UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS (IQSC)
GRUPO DE QUÍMICA MEDICINAL E BIOLÓGICA (NEQUIMED)

KATARINA BOTELHO SARAIVA

ANÁLISE DA ATIVIDADE DE MOLÉCULAS INIBIDORAS DE CISTEÍNO
PROTEASE EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE PRÓSTATA (PC-3 E
DU 145) E FÍGADO (Hep G2).

KATARINA BOTELHO SARAIVA

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

ANÁLISE DA ATIVIDADE DE MOLÉCULAS INIBIDORAS DE CISTEÍNO
PROTEASE EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE PRÓSTATA (PC-3 E
DU 145) E FÍGADO (Hep G2).

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química do Instituto de
Química de São Carlos da Universidade de
São Paulo, como requisito para a obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química

Orientador: Prof. Dr. Andrei Leitão

São Carlos

2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, pois sem sua permissão nada seria possível.

Aos meus pais Arilda e Rogério e à minha irmã Karla, pela compreensão, paciência, apoio e disponibilidade em ajudar sempre. Mesmo que distante, serão sempre minha base!

Ao meu orientador Prof. Dr. Andrei Leitão, pela oportunidade concedida em um momento tão confuso para mim, pelo respeito, pela atenção, pela sua paciência, esforço, sabedoria, confiança e pela enorme contribuição para meu crescimento profissional.

Ao professor Dr. Carlos Alberto Montanari, por permitir que eu fizesse parte do grupo Nequimed e à técnica Fabiana por toda a assistência nas questões do laboratório.

Às minhas amigas Giovanna, Lara, Beatriz Coelho, Letícia e Beatriz Scarano, que apesar de estarem cada uma em uma parte do mundo, todas fazem parte da minha vida e contribuem sempre no meu desenvolvimento como pessoa. Por suas amizades e apoio em todos os momentos.

Ao meu melhor amigo e namorado Vinícius e à sua família, que tanto me apoiam, acreditam em mim e me incentivam sempre!

Aos amigos do LabECel e Nequimed Talita, Sabrina, Thiago, Luana, Pedro, Marília, Sara, Isabela, Vinícius, Bruno e demais, pela parceria, pela ajuda, pelo apoio e pelos momentos de descontração. Obrigada!

Aos professores e membros da AGEAC de Fortaleza e Rosacruz de Ribeirão Preto, pelo apoio e pelo auxílio no meu crescimento espiritual, que me conferiu equilíbrio e confiança em todos os momentos.

À Universidade de São Paulo pela estrutura física necessária ao desenvolvimento desse trabalho.

Finalmente, agradeço aos órgãos de fomento Capes, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro, fazendo possível todo o nosso trabalho acontecer.

RESUMO

O câncer refere-se a doenças que possuem em comum o aumento incontido de células, que podem migrar para diversas regiões do organismo, tendo relação com aproximadamente 1 a cada 6 mortes causadas no mundo. As cisteíno catepsinas humanas são alvos estudados em neoplasias, uma vez que estão envolvidas no desenvolvimento tumoral. Peptideomiméticos que contêm o grupo nitrila apresentam inibição para cisteíno catepsinas e apresentam potencial atividade citotóxica e citostática. No entanto, é necessário um estudo mais detalhado dos perfis bioativos destes compostos em busca de alternativas terapêuticas para os diversos tipos de câncer. Neste trabalho, uma triagem foi realizada para cerca de 50 compostos sintetizados no grupo (NEQUIMED) usando nos ensaios as linhagens celulares de câncer de próstata (DU 145 e PC-3) e fígado (Hep G2) e comparadas com células não tumorais de fibroblasto de camundongo BALB/3T3 clone A31. As substâncias mais promissoras foram avaliadas em ensaios subsequentes para avaliar a atividade citotóxica e citostática. A série de peptídeos de nitrila apresentou uma maior potência citostática para os compostos Neq0995 e Neq0994 nas linhagens de câncer de próstata. Já para a linhagem de hepatocarcinoma, os melhores compostos foram o Neq0994, e o Neq1014. A relação estrutura-atividade demonstrou que grupos volumosos são importantes na posição P3 (bifenila) para ambas linhagens celulares, sendo que a ciclopropila pode estar presente como substituinte em P1 somente para a linhagem de hepatocarcinoma (Hep G2).

Palavras-chave: inibidores de cisteíno protease, peptídeos de nitrila, atividade citotóxica e citostática, câncer de fígado, câncer de próstata.

ABSTRACT

Cancer refers to diseases that have in common the uncontrolled increase of cell number, which can migrate to different regions of the body. Cancer leads to 1 in 6 deaths, approximately, in the world. Human cysteine cathepsins are targets studied in neoplasia since they are involved in tumor development. Peptidomimetic compounds containing the nitrile group are cysteine cathepsin inhibitions with potential cytotoxic and cytostatic activity. However, it is necessary to perform more in depth-studies to define the biological profile for these compounds, aiming to identify therapeutic alternatives for cancer. Here, a screening was performed for 50 compounds synthesized in the group using prostate (DU 145 and PC-3) and liver (Hep G2) cancer cell lines. A comparative analysis was also made between these tumoral cells and the non-tumoral mouse fibroblast cells (BALB/3T3 clone A31). The most promising substances were evaluated in subsequent trials to assess the cytotoxic and cytostatic activities. The series of nitrile peptoids showed a better cytostatic potency, being Neq0995 and Neq0994 compounds the most potent for both prostate cancer lineages. The best compounds for the hepatocarcinoma cells were Neq0994 and Neq1014. The structure-activity relationship demonstrated that large groups (like biphenyl) are important in the P3 position for both cell lines. In contrast, the cyclopropyl substitution in the P1 position is tolerated only for the hepatocarcinoma cell line (Hep G2).

Keywords: protease cysteine inhibitors, nitrile peptides, cytotoxic and cytostatic activity, liver cancer, prostate cancer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das fases da instalação do dano celular e metástase.....	12
Figura 2 - Representação da metástase.....	13
Figura 3 - Representação do câncer de fígado.....	14
Figura 4 - Representação do câncer de próstata.....	15
Figura 5 - Representação química estrutural do odanacatib (esquerda) e do esqueleto químico de dipeptidil nitrilas com substituintes nas posições P1, P2 e P3	17
Figura 6 - Esquema representativo da substituição da amida entre as posições P2/P3 para a trifluoroetilamina	18
Figura 7 – Esquema representativo da substituição da amida entre as posições P2/P3 para sulfonamida.....	19
Figura 8 - Representação estrutural de duas dipeptidil nitrilas com atividade antineoplásica e antiparasitária e seus respectivos peptoides que estão sendo estudados neste projeto.....	20
Figura 9 – Representação estrutural da doxorrubicina	21
Figura 10 – Esquema representativo da redução de MTT em cristais de formazam	26
Figura 11 – Curvas de linearidade celular para a linhagem BALB/3T3 clone A31, Hep G2, DU 145 e PC-3 durante 72 horas.....	33
Figura 12 – Curvas de crescimento celular para as linhagens: a – BALB/3T3 clone A31, b – Hep G2, c – DU 145, d – PC-3 durante 7 dias.....	35
Figura 13 – Curvas concentração-resposta com o composto de referência doxorrubicina, divididas por linhagens: a – BALB/3T3 clone A31, b – Hep G2, c – DU 145, d – PC-3.	37
Figura 14 – Análise da viabilidade celular dos compostos sintetizados com as linhagem BALB/3T3 clone A31, Hep G2, DU 145 e PC-3.	39
Figura 15 – Estruturas químicas, fórmulas moleculares, massas molares e curva citotóxica dos compostos Neq0924, Neq0973, Neq0983, Neq0986 nas linhagens celulares.....	41
Figura 16 – Estruturas químicas, fórmulas moleculares, massas molares e curva citotóxica dos compostos Neq0994, Neq0995, Neq1014, Neq1033 nas linhagens celulares.....	42

Figura 17 – Curvas de crescimento relativo com compostos na linhagem BALB/3T3 clone A31 durante 7 dias.....	45
Figura 18 – Curvas de crescimento celular com compostos na linhagem Hep G2 durante 7 dias.....	47
Figura 19 – Curvas de crescimento celular com compostos na linhagem DU 145 durante 7 dias.....	49
Figura 20 – Curvas de crescimento celular com compostos na linhagem PC-3 durante 7 dias.....	50
Figura 21 – Estruturas dos peptídeos sintetizados e utilizados nesse estudo	52
Figura 22 – Estruturas químicas e curva citotóxica dos compostos Neq0636, Neq0810, Neq0820.1, Neq1009 e Neq1013 nas linhagens celulares	53
Figura 23 – Esquema representativo das mudanças e diferenças entre os compostos Neq0636, Neq0810, Neq0820 e Neq1009.....	53
Figura 24 – Estrutura química do composto Indisulam	56
Figura 25 – Curvas de crescimento celular com compostos na linhagem BALB/3T3 clone A31 durante 7 dias.....	57
Figura 26 – Curvas de crescimento celular com compostos na linhagem Hep G2 durante 7 dias.....	58
Figura 27 – Curvas de crescimento celular com compostos na linhagem DU 145 durante 7 dias.....	59
Figura 28 – Curvas de crescimento celular com compostos na linhagem PC-3 durante 7 dias.....	60
Figura 29 – Curvas de crescimento celular com o composto Neq0636 nas linhagens BALB/3T3 clone A31 e PC-3 durante 7 dias.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos químicos utilizados.....	25
Tabela 2 – Esquema representativo da adição de compostos, trocas de meio e análise do ensaio citostático.....	29
Tabela 3 – Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}), o ajuste do modelo ($R^2/Sy.x$) e o índice de seletividade (SI) para as linhagens BALB/3T3 clone A31, Hep G2, DU 145 e PC-3.....	37
Tabela 4 – Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}), o ajuste do modelo ($R^2/Sy.x$) e o índice de seletividade (SI) dos peptoides que apresentaram atividade citotóxica.	43
Tabela 5 – Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}), o ajuste do modelo ($R^2/Sy.x$) e o índice de seletividade (SI) para os derivados de dipeptidil nitrilas.	54

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

°C	Graus Celsius
μM	Micromolar
μL	Microlitro
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	Meio de cultura Delbecco Eagle modificado
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Doxo	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F12-K	Nutriente HAM F-12
FBS	Soro Fetal Bovino
g	Grama
g/mL	Grama por mililitro
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IC ₅₀	Valor referência a 50% de inibição de um composto
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Log	Logaritmo (base 10)
mL	Mililitro
MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazólio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
Neq	Sigla das Substâncias bioativas desenvolvidas pelo grupo
NEQUIMED	
NEQUIMED	Grupo de química medicinal e biológica
nM	Nanomolar
PBS	Tampão fosfato-salino
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
RPM	Rotação por minuto
SI	Índice de Seletividade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Câncer.....	11
1.1.1	O câncer de fígado	13
1.1.2	O câncer de próstata	14
1.2	Alvo macromolecular e inibidores	15
2	OBJETIVOS.....	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1	Materiais	24
3.2	Compostos químicos	24
3.3	Manutenção celular	25
3.4	Ensaio celulares.....	26
3.4.1	Análise do crescimento celular para atividade citotóxica - Linearidade	26
3.4.2	Análise do crescimento celular para atividade citostática	27
3.4.3	Análise da concentração do composto de referência – Doxorrubicina.....	27
3.4.4	Triagem das substâncias.....	27
3.4.5	Ensaio citotóxicos quantitativos: curvas concentração-resposta e índice de seletividade	28
3.4.6	Ensaio citostáticos.....	29
3.5	Análise estatística.....	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1	Padronização dos ensaios.....	32
4.1.1	Determinação da concentração de trabalho para estudo da atividade citotóxica	32
4.1.2	Determinação da concentração de trabalho para estudo da atividade citostática	34
4.1.3	Determinação da concentração do composto de referência – controle positivo	36

4.1.4 Triagem dos compostos nas linhagens celulares.	38
4.2 Estudo dos perfis biológicos dos peptoides.....	40
4.2.1 Curvas concentração-resposta – Atividade citotóxica.	40
4.2.2 Curvas de crescimento – Atividade citostática	44
4.3 Estudo dos perfis biológicos dos derivados de dipeptidil nitrilas.	52
4.3.1 Curvas concentração-resposta – Atividade citotóxica.	52
4.3.2 Curvas de crescimento – Atividade citostática.....	56
4.3.3 Avaliação da influência da concentração no perfil citostático	61
 5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	 63
 REFERÊNCIAS	 64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é definido como uma série de doenças resultantes de alterações no DNA das células pela ação de agentes cancerígenos, caracterizado pelo crescimento incontrolável de células, sendo a segunda principal causa de morte no mundo, responsável por uma a cada seis mortes (OPAS, 2018), que ainda requer muitos estudos não apenas para a prevenção, mas também para seu tratamento.

Os fatores que propiciam a iniciação ou a progressão da carcinogênese são chamados de agentes carcinógenos. Não tendo uma origem única, 80% a 90% dos casos de câncer estão relacionados com fatores externos como hábitos e estilo de vida, relacionados com o abuso de álcool, tabagismo, dieta pobre em nutrientes, exposição à radiação solar, entre muitos outros. Os fatores internos estão relacionados com a capacidade do organismo de se defender das agressões externas. O fator genético está mais relacionado à suscetibilidade da ação dos agentes cancerígenos ambientais no organismo. Quanto à idade, as células vão se tornando mais vulneráveis à medida que são mais expostas aos diversos fatores de risco (INCA, 2019).

A instalação do dano celular possui três fases: iniciação, promoção e progressão, que podem ser observadas na **Figura 1**. Na primeira, há uma alteração genética, mas ainda não se detecta um tumor. Na promoção, as células modificadas geneticamente são transformadas em células malignas pelo contato contínuo com o agente cancerígeno promotor. Por último, na progressão, há a proliferação incontida das células alteradas, que evolui até o surgimento clínico da doença. Os tipos de câncer variam de acordo com a velocidade de proliferação das células, a capacidade de acometer tecidos e órgãos vizinhos ou distantes e sua origem, sendo chamado de carcinoma quando se inicia em tecidos epiteliais e de sarcoma quando se inicia em tecidos conjuntivos. (INCA, 2019).

Figura 1 - Representação das fases da instalação do dano celular e metástase.

Fonte: adaptado de Servier, 2018.

A metástase (**Figura 2**) ocorre quando os tumores malignos invadem outros tecidos e órgãos pela ação das metaloproteases (enzimas relacionadas com a degradação da matriz extracelular), cisteíno proteases (como as cisteíno catepsinas L e B) e de fatores angiogênicos, que contribuem na formação de vasos sanguíneos e linfáticos, favorecendo a migração das células (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; VALASTYAN; WEINBERG, 2011), sendo a principal causa de morte por câncer (OPAS, 2018).

Figura 2 - Representação da metástase.

Fonte: Oncologia do Brasil, 2017.

1.1.1 O câncer de fígado

O fígado é a maior glândula do corpo, localizado na cavidade abdominal e exerce diversas funções metabólicas e regulatórias, como a síntese, armazenamento e quebra de glicogênio, produção e secreção da bile, síntese do colesterol, entre outros (JUZA; PAULI, 2014).

O câncer de fígado (**Figura 3**) pode ser de dois tipos: primário, quando se inicia no próprio fígado, conhecido por carcinoma hepatocelular, e secundário, ou metastático, quando decorrente de uma neoplasia maligna no intestino grosso ou no reto. Entre os maiores contribuintes para esse tipo de câncer se encontra o tabagismo e a inalação de sua fumaça (INCA, 2018).

O número estimado de mortes causadas por câncer no fígado em 2018 ultrapassa 750 mil, estando entre os cinco tipos de cânceres mais mortais (IARC, 2018).

A evolução do hepatocarcinoma se dá em um curto período de tempo, geralmente diagnosticado em estado avançado, sendo a remoção cirúrgica o tratamento mais indicado quando o tumor se encontra restrito em apenas uma parte do fígado ou quimioterapia e/ou radioterapia em caso contrário (INCA, 2018).

Figura 3 - Representação do câncer de fígado.

Fonte: Conselho Regional de Farmácia do Rio de Janeiro, 2014.

1.1.2 O câncer de próstata

A próstata é uma pequena glândula presente apenas nos homens e se localiza abaixo da bexiga. O câncer de próstata (CaP) (**Figura 4**) é o segundo mais comum entre os homens no Brasil, atrás somente do câncer de pele, e considerado da terceira idade por ocorrer a partir dos 65 anos em cerca de 75% dos casos no mundo. Além da idade, maus hábitos alimentares e obesidade também são fatores que aumentam o risco da doença (INCA, 2020).

Além disso, esse tipo de câncer está entre os 10 mais mortais, com um valor de quase 359 mil mortes em 2018 (IARC, 2018) em aproximadamente 1,28 milhão de casos (OPAS, 2018) e estima-se 65.840 novos casos em 2020 (INCA, 2020).

O tratamento depende da localização da doença. Quando atingida apenas a próstata, pode ser indicada cirurgia ou radioterapia. Quando localmente avançada, a radioterapia ou cirurgia com tratamento hormonal têm sido utilizadas. Para a doença metastática, indica-se o tratamento hormonal (INCA, 2020).

Figura 4 - Representação do câncer de próstata.

Fonte: adaptado de Prostate Cancer Foundation [s.d.].

O câncer é responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018 e, apesar do desenvolvimento e uso de quimioterápicos para o tratamento do câncer, cada vez mais há uma maior resistência às terapias tradicionais, o que justifica uma constante pesquisa buscando melhores estratégias terapêuticas para o tratamento dessa doença (OPAS, 2018).

1.2 Alvo macromolecular e inibidores

A descoberta e o desenvolvimento de um novo candidato a fármaco envolvem processos complexos, que requerem um amplo período de tempo e alto investimento financeiro (ADAMS; BRANTNER, 2006; SILVERMAN; HOLLADAY, 2014). Na investigação de substâncias químicas bioativas é comum que se estude um alvo macromolecular que será utilizado na pesquisa das pequenas moléculas. Os novos compostos são sintetizados e testados *in vitro*, e aqueles mais potentes são avaliados quanto às suas características farmacocinéticas, toxicidade e segurança em ensaios celulares e, posteriormente, em animais (ANVISA, 2013).

Proteases são enzimas que hidrolisam uma ligação peptídica em uma sequência de aminoácidos através de um ataque nucleofílico, seguido da hidrólise de um intermediário tetraédrico. Dentre estas proteases, tem-se o grupo das cisteíno proteases, das quais fazem parte algumas catepsinas, que estão presentes em diversos tipos de câncer (SIKLOS et al., 2015).

Cisteíno proteases apresentam um amplo espectro regulatório na atividade celular e estão envolvidas em diversos processos patofisiológicos (CONUS, 2010; TURK et al., 2012). Em nosso grupo de pesquisa, inibidores de cisteíno proteases de parasitos (cruzaína para *Trypanosoma cruzi* e CPB para *Leishmania* spp.) têm apresentado atividade antiparasitária em ensaios *in vitro* (BURTOLOSO et al., 2017). Devido à homologia entre as enzimas parasitárias e humanas, estas substâncias podem também ser de interesse como antineoplásicas. No caso de células cancerosas, as cisteíno proteases podem estar relacionadas à adesão e migração destas, remodelação celular e angiogênese, sendo que as catepsinas B, L e S são as mais importantes para regular estas respostas celulares (MOHAMED, 2006).

Siklos e colaboradores (2015) descrevem três tipos de inibidores de cisteíno proteases: os covalentes irreversíveis, que formam uma ligação covalente estável, inativando a enzima, que pode acarretar em efeitos colaterais severos; inibidores covalentes reversíveis, formando uma ligação covalente com o centro reativo da enzima, criando uma ligação instável, com retorno ao estado inicial; inibidores não covalentes reversíveis, que interagem reversivelmente, formando um complexo não covalente com a enzima, usualmente apresentando baixa afinidade pela mesma.

No nosso grupo de pesquisa (NEQUIMED) tem sido observado que inibidores de cisteíno proteases apresentam atividade citostática ao invés de citotóxica em células de câncer de pâncreas (também observado para células de câncer de próstata) e que apresentam redução na formação de colônias e inibição da migração das células cancerosas (QUILLES Jr, 2019a).

Substâncias bioativas com efeito antineoplásico e antiparasitário são planejadas computacionalmente e sintetizadas pelo nosso grupo de pesquisa, onde se utiliza o método de planejamento baseado em hipóteses. Depois de testes, novos compostos derivados são sintetizados e analisados para que haja uma continuação com uma série baseada no composto de partida. Dessa forma, dipeptidil nitrilas e seus derivados têm sido estudadas como substâncias com atividade enzimática otimizada (AVELAR et al., 2015).

Como observado para o odanacatib (**Figura 5**), um derivado de dipeptidil nitrila, inibidor de catepsina K, que foi estudado até a fase III para tratamento de osteoporose, as nitrilas têm demonstrado atividade como inibidoras de cisteíno proteases, com propriedades farmacocinéticas apropriadas para fármacos (MULLARD, 2016). Assim,

derivados de dipeptidil nitrilas têm sido sintetizados como inibidores de cisteíno proteases com simplificação de estrutura em relação ao Odanacatib, sendo a ilustração apresentada na **Figura 5** uma representação da estrutura base dos compostos sintetizados. Todas as substâncias químicas desenvolvidas pelo grupo NEQUIMED utilizam o prefixo Neq seguido do número que identifica a molécula em questão.

Figura 5 - Representação química estrutural do odanacatib (esquerda) e do esqueleto químico de dipeptidil nitrilas com substituintes nas posições P1, P2 e P3.

Fonte: GAUTHIER, 2008.

A fim de se obter moléculas inibidoras de cisteíno proteases, é importante analisar os substituintes indicados na **Figura 5** que irão interagir com os sítios ativos das enzimas a serem inibidas. O grupo ciano interage com o sítio catalítico da enzima e reage com o tiolato da cisteína catalítica, enquanto os substituintes na posição P1 interagem com o subsítio S1 no sítio ativo da enzima. Os substituintes nas posições P2 e P3 são de grande importância pelas funções que possuem os subsítios S2 e S3, relacionados com a seletividade e a afinidade do substrato, respectivamente (FARADAY; CRAIK, 2010).

As dipeptidil nitrilas têm apresentado atividade citostática e antimetastática, inibindo a atividade de proteases que, juntamente com outros componentes de membrana, atuam na degradação de proteínas da membrana, podendo estar relacionadas com adesão e migração das células de câncer.

Estudos já demonstraram que a nitrila atua como um inibidor covalente reversível, onde a ligação covalente é realizada entre o átomo reativo do aminoácido situado no sítio catalítico e um grupo reativo da substância bioativa, formando o complexo enzima-inibidor com a supressão da atividade catalítica (AVELAR et al., 2015; GREENSPAN et al., 2001; SILVA et al., 2017; TURK et al., 2006).

Entretanto, devido à sua similaridade estrutural com substratos endógenos de proteases, as dipeptidil nitrilas podem ser clivadas por diferentes proteases (LOFFET, 2002). Isso justifica a busca por análogos peptídicos metabolicamente estáveis.

Uma estratégia tem sido utilizada, substituindo a ligação peptídica pela trifluoroetilamina (**Figura 6**), gerando uma amina pouco básica, sendo a ligação C-CF₃ tão polar quanto a C=O (SANI; VOLONTERIO; ZANDA, 2007). Além disso, o NH do trifluoroetilamina é um excelente doador de ligação de hidrogênio devido ao efeito retirador de elétrons exercido pelo CF₃, enquanto o grupo trifluoroetilamina um fraco aceitador de ligação de hidrogênio, sendo uma substituição adequada da ligação peptídica (DUNITZ; TAYLOR, 1997).

Figura 6 – Esquema representativo da substituição da amida entre as posições P2/P3 para a trifluoroetilamina.

Fonte: adaptado do Grupo de Química Medicinal & Biológica (NEQUIMED).

Apesar das vantagens da substituição pela trifluoroetilamina, a síntese desses compostos é mais custosa e há o aumento da quantidade de centros quirais. Nesse contexto, outra substituição que resulta em um menor número de centros quirais foi adotada, com a produção das sulfonamidas (**Figura 7**). As sulfonamidas estão presentes em muitos fármacos e comumente presentes em moléculas orgânicas (SEHGELMEBLE et al., 2012).

Figura 7 – Esquema representativo da substituição da amida entre as posições P2/P3 para sulfonamida.

Fonte: adaptado do Grupo de Química Medicinal (NEQUIMED).

Alguns efeitos negativos podem ser apresentados por compostos peptídicos, como baixa biodisponibilidade oral e meia-vida curta (HORWELL, 1995). Assim, há uma maior busca pelo desenvolvimento de substâncias similares e bioestáveis, como as poliglicinas *N*-substituídas, mais conhecidas como peptoides, termo usado pela primeira vez por Ariens e Farmer em 1982 para descrever um análogo de uma molécula pequena de peptídeo. Estudos já vêm sendo realizados utilizando-se peptoides para o tratamento do câncer (HARA *et al.*, 2006; HOOKS; MATHARAGE; UDUGAMASOORIYA, 2011; HUANG *et al.*, 2014)

Neste projeto, uma nova série de peptoides contendo nitrila foi estudada (**Figura 8**). Estas moléculas apresentam uma alteração na posição do substituinte na cadeia principal que leva à eliminação de um carbono assimétrico em relação à estrutura original do peptídeo de origem, com substituição no nitrogênio da amida.

Figura 8 - Representação estrutural de duas dipeptidil nitrilas com atividade antineoplásica e antiparasitária e seus respectivos peptoides que estão sendo estudados neste projeto.

Fonte: adaptado do Grupo de Química Medicinal & Biológica (NEQUIMED).

O uso da estratégia de planejamento baseado em hipótese é atualmente realizado no grupo, no qual uma série de substâncias químicas é sintetizada guiada pelos estudos computacionais, seguido da análise da atividade frente a enzima relacionada à doença em ensaios bioquímicos para aceitar ou rejeitar as hipóteses, formulando e testando novas hipóteses, caso seja necessário. No planejamento baseado em hipótese, alterações são realizadas na posição da ciclopropila e no anel aromático ligado ao nitrogênio do peptoide de tal forma a obter pares moleculares (*Matched Molecular Pairs* - MMP) para análise no contexto da química medicinal (GRIFFEN, 2011).

Além dessas etapas, outras análises são necessárias na caracterização da atividade biológica de novas possíveis substâncias bioativas. Os ensaios *in vitro*, como os estudos celulares, são utilizados como as primeiras triagens em organismos vivos, além de proporcionar respostas rápidas, redução de custos e confirmação de mecanismos inicialmente analisados nos estudos bioquímicos (CRUZ *et al.*, 2017; LEITÃO; MONTANARI; MONTANARI, 2011; SANTOS, 2009). Portanto, neste trabalho, tem-se como enfoque a análise destes compostos por meio de ensaios celulares, que não foi inicialmente contemplada no procedimento de síntese e ensaio bioquímico, visando expandir o conhecimento da atividade *in vitro* das substâncias.

Controles positivos devem ser usados nos ensaios celulares. Neste caso, usualmente são analisados fármacos e compostos bioativos descritos na literatura, como a doxorrubicina (**Figura 9**), que é um composto antitumoral de amplo espectro

utilizado no tratamento do câncer pela sua grande eficácia na morte de células tumorais. Seu uso é limitado pela resistência adquirida em alguns casos e alguns efeitos colaterais, como a cardiomiopatia, vômito e perda de cabelo. No entanto, a vantagem de seu uso é que ela induz a retenção do ciclo celular em qualquer fase em que a célula se encontre (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2013; THORN *et al.*, 2011).

Figura 9 – Representação estrutural da doxorubicina.

Fonte: autoria própria.

Assim, sendo essa substância amplamente utilizada e apresentando atividade citotóxica para as linhagens tumorais Hep G2, DU 145 e PC-3 (FOUAD *et al.*, 2018; SHAFI *et al.*, 2018; TSAKALOUZOU; ECKMAN; BAE, 2012; YURTCU; ISERI; SAHIN, 2015), a mesma foi utilizada como fármaco de referência no trabalho a seguir.

2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade e seletividade de peptideomiméticos contendo nitrila em linhagens de câncer de próstata (DU 145 e PC-3) e hepatocarcinoma (Hep G2) em comparação com células não tumorais de camundongo (BALB/3T3 clone A31).

Foram estabelecidos objetivos específicos, como:

- Realização da triagem de substâncias sintetizadas para análise do comportamento citotóxico das amostras;
- Avaliação do efeito citotóxico das substâncias selecionadas em células de câncer de próstata e fígado através da obtenção da curva concentração-resposta, com determinação do IC₅₀ e seletividade das amostras;
- Determinação das substâncias mais promissoras para as próximas análises biológicas;
- Análise do perfil citostático dos compostos selecionados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

- ❖ Meios de Cultura Celular DMEM (meio Dulbecco MEM em pó) e F12K (em frasco de 500 mL), Tampão Fosfato Salino (PBS) e Penicilina/Estreptomicina – adquiridos da Cultilab®;
- ❖ Soro Fetal Bovino (FBS), solução 0,25% de tripsina com EDTA e Penicilina/Estreptomicina – adquiridos da Vitrocell®;
- ❖ Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3), dimetilsulfóxido (DMSO), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) – adquiridos da Sigma Aldrich®;
- ❖ Capela de fluxo laminar vertical classe II - Pachane®;
- ❖ Centrífuga microprocessada (Quimis®);
- ❖ Mesa agitadora (Quimis®);
- ❖ Sistema robotizado Microlab Nimbus Hamilton (Hamilton Company®);
- ❖ Balança analítica Sartorius CPA26P (Sartorius®);
- ❖ Leitor de microplacas multidetector BioTek™ Synergy HT (BioTek Instruments, Inc.®);
- ❖ As linhagens celulares BALB/3T3 clone A31, Hep G2, DU 145 e PC-3, cultivadas no laboratório e mantidas em uma estufa úmida à 37 °C e 5% de CO_2 , foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ);
- ❖ Doxorrubicina, adquirida da Selleckchem LLC, EUA; e
- ❖ Novas substâncias testadas (Tabela 1), sintetizadas e caracterizadas previamente por outros membros do grupo.

3.2 Compostos químicos

Todas as moléculas usadas neste estudo (**Tabela 1**) foram sintetizadas por membros do grupo (NEQUIMED) e estão disponibilizadas no laboratório para os ensaios (grau de pureza acima de 95 %).

Tabela 1 - Códigos dos químicos utilizados nos ensaios celulares.

Compostos químicos (Neq)			
400.1	544.1	569.1	631
631.2	636	720.1	807
810	820.1	877.1	924
926	927	928	929
930	931	932	973
976	977	979	980
982	986	994	995
999	1000	1001	1009
1010	1011	1012	1013
1014	1033		

Fonte: autoria própria.

Soluções estoque dos compostos foram mantidas em dimetilsulfóxido (DMSO) a -20 °C e diluídas nos meios de cultura para a obtenção das soluções de trabalho contendo 0,5 % (v/v) de DMSO ao final.

3.3 Manutenção celular

Os ensaios usando células de mamíferos foram efetuados nas linhagens BALB/3T3 clone A31 (fibroblasto de camundongo), Hep G2 (câncer de fígado), DU 145 (câncer de próstata) e PC-3 (câncer de próstata), todas adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram adequadamente cultivadas no laboratório em meios de cultura específicos (F12K para a linhagem de câncer de próstata PC-3 e DMEM para as demais), com adição de 10 % (v/v) de soro de feto bovino (FBS), 1% (v/v) de solução de penicilina/estreptomicina, 1,5 g de bicarbonato de sódio, glicose, quando necessário. Para a passagem, as células foram ressuspensas com tripsina quando atingiram cerca de 80% de confluência, com adição de meio de cultura com FBS para inativação, rotação de 1500 rpm durante 5 minutos para sedimentação e ressuspensas com meio de cultura. Os protocolos de cultivo celular já estão estabelecidos no laboratório.

Os fibroblastos de camundongo (BALB/3T3 clone A31) foram escolhidos como controle de linhagem não tumoral pela sua confiabilidade na validação de amostras e por serem muito utilizados em estudos de citotoxicidade (CRUZ et al., 2017; GOMES et al., 2018).

3.4 Ensaios celulares

Todos os estudos neste trabalho foram realizados por meio do ensaio de viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT, sendo este um sal de tetrazólio amarelo e solúvel em meio aquoso e, quando em contato com células vivas, se reduz, com o auxílio de uma enzima redutase, aos cristais de formazan, sendo este um sólido roxo e insolúvel em meio aquoso (**Figura 10**) (LIU et al., 2002).

Figura 10 – Esquema representativo da redução de MTT em cristais de formazan.

Fonte: autoria própria.

3.4.1 Análise do crescimento celular para atividade citotóxica – Linearidade

Foram transferidos 100 μL de soluções com concentrações de $0,5 \times 10^5$ a 5×10^5 células/mL em 3 placas de 96 poços por meio do sistema robotizado Nimbus (Hamilton Robotics) e incubados por 24, 48 e 72 h em estufa com atmosfera a 5 % de CO_2 . Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado da placa com auxílio de uma bomba a vácuo e foi acrescentado 100 μL da preparação de MTT diluído em meio de cultura (1 mg/mL) para cada poço, exceto para a última fileira da placa, onde foi adicionado apenas meio de cultura como controle para se eliminar possíveis interferências da placa. A placa foi incubada em estufa úmida por 3 h e após esse período foi retirada a solução e acrescentado 100 μL de DMSO como solubilizante, já que os cristais de formazan são insolúveis em meio aquoso. A placa permaneceu por 5 minutos em um agitador e em seguida foi feita a análise da viabilidade celular com um leitor microplacas Biotek Synergy HT, no qual a leitura da absorbância foi feita a 570 nm.

O ensaio foi realizado em quintuplicata, em dois ensaios independentes ($N = 10$).

3.4.2 Análise do crescimento celular para atividade citostática

Foram transferidos 100 μL de soluções com concentrações de $1,0 \times 10^3$ a $1,0 \times 10^5$ células/mL em 4 placas de 96 poços por meio do sistema robotizado Nimbus (Hamilton Robotics) e incubados por 2, 4, 6 e 7 dias em estufa com atmosfera a 5 % de CO_2 . Os meios de cultura foram substituídos a cada 2 dias. Após o período de incubação de cada placa, o meio de cultura foi retirado também com auxílio de uma bomba a vácuo e foi acrescentado 100 μL da preparação de MTT diluído em meio de cultura (1 mg/mL) para cada poço, exceto para a última fileira da placa, onde foi adicionado apenas meio de cultura como controle. A placa foi incubada em estufa úmida por 3 h e, após esse período, foi retirada a solução e acrescentado 100 μL de DMSO. A placa permaneceu por 5 minutos em um agitador e em seguida foi feita a análise da viabilidade celular com um leitor microplacas Biotek Synergy HT, no qual a leitura da absorbância foi feita a 570 nm. O ensaio foi realizado em triplicata, em dois ensaios independentes (N = 6).

3.4.3 Análise da concentração do composto de referência – Doxorrubicina

Foram transferidos 100 μL de uma solução com concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL em uma placa de 96 poços e incubadas por 24 horas para a adesão das células. Após esse período, as soluções contendo de 0,001 a 100 μM de doxorrubicina foram adicionadas, seguidos de incubação por 72 horas, com a posterior determinação dos resultados por meio do método colorimétrico. O ensaio foi realizado em quintuplicata, em dois ensaios independentes (N = 10).

3.4.4 Triagem das substâncias

Foram pipetados 100 μL de uma solução com concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL para placas de 96 poços e incubadas por 24 horas para a adesão das células. Após esse período, as soluções contendo 10 e 100 μM de cada composto estudado neste trabalho foram adicionadas, seguidos de incubação por 72 horas, com a posterior

determinação dos resultados por meio do método colorimétrico. O ensaio foi realizado em triplicata, em dois ensaios independentes (N = 6) para cada concentração.

Para as substâncias com características citotóxicas (substância de referência e substâncias de interesse com efeito citotóxico), a análise de viabilidade foi importante para determinar quais concentrações deveriam ser testadas para obtenção da curva concentração-resposta em cada linhagem e determinar quais seriam as mais promissoras.

3.4.5 Ensaios citotóxicos quantitativos: curvas concentração-resposta e índice de seletividade

A mesma quantidade e concentração de células dos ensaios anteriores foi adicionada em uma placa de 96 poços e incubadas por 24 horas. Após esse período, as soluções contendo de 1 a 250 μ M de cada composto foram adicionadas, seguidos de incubação por 72 horas, com a posterior determinação dos resultados por meio do método colorimétrico. O ensaio foi realizado em quintuplicata, em dois ensaios independentes (N = 10) para cada concentração.

A curva concentração-resposta permite compreender melhor o potencial da substância química devido a obtenção da concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular (IC_{50}) quando comparada ao controle negativo. Com o valor de IC_{50} definido, foi possível estabelecer o índice de seletividade (SI) da substância usando a seguinte relação:

$$SI = \frac{IC_{50} \text{ da célula controle (Balb/3T3 clone A31)}}{IC_{50} \text{ da célula de câncer}} \quad (1)$$

Quanto maior a seletividade do composto para a linhagem neoplásica, menor será a probabilidade de observar efeitos na linhagem não tumoral usada como comparativo, o que qualifica o composto para pesquisas posteriores, embora seja conhecido que a seletividade de compostos antineoplásicos tende a ser baixa em ensaios celulares.

3.4.6 Ensaios citostáticos

Para o ensaio citostático, foram transferidos 100 µL de soluções com concentrações de $5,0 \times 10^4$ células/mL em 4 placas de 96 poços por meio do sistema robotizado Nimbus (Hamilton Robotics), com a adição dos compostos após 24 h de incubação. Posteriormente é feita outra incubação por 2, 4, 6 e 7 dias em estufa com atmosfera a 5 % de CO₂. Os meios de cultura foram substituídos a cada 2 dias, contando do dia de adição das células aos poços. Ou seja, a primeira troca é realizada com a apenas 1 dia de contato entre as células e os compostos, como mostrado na **Tabela 2**. Os resultados foram determinados por meio do método colorimétrico MTT. O ensaio foi realizado em triplicata, em dois ensaios independentes (N = 6) para cada concentração. O controle negativo para esse ensaio foi determinado pela média do controle negativo do dia com valores maiores de absorbância do controle negativo, a fim de se obter uma comparação relativa.

Tabela 2 – Esquema representativo da adição de compostos, trocas de meio e análise do ensaio citostático.

Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 7
Adição de células	Adição de compostos	Substituição do meio com composto para meio de cultura e primeira leitura (1 placa)	Substituição do meio com composto para meio de cultura e segunda leitura (1 placa)	Substituição do meio com composto para meio de cultura e terceira leitura (1 placa)	Última leitura (Última placa)

Fonte: autoria própria.

Para as outras leituras obtidas, foram calculadas a porcentagem média de cada concentração testada a partir do valor de 100% do controle negativo (células sem tratamento) e o erro padrão.

A microscopia em campo claro tem um papel importante para checar a contaminação das culturas e verificação de alguma alteração morfológica significativa nas células.

3.5 Análise estatística

Todos os dados foram tratados no programa Microsoft Excel® e os gráficos e valores de IC₅₀ calculados por regressão linear usando o software GraphPad Prism® 5. Foram aplicados dois parâmetros estatísticos globais, o R^2 e o Sy.x, usados para mostrar o ajuste (R), ou variância para o coeficiente de determinação (R^2), e o desvio (Sy.x) do modelo. Ambos parâmetros foram calculados a partir do melhor modelo em relação aos pontos dos gráficos. Valores mais próximos de 1 para R^2 e de 0 para Sy.x demonstram uma maior qualidade do modelo em relação aos dados obtidos. Foram realizados, ainda, os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Dunn para observar as diferenças significativas entre os melhores resultados obtidos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Padronização dos ensaios

4.1.1 Determinação da concentração de trabalho para estudo da atividade citotóxica

De acordo com o procedimento descrito anteriormente, as placas foram lidas utilizando-se o método colorimétrico MTT para cada linhagem celular após 24, 48 e 72 horas a adição das células. Os tempos foram escolhidos conforme o ensaio citotóxico, no qual a leitura é feita após 72 horas a adição do composto, como será visto posteriormente.

No intervalo de tempo do ensaio, as células apresentam uma curva de crescimento quase exponencial, adquirindo um crescimento mais estável, com a diminuição da replicação celular, quando mais próximo ao tempo final do ensaio e em concentrações mais elevadas.

Na **Figura 11** são apresentadas as curvas de linearidade celular nas diferentes concentrações em função da absorbância para cada linhagem. A curva completa é mostrada do lado esquerdo da figura, e o fragmento da curva que contém o comportamento linear à direita.

Figura 11 – Curvas de linearidade celular para a linhagem BALB/3T3 clone A31, Hep G2, DU 145 e PC-3 em intervalos de tempo a 24, 48 e 72 h contendo todos os pontos (esquerda) e as concentrações na seção linear (direita).

Fonte: autoria própria.

Para identificar a concentração ideal de plaqueamento celular para os testes de viabilidade celular se faz necessária uma distribuição uniforme para que os compostos químicos possam atuar uniformemente nas células.

De acordo com dados da American Type Culture Collection (ATCC), as células não tumorais BALB/3T3 clone A31 possui um tempo de duplicação de 18 horas em culturas esparsas. Observa-se um tempo de replicação menor no ensaio apresentado, atingindo um platô a partir da concentração de 3×10^5 células/mL, provavelmente devido à limitação do espaço físico de crescimento para as células e da limitação de nutrientes em placas de 96 poços.

Para a linhagem de hepatocarcinoma (Hep G2), o tempo de duplicação é influenciado pela densidade. Em baixas densidades, como 2×10^5 células/mL, exibe um tempo de duplicação rápido, de 24 h (KELLY; DARLINGTON, 1989), que pode ser observado no ensaio entre 24 e 48 h. Como essas células possuem um crescimento do tipo nodular, há uma maior área de crescimento em densidades mais baixas, mesmo quando adicionadas em um poço de uma placa de 96 poços. Porém, em 72 h, o crescimento celular diminui provavelmente com a diminuição do espaço devido à proliferação de células.

No caso das linhagens de câncer de próstata DU 145 e PC-3, os tempos de duplicação na literatura são de 34 e 25 horas, respectivamente (ATCC). Assim como na linhagem não tumoral, observa-se um tempo de replicação menor nos ensaios apresentados, provavelmente pela mesma razão de redução do espaço de crescimento para as células, já que as mesmas possuem uma morfologia e um comportamento de crescimento similar com a linhagem não tumoral, sendo mais dispersas e ocupando mais espaço dentro dos poços.

Pelo gráfico obtido, fez-se uso da concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL, tendo uma absorbância intermediária suficiente para que, mesmo que haja uma proliferação das células durante os ensaios, não atinjam o platô de linearidade.

4.1.2 Determinação da concentração de trabalho para estudo da atividade citostática

A análise do perfil citostático é necessária para uma avaliação da progressão de doenças como o câncer. Os compostos selecionados foram avaliados quanto aos seus potenciais citostáticos. Primeiramente, foi determinada a quantidade máxima de células a serem usadas no ensaio para as linhagens analisadas neste trabalho.

Como descrito anteriormente, as placas foram lidas utilizando o método colorimétrico MTT para cada linhagem celular após 2, 4, 6 e 7 dias da adição das

células nos poços das placas. Os tempos de incubação foram escolhidos de acordo com o ensaio citostático, no qual a leitura é feita após a adição do composto.

No intervalo de tempo do ensaio, as células apresentam uma curva de crescimento quase exponencial, adquirindo uma fase mais estacionária no crescimento celular com a diminuição da replicação celular, quando está mais próxima ao tempo final do ensaio e em concentrações mais elevadas.

Na **Figura 12** são apresentadas as curvas de crescimento celular nas diferentes concentrações. Os gráficos foram representados em função da absorbância para diferentes tempos de incubação (em dias) para cada linhagem.

Figura 12 – Curvas de crescimento celular para as linhagens BALB/3T3 clone A31 (a), Hep G2 (b), DU 145 (c), PC-3 (d) usando diversas concentrações iniciais incubadas por até 7 dias.

Fonte: autoria própria.

Pode ser observado que, nas concentrações de $1,0 \times 10^5$ e $7,5 \times 10^4$ células/mL, os valores de absorbância são maiores mesmo nos primeiros dias de ensaio em comparação com as outras concentrações analisadas. Na linhagem do hepatocarcinoma, há uma diminuição da taxa de crescimento celular a partir do 4º dia. Essas concentrações não são indicadas como concentrações iniciais de trabalho.

As concentrações de $1,0 \times 10^3$ a $1,0 \times 10^4$ células/mL não foram selecionadas, pois não apresentam crescimento significativo no período de interesse do ensaio.

As concentrações de $2,5$ e $5,0 \times 10^4$ células/mL possuem uma melhor curva de crescimento, com valores baixos de absorbância nos primeiros dias, mas a concentração de $2,5 \times 10^4$ células/mL tem menor valor de absorbância a partir do quarto dia. A concentração de $5,0 \times 10^4$ células/mL mantém um crescimento a partir do quarto dia de ensaio, sendo selecionada, para todas as linhagens, a fim de se manter um padrão e possibilitar a comparação dos resultados do estudo.

4.1.3 Determinação da concentração do composto de referência – controle positivo

Com a concentração celular de plaqueamento ideal definida, foram construídas as curvas concentração-resposta de cada linhagem com o fármaco doxorrubicina (que é a substância de referência) por meio da análise de viabilidade celular por MTT (**Figura 13**).

A determinação da concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular (IC_{50}) para cada linhagem foi obtida para melhor compreensão do potencial da substância, e para estabelecer a concentração ideal para ser utilizada nos próximos ensaios como controle positivo.

Na **Tabela 3** estão os valores de IC_{50} , os parâmetros estatísticos (valor de R^2 e $Sy.x$) e o índice de seletividade (SI) do composto para todas as linhagens estudadas nesse trabalho.

Figura 13 – Curvas concentração-resposta com o composto de referência doxorubicina incubada por 72 h para as linhagens: a – BALB/3T3 clone A31, b – Hep G2, c – DU 145, d – PC-3.

Fonte: autoria própria

Tabela 3 – Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}), o ajuste do modelo ($R^2/Sy.x$) e o índice de seletividade (SI) para as linhagens BALB/3T3 clone A31, Hep G2, DU 145 e PC-3.

	IC_{50}	$R^2/Sy.x$	SI
BALB/3T3 clone A31	$0,60 \pm 0,09 \mu M$	0,95/7,67	
Hep G2	$0,35 \pm 0,04 \mu M$	0,98/3,96	1,71
DU 145	$0,15 \pm 0,05 \mu M$	0,96/5,76	4,00
PC-3	$0,11 \pm 0,06 \mu M$	0,92/6,78	5,45

Fonte: autoria própria

Os efeitos da doxorubicina são relevantes para todas as linhagens, possuindo altas taxas de atividade citotóxica. Um estudo revelou uma potência na ordem de nanomolar em DU 145 ($IC_{50} = 0,10 \pm 0,02 \mu M$) após 72 horas de incubação com o teste colorimétrico MTT (SHAFA *et al.*, 2018). Isto indica uma grande similaridade com os dados da Tabela 3, corroborando também com resultados adquiridos anteriormente

pelo grupo de pesquisa (VALDES, 2019). Outro trabalho publicado apresentou potência na ordem de baixo micromolar em Hep G2 ($IC_{50} = 4,50 \pm 0,2 \mu M$) e PC-3 ($IC_{50} = 8,87 \pm 0,6 \mu M$) após 24 horas de incubação (FOUAD *et al.*, 2018). Esses resultados mostram que, quando incubados durante menos tempo, mais composto é necessário para inibir 50% da viabilidade celular, enquanto que em 72 horas, como analisado neste trabalho, uma menor quantidade foi necessária. Este aumento na potência foi identificado em trabalhos prévios do grupo e, por isto, opta-se pela incubação por 72 h para avaliar a potência das substâncias.

Assim, foi estabelecida a concentração de $10 \mu M$ de doxorrubicina para uso como controle positivo, sendo esta suficiente para matar 70% ou mais de todas as linhagens.

4.1.4 Triagem dos compostos nas linhagens celulares

Em seguida, foi realizada uma triagem de 41 compostos químicos sintetizados pelo grupo (apresentados nos materiais e métodos do presente estudo) em todas as linhagens analisadas neste trabalho. Os testes de viabilidade celular também foram efetuados pelo método colorimétrico com MTT (**Figura 14**).

Figura 14 – Análise da viabilidade celular dos compostos sintetizados com as linhagem BALB/3T3 clone A31, Hep G2, DU 145 e PC-3.

Fonte: autoria própria

Com esse ensaio, foi possível observar a atividade de cada composto químico em cada uma das linhagens. Alguns compostos foram ativos, mostrando um perfil citotóxico, considerando o valor de corte de 50% de viabilidade celular na maior concentração testada (100 μ M): Neq0636, Neq0810, Neq0820.1, Neq1009 e Neq1013. Embora alguns compostos tenham sido bioativos contra as células cancerosas, os mesmos mostraram atividade citotóxica também para a linhagem controle (BALB/3T3 clone A31).

Além desses compostos, uma nova série de substâncias sintetizada pelo grupo, conhecidas como peptoides, também prosseguiram para as próximas análises, a fim de se obter um perfil mais detalhado de suas atividades citotóxicas (Neq0924, Neq0973, Neq0983, Neq0986, Neq0994, Neq0995, Neq1014 e Neq1033). O composto Neq1033 foi sintetizado pela aluna Luana Alves após a triagem, mas foi adicionado para os próximos ensaios para que se obtivesse o perfil de toda a série de peptoides que contêm nitrila.

4.2 Estudo dos perfis biológicos dos peptoides

4.2.1 Curvas concentração-resposta – Atividade citotóxica

Os peptoides têm sido explorados no descobrimento de fármaco devido à sua similaridade com peptídeos e relativa facilidade de síntese (LAU, 2014). Foram desenvolvidos como uma alternativa prática aos peptídeos para várias aplicações terapêuticas, incluindo agentes anticâncer (HUANG *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2015), veículo de administração de medicamentos e agentes microbianos (SAINI, VERMA, 2017).

Assim, esses compostos também foram testados quanto a atividade citotóxica frente a linhagem controle (BALB/3T3) e tumorais (DU 145 e Hep G2). As estruturas e curvas de concentração-resposta estão mostradas nas **Figuras 15 e 16**.

Um sumário dos dados quantitativos provenientes das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}), o ajuste do modelo ($R^2/Sy.x$) e o índice de seletividade (SI) dos peptoides que mostraram atividade é apresentado na **Tabela 4**.

Figura 15 – Estruturas químicas e curvas concentração resposta para atividade citotóxica dos compostos Neq0924, Neq0973, Neq0983, Neq0986 nas linhagens celulares.

Fonte: autoria própria.

Figura 16 – Estruturas químicas e curvas concentração-resposta para atividade citotóxica dos compostos Neq0994, Neq0995, Neq1014, Neq1033 nas linhagens celulares.

Fonte: autoria própria.

Tabela 4 – Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}), o ajuste do modelo ($R^2/Sy.x$) e o índice de seletividade (SI) dos peptídeos que apresentaram atividade citotóxica.

Composto	Linhagem celular	IC_{50} (μM)	$R^2/Sy.x$	SI
Neq0995	BALB/3T3 clone A31	$67,05 \pm 7,16$	0,94/7,74	- 1,36
	Hep G2	$49,14 \pm 4,86$	0,82/10,1	-
	DU 145	> 100	-	-
	PC-3	> 100	-	-
Neq1033	BALB/3T3 clone A31	$40,48 \pm 6,16$	0,97/6,36	-
	Hep G2	> 100	-	-
	DU 145	> 100	-	-
	PC-3	> 100	-	-

Fonte: autoria própria.

Apenas os compostos Neq0995 e Neq1033 apresentaram um perfil citotóxico, enquanto os outros compostos tiveram um IC_{50} maior do que 100 μM , levando a morte celular de menos de 50% nas concentrações testadas nesse ensaio. Entretanto, o composto Neq1033 apresentou atividade apenas para a linhagem não tumoral, enquanto o composto Neq0995 exibiu uma citotoxicidade também para a linhagem de hepatocarcinoma. O valor de IC_{50} para o composto Neq0995 foi para a linhagem de câncer de fígado em relação a linhagem controle, demonstrando uma possível maior sensibilidade para as células do hepatocarcinoma (**Figura 16**). No entanto, o platô inferior para Hep G2 com aproximadamente 40% de viabilidade celular, indica uma possível resistência do hepatocarcinoma.

Deve-se salientar que no grupo de pesquisa já é observado que as substâncias sintetizadas como inibidores de cisteína proteases apresentam atividade citostática ao invés de citotóxica em células de câncer de pâncreas e próstata, apresentando também redução na formação de colônias e inibição da migração celular (Quilles Jr. *et al.*, 2019). Portanto, a análise da atividade citostática é válida para ser realizada nesta série de compostos.

Outros estudos vêm demonstrando que oligômeros de peptídeos podem exibir efeitos citotóxicos em células de câncer de mama, próstata e ovário, fazendo substituições tais quais as realizadas neste trabalho. Nesses casos, mostraram que cadeias laterais muito grandes não beneficiam nem a permeabilidade celular, nem a

toxicidade, mas que precisam atingir certos comprimentos de cadeia para obter alta potência. Além disso, o efeito citotóxico dessas substâncias teve relação com possíveis rupturas nas membranas das células, e sugeriram que o espaçamento dos ligantes e a flexibilidade conformacional dos mesmos podem contribuir para o efeito antiproliferativo (HUANG *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016). Entretanto, nenhum estudo exhibe os efeitos de peptóides com substituintes menores em suas estruturas para efeito anticâncer ou que contenham a nitrila como grupo reativo, sendo inédito o estudo realizado nesse trabalho.

Uma vez que nenhuma substância apresentou atividade antineoplásica relevante no ensaio citotóxico (exceto o composto Neq0995), seu potencial antineoplásico pode estar mais associado com o metabolismo das células tumorais e na inibição do crescimento (LEMAN *et al.*, 2012), mais relacionado com a atividade citostática dessas substâncias. Sendo assim, esses compostos seguiram para uma posterior análise de seus perfis citostáticos.

4.2.2 Curvas de crescimento – Atividade citostática

Como os compostos são adicionados após 24 h do plaqueamento, o período de 2 dias corresponde a 1 dia de exposição ao composto, o período de 4 dias corresponde a 3 dias exposição ao composto e assim por diante.

Apesar de já mencionado nos métodos, é importante destacar que, após 24 horas da adição do composto, há a remoção do meio de cultura que continha o composto seguido da adição do meio sem composto. Desta forma, foi analisado o efeito citostático para uma única adição de composto.

As concentrações selecionadas para essa etapa foram definidas a partir do comportamento citotóxico de cada composto em cada linhagem. Para compostos inativos, que se mantiveram no platô superior da curva concentração-resposta, foram escolhidas maiores concentrações, pois já tinha sido verificada sua inatividade como citotóxico. Para compostos que apresentaram um leve comportamento citotóxico, foram escolhidas concentrações onde os mesmos demonstraram pouca ou nenhuma atividade citotóxica.

Além disso, é importante ressaltar que o crescimento celular é demonstrado como valores relativos, onde o maior valor médio da absorbância dentre todas as

leituras realizadas para o controle negativo foi dado como 100%, sendo que todas as outras leituras foram analisadas em relação a maior absorbância observada.

Nas **Figuras 17 a 20** é visualizado o comportamento citostático de cada peptoide em cada linhagem celular.

Figura 17 – Atividade citostática dos peptoides de nitrila na linhagem BALB/3T3 clone A31 analisados durante 7 dias.

Fonte: autoria própria.

Para a linhagem de fibroblasto de camundongo, não tumoral, pôde ser observado que os compostos Neq0924, Neq0973 e Neq0986 apresentaram baixa ou nenhuma atividade citostática, com inibição de 15 a 20% do crescimento celular no sexto dia nas concentrações de 33,3, 66,6 e 100 μM. O composto Neq1014

demonstrou uma inatividade na menor concentração, mas uma inibição de 50% no sétimo dia na maior concentração testada (66,6 μM). Com um comportamento semelhante, o composto Neq0982 também inibiu 50% do crescimento relativo das células quando testado a 66,6 μM . Entretanto, o composto apresentou atividade citostática também nos outros dias, demonstrando uma maior potência em relação ao Neq1014. Em relação aos compostos Neq0994, Neq0995 e Neq1033, testados nas mesmas concentrações, o composto Neq1033 demonstrou menor crescimento celular, com aproximadamente 1,5x nas concentrações testadas em relação a 3,2x do controle negativo, enquanto que o composto Neq0995 apresentou crescimento de 1,5 a 2x em relação a 3,3x o crescimento das células sem composto. Já com o composto Neq0994 teve um crescimento de 2 a 3x em relação a 3,3x sem composto. Estes resultados mostraram uma potência maior para o composto Neq1033, com aproximadamente 75% de inibição relativa, seguido dos compostos Neq0995 e Neq0994.

Figura 18 – Atividade citostática dos peptídeos de nitrila na linhagem Hep G2 analisados durante 7 dias.

Fonte: autoria própria.

Já na linhagem de hepatocarcinoma, foi observado inatividade para os compostos Neq0973 e Neq0995. Os outros compostos apresentaram a seguinte ordem decrescente de potência para a atividade citostática: Neq0994 > Neq1014 $\approx$ Neq0986 > Neq0924 > Neq1033 > Neq0982. Quando observados os compostos Neq0994 e Neq1014 na concentração de 33,3 μ M, o primeiro apresenta uma inibição de aproximadamente 75% do crescimento celular relativo, enquanto o segundo foi de 50%, demonstrando a maior potência do composto Neq0994 para a linhagem de câncer de fígado.

A fim de se confirmar o resultado obtido para o composto Neq0994, foi utilizado

o teste estatístico de Kruskal-Wallis, uma variação do teste One-way ANOVA, usada para distribuições não-Gaussianas, com o teste de Dunn. O teste foi realizado com os dados do sétimo dia de resultado e pôde-se verificar que houve diferenças significativas entre as duas concentrações estudadas e o controle negativo (valor- $p < 0.0001$).

Na comparação dos compostos Neq1014 e Neq0986, ambos apresentaram uma inibição de aproximadamente 60% quando observados seus comportamentos a 66,6 μM , valor maior do que o observado para os compostos Neq0924, Neq1033 e Neq0982 que foram de 50, 40 e 25% de inibição celular relativa, respectivamente.

De forma similar, com os mesmo parâmetros aplicados anteriormente, fez-se o teste estatístico de Kruskal-Wallis e o de Dunn para o composto Neq1014, com os dados do sétimo dia de resultado, e obteve-se um resultado similar, em que houve diferenças significativas entre as duas concentrações estudadas e o controle negativo (valor- $p < 0.0001$).

Figura 19 – Atividade citostática dos peptídeos de nitrila na linhagem DU 145 analisados durante 7 dias.

Fonte: autoria própria.

Para a linhagem de câncer de próstata DU 145, o composto Neq0986 apresentou inatividade nas concentrações testadas. Já os compostos Neq0924, Neq0973 e Neq0982 apresentaram as menores potências de atividade citostática para essa linhagem, levando a inibição de menos de 30% das células. Os compostos Neq0994, Neq1014 e Neq0995 apresentaram inibição relativa semelhantes, com os dois primeiros exibindo uma inibição relativa de aproximadamente 60% na concentração de 33,3 µM e os compostos Neq1014 e Neq0995 uma inibição também de 60% na concentração de 66,6 µM, maior do que o valor de inibição de 50% encontrada para o composto Neq1033 nessa concentração.

Para os resultados dos melhores compostos Neq0994 e Neq1014, foi

realizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn com o mesmo objetivo estatístico usado anteriormente. O teste foi realizado novamente com os dados do sétimo dia de resultado e observou-se diferenças significativas entre as duas concentrações estudadas e o controle negativo para cada composto (valor-p < 0.0001 para o composto Neq0994 e de 0.005 para o composto Neq1014).

Figura 20 – Curvas de crescimento celular com compostos na linhagem PC-3 durante 7 dias.

Fonte: autoria própria.

Os comportamentos dos compostos para a linhagem de câncer de próstata PC-3 foram relativamente similares à linhagem de câncer de próstata DU 145, o que faz sentido, pois ambas linhagens são de câncer de próstata independente de andrógeno.

Para a PC-3, os compostos que apresentaram pouca atividade citostática foram o Neq0924, o Neq0973 e o Neq0986, com menos de 30% de inibição no sexto dia, diferindo esse último, que apresentou inatividade para a linhagem DU 145. Os compostos Neq0982, Neq1014 e Neq1033 levaram a inibição de aproximadamente 50% das células também no sexto dia nas maiores concentrações testadas. Já os compostos Neq0995 e Neq0994 apresentaram as maiores potências de atividade citostática, com a inibição de 75% utilizando o primeiro composto e, aproximadamente 60% para o segundo, ambos também mais proeminentes no sexto dia.

Para essas maiores potências dos compostos Neq0994 e Neq0995, foi realizado o mesmo teste estatístico anterior, com os mesmos parâmetros, e obteve-se diferenças significativas entre as duas concentrações estudadas e o controle negativo para cada composto (valor-p < 0.0001 para ambos os compostos).

Outras concentrações podem ser posteriormente testadas para alguns dos compostos mais potentes para ter um perfil de atividade citostática mais completo. Além disto, os compostos Neq0924, Neq0973, Neq0982 e Neq0986 apresentaram baixos valores de inibição (aproximadamente 30%).

Para a linhagem de câncer de fígado, o comportamento dos compostos Neq0924 e Neq0986 é diferenciado, demonstrando maiores inibições em relação às outras linhagens e uma maior sensibilidade da linhagem de hepatocarcinoma para estas substâncias.

Na tentativa de se relacionar essas respostas celulares com as estruturas dos compostos (**Figura 21**), pôde-se observar que a maioria dos compostos que exibiram maiores atividades citostáticas apresentam uma maior cadeia na porção P3 da molécula, podendo estar relacionados com a discussão no tópico anterior, que demonstra um maior efeito citotóxico de peptídeos que possuem cadeias laterais maiores. Além disso, foi visto também que não há substituinte na porção P1 da maioria dos compostos que apresentaram maiores potências, que é importante para o perfil citostático dos peptídeos que contêm nitrila.

Para a linhagem do hepatocarcinoma, observou-se um comportamento diferente do obtido nas outras linhagens. Neste caso, os compostos que possuem a bifenila com a metoxila na posição para na porção P3 (Neq0994 e Neq0986), assim como a presença da bifenila na porção P3 e a ciclopropila na porção P1 (como no Neq1014) apresentaram maiores potências citostática, novamente reforçando a

necessidade de grupos mais longos como substituintes na posição P3. As maiores diferenças entre Hep G2 e as outras linhagens são em relação ao composto Neq0995, que demonstrou uma pequena inibição relativa para Hep G2 (ao contrário da DU 145) mesmo possuindo a bifenila em P3, e o Neq0986, que apresentou uma maior potência somente para Hep G2.

Figura 21 – Estruturas dos peptídeos sintetizados e utilizados nesse estudo.

Fonte: autoria própria.

4.3 Estudo dos perfis biológicos dos derivados de dipeptidil nitrilas

4.3.1 Curvas concentração-resposta – Atividade citotóxica

Como selecionado a partir da triagem, os compostos Neq0636, Neq0810, Neq0820.1, Neq1009 e Neq1013 foram testados quanto ao seu perfil citotóxico nas linhagens controle e tumorais. As estruturas e a curva de concentração-resposta estão mostradas na **Figura 22** e uma síntese dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}), os parâmetros estatísticos ($R^2/Sy.x$) e o índice de seletividade (SI) dos derivados de dipeptidil nitrilas que mostraram atividade é apresentada na **Tabela 5**.

Figura 22 – Estruturas químicas e curvas concentração-resposta para atividade citotóxica dos compostos Neq0636, Neq0810, Neq0820.1, Neq1009 e Neq1013 nas linhagens celulares.

Fonte: autoria própria.

Tabela 5 – Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC₅₀), o ajuste do modelo (R²/Sy.x) e o índice de seletividade (SI) para os derivados de dipeptidil nitrilas.

Composto	Linhagem celular	IC ₅₀	R ² /Sy.x	SI
Neq0636	BALB/3T3 clone A31	30,03 ± 6,16 µM	0,96/6,51	- 0,48
	Hep G2	63,10 ± 7,55 µM	0,96/7,72	0,32
	DU 145	93,43 ± 6,14 µM	0,92/7,79	-
	PC-3	> 100	-	-
Neq0810	BALB/3T3 clone A31	31,19 ± 4,81 µM	0,97/6,26	- 0,36
	Hep G2	86,26 ± 4,33 µM	0,99/4,50	0,34
	DU 145	92,49 ± 7,90 µM	0,94/8,44	-
	PC-3	> 100	-	-
Neq0820.1	BALB/3T3 clone A31	12,30 ± 1,58 µM	0,97/6,67	- 0,16
	Hep G2	74,56 ± 6,01 µM	0,98/5,06	0,17
	DU 145	71,60 ± 5,65 µM	0,98/4,71	-
	PC-3	> 100	-	-
Neq1009	BALB/3T3 clone A31	20,52 ± 1,93 µM	0,99/5,39	-
	Hep G2	70,49 ± 5,73 µM	0,98/5,96	0,29
	DU 145	> 100	-	-
	PC-3	> 100	-	-
Neq1013	BALB/3T3 clone A31	3,70 ± 1,26 µM	0,98/5,45	-
	Hep G2	16,28 ± 1,55 µM	0,98/6,86	0,23
	DU 145	20,88 ± 2,46 µM	0,95/8,50	0,18
	PC-3	32,90 ± 5,97 µM	0,97/6,77	0,11

Fonte: autoria própria.

Com esses dados, observa-se que os compostos Neq0636 e Neq0810 (que são diastereoisômeros) demonstraram atividade para a linhagem não tumoral e para as linhagens de câncer de fígado e de próstata DU 145, mas foram inativos para a linhagem de câncer de próstata PC-3, assim como o composto Neq0820.1. O composto Neq1009 foi inativo para as linhagens de câncer de próstata, enquanto o composto Neq1013 apresentou citotoxicidade para todas as linhagens.

Apesar de apresentarem atividade citotóxica e baixos valores de IC₅₀, a linhagem controle possui uma maior sensibilidade para todos os compostos testados. A substituição do bromo pela pirimidina na porção P3 da molécula, visto nos compostos Neq0636 e Neq0810 para Neq0820 e Neq1009, não influenciou a potência de inibição das cisteíno proteases. As diferenças entre as estruturas pode ser melhor

visualizada na **Figura 23**.

Figura 23 – Esquema representativo das mudanças estruturais entre os compostos Neq0636, Neq0810, Neq0820 e Neq1009.

Estudos vêm demonstrando as vantagens de se substituir o grupo carbonila de uma amida para o grupo trifluoroetil, como ocorreu na síntese dos compostos Neq0636, Neq0810, Neq0820 e Neq1009. A mudança gera uma amina metabolicamente estável e pouco básica que mantêm a ligação de hidrogênio de uma amida e a ligação C-CF₃, tão polar quanto a ligação C=O. Espera-se, ainda, que haja uma otimização das interações energeticamente favoráveis devido à melhor orientação dos átomos, ocasionada pela geometria tetraédrica do grupo trifluoroetilamina, com ângulos de ligação próximos de 120° (SANI, VOLONTERIO, ZANDA, 2007), o que justifica a observação do efeito citotóxico não esperado para as substâncias sintetizadas como inibidores de cisteína proteases. Outro ponto é que a troca de uma segunda ligação peptídica por um grupo mimético é relevante para aumentar a estabilidade do composto em relação às possíveis reações de metabolismo.

Além disso, também vem sendo mostrado que propriedades antitumorais são potencializadas pela adição do grupo sulfonamida em candidatos ao tratamento de câncer, como é o caso do E7070/Indisulam (**Figura 24**). De acordo com análises da relação estrutura-atividade, esses compostos causam interrupção do ciclo celular na

fase G1 e inibem a migração celular, sendo a sulfonamida o grupo essencial para a obtenção dessas propriedades (GUO *et al.*, 2019; HUANG *et al.*, 2017). Isto justifica a escolha da síntese de compostos com a presença dessa função orgânica, como é o caso do Neq1013, que apresentou uma maior citotoxicidade.

Figura 24 – Estrutura química do composto Indisulam.

Fonte: PubChem, 2019.

Como discutido e esperado, a mudança para os grupos CF_3 e SO_2 pode ter ocasionado uma maior biodisponibilidade dos compostos pelas interações favoráveis que os agrupamentos podem ocasionar, provocando o efeito citotóxico observado.

Sendo assim, os ensaios citostáticos foram realizados afim de contribuir na análise desses resultados.

4.3.2 Curvas de crescimento – Atividade citostática

Nas **Figuras 25 a 28** é possível observar o comportamento citostático de cada composto em cada linhagem celular após uma única administração do composto.

Figura 25 – Atividade citostática dos derivados de dipeptidil nitrilas na linhagem BALB/3T3 clone A31 após incubação por 7 dias.

Fonte: autoria própria.

Dentre os compostos testados, o Neq0810 mostrou um leve efeito citostático após seis dias, com uma inibição do crescimento relativo de aproximadamente 30%. Os outros compostos se mantiveram inativos nas concentrações testadas.

Figura 26 – Atividade citostática dos derivados de dipeptidil nitrilas na linhagem Hep G2 após incubação por 7 dias.

Fonte: autoria própria.

Para a linhagem de hepatocarcinoma, nenhum dos compostos apresentou um perfil citostático em nenhuma concentração testada, mostrando que os mecanismos de ação dos mesmo não atuam nos processos de proliferação celular para essa linhagem.

Figura 27 – Atividade citostática dos derivados de dipeptidil nitrilas na linhagem DU 145 após incubação por 7 dias.

Fonte: autoria própria.

Assim como na linhagem de câncer de fígado, nenhum dos compostos apresentou atividade citostática em nenhuma concentração testada na linhagem de câncer de próstata DU 145.

Figura 28 – Curvas de crescimento celular com compostos na linhagem PC-3 durante 7 dias.

Fonte: autoria própria.

Dentre os compostos estudados, o Neq0636 levou a redução de 20 a 30% da viabilidade celular nas concentrações testadas após 6 dias, e de 10 a 15% da viabilidade celular em 7 dias, indicando uma fraca atividade citostática. Este foi o único composto com perfil citostático para alguma linhagem tumoral da série de derivados de dipeptidil nitrilas utilizada nesse trabalho.

Uma última análise estatística, com os mesmos parâmetros dos testes anteriores, foi realizada para esse composto, mas a comparação realizada para o sexto dia, onde obteve-se uma maior diferença no resultado. Foi observada uma diferença significativa entre os resultados e o controle negativo (valor- $p < 0.0001$).

Uma análise mais detalhada, com a adição de outras concentrações, foi realizada para detectar a eventual relação entre a concentração do composto e a inibição do crescimento para a linhagem de câncer de próstata PC-3.

4.3.3 Avaliação da influência da concentração no perfil citostático

Foi realizada a análise do comportamento da atividade citostática do composto Neq0636 para a linhagem não tumoral BALB/3T3 clone A31 e para a linhagem de câncer de próstata PC-3 para avaliar a relação da concentração do composto com a inibição do crescimento das células, que pode ser observado na **Figura 29**.

Figura 29 – Análise da atividade citostática para o composto Neq0636 nas linhagens BALB/3T3 clone A31 e PC-3 após incubação por 7 dias.

Fonte: autoria própria.

Para o composto Neq0636, a análise demonstrou a relação do efeito citostático com a concentração, sendo mais relevante para as concentrações maiores que 10 µM.

Pôde ser visualizada uma inibição similar do crescimento relativo para ambas as linhagem nos dias 2 e 4, mas um comportamento diferenciado para a PC-3, que atinge um platô em concentrações mais elevadas (maiores que 10 µM) e em mais tempo de incubação (6 e 7 dias), demonstrando uma maior inibição do crescimento das células de câncer de próstata PC-3, ou um melhor efeito cistostático.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados alcançados e dos tratamentos estatísticos obtidos, pôde-se observar que os compostos mais promissores para a série de peptoides, com maiores potências citostáticas, foram os compostos Neq0994, Neq0994 e Neq1014 para as linhagens de câncer de próstata, com inibição relativa de mais de 60%, podendo este resultado estar relacionado com a presença do bifenil em ambos os compostos, e ainda a presença de uma metoxila no composto Neq0994. Outra característica importante para a bioatividade se refere a ausência de substituinte na porção P1 em duas das estruturas. Já para a linhagem de hepatocarcinoma, os melhores compostos foram o Neq0994, e o Neq1014, semelhante ao Neq0995, mas com uma ciclopropila na porção P1 da molécula. Na série de derivados de dipeptidil nitrilas, o composto Neq0636 apresentou um comportamento citostático para as células de câncer de próstata PC-3.

Dessa forma, outros estudos podem ser realizados com esses compostos. Podem ser feitas análises com menores concentrações dos compostos selecionados como citostáticos para a série de peptoides, para uma relação com a concentração e uma resposta mais detalhada sobre suas potências. Para o composto Neq0636, podem ser feitos estudos em comparação com as células de epitélio de próstata não tumoral PNT-2, atualmente sendo utilizadas no laboratório de pesquisa, sendo esta mais específica para o trabalho em questão.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, C. P.; BRANTNER, V. V. Estimating the cost of new drug development: is it really \$802 million? **Health Affairs**, v. 25, n. 2, p. 420-428, 2006.
- AMBROSINI G, ADIDA C, ALTIERI DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. **Nature Medicine**, v. 3, n. 8, p. 917-921, 1997.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Resolução n. 10, 2013.
- AVELAR, L. A. A. et al. Molecular design, synthesis and trypanocidal activity of dipeptidyl nitriles as cruzain inhibitors. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. 1-24, 2015.
- BERG, E.L. Phenotypic chemical biology for predicting safety and efficacy. **Drug Discovery: Today Technologies**, v. 23, p. 53-60, 2017.
- BURTOLOSO, A.C.B. et al. Anti-trypanosomal activity of non-peptidic nitrile-based cysteine protease inhibitors. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, p. 1-16, 2017.
- CONUS, S.; SIMON, H.U. Cathepsins and their involvement in immune responses. **Swiss Medical Weekly**, v. 140, p. 1-8, 2010.
- CONSELHO REGIONAL DE FARMACIA DO RIO DE JANEIRO. **Cientistas descobrem possível tratamento para conter o câncer de fígado**, 2014.
Disponível em: <http://crf-rj.org.br/noticias/527-cientistas-descobrem-possivel-tratamento-para-conter-o-cancer-de-figado.html>. Acesso em: 02 de Ago. 2020.
- CRUZ, E. C. S. et al. In silico selection and cell-based characterization of selective and bioactive compounds for androgen-dependent prostate cancer cell. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 3, p. 546–550, 2017.
- DUNITZ, J. D.; TAYLOR, R. Organic Fluorine Hardly Ever Accepts Hydrogen Bonds. **Chemistry – A European Journal**, v. 3, n. 1, p. 89-98, 1997.

FATMER, P. S.; ARIENS, E. J. Speculations on the design of nonpeptidic peptidomimetics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 3, p. 362-365, 1982.

FARADY, C. J.; CRAIK, C. S. Mechanisms of Macromolecular Protease Inhibitors. **ChemBioChem**, v. 11, n. 17, p. 2341-2346, 2010.

FOUAD, M. M.; EL-BENDARY, E. R.; SUDDEK, G. M.; SHEHATA, I. A.; EL-KERDAWY, M. M. Synthesis and in vitro antitumor evaluation of some new thiophenes and thieno[2,3-d]pyrimidine derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 81, p. 587-598, 2018.

GAMBARI R. et al. Sensitization of Hep3B hepatoma cells to cisplatin and doxorubicin by corilagin. **Phytotherapy Research**, v. 28, p. 781-783, 2014.

GAUTHIER, J. Y., et al. The discovery of odanacatib (MK-0822), a selective inhibitor of cathepsin K. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 923-928, 2008.

GIODINI A. et al. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. **Cancer Research**, v. 62, n. 62, 2002.

GOMES, F. E. R. et al. Photolysis of parabens using medium-pressure mercury lamps: toxicity effects in MCF7, Balb/c 3T3 cells and ceriodaphnia dubia. **Chemosphere**, v. 208, p. 325–334, 2018.

GREENSPAN, P. D. et al. Identification of Dipeptidyl Nitriles as Potent and Selective Inhibitors of Cathepsin B through Structure-Based Drug Design. **Journal of Medical Chemistry**, v. 44, p. 4524-4534, 2011.

GRIFFEN, E. et al. Matched Molecular Pairs as a Medicinal Chemistry Tool. **Journal of Medical Chemistry**, v. 54, p. 7739-7750, 2011.

GRZONKA, Z.; JANKOWSKA, E.; KASPRZYKOWSKI, F. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 1, p. 1-20, 2001.

GUO, Z. et al. Design, synthesis and evaluation of novel (S)-tryptamine derivatives containing na allyl group and na aryl sulfonamide unit as anticancer agents.

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 29, n. 9, p. 1133-1137, 2019.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n.5, p.646-74, 2011.

HARA, T.; DURELL, S. R.; MYERS, M. C.; APPELLA, D. H. Probing the structural requirements of peptoids that inhibit HDMS-p53 interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 6, 2006.

HOOKS, J. C.; MATHARAGE, J. P.; UDUGAMASOORIYA, D. G. Development of homomultimers and heteromultimers of lung cancer-specific peptoids. **Peptide Science**, v. 96, n. 5, p. 567-77, 2011.

HORWELL. D. C. The 'peptoid' approach to the design of non-peptide, small molecule agonists and antagonists of neuropeptides. **Focus**, v. 13, 1995.

HUANG, R. et al. Discovery of dehydroabietic acid sulfonamide based derivatives as selective matrix metalloproteinases inactivators that inhibit cell migration and proliferation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 979-992, 2017.

HUANG, W. et al. Learning from Host-Defense Peptides: Cationic, Amphipathic Peptoids with Potent Anticancer Activity. **Plos One**, v. 9, n. 2, p. 1-10, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da Saúde. **Câncer de fígado**. Rio de Janeiro: INCA, 2018. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-figado>. Acesso em: 07 ago. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da Saúde. **O que é câncer?** Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 07 ago. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da Saúde. **Câncer de próstata**. Rio de Janeiro: INCA, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>. Acesso em: 04 ago. 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. World Health Organization. **Cancer today**. Lyon, 2018. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/today/home>. Acesso em: 07 ago. 2020.

JUZA, R. M.; PAULI, E. M. Clinical and surgical anatomy of the liver: a review for clinicians. **Clinical Anatomy**, v. 27, n. 5, p. 764-769, 2014.

KELLY, J. H.; DARLINGTON, G. J. Modulation of the liver specific phenotype in the human hepatoblastoma line HepG2. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 25, n. 2, p. 217-222, 1989.

LAU, K. H. A. Peptoids for biomaterials science. **Biomaterials Science**, v. 2, p. 627-633, 2014.

LEE, J. et al. Prostate tumor specific peptide-peptoid hybrid prodrugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 14, p. 2849-2855, 2015.

LEITÃO, A.; MONTANARI, M. L. C.; MONTANARI, C. A. Desenvolvimento de fármacos. In: MONTANARI, C. A. **Química medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos**. São Paulo: EDUSP, p. 94-127, 2011.

LEMAN, E. et al. 1072 Inhibition of bladder cancer cell growth by treatment with synthetically derived anti-cancer peptoids. **The Journal of Urology**, v. 187, n. 4, p. 435-436, 2012.

LIU, Y. et al. Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, n. 2, p. 581–593, 2002.

LOFFET, A. Peptides as Drugs: Is There a Market? **Journal of Peptide Science**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2002.

McELENY K. R. et al. Inhibitors of apoptosis proteins in prostate cancer cell lines. **The Prostate**, v. 51, n. 2, p. 133-140, 2002.

McMILLIAN, M.K. et al. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 18, p. 157-173, 2002.

MOHAMED, M.M.; SLOANE, B.F. Cysteine Cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 764-775, 2006.

MULLARD, A. Merck & Co. drops osteoporosis drug odanacatib. **Nature Review Drug Discovery**, v.15, p. 669, 2016.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM; U.S. Department of Health and Human Services. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/>. Acesso em: 19 Jul. 2020.

O'CONNOR D. S. et al. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. **Proceeding of the National Academy of Science of USA**, v. 97, n. 24, p. 13103–13107, 2000.

ONCOLÓGICA DO BRASIL. Câncer metástase oncologia do brasil. Disponível em: <http://oncologicadobrasil.com.br/sobre-o-cancer/cancer-introducao-pt-4/attachment/cancer-metastase-oncologica-do-brasil-002/>, 2017. Acesso em: 05 ago. 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Organização Mundial da Saúde. **Folha informativa – Câncer**. Brasília: OPAS, 2018. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094. Acesso em: 01 ago. 2020.

PROSTATE CANCER FOUNDATION. **What is localized or locally advanced prostate cancer?**, [s.d.]. Disponível em: <https://www.pcf.org/about-prostate-cancer/diagnosis-staging-prostate-cancer/localized-locally-advanced-prostate-cancer/#:~:text=In%20localized%20prostate%20cancer%2C%20the,as%20lymph%20nodes%20or%20bones>. Acesso em: 03 ago 2020.

PUBCHEM; U.S. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information. **Compound Summary**, [s.d.]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indisulam>. Acesso em: 25 jul. 2020.

QU, F. et al. Semi-synthesis and anti-tumor activity of novel 25-OCH₃-PPD derivatives incorporating aromatic moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 2, p. 189-193, 2019.

QUILLES JR, J. C.; BERNARDI, M. D. L.; BATISTA, P.H. J.; SILVA, S. C.M. S.; ROCHA, C. M. R.; MONTANARI, C. A.; LEITÃO, A. Biological Activity and Physicochemical Properties of Dipeptidyl Nitrile Derivatives Against Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 112-120, 2019a.

QUILLES JR. J. C.; TEZUKA, D. Y.; LOPES, C. D.; RIBEIRA, F. L.; LAUGHTON, C. A.; ALBUQUERQUE, S.; MONTANARI, C. A.; LEITÃO, A. Dipeptidyl nitrile derivatives have cytostatic effects against *Leishmania spp.* Promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 200, p. 84-91, 2019b.

SAINI, A.; VERMA, G. Chapter 10 – Peptoids: tomorrow's therapeutics. **Nanostructures for Novel Therapy**, p. 251-280, 2017.

SANI, M.; VOLONTERIO, A.; ZANDA, M. The Trifluoroethylamine Function as Peptide Bond Replacement. **ChemMedChem**, v. 2, n. 12, p. 1693–1700, 2007.

SANTOS, R. C. Pesquisa aponta vantagens em testes in vitro de medicamentos. **Jornal da Unicamp**, ano 23, n. 433, p. 8, 2009.

SEHGELMEBLE, F. et al. Sulfonimidamides as Sulfonamides Bioisosteres: Rational Evaluation through Synthetic, in Vitro, and in Vivo Studies with γ -Secretase Inhibitors. **ChemMedChem**, v. 7, n. 3, p. 396–399, 2012.

SHAFI, M. H.; JALAL, R.; KOSARI, N.; RAHMANI, F. Efficacy of metformin in mediating cellular uptake and inducing apoptosis activity of doxorubicin. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 99, p. 200-212, 2018.

SIKLOS, M.; BENAÏSSA, M.; THATCHER, G.R. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 6, p. 506-519, 2015.

SILVA, D.G. et al. A comparative study of warheads for design of cysteine protease inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 22, p. 5031-5035, 2017.

SILVERMAN, R. B.; HOLLADAY, M. W. The Organic chemistry of drug design and drug action. 3a. ed. San Diego: **Elsevier Inc**, 2014.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems: doxorubicin cell and molecular biological activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 157–170, 2013.

TSAKALOZOU, E.; ECKMAN, A. M.; BAE, Y. Combination effects of docetaxel and doxorubicin in hormone-refractory prostate cancer cells. **Biochemistry Research International**, v. 12, p. 1-10, 2012.

TURK, V.; STOKA, V.; VASILJEVA, O.; RENKO, M.; SUN, T.; TURK, B.; Turk, D. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1824, p. 68-88, 2012.

THORN C. F. et al. Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenet Genomics**, v. 21, n. 7, p. 440-446, 2011.

TURK B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Review Drug Discovery**, v. 5, n. 9, p. 785–799, 2006.

VALASTYAN, S.; WEINBERG, R.A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v.147, n.2, p.275-292, 2011.

VALDES, T. A. *Avaliação do efeito citostático e citotóxico na terapia combinada de antineoplásicos em linhagens de câncer de mama (MDA-MB-231), fígado (HepG2) e próstata (PC-3 e DU 145)*. 2019. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

WANG, Y.; DEHIGASPITYA, C.; LEVINE, P. M.; PROFIT, A. A. Multivalent peptoid conjugates which overcome enzalutamide resistance in prostate cancer cells. **Cancer research**, v. 76, n. 17, 2016.

YURTCU, E.; ISERI, O. D.; SAHIN, F. I. Effects of silymarin and silymarin-doxorubicin applications on telomerase activity of human hepatocellular carcinoma

cell line HepG2. **Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 20, p. 555-561, 2015.