

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

SARA FRANCHIN DUARTE DE SOUZA

Análise da atividade antineoplásica de derivados de dipeptidil nitrilas em
linhagens metastáticas de células de câncer de mama e próstata

São Carlos

2021

SARA FRANCHIN DUARTE DE SOUZA

Análise da atividade antineoplásica de derivados de dipeptidil nitrilas em
linhagens metastáticas de células de câncer de mama e próstata

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e 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: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Andrei Leitão

São Carlos

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues
Fontes da EESC/USP

S729a Souza, Sara Franchin Duarte de
Análise da atividade antineoplásica de derivados de dipeptidil nitrilas em linhagens metastáticas de células de câncer de mama e próstata / Sara Franchin Duarte de Souza ; orientador Andrei Leitão. -- São Carlos, 2021.
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação Interunidades em Bioengenharia e Área de Concentração em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2021.
1. Linhagens de células de câncer de mama e próstata. 2. Ensaios *in vitro*. 3. Potência. 4. Seletividade. 5. Cisteíno proteases. 6. Derivados de dipeptidil nitrilas. I. Título.

Elena Luzia Palloni Gonçalves – CRB 8/4464

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Sara Franchin Duarte de Souza,

Título: “ Análise da atividade antineoplásica de derivados de dipeptidil nitrilas em linhagens metastáticas de células de câncer de mama e próstata”

Data da defesa: 16/12/2021

Comissão Julgadora	Resultado
Prof(a). Dr(a). Andrei Leitão IQSC/USP - Orientador	<u>Não Votante</u>
Prof(a). Dr(a). Kamilla Swiech Antonietto FCFRP/USP	<u>Aprovada</u>
Prof(a). Dr(a). Felipe Roberti Teixeira UFSCar	<u>Aprovada</u>
Prof(a). Dr(a). Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo UFSCar	<u>Aprovada</u>

Presidente da Comissão de Pós-Graduação: Prof. Dr. Adair Roberto Aguiar

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao
desenvolvimento científico da cura
do câncer.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família por todo amor e suporte. Obrigada mãe, seu esforço me fez chegar até aqui; obrigada pai por todos os ensinamentos de vida que me fizeram ser quem eu sou. Aos meus irmãos, Betinho e André, obrigada por existirem e estarem sempre do meu lado. A vida tem mais sentido com vocês.

Aos meus avós porque sem eles nada disso seria possível.

Ao meu namorado Gustavo por todo apoio e compreensão a todos os meus surtos durante a escrita.

Ao meu orientador Andrei, por toda dedicação e paciência! Obrigada por nunca se cansar de ensinar.

A minha amiga Talia Varenga que foi meu suporte nos momentos mais difíceis e por ter me ajudado ao longo de todo meu mestrado.

A minha amiga Gabriela, minha irmã de alma, pelo companheirismo ao longo de todos esses anos.

A minha filhinha Amora, por me presentear com sua existência. Saudades eterna.

Aos meus colegas de trabalho, pelos estudos e brincadeiras. Eu amo nossos dias juntos.

A todos os meus amigos e professores. Levo todos aqui comigo!

E por último, gostaria de agradecer as agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPESP pelo financiamento de minha pesquisa.

EPÍGRAFE

“Não controlamos a vida, somos a vida. Não controlamos a velhice, a doença e a morte. Passamos. Nada permanece.”

Monja Coen (2020)

RESUMO

FRANCHIN, S. D. S. **Análise da atividade antineoplásica de derivados de dipeptidil nitrilas em linhagens metastáticas de células de câncer de mama e próstata.** 2021. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), os cânceres de mama e de próstata têm maior incidência na população feminina e masculina, respectivamente, desconsiderando o câncer de pele não melanoma. Estes cânceres são inicialmente dependentes de hormônio, mas com o passar do tempo seu crescimento pode se tornar independente da ação destes, principalmente nos casos de tumores metastáticos. A maioria dos tratamentos existentes atualmente em uso atua em tumores primários. A quimioterapia existente para tumores metastáticos ainda é limitada, incorrendo em casos de resistência a fármacos e elevado número de óbitos. Isto justifica a necessidade do estudo de novas substâncias bioativas que aumentem a potência e eficácia dos tratamentos. O grupo de pesquisa NEQUIMED tem realizado a síntese de inibidores de cisteíno proteases derivados de dipeptidil nitrilas, com diversos resultados alcançados para atividade antiparasitária e antineoplásica. Assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar e analisar por meio de ensaios celulares os derivados de dipeptidil nitrila que atuam como inibidores de cisteíno catepsinas, que estão envolvidas na progressão e metástase tumoral. Foram realizados testes de citotoxicidade nas linhagens cancerosas MDA-MB-231, MCF-7, PC-3 e DU 145 pelo método colorimétrico MTT com 33 compostos sintetizados pelo grupo de pesquisa. Destes, seis compostos foram usados para quantificar a potência e seletividade, onde o composto mais promissor codificado como Neq1013 foi identificado. Este apresentou o menor valor de IC_{50} , com potência próxima a 15 μ M e seletividade para as células tumorais quando comparado com as linhagens controle. Estes resultados são de grande valia para o planejamento de novas moléculas bioativas e seleção dos melhores arcabouços químicos para as próximas fases da gênese planejada de fármacos.

Palavras-chave: Linhagens de células de câncer de mama e próstata. Ensaios *in vitro*. Potência. Seletividade. Cisteíno proteases. Derivados de dipeptidil nitrilas.

ABSTRACT

FRANCHIN, S. D. S. **Analysis of the antineoplastic response of dipeptidyl nitrile derivatives in metastatic breast and prostate cancer cell lines.** 2021. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

According to the National Cancer Institute (INCA), breast and prostate cancers have the highest incidence in the female and male populations, respectively, disregarding the non-melanoma skin cancer. These cancers are initially hormone dependent, but over time, their growth may become independent of their action, especially in cases of metastatic tumors. However, most of the existing treatments are designed to treat primary tumors. The available chemotherapy is hampered by drug resistance, leading to a high number of deaths. Therefore, this scenario justifies the study of new bioactive substances that increase the potency and effectiveness of treatments. The NEQUIMED research group has performed the synthesis of cysteine protease inhibitors derived from dipeptidyl nitriles, with several results for antiparasitic and antineoplastic activities. Thus, the present work aims to use cell-based assays to analyze and identify dipeptidyl nitrile derivatives that act as inhibitors of cysteine cathepsins, which are proteins involved in tumor progression and metastasis. Cytotoxicity tests were performed using MDA-MB-231, MCF-7, PC-3, and DU 145 cancer cell lines with the MTT colorimetric method for 33 chemical compounds synthesized by the group. Six compounds were selected to quantify the potency and selectivity, where the most promising compound coded as Neq1013 was identified. Neq1013 showed the lowest IC_{50} value, with potency close to 15 μ M, and selectivity for tumor cells when compared to control cell lines. These are invaluable results for the drug design of new bioactive molecules aiming to select the best chemical scaffolds for the next phases of the drug discovery and development pipeline.

Keywords: Prostate and breast cancer cell lines. *In vitro* assays. Potency. Selectivity. Cysteine proteases. Dipeptidyl nitrile derivatives.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>Hallmarks</i> do câncer.....	29
Figura 2. Estatísticas de incidência e mortalidade de câncer em todo o mundo.....	30
Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma no Brasil.....	31
Figura 4. Representação estrutural do cocomplexo diidrotestosterona com o receptor andrógeno no domínio de interação do ligante (LBD) e dos fármacos e moléculas bioativas que atuam neste alvo macromolecular.....	34
Figura 5. Representação esquemática das alterações moleculares em câncer de próstata resistente à castração (CRPC)	36
Figura 6. Estruturas químicas dos moduladores seletivos do receptor estrógeno (SERMs).....	40
Figura 7. Vias distintas de regulação do estrógeno na expressão do gene: (a) via genômica; (b) ativação de receptores de membrana tirosina quinases; (c) via não genômica; (d) ativação de integrinas.....	42
Figura 8. Inibidores de catepsinas conhecidos e arcabouço químico dos derivados de dipeptidil nitrilas sintetizadas no grupo de pesquisa NEQUIMED.....	45
Figura 9. Representação esquemática das condições de cultivo do ensaio de estrogenicidade em placa de poços.....	96
Figura 10. Estrutura química do quimioterápico Cloridrato de Doxorubicina.....	54
Figura 11. Comparação entre as estruturas químicas do indicador vermelho fenol e do 17- β -estradiol.....	55
Figura 12- Curva de crescimento das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 em diferentes meios de cultura.....	60
Figura 13- Curva concentração-respostas para o fármaco doxorubicina nas linhagens BALB/3T3 clone A31, DU 145, MDA-MB-231 e PC-3.....	61
	64

Figura 14. Arcabouço químico dos derivados de dipeptidil nitrilas sintetizado pelo grupo de pesquisa NEQUIMED.....	66
Figura 15. Relação entre os compostos testados e a viabilidade celular das linhagens BALB/3T3 clone A31, PNT-2, PC-3, DU 145 e MDA-MB-231.....	67
Figura 16. Curvas concentração-resposta para os compostos selecionados a partir das triagens iniciais nas linhagens BALB/ 3T3 Clone A31, DU 145 e MDA-MB-231	70
Figura 17. Estruturas químicas dos Neq0810, Neq0820.1, Neq1009 e Neq1013.....	76
Figura 18. Atividade citostática de dipeptidil nitrilas inibidoras de cisteíno proteases em linhagens de câncer de próstata PC-3 e DU 145 em monocultura.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos químicos utilizados nos experimentos.....	56
Tabela 2. Valor de IC ₅₀ , Índice de Seletividade e R ² /Sy.x para cada linhagem celular.....	63
Tabela 3. Comparação entre o IC ₅₀ da doxorubicina encontrado experimentalmente e os dados encontrados na literatura para as células cancerosas.....	65
Tabela 4. Potência dos compostos selecionados para os ensaios de viabilidade celular.....	73
Tabela 5. Seletividade dos compostos selecionados para os ensaios de viabilidade celular.....	74
Tabela 6. Potência dos compostos Neq0810, Neq0820.1, Neq1009 e Neq1013 para distintas cisteíno catepsinas humanas dados na forma de pKi.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(m/v)	—	Razão massa volume
ADT	—	Terapia de deprivação androgênica
AIPC	—	Câncer de próstata andrógeno-independente
AIs	—	Inibidores de aromatase
Akt	—	Proteína Quinase B
AR	—	Receptor andrógeno
Bcl-2	—	B cell lymphoma protein 2
BCRJ	—	Banco de Células do Rio de Janeiro
BPH	—	Hiperplasia prostática benigna
<i>BRCA</i>	—	BReast-CAnceR susceptibility gene 1
CaP	—	Câncer de próstata
CRPC	—	Câncer de Próstata Resistente à Castração
CTSB	—	Catepsina B
CTSL	—	Catepsina L
CTSS	—	Catepsina S
DMEM	—	Dulbecco's Modified Eagle
DMSO	—	Dimetilsufóxido
DNA	—	Ácido Desoxirribonucleico
ECVAM	—	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EDTA	—	Ácido etilendiamino tetra-acético
EGFR	—	Receptor de fator de crescimento epidérmico
ER	—	Receptor estrógeno
ER α	—	Receptor estrógeno alfa
ER β	—	Receptor estrógeno beta
F12-K	—	Nutriente HAM F-12
FAK	—	Quinase de adesão focal
FBS	—	Soro Fetal Bovino
GnRH	—	Hormônio liberador de gonadotrofina
HER2	—	Receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2
HPV	—	Papilomavirus humano
IARC	—	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

IC ₅₀	–	Valor referência a 50% de inibição de um composto
ICCVAM	–	Interagency Coordinating Committee on the Validation of
Alternative Methods		
IGF1-R	–	Receptor de fator de crescimento semelhante a insulina 1
INCA	–	Instituto Nacional do Câncer
Ki	–	Constante de inibição
LBD	–	Domínio de interação do ligante
LC3-II	–	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LHRH	–	Luteinizing hormone–releasing hormone
Log[cpd]	–	Logaritmo da concentração do composto
MAPKs	–	Quinases ativadas por mitógenos
MMPs	–	Metaloproteinases
MTT	–	Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazólio
NF-kB	–	Fator nuclear kappa B
NICEATM	–	Interagency Center for the Evaluation of Alternative
Toxicological Methods		
NR3	–	Receptores nucleares classe 3
NTP	–	National Toxicology Program
p53	–	Proteína citoplasmática relacionada a morte celular
PI3K	–	Fosfatidilinositol-3-quinase
pKi	–	Log da constante de inibição
PR	–	Receptores de progesterona
PSA	–	Prostate-specific antigen
Quinase Src	–	Quinase específica para
RNA	–	Ácido Ribonucleico
ROS	–	Espécies reativas de oxigênio
RPM	–	Rotação por minuto
SERDs	–	Degradação seletiva do ER
SERMs	–	Receptores estrógeno seletivos
SI	–	Índice de Seletividade
TAM	–	Macrófagos associados a tumor
TFs	–	Fatores de transcrição
TGF-β	–	Fator de crescimento tumoral beta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 Câncer	27
2.2 Câncer de Próstata e Terapias Convencionais	33
2.3 Câncer de Próstata Resistente à Castração (CRPC)	35
2.4 Câncer de mama	36
2.5 Câncer de mama e alternativas terapêuticas	38
2.6 Câncer de mama e o mecanismo de resistência	41
2.7 Cisteíno proteases	43
2.8 Inibidores de catepsinas	44
2.9 Ensaios <i>in vitro</i> usando culturas celulares	46
3. OBJETIVOS	49
3.1 Objetivo Geral	49
3.2 Objetivos Específicos	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 Materiais	51
4.2 Linhagens celulares	51
4.3 Método colorimétrico MTT	52
4.3.1 Estudo de estrogenicidade	53
4.3.2 Compostos químicos e ensaios celulares	54
4.4 Análises estatísticas	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	81
REFERÊNCIAS	83

1. INTRODUÇÃO

As células de organismos multicelulares apresentam diferentes funções de acordo com as necessidades do corpo: devem se multiplicar, morrer e ocupar lugares apropriados quando necessário ao organismo. O câncer é uma doença fundamentalmente genética e o conceito de oncogene define que algumas alterações genéticas podem engatilhar uma transformação na célula (DEBERARDINIS; NAVDEEP, 2016; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INOCA, 2021).

Os estudos em tumores foram inicialmente baseados no vírus do sarcoma de Rous, responsável por causar tumores em galinhas. Genes encontrados neste vírus codificam tirosina quinases hiperativas que afetam a divisão celular, interações célula a célula e comunicação intercelular, contribuindo para o descontrole da divisão celular em muitos tipos de câncer. O mesmo gene é encontrado em humanos (RUBIN, 2011; WEISS; PETER, 2011).

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, ficando apenas atrás das doenças cardiovasculares. Globalmente o câncer de mama fica em primeiro lugar como mais ocorrente com 2,3 milhões de casos, e o câncer de próstata em quarto com 1,4 milhões desconsiderando o câncer de pele não melanoma. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, esta doença foi responsável por 1 a cada 6 mortes em 2020 (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2021).

Todo tipo de câncer requer um regime de tratamento específico que abrange uma ou mais modalidades, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia (WHO, 2021). Mesmo com a existência de diversas quimioterapias em uso atualmente, estes tipos de neoplasias apresentam casos de resistência a fármacos, além do elevado número de mortes. Há também um alto número de efeitos colaterais dos quimioterápicos utilizados, justificando assim a necessidade do estudo de novas substâncias bioativas que aumentem a potência e eficácia dos tratamentos.

Dessa forma, este projeto tem como finalidade identificar moléculas bioativas em pontos de sinalizações intracelulares que atuam na modulação dos mecanismos de multiplicação e morte celular. Este conhecimento é importante para a descoberta de uma nova geração de antitumorais com interesse farmacológico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

O câncer é definido como um conjunto de mais de 100 doenças e se caracteriza, de forma simplificada, pela replicação celular desordenada decorrente de mutações genéticas, se diferenciando de outras doenças genéticas, sobretudo, por apresentar mutações somáticas, em oposição às mutações adquiridas através das células germinativas (INCA, 2021). Essa instabilidade genômica permite mutações aleatórias, incluindo rearranjos cromossômicos que impulsionam a progressão do tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Em tecidos saudáveis, a produção e liberação de promotores de crescimento são controladas, de tal forma que a homeostase e a manutenção da arquitetura e funcionalidade dos tecidos é garantida. As alterações essenciais na fisiologia celular que ditam coletivamente o crescimento maligno e seu grau de malignidade é definido de acordo com duas propriedades: (1) proliferação celular desregulada e (2) invasão e colonização de diferentes órgãos e tecidos. Quando células se proliferam em excesso, mas permanecem agrupadas em uma massa única, é denominado tumor benigno. Em geral, tumores benignos podem ser removidos completamente por cirurgia. O tumor só é canceroso quando suas células invadem tecidos saudáveis, causando danos e prejuízos funcionais, e nesse caso diz-se que ele é maligno (HANAHAN; WEINBERG, 2011; INCA, 2021; WANG *et al.*, 2018).

As características que levam a transformação de células normais em células cancerosas são comuns na maioria ou talvez em todos os tipos de tumores humanos: alterações na regulação da proliferação celular e homeostase, tais como autoprodução de fatores de crescimento; insensibilidade a inibidores de crescimento; evasão de morte celular programada (apoptose); potencial de replicação ilimitado; angiogênese sustentada; invasão e metástase tecidual (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Mais recentemente foi evidenciado duas marcas adicionais envolvidas na patogênese do câncer (Figura 1): a capacidade de modificação e reprogramação do metabolismo energético celular por essas células dando suporte para o crescimento e a proliferação celular contínua, substituindo o programa metabólico que opera na maioria dos tecidos normais e alimenta as operações fisiológicas das células associadas. A segunda marca é a evasão ativa das células

cancerosas do ataque e eliminação pelas células do sistema imunológico, em particular por linfócitos T e B, macrófagos e células *natural killer* (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Provavelmente, a característica mais fundamental das células cancerosas envolve sua capacidade de sustentar a proliferação crônica. As células cancerosas sintetizam os próprios fatores de crescimento, criando um *feedback* positivo, denominado estimulação autócrina. Os fatores de crescimento se ligam aos receptores da membrana plasmática, que procedem à emissão de sinais intracelulares regulando a progressão do ciclo celular, crescimento celular (aumento no tamanho da célula) e frequentemente na influência de outras propriedades biológicas, como a sobrevivência celular e o metabolismo energético. De maneira geral os genes relacionados incluem genes codificadores de proteínas secretoras, fatores de crescimento e seus receptores, proteínas citoplasmáticas e fatores de transcrição nucleares que controlam a expressão dos genes essenciais para a divisão celular (HANAHAN; WEINBERG, 2000; INCA, 2021).

No total, aproximadamente, 1,6% dos 22.000 genes funcionais no genoma humano mostram mutações somáticas recorrentes no câncer. Células saudáveis não apresentam capacidade de divisão infinita devido ao encurtamento dos telômeros em cada ciclo de divisão celular. O processo de encurtamento ativa a senescência de modo que a célula pare de se dividir. Não ocorre a inibição de contato nas células de câncer e elas crescem e se dividem independentemente de seu entorno. São capazes de modular a expressão e atividade de enzimas que podem aumentar o comprimento dos telômeros, tornando-se capazes de se dividir indefinidamente. Algumas proteínas supressoras de tumor apresentam alterações que evitam a seleção destas células defeituosas (GREENBERG, 2015; MCCLATCHEY; YAP, 2012; WITSCH; SELA; YARDEN, 2010).

Apoptose é o mecanismo que favorece a manutenção do equilíbrio celular através da destruição seletiva de estruturas celulares e organelas não funcionais, sendo um importante mecanismo na eliminação de células defeituosas. A resistência adquirida a apoptose é uma característica da maioria ou talvez de todos os tipos de câncer. As células cancerosas conseguem contornar o sistema de controle, alterando os mecanismos detectores de danos e anormalidades (ELMORE, 2007). A mutação mais comum resulta na inativação funcional da proteína p53, componente chave no reconhecimento de danos no DNA, observada em mais de 50% dos cânceres humanos (DUFFY *et al.*, 2017).

O processo de angiogênese é necessário para permitir a propagação e progressão tumoral. A maior parte das células tumorais cresce em condições de hipóxia devido à falta de

vasos sanguíneos que suprem o uso de oxigênio. Assim como os tecidos normais, os tumores requerem um suprimento adequado de oxigênio, metabólitos e uma forma eficaz de remoção de resíduos. Dessa forma, as células presentes no entorno induzem a formação de novos vasos sanguíneos que distribuem e liberam oxigênio e nutrientes para todas as células do corpo. Para isto, manipulam sinais pró e anti-angiogênicos, normalmente controlados no tecido sadio (BERGERS; BENJAMIN, 2003).

À medida que os tumores adquirem um potencial invasivo, as células cancerosas passam por várias alterações. Através dos vasos sanguíneos e linfáticos provenientes do processo de angiogênese tumoral, migram do tumor primário e colonizam outros tecidos e órgãos formando tumores secundários em outros locais do organismo (TALMADGE; FIDLER, 2010). Aproximadamente 90% das mortes por câncer humano são causadas em decorrência das metástases, no entanto, a maioria dos tratamentos existentes é usada em tumores primários (JIANG *et al.*, 2015; PERRET; CRÉPIN, 2008). Para neoplasias, diversas evidências confirmam o papel crucial das catepsinas na progressão, invasão e metástase de tumores (LÖSER; PIETZSCH, 2015).

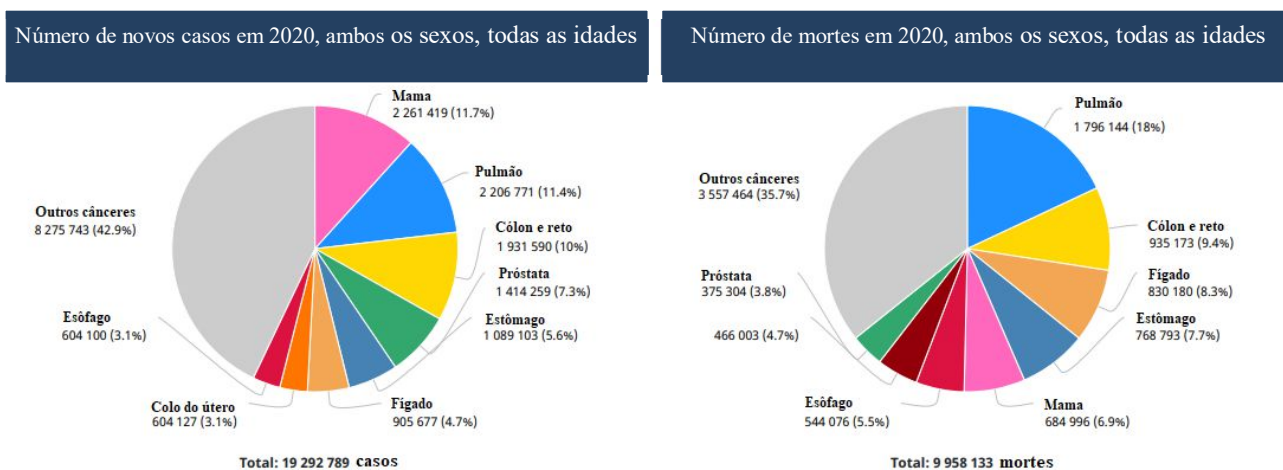
Figura 1. As principais características do câncer.



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

O câncer é o principal problema de saúde pública mundial e uma das causas mais importantes de morbidade e mortalidade em crianças e adultos. Estima-se que no ano de 2020 ocorreram no mundo 19 milhões de novos casos com 9,9 milhões de óbitos, tendo como mais incidente o câncer de mama, seguido pelo câncer de pulmão, cólon e reto e próstata, respectivamente com exceção do câncer de pele não melanoma (**figura 2**) (INCA, 2021; WHO, 2021).

Figura 2. Estatísticas de incidência e mortalidade de câncer em todo o mundo.





Fonte: Adaptado de WHO (2021).

De acordo com o sistema de Informação de Mortalidade do Datasus, em 2019 no Brasil, morreram 232.040 mil pessoas de câncer, sendo 121.686 homens e 110.344, mulheres (Figura 3). É estimado para cada ano do triênio 2020-2022, 625 mil casos novos, sendo o câncer de pele não melanoma como o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada). O câncer de mama é o mais frequente em mulheres correspondendo a 29,7%, e o de próstata em homens com 29,2% (ambos com exceção do câncer de pele não melanoma) (INCA, 2021).

Várias evidências indicam que o processo de tumorigênese ocorre em várias etapas que levam à transformação progressiva de células humanas normais em malignas. O câncer não tem uma causa única, podendo ser gerado por um conjunto de diversos fatores externos, presentes no meio ambiente, e internos, como hormônios, condições imunológicas e mutações genéticas. Geralmente, o conjunto de ambos os fatores contribui para o desenvolvimento da doença, sendo

necessária mais de uma mutação para que ocorra a desregulação da divisão celular (HANAHAN; WEINBERG, 2000; INCA, 2021; WANG *et al.*; 2018).

Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto o câncer de pele não melanoma no Brasil.

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens 	Mulheres 	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.540	9,1%			Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.710	7,5%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.200	5,0%			Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%

Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA (2021).

A mutação pode ocorrer devido à presença de alta energia de radiação ou compostos mutagênicos no ambiente que reagem com o DNA da célula, danificando-o. A incidência e a mortalidade vêm aumentando devido a fatores como crescimento populacional, taxa de envelhecimento, maior exposição a fatores de risco e ao desenvolvimento de tecnologias de diagnóstico. Houve um aumento de cânceres associados a melhoria das condições socioeconômicas com a incorporação de hábitos associados à urbanização como sedentarismo, alimentação inadequada, tabagismo, entre outros. Continentes como a Europa e América do Norte, por exemplo, 1 a cada 5 pessoas irá morrer de câncer (BRAY *et al.*, 2018; HULVAT, 2020; LEWANDOWSKA *et al.*, 2019).

Na maioria das vezes o gene defeituoso causador de câncer não é hereditário, existindo apenas alguns casos mais raros em que são herdados. No entanto, há alguns fatores genéticos que tornam algumas pessoas mais sensíveis à ação dos agentes ambientais que causam alguns tipos de câncer, o que explica por que algumas desenvolvem a doença e outras não, quando expostas a uma mesma substância cancerígena. O envelhecimento também é um fator que aumenta a susceptibilidade a formação de tumores pois além das células do corpo passarem por diversas mudanças, as pessoas idosas estão expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco (GARBER; KENNETH, 2005; INCA, 2021).

Em muitos casos, infecções bacterianas e virais podem contribuir para o surgimento de tumores como resultado indireto dos efeitos carcinogênicos de estados inflamatórios crônicos. O papilomavírus humano, por exemplo, é responsável por mais de 90% dos cânceres da cérvix uterina. Este é o segundo mais comum em mulheres, com uma taxa de mortalidade de 40% (LEWANDOWSKA *et al.*, 2019). Aproximadamente 13% dos cânceres diagnosticados em 2018 globalmente foram atribuídos a infecções carcinogênicas, incluindo *Helicobacter pylori*, papilomavírus humano (HPV), vírus da hepatite B, vírus da hepatite C e vírus *Epstein-Barr*. Os vírus da hepatite B e C aumentam o risco de câncer de fígado e colo do útero, respectivamente. A infecção pelo HIV aumenta substancialmente o risco de câncer, como o câncer cervical (SINGH *et al.*, 2019; WHO, 2021).

O sistema imunológico também pode contribuir para o desenvolvimento de alguns cânceres. A inflamação por células imunes inatas projetadas para combater infecções e curar feridas, induzidas pelo fator de transcrição NF-κB, um importante mediador da resposta imune inata, podem desempenhar um papel importante na progressão do câncer associado à inflamação. Doenças inflamatórias crônicas, como a doença de Crohn e a colite ulcerativa, também são consideradas como fator de risco para o desenvolvimento de tumores (HOESEL; JOHANNES, 2013; SINGH *et al.*, 2019).

O termo estadiamento de câncer é uma classificação para determinar o tratamento oncológico. Ela é definida de acordo com o grau de extensão de um determinado tipo de câncer, levando em conta as características do tumor primário, as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza, e a presença ou ausência de metástases, sendo o tratamento diferente para cada estágio. Para fazer o estadiamento, há algumas regras internacionalmente estabelecidas, sendo o sistema mais utilizado o da União Internacional para o Controle do Câncer (UICC), denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos (INCA, 2021).

O tratamento pode ser feito por diferentes métodos, como cirurgia, quimioterapia e radioterapia, sendo necessário, em muitos casos, combinar mais de uma modalidade. A cirurgia oncológica consiste na retirada do tumor. A quimioterapia utiliza medicamentos para destruir as células cancerosas impedindo, também, que elas se espalhem pelo corpo; e a radioterapia utiliza radiações ionizantes, como raios-X por exemplo, que destroem e impedem que as células do tumor repliquem (INCA, 2021; WANG *et al.*, 2018).

2.2 Câncer de Próstata e Terapias Convencionais

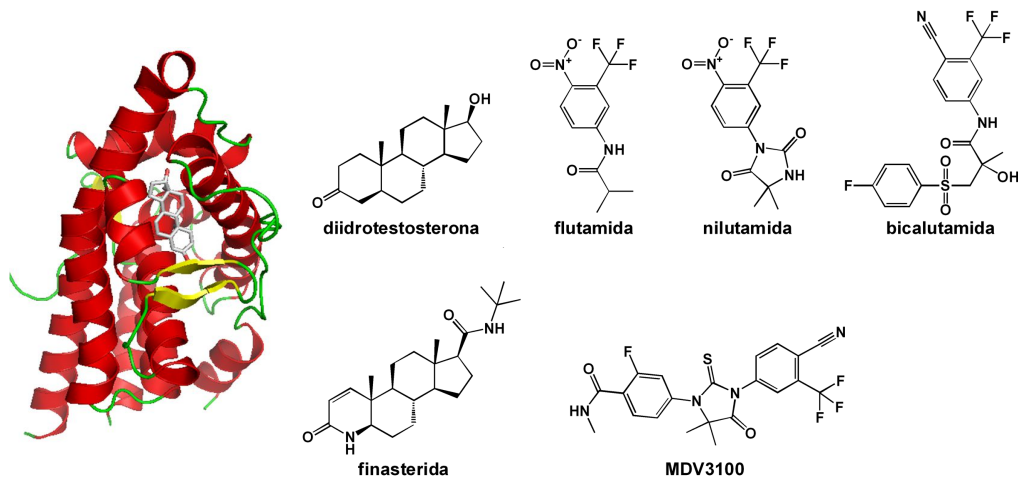
O câncer de próstata (PaC) é a neoplasia com maior incidência em homens (com exceção do câncer de pele não melanoma), sobretudo na faixa etária acima dos 40 anos, no Brasil e no mundo: cerca de 75% dos casos ocorrem a partir dos 65 anos. Embora apenas 1 em cada 350 homens com menos de 50 anos seja diagnosticado com câncer de próstata, a taxa de incidência aumenta para 1 em cada 52 homens nas idades de 50 a 59 anos. De acordo com levantamentos do DATASUS-INCA, afeta aproximadamente 13% da população masculina, e estima-se para o Brasil 65.840 novos casos para o ano de 2020 e aproximadamente 16.000 mortes em 2019. Em valores absolutos, é o quarto tipo mais comum no mundo, representando cerca de 7% do total de cânceres. Anualmente, mais de 1,2 milhão de novos casos são diagnosticados, com mais de 350 mil mortes associadas a essa doença. O risco do câncer de próstata está fortemente associado ao histórico familiar: 9% dos indivíduos diagnosticados têm histórico de câncer na família (RAWLA, 2019; THOMA, 2021).

A próstata é uma glândula masculina localizada na parte baixa do abdômen: abaixo da bexiga e à frente do reto. A próstata envolve a porção inicial da uretra e é responsável pela produção parcial do sêmen. Ela pode se tornar disfuncional e com tamanho aumentado, o que caracteriza um quadro clínico conhecido como hiperplasia prostática benigna (BPH) que usualmente é de fácil tratamento por meio da finasterida (Figura 4) ou intervenção cirúrgica (TIWARI *et al.*, 2005). Ainda assim, o quadro deve ser monitorado para observar alguma eventual alteração maligna, que configura o câncer de próstata.

O desenvolvimento do câncer de próstata (PaC) está associado ao acúmulo de mutações somáticas no genoma das células epiteliais da próstata basal ou luminal (THOMA, 2021). Em sua fase inicial é hormônio-dependente, isto é, multiplica-se a partir da ação dos hormônios androgênicos (testosterona e di-hidrotestosterona) no receptor andrógeno (AR). O mecanismo clássico de ação do receptor andrógeno segue o mesmo padrão dos receptores nucleares classe 3 (NR3), com a ativação e dimerização do receptor a partir do reconhecimento do agonista no domínio de interação do ligante (LBD) (Figura 4). A partir da formação de um cocomplexo, há a interação de várias macromoléculas que atuam como reguladoras de fatores de transcrição do DNA no núcleo da célula (GAO; BOHL; DALTON, 2005). Desta forma, alternativas terapêuticas envolvem a inibição da biossíntese de testosterona e di-hidrotestosterona, por antagonistas do AR (como os fármacos flutamida, nilutamida, bicalutamida e MDV3100, conhecido como enzalutamida (GAO; BOHL; DALTON, 2005; TRAN *et al.*, 2009). A

finasterida, amplamente utilizada no tratamento, é um inibidor da enzima 5α -redutase que converte a testosterona em di-hidrotestosterona, o andrógeno mais prevalente e potente no tecido da próstata, responsável pelo desenvolvimento embriológico e crescimento da glândula, bem como promoção do câncer (RAWLA, 2019).

Figura 4. Representação estrutural do cocomplexo di-hidrotestosterona com o receptor andrógeno no domínio de interação do ligante (LBD) e dos fármacos e moléculas bioativas que atuam neste alvo macromolecular.



MDV3100: enzalutamida.

Fonte: Adaptado Cruz (2015).

É importante ressaltar que essas células epiteliais no órgão normal e canceroso expressam altos níveis de AR que codifica o receptor de andrógeno (AR), e acredita-se que isso conduza a dependência hormonal no câncer de próstata. Além disso, essas células secretam antígeno prostático específico (PSA), uma serina protease que é transcricionalmente ativada pelo AR e frequentemente elevada em homens com câncer de próstata, sendo usada na detecção e diagnóstico de doenças. Várias evidências de que a via do andrógeno é um dos mais importantes mecanismos de sinalização envolvidos no câncer de próstata vêm da análise da via gênica, que revela uma associação significativa entre o risco de câncer de próstata e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de testosterona e di-hidrotestosterona (DHT), entre elas, a 5α -redutase. Complementando esses achados, estudos de associação de todo o genoma identificaram mais de 170 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados ao câncer de próstata (THOMA, 2021). Há também uma associação entre o câncer de próstata e genes envolvidos na sinalização

do receptor de estrogênio. Vários estudos demonstraram que o estrogênio, incluindo o hormônio natural E2, induz múltiplas formas de lesões genéticas, como alterações cromossômicas, danos ao DNA, mutações genéticas e instabilidade de microssatélites, indicando fortemente que o estrogênio pode servir como um modulador no desenvolvimento do câncer de próstata. Alguns estudos também descobriram que pacientes com câncer de próstata apresentam baixos níveis de testosterona e DHT, sugerindo que hormônios não androgênicos, incluindo insulina e vitamina D podem estar envolvidos na carcinogênese da próstata (RAWLA, 2019; REBELLO *et al.*, 2021).

O carcinoma prostático pode ser assintomático no estágio inicial. No entanto, os sintomas mais frequentes são dificuldade em urinar, aumento da frequência e noctúria. O estágio mais avançado da doença pode se manifestar com retenção urinária e dor óssea uma vez que o esqueleto axial é o local mais comum de doença metastática óssea. Quando mais grave, pode provocar infecção generalizada ou insuficiência renal (RAWLA, 2019).

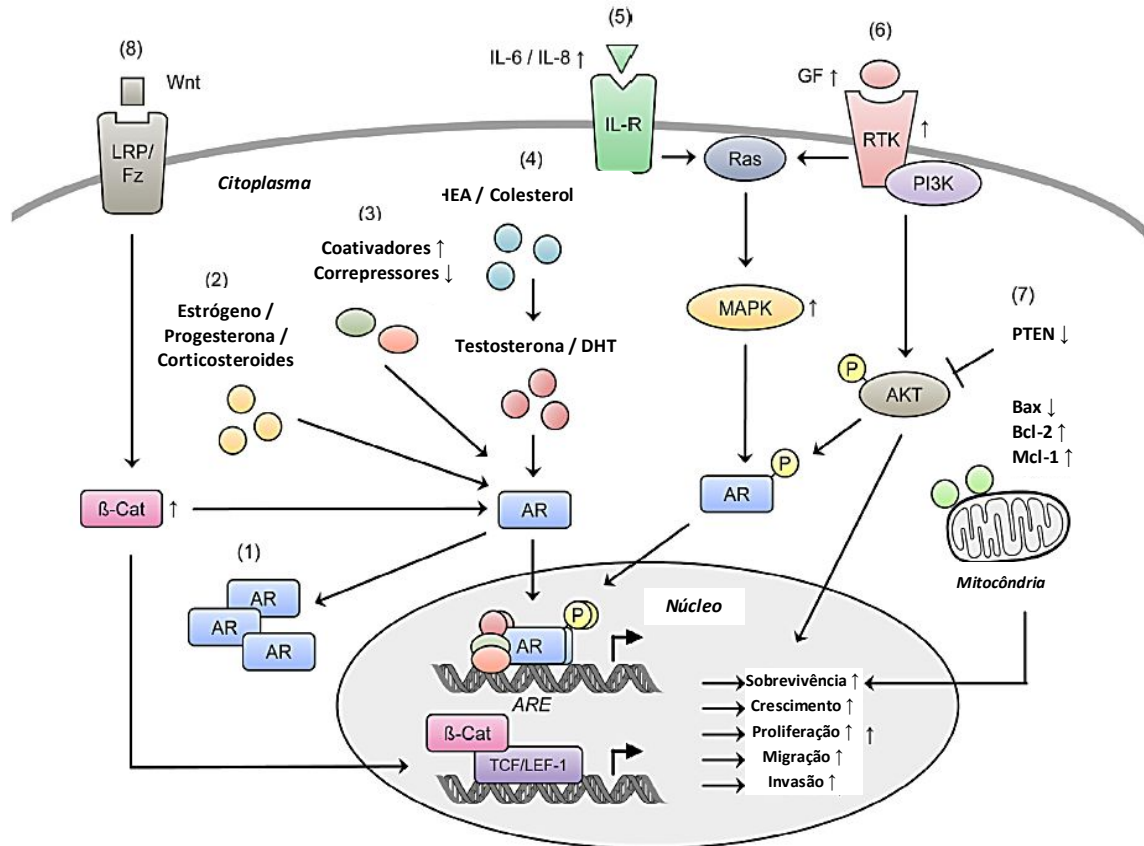
O diagnóstico é feito a partir da biópsia prostática por via transretal ou transperineal e guiada por ultrassonografia e/ou ressonância magnética. A indicação de biópsia depende do toque retal e da dosagem do antígeno prostático específico (PSA). Muitos cânceres de próstata são detectados com base em níveis plasmáticos elevados de PSA (acima de 4 ng/mL), uma glicoproteína normalmente expressa pelo tecido da próstata. No entanto, como também foram encontrados homens sem câncer com PSA elevado, a biópsia do tecido é o padrão de diagnóstico para confirmar a presença do câncer (LITWIN; HUNG-JUI, 2017; RAWLA, 2019; THOMA, 2021).

2.3 Câncer de Próstata Resistente à Castração (CRPC)

A terapia de deprivação androgênica (ADT) não é curativa em muitos casos 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 se manteve importante para a progressão do CRPC. Atualmente, muitas das aberrações 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 corretores, mecanismos de apoptose, entre outros (Figura 5), obtendo como resultado o incremento do crescimento, sobrevivência, proliferação, migração e invasão das células cancerosas (KATZENWADEL; WOLF, 2015). Desse modo, novas alternativas terapêuticas são necessárias para cada uma dessas diferentes vias.

Figura 5. Representação esquemática das alterações moleculares em câncer de próstata resistente à castração (CRPC). Cada número entre parêntesis indica uma via de sinalização distinta associada ao câncer.



Fonte: Modificado de Katzenwadel e Wolf (2015).

2.4 Câncer de mama

O câncer de mama é o tipo que apresenta a maior incidência entre as mulheres (2,3 milhões), sem considerar o câncer de pele não melanoma. A cada 71 segundos no mundo uma mulher morre por câncer de mama, totalizando aproximadamente 685 mil mortes no ano de 2020. Para o Brasil, estimam-se 66.280 novos casos, indicando que 61,61 a cada 100 mil

mulheres irão desenvolver esta neoplasia este ano, com maior prevalência na região sudeste (INCA, 2021).

O câncer de mama surge nas células epiteliais dos ductos (85%) ou lóbulos (15%) do tecido glandular mamário. Quando confinado nestes locais, são assintomáticos e apresentam potencial mínimo de disseminação (metástase). Dezenas de mutações genéticas foram identificadas em mulheres com essa neoplasia, como amplificações, mutações de perda de função, mutações de ganho de função e deleções. As características moleculares clinicamente relevantes são o receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2), receptores hormonais de estrogênio e de progesterona (ER e PR) e mutações em *BRCA* (HARBECK *et al.*, 2019).

O câncer de mama é 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 (LAW; MARTIN, 2020). O câncer de mama com receptor de estrogênio positivo é o tipo mais comum. ER α é expresso em até 10% em tecido normal de mama, no entanto, cerca de 80% de todos os cânceres de mama expressam o receptor de estrogênio (ER+) e dependem do estrógeno para o crescimento e a disseminação das células cancerosas (CAMARILLO *et al.*, 2014; COMŞA; CÎMPEAN; RAICA, 2015; JIA; DAHLMAN-WRIGHT; GUSTAFSSON, 2015).

Uma em cada oito mulheres, ou aproximadamente 12%, serão diagnosticadas com câncer de mama em sua vida. No entanto, as mulheres com certas mutações genéticas tendem a um risco maior de contrair a doença ao longo da vida. Estima-se que 55-65% das mulheres com mutação em *BRCA1* desenvolverão câncer de mama antes dos 70 anos e aproximadamente 45% das mulheres com uma mutação em *BRCA2* desenvolverão câncer de mama aos 70 anos (NATIONAL BREAST CANCER FOUNDATION - NBCF, 2021).

Menos de 10% das mulheres diagnosticadas com câncer de mama têm mutação nos genes *BRCA*. Estes desempenham um grande papel na prevenção nesse tipo de câncer ajudando a reparar quebras de DNA que podem levar ao crescimento descontrolado de tumores, sendo conhecidos como genes supressores de tumor. Uma pequena porcentagem de pessoas, cerca de uma em 400, carrega os genes *BRCA1* ou *BRCA2* mutados, podendo tornar ineficaz o reparo do DNA quebrado e na prevenção do câncer de mama. Mulheres com mutação *BRCA1* ou *BRCA2* que superam o câncer de mama parecem ter uma chance maior do que a média de recorrência, ou seja, desenvolver um segundo câncer (KOTSPOULOS, 2018; NBCF, 2021).

Os cânceres de mama associados a *BRCA1* exibem as características patológicas de um fenótipo agressivo e são geralmente negativos para receptores hormonais (triplo negativo), sendo mais difícil de tratar, enquanto os cânceres de mama associados a *BRCA2* tendem a se assemelhar aos cânceres esporádicos e são predominantemente positivos para receptores hormonais (KOTSPOULOS, 2018).

Os tumores de mama triplo positivo são HER2+, ER+ e PR+. HER2 é uma proteína presente na parte externa das células mamárias que promove seu crescimento. Esses cânceres tendem a crescer e se disseminar mais rapidamente do que outros tipos de câncer de mama, mas são mais propensos a responder ao tratamento com medicamentos específicos como os hormonais e que têm como alvo o bloqueio da via HER2 (LOIBL; GIANNI, 2017).

Tumores de mama triplo-negativos apresentam baixa expressão de HER2 e não apresentam os receptores hormonais de estrogênio ou progesterona. Possuem um mau prognóstico com relação à cura e sobrevivência e não possuem terapias-alvo, tendo a quimioterapia como principal tratamento e as imunoterapias também mostram sinais precoces de melhora na sobrevida. Além disso, tumores triplo-negativos possuem uma propensão a metástase, tornando o tratamento mais difícil que outros tipos de câncer de mama, uma vez que a taxa de cura do câncer de mama metastático é muito baixa (LOIBL; GIANNI, 2017).

2.5 Câncer de mama e alternativas terapêuticas

Os primeiros passos para o tratamento do câncer de mama são a cirurgia para retirada do tumor primário, seguida de quimioterapia, radioterapia e terapia-alvo dependendo do tipo de câncer de mama. Entretanto, estes tratamentos apresentam efeitos colaterais.

Os pacientes ER-positivo recebem terapia endócrina adjuvante após a cirurgia. Dentro da terapia hormonal utilizada para o tratamento de câncer é importante levar em consideração se o câncer é desenvolvido na etapa de pré-menopausa ou pós-menopausa. A remoção cirúrgica dos ovários é a primeira opção, além da castração química (usando agonistas do GnRH ou LHRH) ou irradiação (ABRAHAM; STAFFURTH, 2007). No entanto, o tratamento na etapa de pós-menopausa é mais complexo, pois consiste em suprimir a influência do estradiol utilizando o receptor estrogênio (ER) como alvo, mediante o uso de moduladores ER seletivos (SERMs), ou indiretamente mediante o bloqueio da conversão de andrógenos a estrogênio através do uso de inibidores de aromatase (AIs) e de degradação seletiva do ER (SERDs) (HISCOX; DAVIES; BARRET-LEE, 2009).

Assim, a terapia hormonal, como o tamoxifeno e o raloxifeno, é comumente usada em pacientes que apresentam a expressão do ER α , ajudando a desacelerar ou interromper o crescimento dos cânceres de mama ER+, bloqueando as ações do estrogênio. A resistência primária ou adquirida ao tamoxifeno representa um grande desafio clínico no tratamento do câncer de mama ER+ (COMŞA; CÎMPEAN; RAICA, 2015).

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 a quantidade do ER β diminui (LEYGUE *et al.*, 1998).

Os ERs estão presentes em diferentes tecidos do corpo como o ósseo, útero (além de vagina e endométrio), mama, sistema cardiovascular e fígado, e são modulados pelos SERMs a partir das interações intermoleculares. Os SERMs são uma classe de compostos que possui atividade agonista ou antagonista do estrogênio de forma seletiva nos tecidos (MIRKIN, 2015). 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 (SHANLE; XU, 2010).

Os SERMs são classificados segundo suas estruturas químicas: os trifeniletílenos, considerados de primeira geração (tamoxifeno e toremifeno), os benzotiofenos considerados de segunda geração (raloxifeno) e os naftalenois e derivados indol (lasofoxifeno e bazedoxifeno respectivamente) terceira geração (Figura 6) (PINKERTON; THOMAS, 2014).

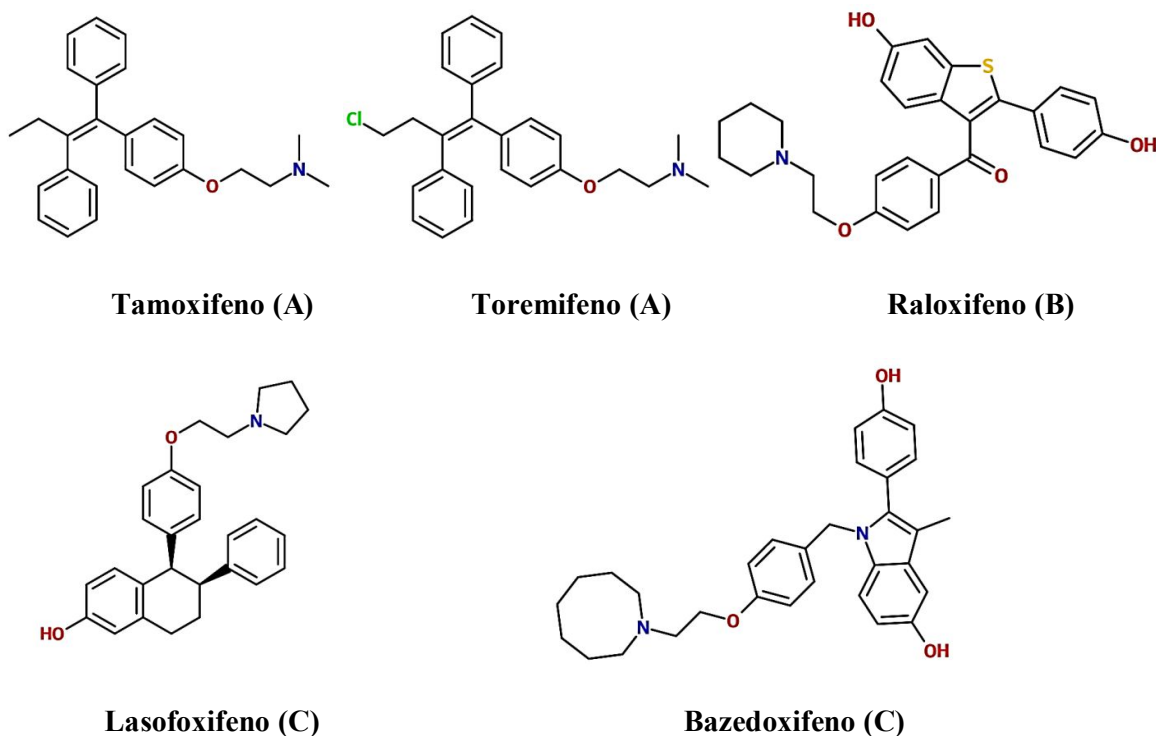
O tamoxifeno compete com o estrogênio para se ligar ao ER. Ele atua como antagonista do estrogênio e é principalmente citostático para o crescimento *in vitro* de células de câncer de mama estrogênio-dependentes (MCF-7), inibindo sua progressão desde a fase G₁ do ciclo celular, induzindo adicionalmente a apoptose. Em outros tecidos como o endométrio e ósseo, ele atua como agonista do estrogênio induzindo a proliferação endometrial e preserva a massa óssea em mulheres na pós-menopausa, preservando a densidade óssea e reduzindo o risco de fraturas (embora não seja significativo) (O'REGAN; JORDAN, 2002). O toremifeno foi desenvolvido há mais de 20 anos obtendo similar eficácia ao tamoxifeno com um perfil melhorado quanto à segurança (VOGEL *et al.*, 2014).

O raloxifeno foi aprovado inicialmente para o tratamento do câncer de mama. No entanto, ele também atua como agonista do ER nos ossos e possui efeitos como antiartrite e antiosteoporose quando é utilizado em tratamento a longo prazo. No câncer de mama estrogênio-dependente, o raloxifeno oferece resistência mediante a ligação ao ER bloqueando a transcrição induzida pelo estrogênio (DAI; WU, 2011). Os estudos de tamoxifeno e raloxifeno (STAR)

realizados em pacientes 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 ser superior no balanço farmacológico versus toxicológico.

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 (PINKERTON; THOMAS, 2014). 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, MCF-7:2A, MCF-7 e T47D) (LEWIS-WAMBI *et al.*, 2014).

Figura 6. Estruturas químicas dos moduladores seletivos do receptor estrógeno (SERMs) demonstrando os esqueletos do tipo trifenilileno (A), benzotiofeno (B) e derivado do naftalenol (C).



Fonte: Cruz (2015).

2.6 Câncer de mama e o mecanismo de resistência

Similarmente à neoplasia na próstata, o câncer de mama apresenta resistência ao tratamento endócrino conforme vão sendo administrados os tratamentos desde os moduladores seletivos do receptor estrógeno (SERMs), até os compostos que causam degradação seletiva do receptor estrógeno (SERDs), tendo como consequência 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) (OSBORNE; SCHIFF, 2011). A função clássica do ER é sua função nuclear (Figura 7a) 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 tipo 2 de fator de crescimento epidérmico humano) e o receptor de fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF1-R) (Figura 7b). 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 independente do receptor. Esta via não genômica juntamente com moléculas coativadoras (ex. a quinase Src) (Figura 7c) ativam diversas vias 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 corre reguladores. Finalmente a via de quinase mediante estímulo extracelular (estresse) pode ser ativada mediante a p38 e JNK, às quais podem modular a função do receptor partir da fosforilação do ER e seus corre reguladores. Esses estímulos extracelulares também podem ativar aos membros da família integrinas, com ativação de outra via de quinase (ex. FAK - quinase de adesão focal) (Figura 7d). Desta forma pode haver uma atividade semelhante às MAPKs (quinases ativadas por mitógenos) (OSBORNE; SCHIFF, 2011).

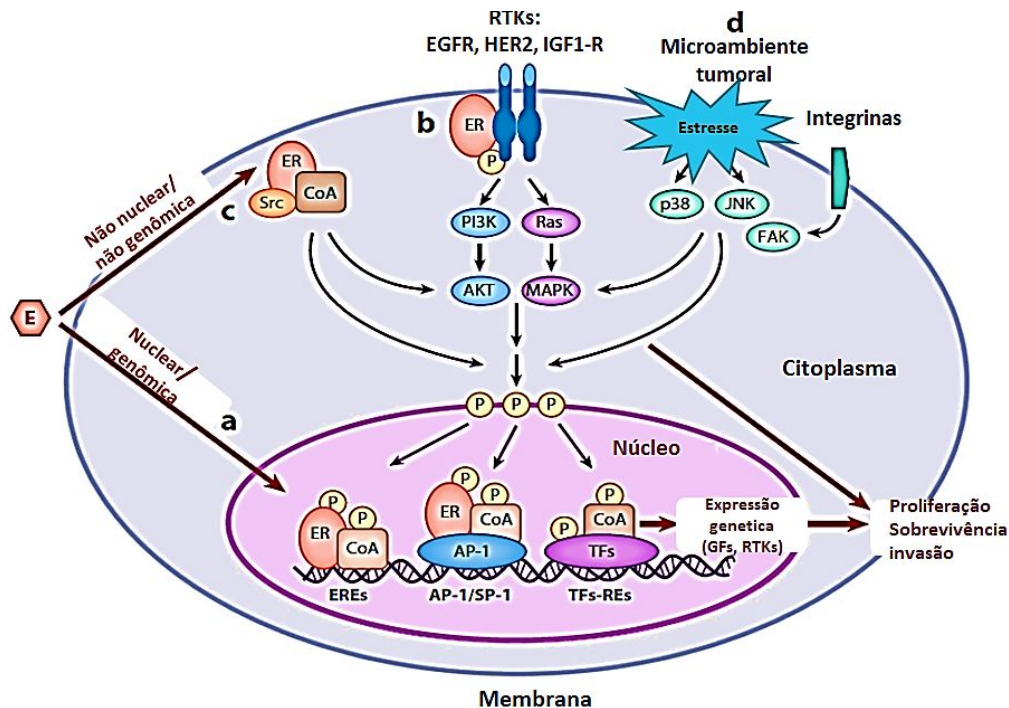
Conhecendo as vias de ação do ER, foram propostos mecanismos de resistência associados aos tumores (MUSGROVE; SUTHERLAND, 2009). A primeira via é referente ao ER e os corre reguladores do ER, onde a função do ER é regulada mediante modificações pós-transducionais (fosforilação, metilação) influenciando interações com outras proteínas, incluindo corre reguladores de transcrição e sinalizações de moléculas citoplasmáticas.

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 (MUSGROVE; SUTHERLAND, 2009).

A terceira é referente às vias do receptor do fator de crescimento, que 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 estrogênio independente. Estes fatores de crescimento podem contribuir à repressão transcricional da expressão do ER, resultando em uma resistência ao tratamento endócrino (NORMANO *et al.*, 2012).

Figura 7. Vias distintas de regulação do estrogênio na expressão do gene: (a) via genômica; (b) ativação de receptores de membrana tirosina quinases; (c) via não genômica; (d) ativação de integrinas.



Fonte: Adaptado de Osborne e Schiff (2011).

Os tratamentos para o câncer estão se tornando mais individualizados com base nas características das células tumorais. No entanto, o desafio mais urgente no campo do câncer de mama é garantir que os pacientes em todas as partes do mundo tenham acesso a um diagnóstico padrão e tratamento de alta qualidade, serviços de suporte e cuidados paliativos adequados além de evitar o diagnóstico tardio (HARBECK *et al.*, 2019). O diagnóstico é realizado por meio da mamografia de rastreamento positiva (imagem de raios-X das mamas), ou o desenvolvimento

de sintomas e alterações mamárias (caroço, dor localizada ou alterações na pele), requerendo avaliação diagnóstica apropriada. Um ‘teste triplo’ - compreendendo exame clínico, imagem e biópsia por agulha - é usado para confirmar um diagnóstico. A caracterização completa do câncer requer avaliação da histologia do tumor; grau; status do receptor ER, PR e HER2; tamanho; envolvimento de linfonodos; extensão da vascularização; e status da margem cirúrgica (que é obtido quando o tumor é excisado).

2.7 Cisteíno proteases

As cisteíno proteases, juntamente com as metaloproteases de matriz (MMPs) e as serino proteases, degradam a matriz extracelular, facilitando deste modo o crescimento e invasão da neoplasia (MOHAMED; SLOANE, 2006).

Onze catepsinas expressas em animais pertencem à classe das cisteíno proteases da subfamília da papaína (catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, X e W). Dados recentes demonstraram que a localização das catepsinas não se limita ao compartimento endolisossomal, mas também foram encontrados no citoplasma, núcleo, mitocôndria e espaço extracelular da célula, indicando sua ampla atividade biológica. As catepsinas são integradas em quase todos os processos associados ao lisossomo como degradação de proteínas, autofagia, sinalização de estresse celular e morte celular, entre outros. Catepsinas como a B e a L são importantes na regulação da síntese de proteínas e na sua degradação. No contexto da carcinogênese, as catepsinas secretadas contribuem para a degradação e remodelação da matriz extracelular do tumor, enquanto as catepsinas intracelulares são componentes essenciais das vias de sinalização, que podem aumentar o crescimento e a inflamação das células cancerosas (MOHAMED; SLOANE, 2006; OLSON; JOYCE, 2015; RUDZIŃSKA *et al.*, 2019).

As expressões de algumas cisteíno proteases estão aumentadas em vários tipos celulares, como a catepsina K em osteoclastos (remodelação óssea) e catepsina S no sistema imunológico. Embora a implicação potencial na progressão do tumor tenha sido proposta para todas as 11 cisteíno proteases, as catepsinas B, L, S, K e X são evidenciadas como envolvidas neste processo, inclusive com a catepsina B descrita historicamente como a primeira enzima desta família relacionada ao câncer (LÖSER; PIETZSCH, 2015).

Além da atividade intracelular, as catepsinas podem ser secretadas para atuarem no microambiente tumoral. A contribuição das proteases para a invasão tumoral se deve ao seu papel na degradação da matriz extracelular. As proteases clivam moléculas de adesão célula-

célula contribuindo para a invasão e metástase de tecidos, o que promove um fenótipo altamente invasivo. A E-caderina é uma molécula de adesão celular e um importante supressor de tumor epitelial devido à sua capacidade de manter a organização do tecido e suprimir a sinalização intracelular e foi identificada como substrato para as catepsinas B (CTSB), L (CTSL) e S (CTSS) em tumores. A atividade dessas proteases na borda invasiva do tumor está associada à perda de E-caderina da superfície celular e à desagregação das células tumorais (OLSON; JOYCE, 2015).

Mediante isso, as catepsinas demonstraram ser parte da resposta dinâmica à terapia anticâncer no microambiente tumoral e podem ter papéis cruciais no desenvolvimento da resistência terapêutica. Experimentos *in vitro* mostraram que a inibição de catepsinas leva à redução da invasão de células tumorais em uma variedade de cânceres, incluindo melanoma, mama, cólon, próstata e pulmão (TURK; KOS; TURK, 2004). Além disto, de forma diferente aos receptores nucleares e hormônios, os inibidores destas cisteíno catepsinas podem *a priori* ser usados de forma eficaz em células de câncer de próstata e mama independentemente do nível hormonal, ou da expressão dos seus receptores.

2.8 Inibidores de catepsinas

Exemplos clássicos de inibidores de catepsinas são os peptidomiméticos, tais quais os epóxidos como o E-64 (Figura 8) que é um inibidor de cisteíno proteases lisossomais que foi estudado em ensaios pré-clínicos, mas falhou em testes clínicos em humanos. O principal problema identificado para vários inibidores desta classe foi a ausência de seletividade devido a seu baixo reconhecimento intermolecular necessário para as catepsinas de interesse em relação a outras macromoléculas (BROMME, ; WILSON, 2011).

Outro inibidor conhecido é a molécula KGP94 (Figura 8) que é inibidor da catepsina L, a qual suprime o microambiente da metástase tumoral avançada associada a funções das células de câncer de próstata e mama (SUDHAN; SIEMANN, 2013).

Tendo como base a importância das catepsinas e os resultados descritos na literatura para seus inibidores, o grupo de pesquisa NEQUIMED tem realizado a síntese de inibidores de cisteíno catepsinas derivados de dipeptidil nitrilas (Figura 8), com diversos resultados alcançados para atividade antiparasitária e antineoplásica (QUILLES JR. *et al.*, 2019).

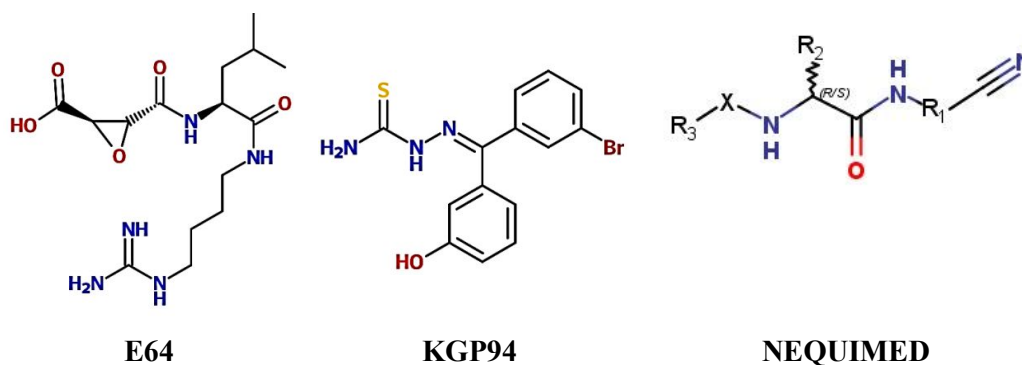
Este tipo de antineoplásico pode atuar em células onde as alternativas terapêuticas correntes não apresentam eficácia devido à resistência. Sabe-se que no caso dos cânceres

hormônio-dependentes, a terapia atual é baseada na supressão da atividade do receptor nuclear (AR ou ER), mas não é efetiva quando este se torna resistente a esta classe de antitumorais. Além disso, células metastáticas de câncer de próstata e mama podem se tornar resistentes à terapia de supressão hormonal, inclusive pelo fato de possuírem níveis muito baixos de expressão do AR ou ER, como é o caso da linhagem de células de câncer de próstata (DU 145) e de mama triplo negativa (MDA-MB-231) (KAIGHN *et al.*, 1979). Assim, as dipeptidil nitrilas e seus derivados foram ensaiados neste projeto. Estes ensaios podem ser realizados com o composto administrado de forma isolada, ou então combinada com compostos de referência como fármacos (VINALL *et al.*, 2007).

Os inibidores sintetizados no grupo de pesquisa possuem alta afinidade com o sítio catalítico das catepsinas. Seu grupo eletrofilico é atraído pela região nucleofílica da enzima, sendo o tiolato no caso das cisteíno proteases (BAILLIE, 2016). Neste projeto, os compostos foram testados por meio ensaios usando células de câncer de próstata e mama como modelos *in vitro*.

No processo de descoberta de fármacos, compostos pouco solúveis em água são frequentemente encontrados. Dessa forma, o dimetilsulfóxido (DMSO - $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$), um líquido orgânico polar, é muito usado como solvente químico por ser parcialmente solúvel em meio aquoso e meio orgânico. Atua no transporte de membrana, apresentando a capacidade de penetrar em membranas biológicas. É o solvente menos tóxico da classe de solventes dipolares apróticos, como dimetilformamida e dimetilacetamida (COSTA *et al.*, 2017; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2020; VIOLANTE *et al.*, 2002)

Figura 8. Inibidores de catepsinas conhecidos e arcabouço químico dos derivados de dipeptidil nitrilas sintetizadas no grupo de pesquisa NEQUIMED.



Fonte: Autoria própria.

2.9 Ensaaios *in vitro* usando culturas celulares

Para testar os compostos faz-se necessário estabelecer um método de ensaio *in vitro* para que haja a detecção da resposta biológica em um sistema mais próximo do fisiológico. O estudo fenotípico celular é a alternativa mais apropriada para a triagem inicial de novas moléculas, onde a resposta biológica observada é derivada da modulação dos processos bioquímicos no modelo celular que mimetiza o câncer (MOFFAT; RUDOLPH; BAILEY, 2014). Devido à complexidade do sistema celular, com a possibilidade de estudar mutações e resistência, os ensaios fenotípicos permitem a avaliação dos compostos químicos de forma holística e, assim, podem ser aplicados para moléculas que atuam tanto na via de sinalização do receptor nuclear ou outros, dependendo do tipo de célula.

Células originárias de tumores de próstata são amplamente usadas em estudos desta natureza, como PC-3 (derivada do câncer de próstata metastático ósseo e independente de andrógeno), DU 145 (obtida a partir da metástase do câncer para o cérebro e AR-independente) (HOROSZEWICZ, 1983; KAIGHN *et al.*, 1979). As células podem formar grânulos no citoplasma como resposta a um agente exógeno. De acordo com estudos anteriores, esse mecanismo está relacionado à diferenciação celular que, em última análise, leva à redução da proliferação das células tumorais (HAYNES *et al.*, 2009). No caso das linhagens de câncer de mama hormônio-dependente (MCF-7) e hormônio-independente (MDA-MB-231), o mesmo perfil pode ser obtido por meio dos ensaios celulares. Outras respostas celulares foram identificadas, sendo a morte celular (atividade citotóxica) uma das possibilidades iniciais explorada. A inibição da replicação celular é outra possibilidade a ser explorada e torna-se possível estabelecer modelos *in vitro* para tal.

A linhagem celular PC-3 é originalmente derivada do câncer de próstata metastático ósseo e é independente de andrógeno. Ela apresenta baixa atividade da testosterona 5 α -redutase e expressa PSA (AMERICAN TYPES CULTURE COLLECTION - ATCC, 2020c). As células DU 145 foram derivadas de um tumor metastático do cérebro. Elas são insensíveis a presença de hormônios e não expressam PSA, além de terem menor potencial para formação de esferoides, quando comparado com a PC-3 (ATCC, 2020a)

MCF-7 é uma linhagem celular mamária humana derivada do derrame pleural de um câncer de mama metastático e que tem sido usada em pesquisa de câncer há mais de 45 anos.

Foi isolada pela primeira vez em 1970 do tecido mamário de uma mulher caucasiana de 69 anos (COMŞA; CÎMPEAN; RAICA, 2015).

A linhagem é útil para estudos de câncer de mama *in vitro* porque além de ser aderente e com crescimento em monocamada, é a primeira linhagem de células de câncer de mama com resposta hormonal, possuindo características de epitélio mamário diferenciado e retendo várias características particulares tecido mamário, como o processamento de estrogênio na forma de estradiol, receptores de progesterona, glicocorticoides, HER2 negativo, e a capacidade de formar cúpulas quando cultivadas *in vitro* (ATCC, 2021; CAMARILLO *et al.*, 2014).

A linhagem MDA-MB-231, é um adenocarcinoma mamário metastático também proveniente de um derrame pleural. Além de ser altamente agressiva, invasiva e pouco diferenciada, é classificada como uma linhagem celular triplo-negativa por carecer da expressão de receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR), e receptores do tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), resultando em poucas opções de tratamento por não possuir um alvo terapêutico específico (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011). Semelhante a outras linhagens de células cancerosas, a capacidade de invasão das células MDA-MB-231 é mediada pela degradação proteolítica da matriz extracelular (ATCC, 2020b; EUROPEAN COLLECTION OF AUTHENTICATED CELL CULTURES - ECACC, 2020).

Além das células cancerosas, uma linhagem de fibroblasto de camundongo (BALB/ 3T3 clone A31) e de epitélio de próstata (PNT-2), ambas não tumorais, também foram usadas nos estudos para observar a seletividade da atividade biológica das séries de compostos. Este é um parâmetro complementar importante para definir se os compostos apresentam potencial para serem explorados em ensaios mais complexos em etapas seguintes da gênese planejada de fármacos.

A linhagem BALB/3T3 clone A31 é um fibroblasto de camundongo não tumoral desenvolvido por Aaronson e Todaro em 1968 a partir de embriões de camundongos BALB/c. Apresenta característica de se dividir indefinidamente e já é amplamente utilizada como controle em diversos ensaios citotóxicos (ASSOCIAÇÃO TÉCNICO CIENTÍFICA PAUL EHRLICH - APABCAM, 2020a; NAKAMURA, 2013).

Os fibroblastos são células metabolicamente ativas que desempenham papéis críticos como regulação de matrizes extracelulares e são encontradas na maioria dos tecidos e órgãos do corpo (MCANULTY, 2007). Seu uso foi validado pelo *National Toxicology Program* (NTP), *Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods*

(NICEATM) e *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM), sendo recomendado principalmente antes de estudos *in vivo*, podendo reduzir o uso de animais em até 50% (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD, 2010).

A linhagem PNT-2 é uma célula humana epitelial saudável proveniente da próstata de um adulto de 33 anos. Foi imortalizada por transfecção com um plasmídeo contendo o genoma de SV40 com uma origem de replicação defeituosa (APABCAM, 2020b).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este estudo visou identificar novas substâncias bioativas a partir de estudos *in vitro* usando modelos celulares bidimensionais (2D) para o câncer de próstata humana (PC-3 e DU 145) e o de mama humana (MCF-7 e MDA-MB-231). Estes dados levaram a determinação da potência e índice de seletividade quando comparado com a linhagem não tumoral de fibroblasto de camundongo (BALB/3T3 clone A31) e de próstata (PNT-2).

3.2 Objetivos Específicos

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

- Análise da atividade de uma série com 33 compostos químicos nas linhagens DU 145 e PC-3 (câncer de próstata), MCF-7 e MDA-MB-231(câncer de mama) usando colorimetria (MTT);
- Estabelecer a potência (IC₅₀) para os compostos ativos;
- Determinar o índice de seletividade desses compostos com análise comparativa em células não tumorais de próstata (PNT-2) e fibroblasto de camundongo (BALB/3T3 clone A31).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

- Meios de Cultura Celular DMEM (meio Dulbecco MEM em pó), F12K (nutriente HAM F-12) e RPMI 1640 - Cultilab[®];
- Solução penicilina/estreptomicina (1% v/v) – Cultilab[®];
- Soro Fetal Bovino (FBS);
- Solução 0,25% (m/v) de tripsina com EDTA– adquiridos da Vitrocell;
- D-Glicose, bicarbonato de Sódio (NaHCO₃), dimetilsulfóxido (DMSO), dodecilsulfato de sódio (SDS), ácido acético glacial (99,7%), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) – adquiridos da Sigma Aldrich;
- Capela de fluxo laminar vertical classe II - Pachane PCR (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.);

4.2 Linhagens celulares

Os ensaios foram efetuados nas linhagens de células cancerosas de próstata PC-3 e DU 145 (andrógeno-independentes) e nas linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231 (estrógeno-independente) e MCF-7 (estrógeno-dependente) em culturas monocamadas. As linhagens não cancerosas de próstata (PNT-2) e de fibroblasto de camundongo *Mus musculus* (BALB/3T3 clone A31) foram utilizadas como controle. Todas as linhagens são amplamente usadas nos ensaios biológicos como modelos *in vitro* em nosso grupo de pesquisa e foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

As linhagens DU 145, MDA-MB-231, MCF-7 e BALB/3T3 clone A31 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com solução de penicilina/estreptomicina, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 3,5 g/L de glicose e 10% (v/v) de soro fetal bovino. A linhagem de próstata PC-3 foi cultivada em meio F12-K suplementado com solução de

penicilina/estreptomicina (1% v/v), 1,5 g/L de bicarbonato de sódio e 10% (v/v) de soro de feto bovino e a linhagem de próstata PNT-2 foi cultivada em meio RPMI 1640 também suplementado com solução de penicilina/estreptomicina (1% v/v), 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 4,5 g/L de glicose e 10% (v/v) de soro fetal bovino.

As culturas celulares eram mantidas em frascos, diluídas em meio e incubadas em estufa úmida a 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂. As passagens foram controladas, chegando ao número máximo de 20 subcultivos. A troca do meio de cultura era realizada a cada 48 h até atingirem confluência de 80%, onde foram feitas as suas passagens para a realização dos ensaios celulares.

Características como morfologia e tempo de replicação celular eram controlados afim de verificar a autenticidade da linhagem.

4.3 Método colorimétrico MTT

O método colorimétrico MTT foi utilizado para os ensaios de viabilidade celular, triagem das substâncias químicas e para obtenção da curva concentração-resposta. O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) é um sal de tetrazólio amarelo e solúvel em meio aquoso e, quando em contato com células metabolicamente ativas, ocorre uma redução com o auxílio de enzimas redutases formando cristais de formazan, sendo este um sólido roxo e insolúvel em meio aquoso (MOSMANN,1983). Os cristais ficam armazenados em vesículas lipídicas no citoplasma celular, sendo necessária a utilização de solventes tensoativos, como o dimetilsulfóxido (DMSO), para rompimento da membrana celular e solubilização dos cristais. Após a homogeneização, é feita análise colorimétrica na região do visível (BERGO, 2015; CARMICHAEL *et al.*, 1987).

Primeiramente, as linhagens celulares atingiram uma confluência de 80% nos frascos de cultura para todos os ensaios. O meio de cultura foi então retirado, as células foram lavadas com tampão PBS, e tripsinizadas com incubação entre 3 e 5 minutos (dependendo da linhagem celular) em estufa úmida. Posteriormente, foi adicionado meio de cultura na mesma quantidade de tripsina para a sua inativação.

A amostra foi centrifugada a 200 g durante 5 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensão em meio de cultura. As células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando um microscópio invertido. Foram pipetados 100 µL de uma solução contendo

$1,0 \times 10^5$ células/mL em placa de 96 poços. Após 24 h de incubação para aderência das células, os compostos de interesse de cada ensaio foram diluídos em meio de cultura e incubados por 72 h. A incubação ocorreu em estufa úmida a 37 °C com atmosfera a 5% CO₂. Os poços da borda foram preenchidos com meio de cultura para evitar perda de conteúdo por evaporação.

Após as 72 horas, o sobrenadante foi retirado da placa e 100 µL de solução com 20% (m/v) de MTT em meio de cultura foi incubado por 3 h com as células, seguido da aspiração do meio e adição do DMSO. A placa permaneceu por 1 hora em um agitador para completa dissolução dos cristais de formazan formados e, em seguida, foi feita a análise com um leitor microplacas Biotek Synergy HT, em uma absorbância de 570 nm. Os ensaios foram realizados em quintuplicata em dois ensaios independentes (N = 5).

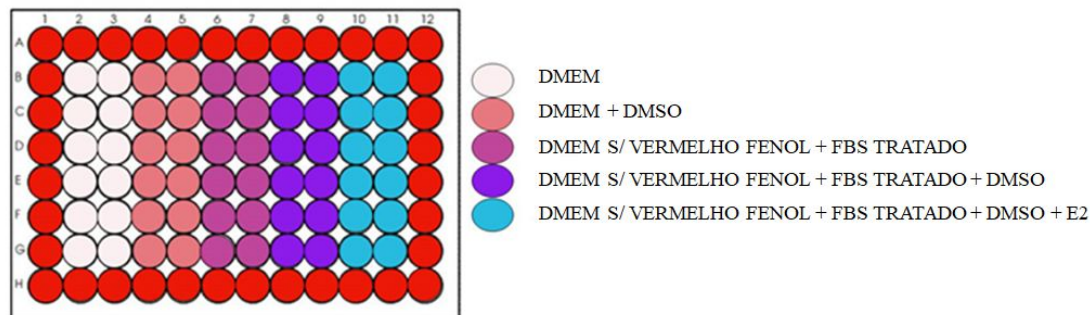
4.3.1 Estudo de estrogenicidade

Para observar a resposta celular à presença do hormônio estradiol, foi analisado o crescimento celular por colorimetria (MTT) nas linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF-7 (estrógeno-independente e dependente respectivamente). Para essa análise foi necessário tratar a solução de FBS contida no meio de cultura uma vez que hormônios endógenos presentes na solução interagem com os receptores estrogênicos da célula, influenciando no crescimento da mesma (BERGO, 2015; JOSHI *et al.*, 2020; WELSHONS *et al.*, 1988).

Para isso, a solução de FBS foi tratada previamente antes de ser acrescentada ao meio de cultura. 0,5 g de carvão ativado e 0,05 g de dextran foram adicionados em 50,0 mL de FBS. A mistura foi agitada por 30 min a 4 °C e depois mantida em repouso por 15 min na mesma condição de temperatura. Posteriormente a solução foi centrifugada a 200 g três vezes em tempos de 15 min e esterilizada por filtração em membrana PVDF 0,22 µm. O FBS tratado foi então adicionado ao meio de cultura sem vermelho fenol.

Cinco condições de cultivo foram utilizadas neste ensaio a fim de verificar a interferência dos componentes do meio de cultura no crescimento celular: meio de cultivo DMEM com vermelho fenol e 10% (v/v) de FBS sem tratamento; meio DMEM com vermelho fenol, 10% (v/v) de FBS sem tratamento e 0,5% de DMSO; meio DMEM sem vermelho fenol e 10% (v/v) de FBS tratado; meio DMEM sem vermelho fenol com 10% (v/v) de FBS tratado e 0,5% de DMSO; e meio DMEM sem vermelho fenol com 10% (v/v) de FBS tratado, 0,5% de DMSO e 10 nM de estradiol.

Figura 9. Representação esquemática das condições de cultivo do ensaio de estrogenicidade em placa de 96 poços.



Fonte: autoria própria.

As linhagens celulares foram pipetadas em placa de 96 poços na concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL. O estudo foi feito em decuplicata em dois ensaios independentes ($N = 20$) durante um período de seis dias com as leituras sendo realizadas a cada dois dias. O meio de cultura também foi trocado a cada dois dias.

4.3.2 Compostos químicos e ensaios celulares

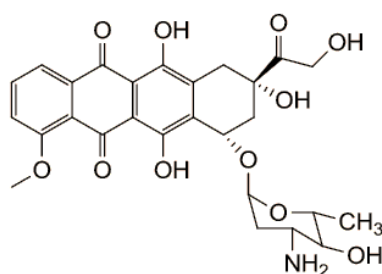
O controle negativo serve como modelo de uniformidade da resposta biológica. As células desse controle constituem um parâmetro de comparação por representar 100% da viabilidade celular. Para isso, foi utilizado meio de cultivo sem tratamento contendo 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO), solvente escolhido para diluir todas as substâncias químicas testadas (VALDEZ, 2019).

No entanto, altas concentrações de DMSO podem resultar em danos celulares. Mediante isso, baseado em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, a concentração de DMSO foi padronizada a 0,5% para todos os ensaios celulares, visando evitar a morte celular não relacionada ao efeito dos compostos (COSTA *et al.*, 2017; LIMA FILHO *et al.*, 2020; VALDEZ, 2019; VIOLANTE *et al.*, 2002).

O composto de referência utilizado nesse estudo como controle positivo para os testes de citotoxicidade foi a doxorrubicina (Figura 10). A doxorrubicina é um antibiótico da classe das antraciclina isolada de espécies de *Streptomyces* com atividade antitumoral citotóxica de

amplo espectro. Os efeitos da doxorrubicina estão relacionados à interação com a topoisomerase II e DNA passíveis de clivagem, inibindo assim a replicação e a ação das DNA e RNA polimerases. A doxorrubicina também tem a capacidade de se ligar à membrana celular lipídica afetando uma variedade de funções celulares e de reagir com algumas enzimas, como oxidases, redutases e desidrogenases, dando origem a espécies altamente reativas, que ocasionam alterações morfológicas associadas a apoptose (GLENMARK FARMACÊUTICA, 2020).

Figura 10. Estrutura química do quimioterápico doxorrubicina.



Fonte: Adaptado Rocha (2010).

Diluições desse composto foram realizadas para a construção da curva concentração-resposta para todas as linhagens celulares trabalhadas, a fim de obter a concentração mínima necessária para inibir 50% da viabilidade celular (IC_{50}) quando comparada ao controle negativo.

A partir de um estoque de 50 mM em DMSO foram realizadas diluições em série para esse composto nas concentrações de 100 μ M, 10 μ M, 1,0 μ M, 333 nM, 0,1 μ M, 33,3 nM, 0,010 μ M, 3,3 nM e 1,0 nM para obtenção da curva concentração-resposta. As linhagens celulares foram semeadas em placa de 96 poços na concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL. Após 24 horas, as diferentes concentrações de doxorrubicina diluídas em meio de cultura com ajuste de 0,5% (v/v) de DMSO foram acrescentadas na placa e agiram durante 72 horas. Após este tempo, a viabilidade celular foi quantificada pelo método colorimétrico MTT (tópico 4.3).

Um total de 33 moléculas produzidas e caracterizadas pelo grupo NEQUIMED, com grau de pureza acima de 95%, foram testadas em ensaios citotóxicos (Tabela 1). A triagem das substâncias químicas foi realizada para avaliar a atividade citotóxica.

Tabela 1. Códigos dos derivados de dipeptidil nitrilas sintetizadas pelo grupo NEQUIMED utilizados nos experimentos.

Compostos químicos (Neq)			
400.1	544.1	569.1	631.2
686	720.1	807	810
820.1	877.1	926	927
928	929	930	931
932	976	977	979
980	981	996	997
998	999	1000	1001
1009	1010	1011	1012
1013			

Fonte: autoria própria.

Após o processo de adição das células em placas de 96 poços na concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL e 24 h de incubação para aderência, as substâncias químicas foram diluídas em meio de cultura nas concentrações de 10 μ M e 100 μ M com ajuste de 0,5% (v/v) de DMSO. Foi feita uma incubação por 72 h em estufa úmida a 37 °C com atmosfera a 5% CO₂.

Nas duas últimas colunas de cada placa foram colocados os controles positivos e negativos, respectivamente. O controle negativo consistia em meio de cultura com 0,5% (v/v) de DMSO. Espera-se que as células desse controle se mantenham vivas durante todo ensaio. Como controle positivo foi utilizado a doxorrubicina na concentração de 10 μ M, para observar a uniformidade da resposta biológica.

Todos os ensaios foram realizados em quintuplicata em dois ensaios independentes. A partir das leituras obtidas foi calculada a porcentagem média de cada concentração testada a partir do valor controle negativo (100%) e o desvio padrão.

Após a triagem realizada com a série de inibidores de cisteíno proteases, foi construída a curva concentração resposta para determinação da concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular (IC₅₀) das substâncias para determinar sua potência.

As linhagens foram tripsinizadas e semeadas em placas de 96 poços na concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL. Após 24 h, o meio de cultura foi retirado e diferentes concentrações de cada composto (250 μ M, 150 μ M, 100 μ M, 66,6 μ M, 33,3 μ M, 10 μ M e 1,0 μ M) foram

misturados em meio de cultura e adicionados na placa. A viabilidade celular foi analisada após 72 h pelo método colorimétrico MTT, com a leitura da absorbância a 570 nm feita em leitor de placa BioTek Synergy HT. A partir desses dados foi determinado o valor IC_{50} de cada substância para todas as linhagens usando o programa GraphPad Prism 5.0.

4.4 Análises estatísticas

As análises dos dados foram realizadas com auxílio dos programas Microsoft Excel® e GraphPad Prism 5. O IC_{50} é a concentração necessária de determinada substância química para inibir 50% da viabilidade celular. A partir dela, o índice de seletividade (SI) é calculado usando a seguinte relação:

$$SI = \frac{IC_{50} \text{ da célula controle (BALB/3T3 clone A31 e PN - 2)}}{IC_{50} \text{ da célula cancerosa}}$$

Quanto maior a seletividade do composto para as linhagens cancerosas, menor será a probabilidade de observar efeitos adversos na concentração que leva a atividade farmacológica nos estudos *in vitro*.

Os valores R^2 e $Sy.x$ são parâmetros estatísticos usados para mostrar o ajuste (R), ou variância para o coeficiente de determinação (R^2) e o desvio ($Sy.x$) do modelo. Ambos os parâmetros são calculados a partir do melhor modelo em relação aos pontos que se tem no gráfico, sendo que quanto mais próximo a 1 para R^2 e a 0 para $Sy.x$, melhor é a qualidade dos dados obtidos.

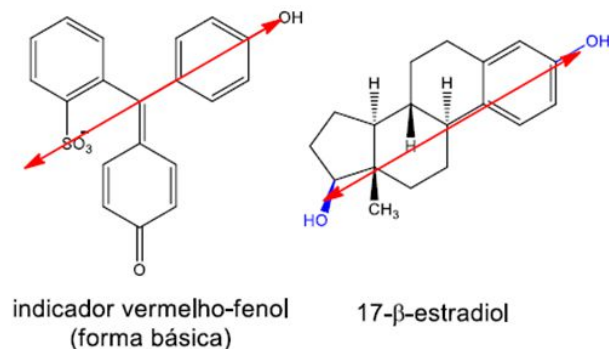
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente foi realizado o ensaio de crescimento celular das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 em diferentes meios de cultura para avaliar a atividade estrogênica na célula (Figura 9). A presença de hormônios no soro em meios de cultura de tecidos dificulta a demonstração de hormônios específicos e efeitos anti-hormônio. As células de câncer de mama humano MCF-7 que expressam receptores de estrogênio e progesterona foram adaptadas para crescimento de longo prazo em baixa concentração de soro (0,5% de soro fetal de bovino) (COMŞA; CÎMPEAN; RAICA, 2015).

Dos hormônios esteroidais sexuais, sabe-se que os estrógenos estimulam uma variedade de processos biossintéticos nas células-alvo responsivas a hormônios, como as da mama e do útero. No entanto, componentes contidos no meio de cultura utilizados na cultura celular, como o vermelho fenol e hormônios endógenos relativos ao soro de feto bovino, podem interferir no crescimento celular de células dependentes de hormônio (BERGO, 2015; SWEENEY *et al.*, 2012).

O vermelho fenol é uma substância comumente utilizada em meios de cultura como indicador ácido-base por atuar em uma faixa de pH de 6,6 a 8,0, similar ao ambiente tecidual. O problema deste indicador está em sua estrutura química: a distância entre a hidroxila e o grupo sulfônico é bastante similar aos grupos hidroxila da molécula 17- β -estradiol (Figura 11). Este apresenta atividade estrogênica significativa nas concentrações de 15 a 45 μ M, ligando ao receptor de estrógeno das células humanas de câncer de mama MCF-7. Nas concentrações presentes nos meios de cultura de tecidos, o vermelho fenol causa estimulação estrogênica parcial, aumentando o número de células para 200%, ou seja, com uma estimulação significativa da proliferação celular e síntese proteica (BERGO, 2015; BERTHOIS; KATZENELLENBOGEN; KATZENELLENBOGEN, 1986; SWEENEY *et al.*, 2012).

Figura 11. Comparação entre as estruturas químicas do indicador vermelho fenol e do 17- β -estradiol.



Fonte: Bergo (2015).

Embora o vermelho fenol seja um estrógeno de baixa afinidade, ele está presente nos meios de cultura em altas concentrações ($15 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Dessa forma, a utilização de meio com vermelho fenol para o crescimento das células MCF-7 torna-se um sistema insensível para a realização dos ensaios celulares (BERGO, 2015; BERTHOIS; KATZENELLENBOGEN; KATZENELLENBOGEN, 1986; SWEENEY *et al.*, 2012).

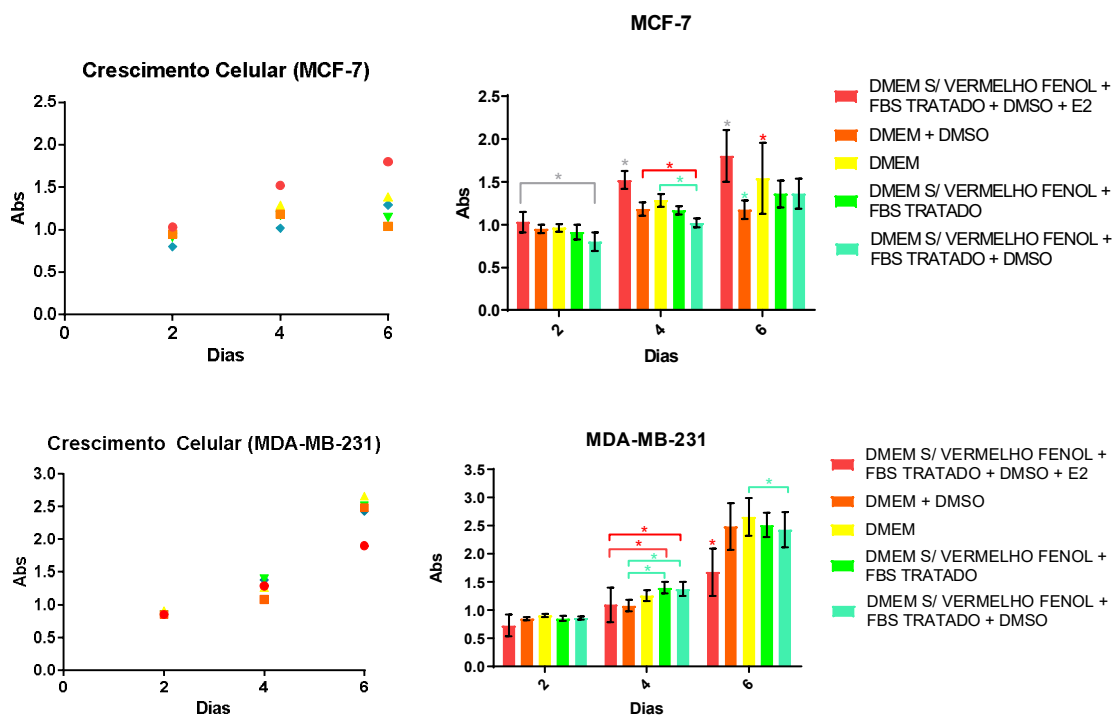
Além do vermelho fenol, fatores séricos também modulam a taxa de crescimento das linhagens celulares. O soro de feto bovino (FBS), mais comumente utilizado nos meios de cultivo, é composto por fatores de crescimento que promovem a proliferação celular, fatores de adesão e atividade antitripsina. O soro também é uma fonte de minerais, lipídios e hormônios para as células. Dessa forma, o FBS é uma fonte de estrogênios endógenos que acabam interferindo no crescimento celular de células hormônio dependente (FRESHNEY, 2010).

Mediante isso, o meio de cultura passou por um tratamento feito com uma combinação de carvão ativo e dextran descrito anteriormente nos métodos. Nesse processo, o carboidrato recobre a superfície do adsorvente, permitindo que apenas moléculas menores, como os hormônios livres, sejam retidas por adsorção no carvão ativo, deixando o meio livre de possíveis hormônios esteroidais (BERGO, 2015; SACEDA *et al.*, 1988).

Assim, corroborando com os dados da literatura, a linhagem MCF-7 apresentou crescimento estatisticamente maior no meio com o hormônio estrogênio, comprovando sua característica hormônio dependente. Além disso pode-se observar que o meio DMEM com vermelho fenol e soro de feto bovino também estimulou o crescimento da linhagem celular, comprovando a interferências destes constituintes na replicação (SWEENEY *et al.*, 2012). A

linhagem MDA-MB-231 cresceu de maneira similar na maioria das condições de cultura, com exceção do sexto dia de análise no qual é possível observar um declínio da viabilidade celular na presença do hormônio esteroideal (Figura 12). Para a análise foi utilizado two-way ANOVA com o teste Tukey de múltiplas comparações ($p < 0,05$).

Figura 12. Curva de crescimento das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 em diferentes condições de cultivo.



O crescimento celular foi analisado em cinco condições de cultivo nos tempos de 2, 4 e 6 dias. O crescimento celular foi determinado por MTT como descrito nos métodos ($n=20$) e os resultados são apresentados em absorbância. * Para a análise foi utilizado two-way ANOVA com o teste Tukey de múltiplas comparações ($p < 0,05$).

Fonte: autoria própria

Como já mencionado, os hormônios sexuais desempenham um papel substancial na etiopatogenia e progressão de vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama. Mecanicamente, estrógeno e progesterona promovem o crescimento e desenvolvimento de tumores de mama através da ligação em seus receptores nucleares específicos, aumentando o número e a taxa mitótica das células. Em especial, os estrogênios ligam-se aos receptores ER- α e ER- β que desempenham papéis contraditórios na proliferação de células de câncer: enquanto

ER- α induz uma atividade estimulatória na progressão e metástase do câncer de mama, ER- β apresenta propriedades supressoras de tumor (PERKINS *et al.*, 2017). A linhagem MCF-7 é ER α positiva. Sendo assim, podemos concluir que ER α medeia a proliferação celular induzida por estrogênio na linhagem celular justificando o aumento da viabilidade celular no meio com a presença do hormônio (figura 12) (LIAO *et al.*, 2014).

Já a linhagem celular mamária triplo negativa MDA-MB-231 não expressa ER- α , receptores de progesterona e HER2. No entanto, o ER- β foi detectado em muitos cânceres de mama triplo negativo, incluindo a MDA-MB-231, além de receptores de estrogênio acoplado à proteína G e receptores relacionados ao estrogênio. Além disso, é possível que alguns outros receptores não identificados se liguem ao estrogênio (TREECK *et al.*, 2020). Como o ER- β está associado à diminuição da proliferação e progressão do câncer, pode-se supor que o efeito antiproliferativo notado no sexto dia de análise pode ser consequência da interação estradiol com o ER- β (SIMU *et al.*, 2021).

Assim, com base nos resultados obtidos, os experimentos com a linhagem celular MCF-7 foram realizados em meio de cultura sem vermelho fenol suplementado com FBS tratado e hormônio estrogênio na concentração de 10 nM, enquanto nos ensaios com a MDA-MB-231 foi utilizado DMEM com vermelho fenol e 10% (v/v) de FBS sem tratamento. Dessa forma, os experimentos puderam ser conduzidos normalmente com estas linhagens.

Em trabalhos que realizam a triagem de novas substâncias bioativas é necessária a utilização de grupos controles, que servem como parâmetro de comparação para avaliação da seletividade das linhagens celulares e determinação da potência dos compostos químicos analisados.

A doxorubicina, escolhida como controle positivo, é um fármaco com atividade antineoplásica conhecida. É um quimioterápico com ação para diversos tipos de células tumorais, incluindo o câncer de mama e o de próstata. Estudos mostraram uma taxa de resposta entre 20 e 40% em células cancerosas mamárias em humanos com a utilização do cloridrato de doxorubicina (GLENMARK FARMACÊUTICA, 2020).

Apesar de ser um dos fármacos mais utilizados no tratamento quimioterápico contra o câncer há aproximadamente 50 anos, seu mecanismo molecular não é totalmente elucidado e seu uso é limitado devido à ampla gama de efeitos colaterais por não atuar de forma seletiva, lesando também células normais. Os efeitos adversos podem ser cardiomiopatia, insuficiência cardíaca e confusão mental. Tecidos com rápida proliferação, como tecidos tumorais, medula

óssea, mucosa gastrointestinal e oral e folículos capilares são mais sensíveis aos efeitos antiproliferativos da doxorrubicina (OCTAVIA *et al.*, 2012).

A doxorrubicina é metabolizada principalmente pelo fígado. Seus efeitos tóxicos podem estar relacionados à intercalação dos seus anéis planos entre os pares de bases do DNA, inibindo assim a replicação. Além disto, há a formação de um complexo com a topoisomerase e o DNA, formando um sistema ternário, que inibe a replicação celular. A capacidade da doxorrubicina de se ligar à membrana celular também pode afetar uma variedade de funções, estando aparentemente envolvida com a produção de radicais livres altamente reativos e tóxicos. Também foi observado alterações nas características morfológicas associadas a apoptose, o que pode ser também um dos mecanismos de ação da doxorrubicina (GLENMARK FARMACÊUTICA, 2020).

A partir disso, foram construídas as curvas concentração-resposta com as linhagens BALB/3T3 clone A31, DU 145, PC-3 e MDA-MB-231, MCF-7 e PNT-2 para o fármaco doxorrubicina por meio da análise de viabilidade celular por MTT, determinando assim qual a concentração ideal para ser utilizada nos próximos ensaios como controle positivo. Os valores obtidos estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Valor de IC₅₀, Índice de Seletividade e R²/Sy.x para cada linhagem celular referente ao composto de referência doxorrubicina.

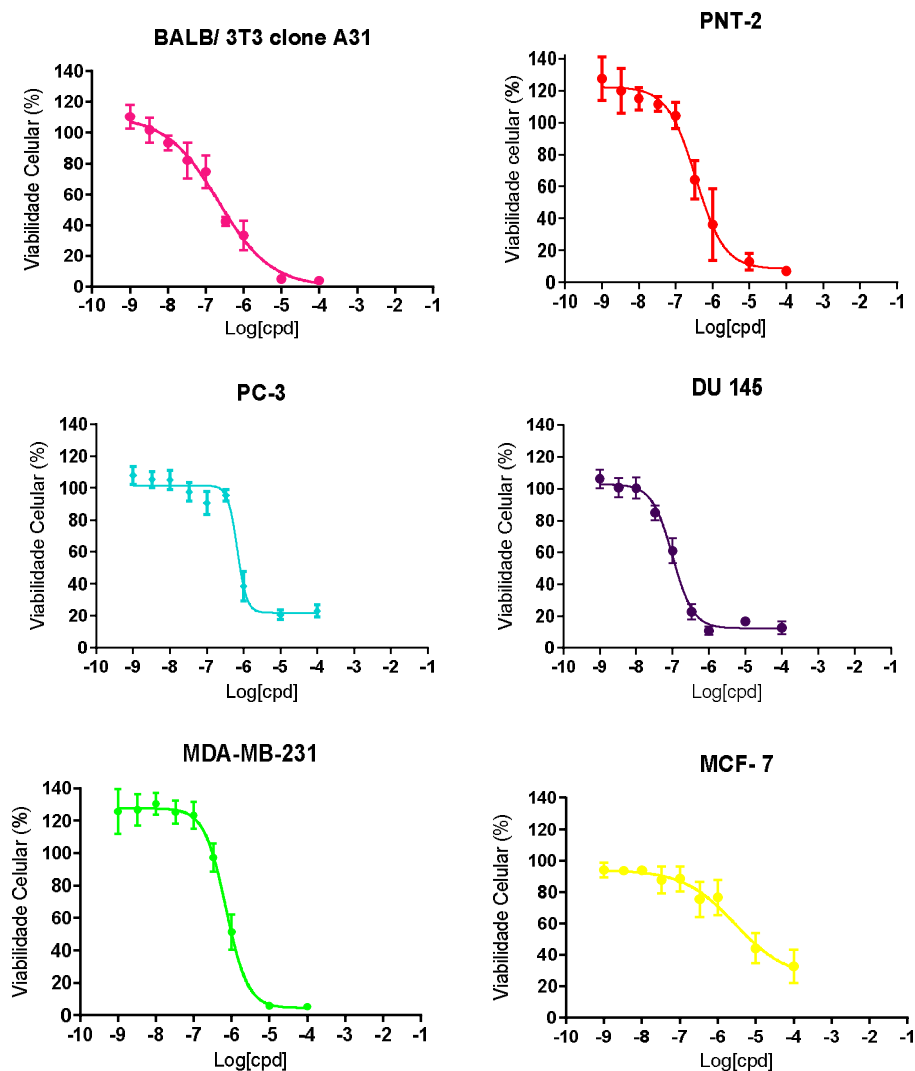
Linhagem celular	IC₅₀ (SE) µM	R²/Sy.x	SI_{BALB}; SI_{PNT-2} *
BALB/ 3T3 clone A31	0,219 (0,034)	0,96/8,20	-
PNT-2	0,353 (0,045)	0,94/12,1	-
DU 145	0,100 (0,0060)	0,98/5,97	2,2; 6,9
PC-3	0,675 (0,0437)	0,95/7,47	0,32; 0,52
MCF-7	2,83 (1,62)	0,87/8,50	0,08; 0,12
MDA-MB-231	0,715 (0,041)	0,98/8,19	0,31; 0,49

SE: erro padrão. * SI_{BALB}; SI_{PNT-2}: Índice de seletividade referente a BALB/3T3 clone A31 e PNT-2, respectivamente.

Fonte: Autoria própria.

Os gráficos das curvas concentrações-respostas são mostrados na Figura 13. Eles mostram que mesmo em concentrações muito altas, a doxorrubicina não leva a morte de 100%, especialmente para as linhagens PC-3 e MCF-7. Pode ser que haja resistência destas linhagens ao fármaco, caso a cultura das células remanescentes fosse mantida.

Figura 13- Curvas concentração-respostas para o fármaco doxorrubicina nas linhagens BALB/ 3T3 clone A31, PNT-2, DU 145, PC-3, MDA-MB-231e MCF-7.



Os dados representam a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes em quintuplicata. As concentrações testadas foram de 100 μM , 10 μM , 1,0 μM , 333 nM, 0,1 μM , 33,3 nM, 0,010 μM , 3,3 nM e 1,0 nM e o resultado obtido pelo método colorimétrico MTT. O controle negativo consistia em meio de cultura com 0,5% (v/v) de DMSO e foi o parâmetro de comparação (100%) para obtenção da viabilidade celular. No eixo X é representado o Log da concentração em μM no eixo Y a porcentagem do número de células viáveis após 72h de incubação com o composto.

Fonte: autoria própria.

Os valores de IC_{50} obtidos na literatura para as linhagens cancerosas mamárias são de 1,26 μM para a célula MDA-MB-231, 0,01 μM para a linhagem MCF-7, 1,09 μM para as

linhagens de próstata PC-3 e 0,07 μM para a linhagem DU 145 (WELLCOME SANGER INSTITUTE, 2020). Valores de IC_{50} para as linhagens controle, como BALB/3T3 clone A31 e PNT-2 não foram encontrados na mesma fonte. No entanto, comparando o resultado obtido do IC_{50} da doxorubicina para a BALB/3T3 clone A31 ($0,219 \pm 0,034 \mu\text{M}$) neste trabalho, com trabalhos anteriores do nosso grupo, nota-se uma diferença significativa, no qual o IC_{50} encontrado foi acima de 1,0 μM (VALDES, 2019). Conforme observado na Tabela 3, os valores obtidos nos experimentos neste trabalho e os dados retirados da literatura mostraram uma boa correspondência, exceto pela linhagem MCF-7.

Tabela 3. Comparação entre o IC_{50} da Doxorubicina obtido experimentalmente e os dados encontrados na literatura para as células cancerosas.

Linhagem celular	IC_{50} obtido (μM)	IC_{50} literatura (μM)	Razão*
DU 145	0,100	0,07	1,4
PC-3	0,675	1,09	0,62
MCF-7	2,832	0,01	283
MDA-MB-231	0,715	1,26	0,57

* A diferença é dada pela razão $\text{IC}_{50 \text{ obtido}}/\text{IC}_{50 \text{ literatura}}$. Os dados da literatura retirados do WELLCOME SANGER INSTITUTE, 2020.

Fonte: Autoria própria.

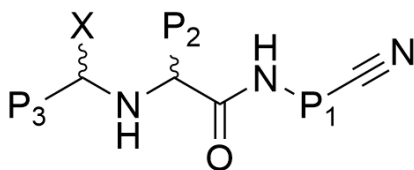
Analisando os gráficos de concentração resposta para cada linhagem (Figura 13), a concentração da doxorubicina de 10 μM (correspondendo ao valor de -5 no gráfico) foi selecionada para uso como controle positivo devido à baixa porcentagem de células viáveis. De acordo com os ensaios, o índice de seletividade da doxorubicina mostrou-se muito baixo (Tabela 2), sendo igual ou superior a 1 somente para a linhagem de câncer de próstata DU 145.

Com a concentração do controle positivo estabelecida, foi realizada a triagem de 33 compostos nas linhagens DU 145, PC-3, PNT-2, MDA-MB-231, MCF-7 e BALB/3T3 clone A31, que serão discutidas a seguir.

A pesquisa e a triagem de novos fármacos iniciam-se a partir da necessidade de novas substâncias bioativas para tratar ou conter uma doença cujo tratamento é ainda ineficaz ou apresenta limitações, como é o caso dos antitumorais. Todos os novos compostos testados neste trabalho são baseados no arcabouço químico demonstrado na Figura 14. Nele são introduzidos substituintes para aumentar a afinidade com o sítio ativo das cisteíno proteases. Os substituintes

P2 e P3 podem ser facilmente variados. A alternativa utilizada por nosso grupo engloba o estudo de inibidores seletivos que formam ligações covalentes reversíveis entre o átomo do aminoácido do sítio catalítico e um grupo reativo da substância química. O inibidor se liga covalentemente a um alvo molecular e, assim, suprime sua função biológica, e depois de um tempo a ligação é quebrada liberando o composto e a enzima (BAILLIE, 2016; QUILLES JR. *et al.*, 2019a).

Figura 14. Arcabouço químico dos derivados de dipeptidil nitrilas sintetizados pelo grupo de pesquisa NEQUIMED com a posição dos substituintes indicadas na estrutura.

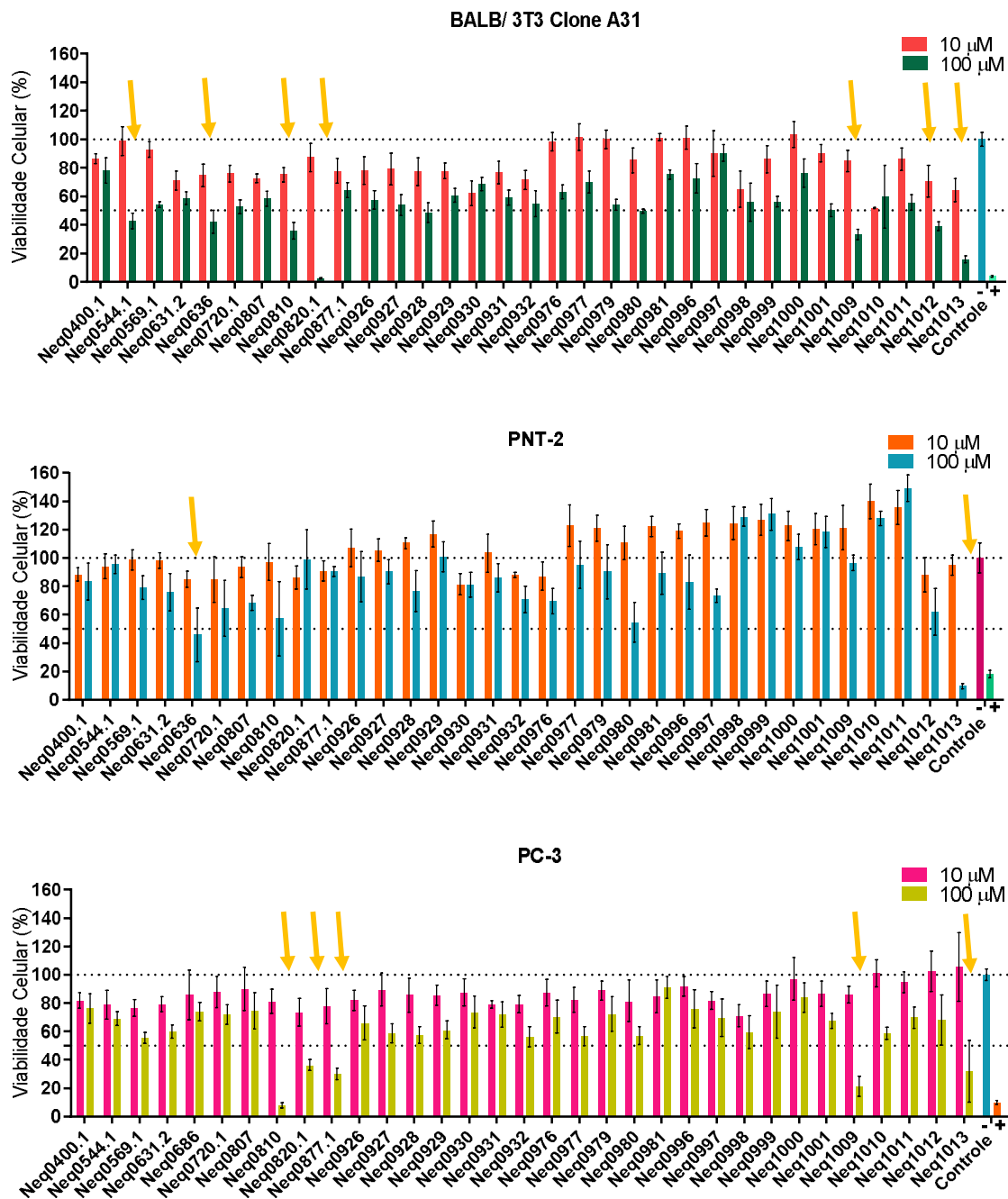


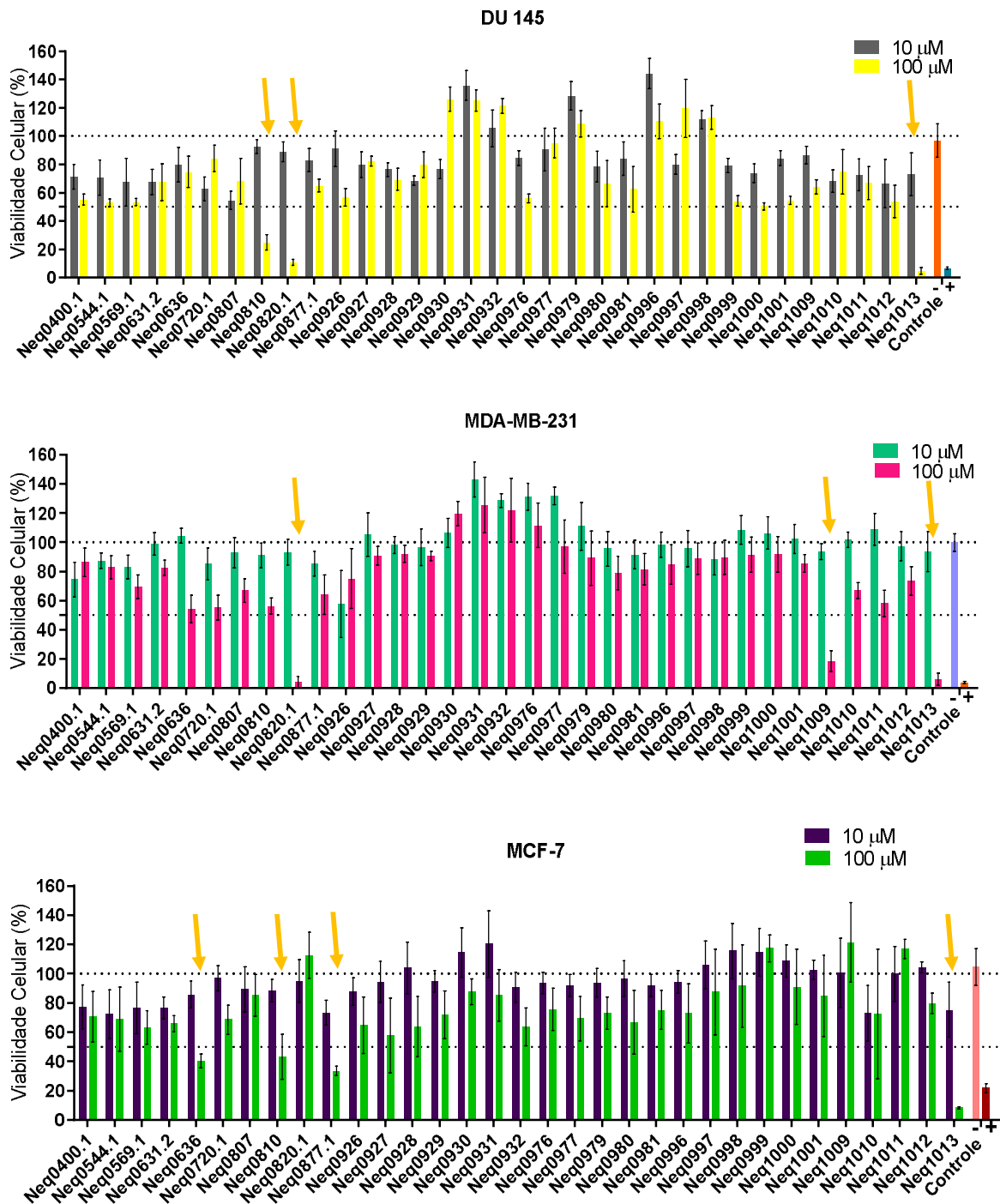
Fonte: Adaptado de Roxo (2019).

O teste de viabilidade celular foi efetuado pelo método de MTT e levou a obtenção dos resultados demonstrados na Figura 15. Nota-se, conforme esperado, que apenas alguns compostos foram ativos, considerando o valor de corte de 50% de viabilidade celular na maior concentração testada (100 μ M). Além disto, há também a questão da seletividade, pois alguns compostos bioativos contra as células cancerosas mostraram ser ativos contra as células dos grupos controle.

O resultado idealmente a ser alcançado nesse ensaio seria identificar uma substância que matasse um elevado número de células cancerosas nas duas concentrações testadas e que fosse inativo nas células controle. No entanto, isto é raramente alcançado em ensaios com novas substâncias bioativas em estágios iniciais como este.

Figura 15. Relação entre os compostos testados e a viabilidade celular das linhagens BALB/3T3 clone A31, PNT-2, PC-3, DU 145, MDA-MB-231 e MCF-7 após 72h de incubação nas concentrações de 10 e 100 μ M, realçando os compostos mais potentes (setas amarelas).





As barras representam a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes em quintuplicata. A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico MTT. Como controle negativo consistia em meio de cultura com 0,5% (v/v) de DMSO e como controle positivo foi utilizado a doxorrubicina na concentração de 10 µM.

Fonte: autoria própria.

Analisando primeiramente as células de câncer de próstata, notamos que houve pouca diferença na resposta celular entre elas (Figura 15). Para ambas as linhagens os compostos Neq0810, Neq0820.1 e Neq1013 foram citotóxicos na concentração de 100 μ M. A linhagem PC-3 também apresentou morte celular maior que 50% com o Neq0877.1 e Neq1009.

As células de câncer de próstata humano PC-3 e DU-145 são linhagens clássicas de câncer utilizadas em estudos *in vitro*. Apresentam algumas diferenças morfológicas e fenotípicas que podem justificar a diferença na resposta aos compostos bioativos.

Já havia sido observado por outros integrantes do nosso grupo de pesquisa que a linhagem PC-3 é mais sensível aos compostos químicos analisados quando comparado com a DU 145 (dados não publicados). A diferença mais marcante nesse caso entre as duas linhagens é que a PC-3 mostra características de adenocarcinoma pouco diferenciado, ou seja, um tipo mais invasivo, com alto potencial metastático e, conseqüentemente, maior expressão de cisteína proteases. Há também anormalidade no processo de diferenciação da PC-3 em relação às células não tumorais do organismo, resultando assim, em uma maior sensibilidade aos inibidores quando comparado com as células DU-145, que têm um potencial metastático moderado (CUNNINGHAM; YOU, 2015).

Comparando esses resultados também com as linhagens controle, observamos que a maioria dos compostos foi ativa para a BALB/3T3, com exceção do composto Neq0877.1. Já para a PNT-2, tivemos um número menor de compostos bioativos, sendo somente o Neq0636 e o Neq1013 citotóxicos.

A linhagem PNT-2 foi utilizada pela primeira vez em nosso grupo de pesquisa, não apresentando dados comparativos. No entanto, foi observado que esta linhagem apresenta maior resistência em relação aos fibroblastos para esta série de compostos, o que é interessante, pois esta é proveniente de humanos.

Já para as linhagens de câncer mama, observamos que as células hormônio dependentes foram mais sensíveis aos compostos, quando comparadas com a linhagem MDA-MB-231. Para a linhagem tumoral de mama hormônio independente, três compostos com potencial citotóxico: Neq0820.1, Neq1009 e Neq1013. Para a linhagem MCF-7 foram encontrados quatro compostos: Neq0686, Neq0810, Neq0877.1 e Neq1013. Como já mencionado, com exceção do Neq0877.1, esses compostos também mataram as células controle BALB/3T3 clone A31.

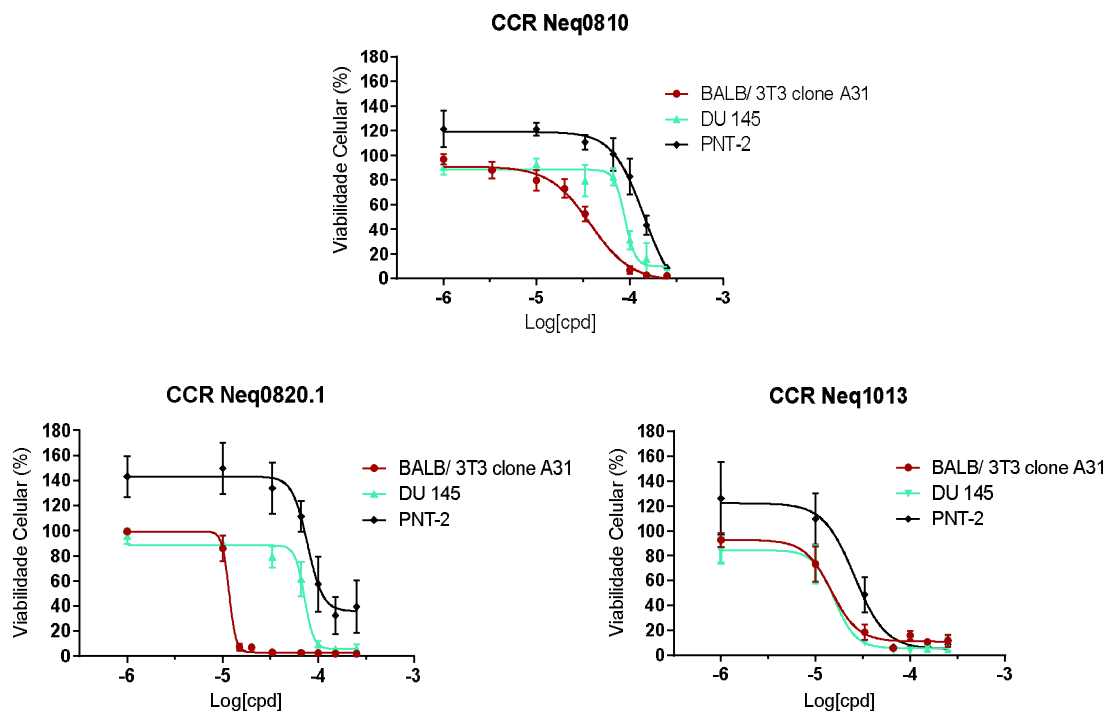
No total foram encontradas seis substâncias bioativas que inibiram pelo menos 50% a viabilidade das células cancerosas que poderiam ter alguma seletividade. A partir destes

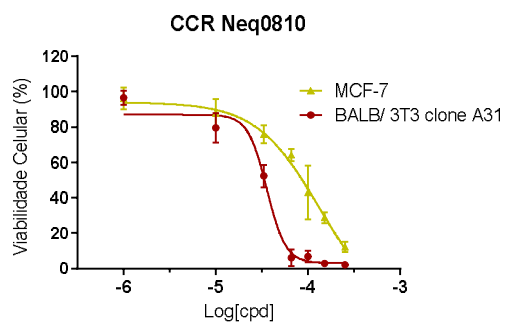
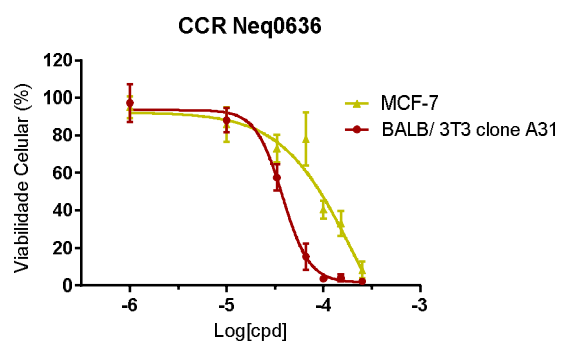
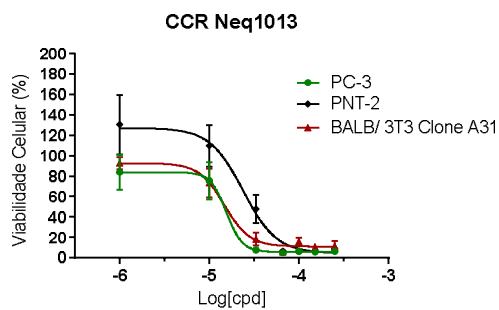
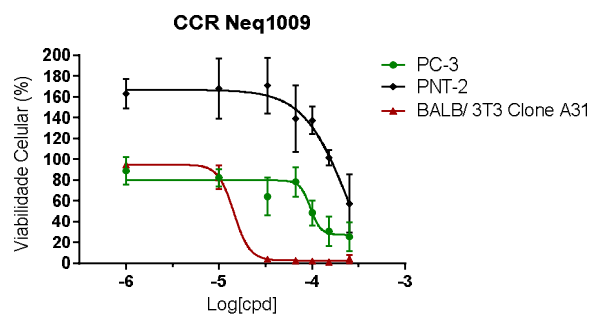
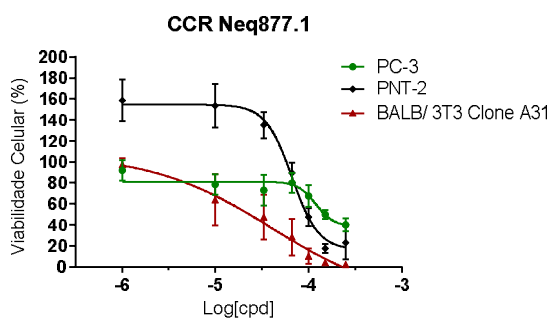
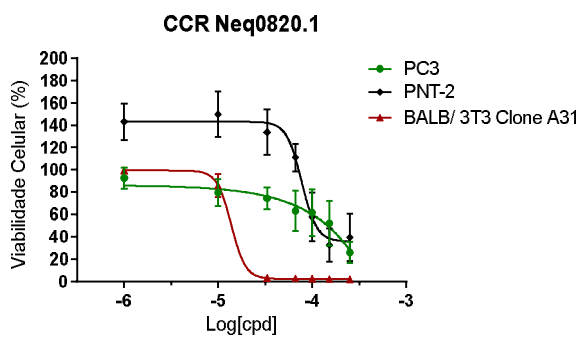
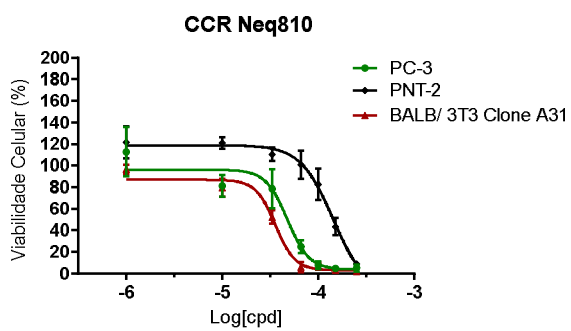
resultados preliminares obtidos na triagem, os compostos foram selecionados para a construção da curva concentração-resposta (Figura 16) e determinação do IC_{50} (Tabela 4) e índice de seletividade (Tabela 5).

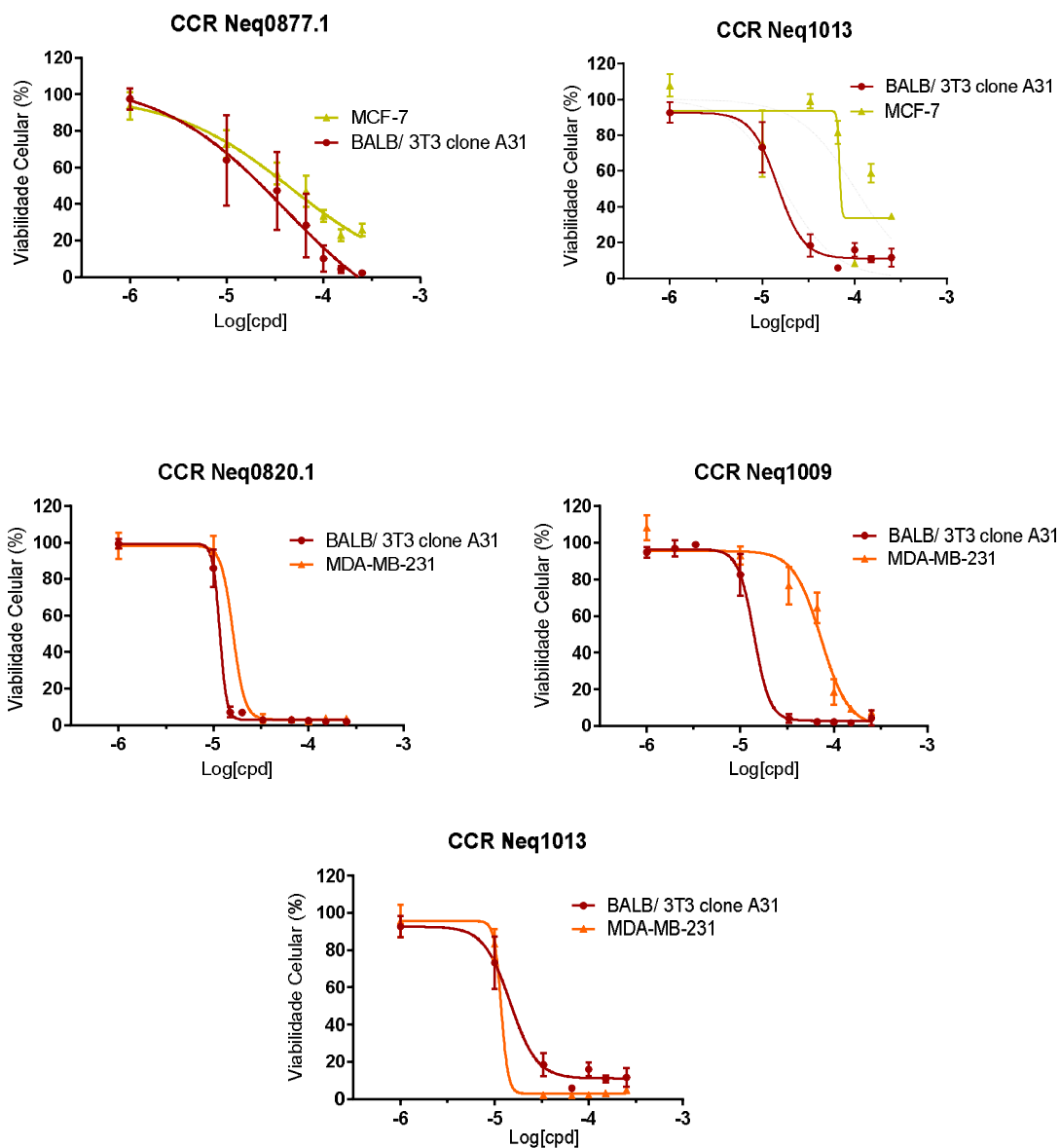
Os compostos Neq0810, Neq0820.1 e Neq1013 foram selecionados para a construção da curva concentração-resposta e determinação do IC_{50} para a linhagem DU 145. Para a linhagem PC-3, além dos três citados anteriormente, foi analisado o Neq0877.1 e o Neq1009. No caso das linhagens de mama, para MDA-MB-231, os compostos Neq0820.1, Neq1009 e Neq1013 foram selecionados para a determinação das curvas concentração-resposta, para o cálculo da potência e do índice de seletividade e para as células MCF-7 os compostos Neq0686, Neq0810, Neq0877.1 e o Neq1013.

Quando as curvas concentração-resposta são realizadas em condições idênticas, torna-se possível fazer uma comparação dos compostos químicos e a concentração necessária para alcançar o efeito desejado, como é o caso apresentado.

Figura 16. Curvas concentração-resposta para os compostos selecionados a partir das triagens iniciais nas linhagens BALB/3T3 Clone A31, PNT-2, DU 145, PC-3, MDA-MB-231 e MCF-7.







Os dados representam a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes em quintuplicata. As concentrações analisadas foram de 250 μM , 150 μM , 100 μM , 66,6 μM , 33,3 μM , 10 μM e 1,0 μM e o resultado obtido pelo método colorimétrico MTT. O controle negativo consistia em meio de cultura com 0,5% (v/v) de DMSO e foi o parâmetro de comparação (100%) para obtenção da viabilidade celular. No eixo X é representado o Log da concentração em μM no eixo Y a porcentagem do número de células viáveis após 72h de incubação com o composto.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 4. Potência dos compostos selecionados para os ensaios de viabilidade celular.

Composto	BALB/3T3 Clone A31		MDA-MB-231		MCF-7	
	IC ₅₀ (SE) µM	R ² /Sy.x	IC ₅₀ (SE) µM	R ² /Sy.x	IC ₅₀ (SE) µM	R ² /Sy.x
Neq0636	37,8 (0,13)	0,98/6,13	-	-	<100	0,90/9,99
Neq0810	37,7 (1,70)	0,98/6,17	-	-	<100	0,91/8,96
Neq0820.1	11,6 (0,18)	0,99/4,95	16,0 (2,47)	0,99/4,74	-	-
Neq0877.1	40,1 (36,4)	0,84/14,73	-	-	42,6 (20,9)	0,92/6,92
Neq1009	14,0 (1,28)	0,98/5,38	72,8 (4,65)	0,92/5,38	-	-
Neq1013	14,6 (0,99)	0,91/10,1	11,8 (0,72)	0,98/4,99	<100	0,67/20,1

Composto	BALB/3T3		DU 145		PC-3		PNT-2	
	IC ₅₀ (SE) µM	R ² /Sy.x	IC ₅₀ (SE) µM	R ² /Sy.x	IC ₅₀ (SE) µM	R ² /Sy.x	IC ₅₀ (SE) µM	R ² /Sy.x
Neq0810	37,7 (1,70)	0,98/6,17	88,7 (2,61)	0,93/9,53	47,7 (3,23)	0,89/14,6	<100	0,94/10,4
Neq0820.1	11,6 (0,18)	0,99/4,95	71,6 (1,56)	0,95/8,46	<100	0,98/4,95	77,07 (3,79)	0,87/19,1
Neq0877.1	40,1 (36,4)	0,84/14,7	-	-	<100	0,74/10,	66,4 (5,12)	0,94/14,5
Neq1009	14,0 (1,28)	0,98/5,38	-	-	95,5 (3,65)	0,73/14,1	<100	0,72/22,8
Neq1013	14,6 (0,99)	0,91/10,1	15,8 (1,56)	0,91/10,6	15,4 (2,42)	0,92/9,97	25,7 (2,2)	0,92/13,8

SE: erro padrão.

Fonte: Autoria própria.

Como observado nas Tabelas 4 e 5, dentre os compostos selecionados para a curva concentração-resposta, os compostos Neq0810, Neq0820.1 e Neq1013 demonstraram afetar o metabolismo das linhagens cancerosas com uma concentração menor de composto, quando comparadas com as linhagens controle, sendo seletivos em alguns casos.

Tabela 5. Seletividade dos compostos selecionados para os ensaios de viabilidade celular.

Composto	PC-3		DU 145		MDA-MB-231	MCF-7
	BALB/3T3 clone A31	PNT-2	BALB/3T3 clone A31	PNT-2	BALB/3T3 clone A31	BALB/3T3 clone A31
Neq0636	-	-	-	-	-	0,38
Neq0810	0,79	2,11	0,43	1,13	-	0,38
Neq0820.1	0,12	0,77	0,16	1,08	0,73	-
Neq0877.1	0,40	0,66	-	-	-	0,94
Neq1009	0,15	1,05	-	-	0,19	-
Neq1013	0,95	1,66	1,14	1,67	1,18	0,15

Fonte: Autoria própria.

Analisando a Tabela 5, observa-se que o composto Neq0810 foi mais seletivo para as linhagens PC-3 e DU 145 quando comparado com a célula não tumoral PNT-2 (2,11 e 1,13), enquanto o composto Neq0820.1 foi seletivo apenas para a linhagem DU 145 e Neq1009 foi apenas para a PC-3, apresentando um índice de seletividade de 1,08 e 1,05, respectivamente.

Para a linhagem MCF-7 nenhum composto foi seletivo quando comparado com a linhagem controle BALB/3T3 clone A31. Já para a linhagem MDA-MB-231, o composto Neq1013 apresentou melhor resultado com um índice de seletividade maior do que 1,0.

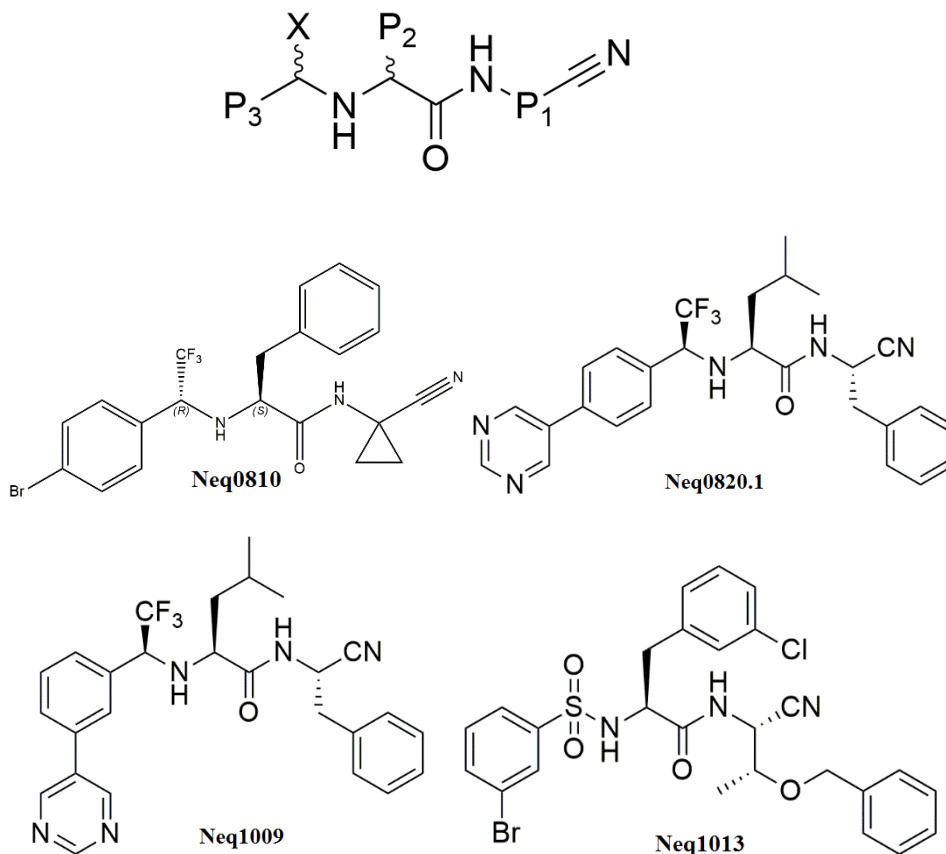
Apenas o Neq1013 foi seletivo para as linhagens cancerosas de mama e próstata. Além disso, este composto apresentou o menor valor de IC₅₀ para a maioria dos tipos celulares testados, com exceção da linhagem celular MCF-7. De acordo com Indrayanto, Putra e Suhud, 2021, compostos com valor de IC₅₀ de 1-20 µM apresentam boa atividade, mas podem apresentar um elevado potencial citotóxico. No entanto, maioria dos casos, o IC₅₀ ideal deve ser inferior a 10 µM, uma vez que em concentrações maiores, podem inibir algumas enzimas essenciais. A maioria dos fármacos no mercado apresenta concentrações plasmáticas menores que 10 µM, ressaltando a necessidade de ter compostos com elevada potência.

Apesar de a triagem os compostos apresentar potencial inibitório do metabolismo celular na linhagem MCF-7, na curva concentração-resposta eles apresentaram um valor de IC_{50} elevado mesmo quando comparados com a linhagem controle e com a linhagem celular cancerosa MDA-MB-231. Diante desses resultados encontrados até agora, ainda é necessário um estudo mais detalhado da ação desses inibidores nas células de câncer de mama e de próstata para posterior comparação da influência dos hormônios na resposta celular.

Era esperado que as substâncias fossem ativas independentemente da presença de hormônio. No entanto, há a possibilidade de que a adição do hormônio esteroideal possa levar a uma maior resistência às linhagens hormônio-dependentes, conforme observado em dados obtidos pelo grupo ainda não publicados.

As estruturas químicas dos compostos que apresentam seletividade estão representadas na Figura 17. Todos os compostos, como já mencionado, são derivados de dipeptidil nitrilas, com diferentes substituintes nos subsítios P1, P2 e P3 (Figura 17).

Figura 17. Arcabouço químico dos derivados de dipeptidil nitrilas sintetizadas no grupo de pesquisa NEQUIMED e estruturas químicas dos compostos Neq0810, Neq0820.1, Neq1009 e Neq1013.



Fonte: Autoria própria.

Os quatro compostos apresentam grupos distintos da carbonila na posição X (Figura 14) em relação a dipeptidil nitrilas para aumentar a estabilidade metabólica do composto, evitando principalmente a hidrólise nessa região. Além disto, todos também possuem substituintes na posição P1 para aumentar a estabilidade química/metabólica, evitando assim ataque nucleofílico de outros compostos presentes no meio celular no carbono nucleofílico da nitrila. Somente o composto Neq1013 possui uma sulfonamida aromática na posição X/P3, com um bromo no anel aromático na posição meta. Na posição P2 a fenilalanina tem um substituinte cloro na posição meta e um éter quiral na posição P1. Este tipo de substituinte estendido na posição P1 tem sido estudado mais recentemente para inibidores de cisteíno proteases.

Essas substâncias foram inicialmente planejadas e sintetizadas para a cruzaina (protease de *T. cruzi*), que é homóloga a catepsina L humana. Vários destes compostos foram também testados e apresentam atividade para esta enzima humana, em estudos realizados por outros

membros do grupo (CIANNI *et al.*, 2020; ROCHO, 2019). Os compostos são quantificados por meio do pKi (constante de inibição) que corresponde ao logaritmo da constante de inibição do alvo. Inibidores covalentes reversíveis têm demonstrado bons valores de Ki, na ordem de nanomolar (ROCHO, 2019), como mostrado na Tabela 6 para as catepsinas L, S, K e B. Os dados foram disponibilizados pelo grupo NEQUIMED e alguns ainda não foram publicados. Ainda não se tem estudos sobre o composto Neq0810.

Quanto maior o valor de pKi, maior a inibição da proteína. Um composto com pKi > 7 é considerado potente, pois está abaixo de 100 nM, enquanto a substância com pKi > 9 é um inibidor muito potente (abaixo de 10 nM). Analisando os valores de pKi das substâncias testadas (Tabela 6) todos apresentaram alta afinidade pelas catepsinas, com exceção da catepsina B para o Neq1009. Vale ressaltar que Neq1013 possui a maior potência e seletividade para a catepsina L.

Tabela 6. Potência dos compostos Neq0810, Neq0820.1, Neq1009 e Neq1013 para distintas cisteíno catepsinas humanas descritos como pKi.

Compostos	Catepsina L	Catepsina S	Catepsina K	Catepsina B
Neq0820.1	7,6 ± 0,01	8,4 ± 0,05	7,6 ± 0,08	5,6 ± 0,1
Neq1009	8,1 ± 0,06	8,4 ± 0,02	8,5 ± 0,09	< 4,0
Neq1013	9,6 ± 0,08	7,1 ± 0,03	6,2 ± 0,07	7,4 ± 0,03

Fonte: Rocho (2019).

Portanto, estes compostos podem ter seu mecanismo de ação relacionado a inibição de uma ou mais cisteíno catepsinas, sendo necessário fazer estudos celulares para poder confirmar esta relação. Diversos processos metabólicos celulares podem influenciar diretamente na ação do composto, interferindo nos resultados. Inibidores de enzima podem acabar sofrendo efluxo. Mesmo quando um inibidor acessa a estrutura celular de interesse, ele ainda pode precisar competir com substratos de alta afinidade. Até quando a concentração intracelular livre de inibidor é suficiente para envolver o alvo terapêutico proposto, ainda pode ser necessário perturbar outros processos celulares a fim de alcançar a resposta fenotípica desejada (AVELAR *et al.*, 2015).

Alguns mecanismos biológicos podem ser explanados como possíveis causas da morte celular por inibidores de cisteíno proteases. Autofagia e apoptose são vias catabólicas essenciais para a homeostase e, geralmente, ambas são consideradas supressoras de tumor. Várias vias moleculares interconectam a autofagia e a apoptose, portanto, qualquer desregulação desses processos pode favorecer a proliferação de células cancerosas (RUDZIŃSKA *et al.*, 2019).

A autofagia é um processo de autodigestão intracelular, no qual proteínas e organelas danificadas são transportadas para o lisossomo para serem degradadas. Além de promover a morte celular autofágica, este processo previne o aparecimento do câncer ao remover proteínas e organelas danificadas, reduzindo as espécies reativas de oxigênio (ROS). No entanto, em estágios muito agressivos de desenvolvimento do tumor, a autofagia pode levar a proteção das células malignas do estresse células. As catepsinas podem ser as principais reguladoras da autofagia pró-sobrevivência em células cancerosas, e a inibição delas pode aumentar a eficácia do tratamento do câncer focado na inibição autofágica (RUDZIŃSKA *et al.*, 2019).

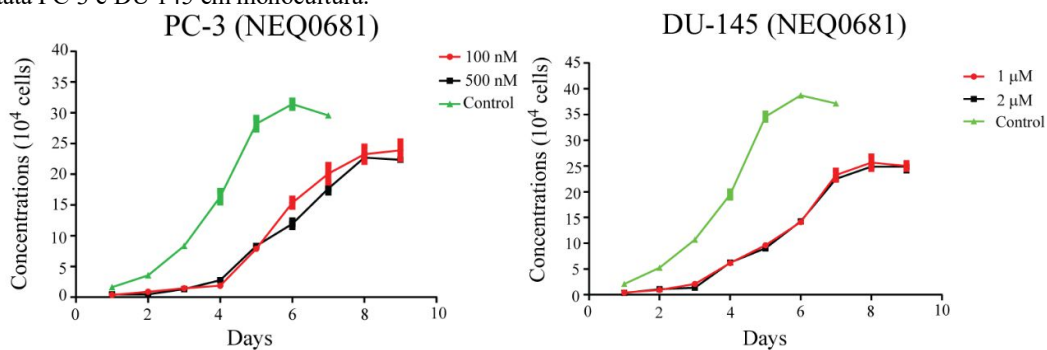
Células de câncer de mama MCF-7 tratadas o com o inibidor de catepsina E-64 resultaram em uma redução significativa do número de células apoptóticas, com aumento da formação de autofagossomo (LAMPARSKA-PRZYBYSZ; GAJKOWSKA; MOTYL, 2005). A inibição de catepsinas foi associada a morte de células de neuroblastoma por desregulação das vias de sinalização celular IGF-1/MAPK/AKT, necessária para o crescimento e sobrevivência das células tumorais. Com a inibição da catepsina foi notado acúmulo de fragmentos do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) nos autofagossomos (SOORI; MASON, 2016).

Cartledge *et al.*, 2013 também mostrou em seu trabalho que a inibição das catepsinas B e L oferece uma nova abordagem terapêutica potencial para o tratamento do neuroblastoma. A inibição das catepsinas mostrou favorecer a autofagocitose, no qual houve um acúmulo de estresse celular e marcadores autofágicos, como o LC3-II, uma etapa chave na formação de autofagossomos, precedendo a morte celular.

A inibição da catepsina evita a degradação das proteínas para fornecer os seus aminoácidos como nutrientes para a célula e, conseqüentemente, há o *turnover* das proteínas que são sequestradas durante a autofagia constitutiva. O acúmulo de proteínas não degradadas precede a indução a apoptose, indicando que essa perturbação da autofagia pode ser um efeito precoce que acaba levando à morte celular (CARTLEDGE *et al.*, 2013).

Sabe-se também que a inibição da catepsina restringe o crescimento de muitos tipos de células cancerosas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, causando efeitos na proliferação celular, invasão de células tumorais e angiogênese (RUDZIŃSKA *et al.*, 2019), uma vez que as substâncias inibidoras de cisteíno proteases usualmente apresentam atividade citostática, conforme artigo de nosso grupo para a linhagem de câncer de pâncreas MIA PaCa-2 (QUILLES JR. *et al.*, 2019b). Este mesmo efeito tem sido observado em outros trabalhos em desenvolvimento, incluindo as linhagens DU 145 e PC-3 (Figura 18) (LEITÃO; TEZUKA, 2018).

Figura 18. Atividade citostática de dipeptidil nitrilas inibidoras de cisteíno proteases em linhagens de câncer de próstata PC-3 e DU 145 em monocultura.



A substância Neq0681 foi testada nas concentrações de 100 e 500 nM para a linhagem PC-3 e 1 e 2 μM para a linhagem DU 145. As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 células/mL, e foram contadas a cada 24h até atingirem um platô, indicando a entrada na fase estacionária. De acordo com os dados obtidos, as células sem tratamento atingiram seu crescimento máximo em seis dias, enquanto os poços tratados em oito dias. No eixo X é representado os dias e no eixo Y o número de células.

Fonte: Retirado de Leitão e Tezuka (2018).

Ainda é necessário um estudo mais detalhado da ação desses inibidores nas células de câncer de mama e de próstata para investigar seu mecanismo de ação. Analisando os diversos dados encontrados na literatura citados nesse trabalho, podemos inferir que as cisteíno proteases são bons alvos terapêuticos contra o câncer.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O desenvolvimento de compostos químicos bioativos para determinada doença, desde a ideia original até o lançamento de um produto acabado, é um processo complexo que pode levar anos. Este processo é iniciado porque há uma doença ou condição clínica sem produtos adequados disponíveis e é essa necessidade clínica não atendida que é a motivação subjacente para o projeto. A pesquisa inicial gera dados para desenvolver uma hipótese de que a inibição ou ativação de uma proteína ou via resultará em um efeito terapêutico.

Da triagem dos 33 compostos inibidores de cisteína proteases, foram selecionados quatro compostos com potencial antineoplásico para as células de câncer: Neq810, Neq0820.1, Neq1009 e Neq1013. O composto Neq1013 apresentou melhor resultado, sendo ativo para um maior número de linhagens cancerosas (MDA-MB-231, DU 145 e PC-3), apresentando o menor valor de IC_{50} , próximo a 15 μ M, e um índice de seletividade maior do que 1,0 quando comparado com as linhagens não tumorais. Apresentou também maior potência para as células hormônio independentes, que são mais difíceis de serem tratadas.

Os resultados alcançados tornam difícil a interpretação mecanística para os compostos, uma vez que todos foram potentes inibidores das cisteína catepsinas humanas. A partir da estrutura química conhecida desses compostos podem ser feitos estudos para a otimização química que levem a uma maior potência na célula, podendo estes serem modificados pela química medicinal através das relações estrutura-atividade, para melhorar as propriedades físico-químicas e farmacológicas, aumentando sua potência e seletividade. Estes resultados serão de grande valia para o planejamento de novas moléculas bioativas e seleção dos melhores arcabouços químicos para as próximas fases da gênese planejada de compostos químicos.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, J.; STAFFURTH, J. Hormonal therapy for cancer. **Medicine**, v. 36, n. 1, p. 29–32, 2007.
- AMERICAN TYPES CULTURE COLLECTION. **DU 145 (ATCC® HTB-81TM)**. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/all/HTB-81.aspx>. Acesso em: 17 ago. 2020a.
- AMERICAN TYPES CULTURE COLLECTION. **BALB/3T3 clone A31**. Disponível em: <http://bcrj.org.br/celula/3T3-Clonea31-Mouse-Embryo>. Acesso em: 17 ago. 2020a.
- AMERICAN TYPES CULTURE COLLECTION. **MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26TM)**. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/all/HTB-26.aspx#characteristics>. Acesso em: 18 ago. 2020b.
- AMERICAN TYPES CULTURE COLLECTION. **PC-3 (ATCC® CRL-1435TM)**. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-1435.aspx>. Acesso em: 17 ago. 2020c.
- AMERICAN TYPES CULTURE COLLECTION. **MCF7 ((ATCC® HTB-26TM)**. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/htb-22>. Acesso em: 11 ago. 2021.
- ASSOCIAÇÃO TÉCNICO CIENTÍFICA PAUL EHRLICH. **PNT-2**. Disponível em: <http://bcrj.org.br/celula/pnt2-prostate-normal-human-epithelial>. Acesso em: 17 ago. 2020b.
- 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. e0003916, 2015.
- BAILLIE, T. A. Targeted covalent inhibitors for drug design. **Angewandte Chemie**, v.55, n.43, p.13408-13421, 2016.
- BALK, S. P.; KNUDSEN, K. E. AR, the cell cycle, and prostate cancer. **Nuclear Receptor Signaling**, v. 6, p. e001, 2008.
- BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 401-410, 2003.
- BERGO, P. L. S. **Padronização de extratos de folhas de amoreira com potencial fitoestrogênico para uso no tratamento dos sintomas do climatério**. 2015. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.
- BERTHOIS, Y.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 8, p. 2496-2500, 1986.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BROMME, D.; WILSON, S. Role of cysteine cathepsins in extracellular proteolysis. *In*: PARKS, W. C.; MECHAM, R. P. **Extracellular matrix degradation**. Basingstoke: Springer Nature, 2011, p. 23-51.

CAMARILLO, I. G. *et al.* Low and high voltage electrochemotherapy for breast cancer: an in vitro model study. *In*: SUNDARARAJAN, R. **Electroporation-based therapies for cancer**. New York: Elsevier, 2014. Cap.4, p. 55-102.

CARMICHAEL, J. *et al.* Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Research**, Bethesda, v. 4, n. 47, p. 936-942, 1987.

CARTLEDGE, D. M. *et al.* Inhibitors of cathepsins B and L induce autophagy and cell death in neuroblastoma cells. **Investigational New Drugs**, v. 31, n. 1, p. 20-29, 2013.

CIANNI, L. *et al.* Optimization strategy of single-digit nanomolar cross-class inhibitors of mammalian and protozoa cysteine proteases. **Bioorganic Chemistry**, v. 101, p. 104039, 2020.

COMŞA, Ş.; CÎMPEAN, A. M.; RAICA, M. The Story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. **Anticancer Research**, v. 35, n. 6, p. 3147-3154, 2015.

COSTA, L. A. *et al.* Dimethyl sulfoxide (DMSO) decreases cell proliferation and TNF- α , IFN- γ , and IL-2 cytokines production in cultures of peripheral blood lymphocytes. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1789, 2017.

CRUZ, E. C. S. **Estudo de novas moléculas antitumorais em linhagens de células de câncer de próstata e mama hormônio-dependentes**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015. DOI: 10.11606/D.75.2015.tde-09112015-161010.

CUNNINGHAM, D.; YOU, Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. **Journal of Biological Methods**, v. 2, n. 1, p. 17, 2015.

DAI, X.; WU, J. J. Selective estrogen receptor modulator: raloxifene. **Journal of Reproction & Contraception**, v.22, n.1, p. 51-60, 2011.

DEBERARDINIS, R. J.; NAVDEEP, S. C. Fundamentals of cancer metabolism. **Science Advances**, v. 2, n. 5, May 2016. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>.

DUFFY, M. J. *et al.* Mutant P53 as a target for cancer treatment. **European Journal of Cancer**, v. 83, p. 258-265, 2017.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p.495-516, 2007.

EUROPEAN COLLECTION OF AUTHENTICATED CELL CULTURES. **Cell line profile MDA-MB-231**. Disponível em: <https://www.phe->

culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=92020424&collection=ecacc_gc. Acesso em: 18 ago. 2020.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. 6thed. Nova Jersey: John Wiley, 2010.

GAO, W., BOHL, C. E.; DALTON, J. T. Chemistry and structural biology of androgen receptor. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 9, p. 3352-3370, 2005.

GARBER, J. E.; KENNETH, O. Hereditary cancer predisposition syndromes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 2, p. 276-292, 2005.

GHAM, D.; YOU, Z. In Vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. **Journal of Biological Methods**, v. 2, n. 1, p. 322, 2015.

GLENMARK FARMACÊUTICA LTDA. **Cloridrato de doxorubicina**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7382002018&pIdAnexo=10696904. Acesso em: 2 ago. 2020.

GREENBERG, R. A. Telomeres, crisis and cancer. **Current Molecular Medicine**, v. 5, n. 2, p. 213-218, 2005.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARBECK, N. *et al.* Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p.66, 2019.

HAYNES, M. K. *et al.* Detection of intracellular granularity induction in prostate cancer cell lines by small molecules using the hyperCyt® high-throughput flow cytometry system. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 14, n. 6, p. 596-609, 2009.

HISCOX, S., DAVIES, E. L.; BARRETT-LEE, P. Aromatase inhibitors in breast cancer. **Maturitas**, v. 63, n. 4, p. 275-279, 2009.

HOESEL, B.; JOHANNES, A. S. The Complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 1, p. 86, 2013.

HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 4, p. 215, 2011.

HOROSZEWICZ, J. S. *et al.* LNCaP model of human prostatic carcinoma. **Cancer Research**, v. 43, n. 4, p. 1809-1818, 1983.

HULVAT, M. C. Cancer incidence and trends. **Surgical Clinics of North America**, v. 100, n. 3, p. 469-481, 2020.

INDRAYANTO, G.; PUTRA, G. S.; SUHUD, F. Validation of in-vitro bioassay methods: application in herbal drug research. **Profiles Of Drug Substances, Excipients And Related Methodology**, v. 46, p. 273-307, 2021.

INSTITUO NACIONAL DO CÂNCER. **Atlas on-line de mortalidade**. Disponível em: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>. Acesso em: 24 ago. 2021.

JIA, Min, DAHLMAN-WRIGHT, Karin; GUSTAFSSON, Jan-Åke. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 29, n. 4, p. 557-568, 2015.

JIANG, W.G. *et al.* Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S244-S275, 2015.

JOSHI, A. *et al.* Effective inhibitory activity against MCF-7, A549 and HepG2 cancer cells by a phosphomolybdate based hybrid solid. **Dalton Transactions**, v. 49, n. 21, p.7069-7077, 2020.

KAIGHN, M. E. *et al.* Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). **Investigative Urology**, v. 17, n. 1, p. 16-23, 1979.

KATZENWADEL, A.; WOLF, P. Androgen deprivation of prostate cancer: leading to a therapeutic dead end. **Cancer Letters**, v. 367, n. 1, p. 12-17, 2015.

KOTSOPOULOS, J. BRCA mutations and breast cancer prevention. **Cancers**, v. 10, n. 12, p. 524-538, 2018.

LAMPARSKA-PRZYBYSZ, M.; GAJKOWSKA, B.; MOTYL, T. Cathepsins and BID are involved in the molecular switch between apoptosis and autophagy in breast cancer MCF-7 cells exposed to camptothecin. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56 Suppl 3, p. 159-179, 2005.

LAW, J.; MARTIN, E. (Org.). **Concise medical dictionary**. Oxônia: Oxford University Press, 2020. Disponível em: <https://www.oxfordreference.com/view/10.1093/acref/9780198836612.001.0001/acref-9780198836612>. Acesso em: 24 ago. 2020.

LEITAO, A.; TEZUKA, D. Y. Cytostatic effect of cysteine protease inhibitors for DU-145 and PC3 prostate cancer cell lines. *In: CONGRESS OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY*, 19., 2018, São Paulo. **Livro de Resumos [...]**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2018. Resumo A33.

LEWANDOWSKA, A. *et al.* Environmental risk factors for cancer – review paper. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 26, n. p. 1-7, 2019.

LEWIS-WAMBI, J. S. *et al.* The Selective estrogen receptor modulator bazedoxifene inhibits hormone-independent breast cancer cell growth and down-regulates estrogen receptor α and Cyclin D1. **Molecular Pharmacology**, v. 80, n. 4, p. 610-620, 2011.

- LEYGUE, E. *et al.* Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 58, n. 15, p.3197-3201, 1998.
- LIAO, X.-H. *et al.* Estrogen receptor α mediates proliferation of breast cancer MCF-7 cells via a P21/PCNA/E2F1-dependent pathway. **FEBS Journal**, v. 281, n. 3, p.927-942, 2014.
- LIMA FILHO, O. C. *et al.* Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *eremanthus erythropappus* sobre células de câncer mamário MCF-7. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 3, p. 4699-4727, 2020.
- LITWIN, M. S.; HUNG-JUI, T. The Diagnosis and treatment of prostate cancer: a review. **JAMA**, v. 317, n. 24, p. 2532-2542, 2017.
- LOIBL, S.; GIANNI, L. HER2-positive breast cancer. **The Lancet**, v. 389, n. 10087, p. 2415-2429, 2017.
- LÖSER, R.; PIETZSCH, J. Cysteine cathepsins: their role in tumor progression and recent trends in the development of imaging probes. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, p. 37, 2015.
- MCANULTY, R. J. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 4, p. 666-671, 2007.
- MCCLATCHEY, A. I.; YAP, A. S. Contact inhibition (of proliferation) redux. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 24, n. 5, p. 685-694, 2012.
- MCF-7 cell line - breast cancer cell lines | MCF-7 cells. 2014. Disponível em: <https://www.mcf7.com/>. Acesso em: 9 jul. 2020.
- MIRKIN, S.; PICKAR, J. H. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): a review of clinical data. **Maturitas**, v. 80, n. 1, p. 52-57, 2015.
- MOFFAT, J. G., RUDOLPH, J.; BAILEY, D. Phenotypic screening in cancer drug discovery — past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 8, p. 588-602, 2014.
- MOHAMED, M. M.; SLOANE, B. F. Multifunctional enzymes in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 10, p. 764-775, 2006.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p.55-63, 1983.
- MUSGROVE, E. A.; SUTHERLAND, R. L. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 9, p. 631-643, 2009.
- NAKAMURA, H. BALB/c mouse. In: BRENNER'S encyclopedia of genetics. Amsterdam: Elsevier, 2013. p. 290–292. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123749840001339>. Acesso em: 17 ago. 2020.

NATIONAL BREAST CANCER FOUNDATION. BRCA: the breast cancer gene. Disponível em: <https://www.nationalbreastcancer.org/what-is-brca/>. Acesso em: 9 set. 2021.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Dimethyl sulfoxide**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dimethyl-sulfoxide>. Acesso em: 9 jul. 2020.

NORMANO, N. *et al.* Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, n. 6, p. 1213-1225, 2012.

OCTAVIA, Y. *et al.* Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, n. 6, p.1213-1225, 2012.

OLSON, O. C.; JOYCE, J. A. Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 12, p. 712-729, 2015.

O'REGAN, R. M; JORDAN, V C. The Evolution of tamoxifen therapy in breast cancer: selective oestrogen-receptor modulators and downregulators. **The Lancet Oncology**, v. 3, n. 4, p. 207-214, 2002.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests**. Paris: OECD, 2010. (OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, 129).

OSBORNE, C. K.; SCHIFF, R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. **Annual Review of Medicine**, v. 62, n. 1, p. 233-247, 2011.

PERKINS, M. S. *et al.* A Comparative characterization of estrogens used in hormone therapy via estrogen receptor (ER)- α and - β . **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 174, p. 27-39, 2017.

PERRET, G.Y.; CRÉPIN, M. New Pharmacological strategies against metastatic spread. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 22, n. 5, p. 465-492, 2008.

PINKERTON, J. V.; THOMAS, S. Use of SERMs for treatment in postmenopausal women. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 142, p. 142–154, 2014.

QUILLES JUNIOR, J. C. **Planejamento molecular, atividade tripanossomicida e anticancerígena de inibidores covalentes reversíveis de cisteíno proteases**. 2019. Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019a. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-05062019-154535/>. Acesso em: 17 ago. 2020.

QUILLES JR., J. C. *et al.* Biological activity and physicochemical properties of dipeptidyl nitrile derivatives against pancreatic ductal adenocarcinoma cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 112-120, 2019.

RACOMA, I. O. *et al.* Thymoquinone inhibits autophagy and induces cathepsin-mediated, caspase-independent cell death in glioblastoma cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e72882, 2013.

RAWLA, P. Epidemiology of prostate cancer. **World Journal of Oncology**, v. 10, n. 2, p.63-89, 2019.

REBELLO, R. *et al.* Prostate cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, p.9, 2021.

ROCHA, V. C. J. **Estratégia para reduzir a cardiotoxicidade da doxorubicina (DOX) sem afetar sua atividade antineoplásica**. 2010. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2010.

ROCHO, F. R. **Structure-activity relationships of cysteine protease inhibitors**. 2019. Dissertation (Master) – São Carlos Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Carlos, 2019. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-17022020-135630/>. Acesso em: 20 ago. 2020.

RUBIN, H. The Early history of tumor virology: Rous, RIF, and RAV. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 35, p.14389-14396, 2011.

RUDZIŃSKA, M. *et al.* The Role of cysteine cathepsins in cancer progression and drug resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, p. 3602-3622, 2019.

SACEDA, M. *et al.* Regulation of the estrogen receptor in MCF-7 cells by estradiol. **Molecular Endocrinology**, v. 2, n. 12, p.1157-1162, 1988.

SHANLE, E. K.; XU, W. Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 13, p. 1265-1276, 2010.

SIMU, S. *et al.* Insights into the behavior of triple-negative MDA-MB-231 breast carcinoma cells following the treatment with 17 β -Ethinylestradiol and Levonorgestrel. **Molecules**, v. 26, n. 9, p.2776-2790, 2021.

SINGH, N. *et al.* Inflammation and cancer. **Annals of African Medicine**, v. 18, n. 3, p. 121-126, 2019.

SOORI, M., LU, G.; MASON, R. W. Cathepsin inhibition prevents autophagic protein turnover and downregulates insulin growth factor-1 receptor-mediated signaling in neuroblastoma. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 356, n. 2, p. 375-386, 2016.

SUDHAN, D. R.; SIEMANN, D. W. Cathepsin L inhibition by the small molecule KGP94 suppresses tumor microenvironment enhanced metastasis associated cell functions of prostate and breast cancer cells. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 30, n. 7, p. 891-902, 2013.

SWEENEY, E. E. *et al.* Models and mechanisms of acquired antihormone resistance in breast cancer: significant clinical progress despite limitations. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 9, n. 2, p. 143-163, 2012.

TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. **Cancer Research**, v. 70, n. 14, p. 5649-5669, 2010.

THOMA, C. Prostate cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, p. 8, 2021.

TIWARI, A. *et al.* Benign prostatic hyperplasia: an insight into current investigational medical therapies. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 14, n. 11, p. 1359-1372, 2005.

TRAN, C. *et al.* Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. **Science**, v. 324, n. 5928, p. 787-790, 2009.

TREECK, O. *et al.* Estrogen actions in triple-negative breast cancer. **Cells**, v. 9, n. 11, p. 2358-2373, 2020.

TURK, V.; KOS, J.; TURK, B. Cysteine cathepsins (proteases)—on the main stage of cancer?. **Cancer Cell**, v. 5, n. 5, p. 409-410, 2004.

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. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

VINALL, R. L. *et al.* Combination treatment of prostate cancer cell lines with bioactive soy isoflavones and perifosine causes increased growth arrest and/or apoptosis. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 20, p. 6204-6216, 2007.

VIOLANTE, G. *et al.* Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 12, p. 1600-1603, 2002.

VOGEL, C. L. *et al.* Toremifene for breast cancer: a review of 20 years of data. **Clinical Breast Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2014.

WANG, J. J. *et al.* Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 12, p.3855-3864, 2018.

WEISS, R. A.; PETER, K. V. 100 Years of rous sarcoma virus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 12, p.2351-2355, Nov. 2011.

WELLCOME SANGER INSTITUTE. **Genomics of drug sensitivity in cancer**. Disponível em: <https://www.cancerrxgene.org/compound/Doxorubicin/133/overview/ic50?>. Acesso em: 28 jan. 2020.

WELSHONS, W. V. *et al.* Estrogenic activity of phenol red. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 57, n. 3, p. 169-178, 1988.

WITSCH, E.; SELA, M.; YARDEN, Y. Roles for growth factors in cancer progression. **Physiology**, v. 25, n. 2, p. 85-101, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/cancer>. Acesso em: 21 ago. 2021.