENG, M.; CHAO, H.; WANG, P. The role of selective estrogen receptor modulators on breast cancer: from tamoxifene to raloxifene. **Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 47, n. 1, p. 24-30, 2008.
71. PRITCHARD, K. Breast cancer prevention with selective estrogen receptor modulators. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 949, p. 89-98, 2001.
72. O'REGAN, R.; JORDAN, V. The evolution of tamoxifen therapy in breast cancer: selective oestrogen-receptor modulators and downregulators. **Oncology**, v. 3, p. 207-213, 2002.
73. VOGEL, C.; JOHNSTON, M.; CAPERS, C.; BRACCIA, D. Toremifene for breast cancer: a review of 20 years of data. **Clinical Breast Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2014.
74. DAI, X.; WU, J. Selective estrogen receptor modulator: raloxifene. **Journal of Reproduction & Contraception**, v. 22, n. 1, p. 51-60, 2011.
75. LEWIS-WAMBI, J.; KIM, H.; CURPAN, R.; GRIGG, R.; SARKER, M. The selective estrogen receptor modulator bazedoxifene inhibits hormone-independent breast cancer cell growth and down-regulates estrogen receptor alpha and cyclin D1. **Molecular Pharmacology**, v. 80, n. 4, p. 610-620, 2011.
76. FABIAN, C. The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer. **International Journal of Clinical Practice**, v. 61, n. 12, p. 2051-2063, 2007.

77. CAMPOS, S. Aromatase inhibitors for breast cancer in postmenopausal woman. **The Oncologist Breast Cancer**, v. 9, p. 126-136, 2004.
78. ORLANDO, L.; SCHIAVONE, P.; FEDELE, P.; CALVANI, N.; NACCI, A.; RIZZO, P.; MARINO, A.; SPONZIELLO, F.; MAZZONI, E.; CINEFRA, M.; FAZIO, N. Molecularly targeted endocrine therapies for breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 36, n. 3, p. 67-71, 2010.
79. KIESER, K.; KIM, D.; CARLSOM, K.; KATZENELLENBOGEN, B.; KATZENELLENBOGEN, J. Characterization of the pharmacophore properties of novel selective estrogen receptor downregulators (SERDs). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 3320-3329, 2010.
80. SHODA, T.; OKUHIRA, K.; KATO, M.; DEMIZU, Y.; INOUE, H.; NAITO, M.; KURIHARA, M. Design and synthesis of tamoxifen derivatives as selective estrogen receptor down-regulator. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 87-89, 2014.
81. OSBORNE, C.; SCHIFF, R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. **Annual Review of Medicine**, v. 62, p. 233-247, 2011.
82. SCHIFF, R.; MASSARWEH, S.; OSBORNE, C. Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 331-336, 2004.
83. ALI, S.; COOMBES, R. C. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. **Natural Reviews**, v. 2, p. 101-114, 2002.
84. MUSGROVE, E.; SUTHERLAND, R. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. **Nature Reviews**, v. 9, p. 631-643, 2009.
85. RING, A.; DOWSERR, M. Mechanisms of tamoxifen resistance. **Endocrine-Related Cancer**, v. 11, p. 643-658, 2004.
86. NORMANO, N.; DI MAIO, M.; DE MAIO, E.; DE LUCA, A.; GIORDANO, A.; PERRONE, F. Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 12, p. 721-747, 2005.
87. WERMUTH, C.; GANELLIN, C.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. **Glossary of terms used in medicinal chemistry**: IUPAC Recommendations, 1998. IUPAC, 1998. p. 385-395.

88. IMMING, P. **The practice of medicinal chemistry**: Medicinal chemistry: definitions and objectives, drug activity phases, drug classification systems. Weinheim: Elsevier, 2008. p. 63-71.
89. OFFERMANN, S.; ROSENTHALL, W. **Encyclopedia of molecular pharmacology**. New York: Springer, 2008, v. 2, p. 584-587.
90. MOSTAFA, M.; SLOANE, B. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. **Tumor Microenvironment**, v. 6, p. 764-775, 2006.
91. TURK, V.; KOS, J. Cysteine cathepsins (proteases) - on the main stage of cancer?. **Cancer Cell**, v. 5, p. 409-410, 2004.
92. BROMME, D.; WILSON, S. Role of Cysteine Cathepsins in Extracellular Proteolysis. **Extracellular matrix degradation. Biology of Extracellular Matrix**, v. 2, p. 23-51, 2011.
93. SUDHAN, D. Cathepsin L inhibition by the small molecule KGP94 suppresses tumor microenvironment enhanced metastasis associated cell functions of prostate and breast cancer cells. **Clinical and Experimental Metastasis**, p. 891-902, 2013.
94. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity. **Journal of immunological methods**, p. 55-63, 1983.
95. STOCKERT, J.; CASTRO, A. MTT assay for cell viability: intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, p. 785-796, 2012.
96. LONGOBARDI, A. **Flow Cytometry**: first principles. New York: Wiley-Liss, 2001. 281 p.
97. DARZYNKIEWICZ, Z.; ZHAO, H. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. **Seminars in Hematology**, v. 38, n. 2, p. 179-193, 2001.
98. HOROSZEWICZ, J.; LEONG, S.; KAWINSKI, E.; KARR, J.; ROSENTHAL, H.; CHU, M.; MIRAND, E.; MURPHY, G.; LNCaP model of human prostate carcinoma. **Cancer Research**, v. 43, p. 1809-1818, 1983.
99. MANTONI, T.; REID, G.; GARRET, M. Androgen receptor activity is inhibited in response to genotoxic agents in a p53-independent manner. **Oncogene**, v. 25, p. 3139-3149, 2006.

100. KATZENELLENBOGEN, B.; KENDRA, K.; NORMAN, M.; BERTHOIS, Y. Proliferation, hormonal responsiveness, and estrogen receptor content of MCF-7 human breast cancer cells grown in the short-term and long-term absence of estrogens. **Cancer Research**, v. 47, p. 4355-4360, 1987.
101. FALANY, J.; MACRINA, N.; FALANY, C. Regulation of MCF-7 breast cancer cell growth by beta-estradiol sulfation. **Breast Cancer Research Treatment**. v. 74, p. 167-1676, 2002.
102. GUERRERO, J.; ALFARO, I.; GOMEZ, F.; PROTTER, A.; BERNALES, S. Enzalutamide, an androgen receptor signaling inhibitor, induces tumor regression in a mouse model of castration-resistant prostate cancer. **The prostate**. v. 73, p. 1291-1395, 2013.
103. LIU, H.; LEE, E.; GAJDOS, C.; PEARCE, S.; CHEN, B.; OSIPO, C.; LOWETH, J.; McKIAN, K.; REYES, A.; WING, L.; JORDAN, C. Apoptotic action of 17beta-estradiol in raloxifene-resistant MCF-7 cell in vitro and vivo. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, p. 1586-1597, 2003.
104. PURUSHOTTAMACHAR, P.; GODBOLE, A.; GEDIYA, L.; MARTIN, M.; VASAITIS, T.; KWEGYR-AFFUL, A.; TAMALINGAM, S.; ATES-ALAGOZ, Z.; NJAR, V. Systematic structure modifications of multi-target prostate cancer drug galeterone to produce novel androgen receptor down-regulating as an approach to treatment of advanced prostate cancer. **Journal of medical chemistry**, v. 56, p. 4880-4898, 2013.
105. BRADY, H.; DESAI, S.; GAYO-FUNG, L.; KHAMMUNGKHUNE, S.; PASCASIO, L.; SUTHERLAND, M.; ANDERSON, D.; BHAGWAT, S.; STEIN, B. Effects of SP500263, a novel, potent antiestrogen on breast cancer cells and in xenografts models. **Cancer Research**, v. 62, p. 1439-1442, 2002.
106. TOREN, P.; KIM, S.; CORDONNIER, T.; CRAFTER, C.; DAVIES, B.; FAZLI, L.; ZOUBEIDI, A.; GLEAVE, M. Combination AZD5363 with enzalutamide significantly delays enzalutamide-resistant prostate cancer in preclinical models. **European Urology**, v. 67, p. 986=990, 2015.
107. KURUMA, H.; MATSUMOTO, H.; SHIOTA, M.; BISHOP, J.; LAMOUREUX, F.; THOMAS, C.; BRIERE, D.; LOS, G.; FANJU, A.; ZOUBEIDI, A. A novel antiandrogen, compound 30, suppresses castration-resistant and MDV3100-resistant prostate cancer growth in vitro and in vivo. **Molecular Cancer Therapeutics**, p. 567-576, 2013.

108. FRYAR-TITA, E.; DAS, J.; DAVIS, J.; DESOTO, J.; GREEN, S.; SOUTHERLAND, W.; BOWEN, D. Raloxifene and selective cell cycle specific agents: a case for the inclusion of raloxifene in current breast cancer treatment therapies. **Anticancer Research**, v. 27, p. 1393-1400, 2007.
109. TU, Z.; LI, H.; MA, Y.; TANG, B.; TIAN, J.; AKERS, W.; ACHILEFU, S.; GU, Y. The enhanced antiproliferative response to combined treatment of trichostatin A with raloxifene in MCF-7 breast cancer cells and its relevance to estrogen receptor beta expression. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 366, p. 111-122, 2012.