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

TALITA ALVARENGA VALDES

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)

São Carlos
2019

TALITA ALVARENGA VALDES

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)

VERSÃOCORRIGIDA

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

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO 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 com os dados inseridos pelo (a) autor(a).

Valdes, Talita Alvarenga
V145a 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) / Talita Alvarenga Valdes; orientador Andrei Leitão. São Carlos, 2019.

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, 2019.

1. Ensaios celulares. 2. Câncer de próstata. 3. Câncer de fígado. 4. Câncer de mama. 5. Inibidores da Via PI3K-AKT-mTOR. 6. Migração celular. 7. Terapia combinada. 8. Resposta fenotípica. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

TALITA ALVARENGA VALDES

Título: "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)"

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Data da defesa: 20/02/2019

Prof. Dr. Andrei Leitão (Orientador)	Instituto de Química de São Carlos / USP
Assinatura: Andrei Leitão	Não votante

Prof(a). Dr(a). Ana Carolina Baptista Moreno Martin	Universidade Federal de São Carlos
Assinatura:	Resultado: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Kamilla Swiech Antonietto	FCFRP/USP
Assinatura:	Resultado: Aprovado

Prof(a). Dr(a). João Agostinho Machado Neto	ICB/USP
Assinatura: Andrei Leitão	Resultado: Aprovada

Homologado em:____/_____/_____

A minha mãe pelo amor, carinho e por sempre acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a minha mãe por todo cuidado, paciência, e principalmente, por nunca ter deixado de acreditar em mim, nem por um minuto. Eu te amo demais!

A minha família pelo amor, carinho e união. A energia de vocês é contagiante e linda, sempre fazem com que todos se sentam especiais e amados. Mesmo longe vocês sempre se mantiveram presente e me ensinaram o que é família. Agradeço por torcerem por mim!

Ao meu companheiro Thiago, pelo forte apoio, amor, parceria e paciência durante toda a minha jornada até aqui, nunca deixando de acreditar na minha capacidade de alcançar os meus objetivos e sempre me incentivando a correr atrás dos meus sonhos. Eu te amo.

A todos os amigos que fiz no decorrer da minha vida, em especial aos amigos da graduação e aos que tive o privilégio de morar junto. Destaco minha gratidão as minhas amigas dudugas, a família que tive a sorte de conhecer nessa cidade que abrigou alguns dos melhores anos da minha vida. Vocês são incríveis.

Agradeço meu amigo Rafa por ter me despertado, nada faria sentido se não fosse o nosso encontro. Você sempre será muito especial!

Ao Prof. Dr. Andrei Leitão, pela orientação, confiança, paciência e cuidado com os alunos. Agradeço pela disponibilidade conosco e por nunca menosprezar qualquer dúvida de aluno, por mais básicas que fossem.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari, agradeço por me permitir fazer parte do Grupo de Química Medicinal (NEQUIMED), à técnica Fabiana, por todo amparo nas questões laboratoriais, a todos os colegas de grupo e, em especial, aos colegas de laboratório que sempre estenderam a mão para me ajudar de alguma forma. Ao Ariel e a Daiane agradeço com todo meu coração, não só a amizade, mas todo o suporte durante o mestrado.

A Universidade de São Paulo, ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC), ao programa de Pós-graduação Interunidades em Bioengenharia e todos seus funcionários.

Aos órgãos de fomento FAPESP, CNPq e especialmente, CAPES, pelo apoio financeiro para que esse trabalho pudesse ser realizado e pelo incentivo à pesquisa em nosso país.

A todos os professores que já tive na vida, obrigada!

“Do or do not. There is no try”

Mestre Yoda (1980)

RESUMO

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).** 2018. 116f. 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, 2018.

O câncer é um conjunto de doenças caracterizado pelo crescimento desordenado e incontrolável de células capazes de, por meio de diversas alterações metabólicas, colonizar novos tecidos e órgãos determinando a formação de novos tumores. Atualmente 8,2 milhões de pessoas morrem de câncer no mundo e estima-se que em 2018 haverá o aumento de 600 mil novos casos de câncer no Brasil, sendo necessário identificar novas substâncias químicas com interesse farmacológico antineoplásico. Neste contexto, ensaios celulares apresentam grande relevância para a identificação de substância com novos mecanismos de ação. Neste estudo, foram realizados ensaios citotóxicos, de migração celular e de terapia combinada para uma série de compostos usando linhagens de câncer de mama (MDA-MB-231), fígado (HepG2), próstata (PC-3 e DU 145) e uma não tumoral de fibroblasto (Balb/C 3T3 clone A31). Foram utilizadas substâncias químicas de referência com diferentes mecanismos de ação e substâncias bioativas com atividade citotóxica (inibidores de quinase) ou citostática (inibidores de cisteíno proteases), desenvolvidas pelo grupo NEQUIMED. Dentre os compostos de referência que atuam na via de sinalização PI3K-AKT-mTOR, o AZD-8055 (inibidor competitivo ao ATP da mTOR) apresentou o melhor perfil farmacológico, com alta potência e seletividade. Dentre as novas moléculas citotóxicas, Neq0438 e Neq0440 demonstraram ser seletivos para a linhagem PC-3 frente a todas as outras analisadas. Além disto, alguns dos inibidores de cisteíno proteases inibiram a migração celular. Quando administradas conjuntamente com as substâncias de referência, estes inibidores levaram a sinergia em várias combinações, sendo que Doxorrubicina + Neq0780 apresentou um aumento na potência de 33 vezes em comparação com a monoterapia para MDA-MB-231. Estes resultados compelem novas análises de combinação com novas substâncias desenvolvidas, além de estimular investigações do mecanismo de morte celular gerado pela combinação Doxorrubicina+Neq0780.

Palavras-chave: Ensaios celulares. Câncer de próstata. Câncer de fígado. Câncer de mama. Inibidores da via PI3K-AKT-mTOR. Migração celular. Terapia combinada. Resposta fenotípica.

ABSTRACT

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).** 2018. 116f. 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, 2018.

Cancer is a set of diseases characterized by the disordered and uncontrollable growth of cells capable of, through various metabolic alterations, colonize new tissues and organs, thus, forming new tumors. Currently 8.2 million people die of cancer in the world and it is estimated that in 2018 there will be an increase of 600 thousand new cases of cancer in Brazil, turning out to be necessary to develop new candidates for this disease. In this context, cell assays have great relevance for the identification of substances with new mechanisms of action. Here, cytotoxic, cell migration and combined therapy assays were used for a set of compounds using breast (MDA-MB-231), liver (HepG2) and prostate (PC-3 e DU 145) cancer lines, including fibroblast (Balb/C 3T3 clone A31) as a non-tumoral. Reference chemicals with different mechanisms of action and bioactive substances with cytotoxic (kinase inhibitors) or cytostatic activity (inhibitors of cysteine proteases) were used, developed by the NEQUIMED group. Among the reference compounds that act on the PI3K-AKT-mTOR pathway, AZD-8055 (the ATP competitive inhibitor for mTOR) had the best pharmacological profile, with high potency and selectivity. Out of the set of new molecules, Neq0438 and Neq0440 showed selectivity toward PC-3 linage. Moreover, some cysteine protease inhibitors could reduce the cell migration process. These compounds were combined with the reference ones, which led to synergy in many cases. The best combination was Doxorrubicina + Neq0780, with potency increment of 33 times in comparison with the monotherapy for MDA-MB-231. The results achieved are now subject for new analyses involving the combined therapy using novel chemicals, and stimulate the study of the cell death mechanism triggered by the combination of Doxorrubicina+Neq0780.

Key words: Cell-based assays. Prostate cancer. Liver cancer. Breast cancer. Inhibitors of the PI3K-AKT-mTOR pathway. Cell migration. Combined therapy. Phenotypic response.

LISTA DE FIGURAS

.

Figura 1 – Dados globais de incidência do câncer no ano de 2012 ..... **28**
Figura 2 – Dados globais de mortalidade por câncer no ano de 2012 ..... **28**
Figura 3 – Estimativa dos cinco principais tipos de câncer em homens e mulheres no biênio 2018-2019 para o Brasil **29**
Figura 4 – Processo de formação e desenvolvimento do câncer **31**
Figura 5 – *Hallmarks* que atuam na formação do microambiente tumoral **34**
Figura 6 – Processo de formação de metástase **36**
Figura 7 – Representação da via de sinalização mTOR **42**
Figura 8 – Esquema simplificado da atuação dos inibidores da via de sinalização PI3K-AKT-mTOR e suas estruturas químicas **44**
Figura 9 – Representação estrutural da doxorrubicina e YM 155 ..... **46**
Figura 10 – Estruturas químicas das substâncias testadas quanto a atividade citotóxica **48**
Figura 11 – Derivados de dipeptidil nitrilas testados na análise citostática **50**
Figura 12 – Morfologia das linhagens celulares utilizadas nesse estudo **55**
Figura 13 – Mapeamento da placa de 96 poços para a triagem das substâncias químicas **59**
Figura 14 – Mapeamento da placa de 24 poços do ensaio de fechamento da risca **61**
Figura 15 – Mapeamento da placa de 96 poços do ensaio para terapia combinada **62**
Figura 16 – Viabilidade celular na linhagem Balb/C 3T3 clone A31 (fibroblasto de camundongo) utilizada como controle para as substâncias da primeira série **64**
Figura 17 – Viabilidade celular obtida usando a primeira série de substâncias na linhagem de câncer de próstata DU 145 ..... **65**
Figura 18 – Viabilidade celular obtida usando a primeira série de substâncias na linhagem PC-3 de câncer de próstata **66**
Figura 19 – Viabilidade celular obtida usando a primeira série de substâncias na linhagem de hepatocarcinoma (HepG2) **67**
Figura 20 – Viabilidade celular obtida usando a primeira série de substâncias na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 ..... **68**
Figura 21 – Curvas concentração-resposta das substâncias de referência na linhagem DU 145 e no controle (Balb/C 3T3 clone A31) **69**
Figura 22 – Curvas concentração-resposta das substâncias químicas na linhagem PC-3 e no controle (Balb/C 3T3 clone A31) **71**

Figura 23 – Curvas concentração-resposta das substâncias de referência na linhagem HepG2 e no controle (Balb/C 3T3 clone A31) **75**
Figura 24 – Curvas concentração-resposta das substâncias de referência na linhagem MDA-MB-231 e no controle (Balb/C 3T3 clone A31) **79**
Figura 25 – Triagem da segunda série de substâncias químicas na linhagem Balb/C 3T3 clone A31 para determinação da atividade citotóxica **83**
Figura 26 – Triagem da atividade citotóxica da segunda série de substâncias químicas nas linhagens tumorais de próstata (DU 145 e PC-3), fígado (HepG2) e mama (MDA-MB-231) **83**
Figura 27 – Padronização da concentração de plaqueamento para o ensaio de migração celular (*Wound Healing*) nas linhagens DU 145 (A), PC-3 (B), HepG2 (C) e MDA-MB-231 (D), no tempo de 0, 24 e 48 h, respectivamente **86**
Figura 28 – Análise da inibição da migração celular por meio do fechamento de risca para a linhagem de neoplasia prostática metastática DU 145 após 24 e 48 h de incubação com concentrações de 1 e 10 µM das substâncias de interesse **88**
Figura 29 – Análise da inibição da migração celular por meio do fechamento de risca para a linhagem de neoplasia prostática metastática PC-3 após 24 e 48 h de incubação com concentrações de 1 e 10 µM das substâncias de interesse **89**
Figura 30 – Análise da inibição da migração celular por meio do fechamento de risca para a linhagem de neoplasia prostática metastática HepG2 após 24 e 48 h de incubação com concentrações de 1 e 10 µM das substâncias de interesse **90**
Figura 31 – Análise da inibição da migração celular por meio do fechamento de risca para a linhagem de neoplasia prostática metastática MDA-MB-231 após 24 e 48 h de incubação com concentrações de 1 e 10 µM das substâncias de interesse **91**
Figura 32 – Curvas concentração-resposta da combinação das substâncias de referência (Doxorrubicina ou NVP-BKM 120) com a concentração fixa de nitrila Neq0851 (10 µM) para a linhagem DU 145 ..... **94**
Figura 33 – Curvas concentração-resposta da combinação das substâncias de referência (AZD-8055, BEZ 235 ou Doxorrubicina) com a concentração fixa de nitrila Neq0850 ou Neq0827 (10 µM) para a linhagem PC-3 ..... **95**
Figura 34 – Curvas concentração-resposta da combinação da substância de referência (AZD-8055) com a concentração fixa das nitrilas (10 µM) para a linhagem HepG2 ..... **97**
Figura 35 – Curvas concentração-resposta da combinação da substância de referência (Doxorrubicina) com a concentração fixa das nitrilas (10 µM) para a linhagem HepG2 ..... **98**

Figura 36 – Curvas concentração-resposta da combinação da substância de referência (AZD-8055) com a concentração fixa das nitrilas (10 µM) para a linhagem MDA-MB-231 ..... **101**
Figura 37 – Curvas concentração-resposta da combinação da substância de referência (BEZ 235) com a concentração fixa das nitrilas (10 µM) para a linhagem MDA-MB-231 ..... **101**
Figura 38 – Curvas concentração-resposta da combinação da substância de referência (Doxorrubicina) com a concentração fixa das nitrilas (10 µM) para a linhagem MDA-MB-231 ..... **102**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Substâncias químicas utilizadas nos ensaios celulares **53**
Tabela 2 – Substâncias e linhagens celulares selecionadas para estudos mais detalhados **68**
Tabela 3 – Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}), o ajuste do modelo (R^2/Sy.x) e o índice de seletividade (SI) para as linhagens DU 145 e Balb/C **70**
Tabela 4 – Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}), o ajuste do modelo (R^2/Sy.x) e o índice de seletividade (SI) para as linhagens PC-3 e Balb/C **72**
Tabela 5 – Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}), o ajuste do modelo (R^2/Sy.x) e o índice de seletividade (SI) para as linhagens HepG2 e Balb/C **76**
Tabela 6 – Sumário dos dados das curvas concentração-resposta constando a potência (IC_{50}), o ajuste do modelo (R^2/Sy.x) e o índice de seletividade (SI) para as linhagens MDA-MB-231 e Balb/C **80**
Tabela 7 – Linhagens celulares e substâncias de referência selecionadas para serem aplicadas no estudo de terapia combinada **82**
Tabela 8 – Substâncias bioativas selecionadas para o ensaio de migração celular **85**
Tabela 9 – Concentrações de células utilizadas para o plaqueamento no ensaio de fechamento de risca de acordo com cada linhagem celular **87**
Tabela 10 – Substâncias químicas selecionadas para o estudo de terapia combinada, bem como as linhagens cancerígenas às quais foram aplicadas as combinações **93**
Tabela 11 – Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}) e sua variação, o ajuste do modelo (R^2/Sy.x) para as substâncias de referência (Doxorrubicina e NVP-BKM 120) em monoterapia ou combinadas com o Neq0851 a 10 µM na linhagem DU 145.....**94**
Tabela 12 – Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}) e sua variação, o ajuste do modelo (R^2/Sy.x) para as substâncias de referência (AZD-8055, BEZ 235 ou Doxorrubicina) em monoterapia ou combinadas com o Neq0850 ou Neq0827 a 10 µM na linhagem PC-3 ..... **95**
Tabela 13 – Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}) e sua variação, o ajuste do modelo (R^2/Sy.x) para as substâncias de referência (AZD-8055 ou

Doxorrubicina) em monoterapia ou combinadas com as nitrilas a 10 µM na linhagem HepG2 ..... **99**

Tabela 14 – Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}) e sua variação, o ajuste do modelo (R^2/Sy.x) para as substâncias de referência (AZD-8055, BEZ 235 ou Doxorrubicina) em monoterapia ou combinadas com as nitrilas a 10 µM na linhagem MDA-MB-31 ..... **103**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ºC	_	Graus Celsius
µM	_	Micromolar
µL	_	Microlitro
A	_	Área
AIDS	_	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AKT	_	Proteína quinase B
AZD	_	AZD-8055
Bcl-2	_	B-cell lymphoma 2 (proteína reguladora de apoptose)
BCRJ	_	Banco de Células do Rio de Janeiro
BEZ	_	BEZ 235
BRCA	_	Proteínas de reparo do DNA
CaP	_	Câncer de próstata
CO_2	_	Dióxido de carbono
DMEM	_	Meio de cultura Delbecco Eagle modificado
DMSO	_	Dimetilsufóxido
DNA	_	Ácido Desoxirribonucleico
Doxo	_	Doxorrubicina
EDTA	_	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F12-K	_	Nutriente HAM F-12
FaS	_	Receptor de membrana que leva a morta celular programada
FBS	_	Soro Fetal Bovino
FRB	_	Domínio da proteína mTOR
g	_	Grama
g/mL	_	Grama por mililitro
HC	_	Hepatocarcinoma
HIV	_	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	_	Papilomavirus humano
HTLV-I	_	Vírus linfotrópico de células T humanos tipo 1
IARC	_	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IC_{50}	_	Valor referência a 50% de inibição de um composto
ICCVAM	_	National Toxicology Program

INCA	_	Instituto Nacional do Câncer
Log	_	Logaritmo (base 10)
mL	_	Mililitro
MMP`s	_	Metaloproteinases
mTOR	_	Alva da Rapamicina em Mamíferos
MTT	_	Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazólio
NA	_	Não ativo
$NaHCO_3$	_	Bicarbonato de sódio
Neq	_	Sigla das Substâncias bioativas desenvolvidas pelo grupo NEQUIMED
nM	_	Nanomolar
NVP	_	Inibidor competitivo ao ATP em PI3K
p53	_	Proteína citoplasmática relacionada a morte celular
PBS	_	Tampão fosfato-salino
PDK1	_	Phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PI3K	_	Fosfatidilinositol-3-quinase
PIP_2	_	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PIP3	_	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
pRB	_	Proteína supressora de tumor relacionada a mecanismos de reparo
PTEN	_	Proteína supressora de tumor que regula AKT
RPM	_	Rotação por minuto
ROS	_	Espécies reativas de oxigênio
S6K	_	Proteína ribossomal S6
SDS	_	Dodecilsulfato de sódio
SeC	_	Selenocistina
SI	_	Índice de Seletividade
TGF-β	_	Fator de crescimento tumoral beta
v/v	_	Concentração volume/volume
YM-155	_	Brometo de Sepantrônio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 27

1.1. Epidemiologia do câncer 27

1.2. Características do câncer 30

1.2.1. Definição 30

1.2.2. Desenvolvimento e causas 30

1.2.3. Metástase 35

1.3. Tipos de câncer 36

1.3.1. Câncer de próstata 36

1.3.2. Câncer de fígado 37

1.3.3. Câncer de mama 38

1.4. Ensaios Celulares 39

1.5. Substâncias químicas 40

1.5.1. Substâncias de referência 40

1.5.1.1. Inibidores da via PI3K-AKT-mTOR 40

1.5.1.2 Demais substâncias antineoplásicas 44

1.5.2. Substâncias de interesse 46

2. OBJETIVOS 51

3. MATERIAL E MÉTODO 52

3.1. Materiais 52

3.1.1. Meios de cultura 53

3.1.2. Linhagens celulares 53

3.2. Método 56

3.2.1. Manutenção celular 56

3.2.2. Análise da citotoxicidade - viabilidade celular 56

3.2.3. Ensaio de migração celular (*Wound Healing*) 60

3.2.4. Terapia Combinada 61

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 63

4.1. Análise da citotoxicidade da primeira série de substâncias 63

4.1.1. Triagem nas linhagens celulares 63

4.1.2. Ensaios quantitativos: curvas concentração-resposta 69

4.2. Avaliação da atividade citostática da segunda série de substâncias 82

4.2.1. Triagem nas linhagens celulares 82

4.2.2. Ensaio de fechamento de risca (*Wound healing*) 85

4.3. Terapia Combinada 92

4.3.1. Linhagens de neoplasia prostática metastática (PC-3 e DU 145) 93

4.3.2. Linhagem de hepatocarcinoma (HepG2) 96

4.3.3. Linhagem de câncer de mama (MDA-MB-231) 100

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS 105

REFERÊNCIAS 106

1. INTRODUÇÃO

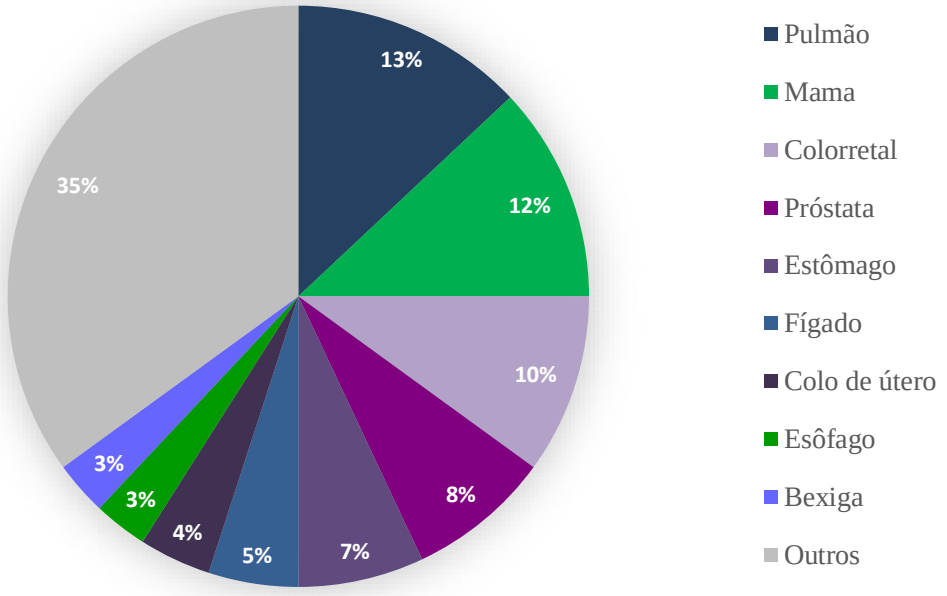
O câncer é definido como uma série de doenças decorrentes de alterações genéticas que podem ser de causas ambientais ou hereditárias. Atualmente o câncer é uma das doenças que mais acomete e mata pessoas em todo o mundo, com perspectivas elevadas de incidência e morte para os próximos anos. Esse cenário descreve a importância no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da doença (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, 2018a; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS, 2018).

1.1. Epidemiologia do câncer

O desenvolvimento e uso de quimioterápicos no tratamento do câncer tem revelado avanços, com aumento da expectativa e qualidade de vida dos pacientes. No entanto, a progressão da resistência às terapias convencionais leva a uma constante pesquisa pela ampliação e aprimoramento do tratamento desta doença, especialmente pelo fato de sua endemia global. De acordo com a Organização Mundial da saúde, o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, representando 1 a cada 6 óbitos. Somente em 2015 foram reportadas cerca de 8,8 milhões de mortes relacionadas à doença (OMS, 2018).

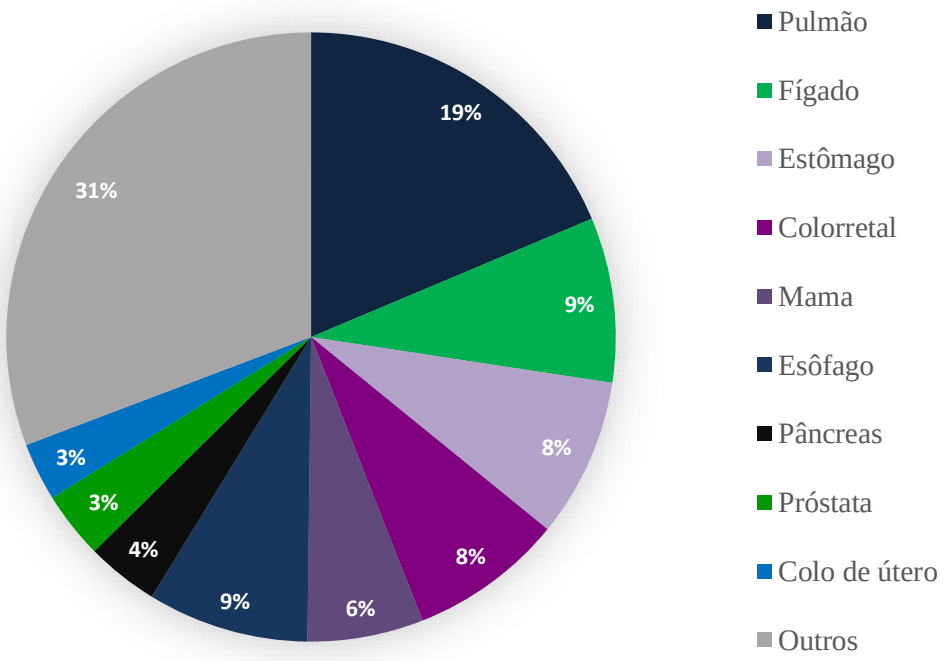
A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) disponibiliza relatórios periódicos que descrevem dados de distribuição e mortalidade de neoplasias malignas em todo o mundo (Figuras 1 e 2). De acordo com o último relatório, em 2012 foram reportados cerca 14 milhões de novos casos. A expectativa é que esses valores aumentem significativamente até 2030, podendo chegar a 30 milhões de novos diagnósticos, com taxa de mortalidade estimada em 13 milhões a cada ano (STEWART; WILD, 2014).

Figura 1. Dados globais de incidência do câncer no ano de 2012.



Fonte: Adaptado de Stewart e Wild (2014).

Figura 2. Dados globais de mortalidade por câncer no ano de 2012.



Fonte: Adaptado de Stewart e Wild (2014).

De modo geral, a incidência do câncer é observada, em sua maioria, nos países mais desenvolvidos. Em regiões como América do Norte, Europa Ocidental, Japão, Coreia do Sul, Austrália e Nova Zelândia, predominam-se as neoplasias associadas à urbanização e desenvolvimento, tais como: câncer de pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto. Em países de menor desenvolvimento é alta a ocorrência de cânceres relacionados a infecções, como: câncer no colo do útero, estômago, esôfago e fígado (FERLAY et al., 2012).

No Brasil, a partir de 2018, estima-se a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer a cada ano (INCA, 2018a). O câncer de pele não melanoma está no topo de maior incidência, representando 170 mil novos casos, seguido dos cânceres de próstata, pulmão, mama feminina, cólon e reto. Também é preciso destacar alta prevalência dos cânceres de colo de útero, estômago e esôfago. Os índices de incidência quando ajustados por gênero e faixa etária correspondem às taxas de países em desenvolvimento (INCA, 2018a). A Figura 3 descreve as porcentagens da expectativa dos principais tipos de câncer, em homens e mulheres, previstos para a população brasileira no biênio 2018-2019, de acordo com o INCA (2018a).

Figura 3. Estimativa dos cinco principais tipos de câncer em homens e mulheres no biênio 2018-2019 para o Brasil.

Fonte: Adaptado de INCA (2018a)

1.2. Características do câncer

1.2.1. Definição

Neoplasias benignas ou malignas são descritas como aglomerados anormais de células. São originados da proliferação celular persistente, descontrolada e em excesso (ALBERTS et al., 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

Neoplasias benignas são descrita como tumores celulares com formato bem delimitado, crescimento lento e expansivo. As células que compõem a massa tumoral são semelhantes às dos tecidos normais. Além disso, não são capazes de invadir outros tecidos e órgãos. Esse tipo de tumor, na maioria das vezes, apresenta baixa reincidência após extração (ALBERTS et al., 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

As neoplasias malignas, também conhecidas como “câncer”, compreendem o conjunto de doenças que apresenta como característica comum o crescimento desordenado, agressivo e incontrolável de células, sendo capazes de invadir órgãos e tecidos, espalhando-se por diversas regiões do corpo (metástase) (INCA, 2018b). A neoplasia estimula a proliferação de novos vasos sanguíneos e outros fatores que alteram as vias de sinalização celular (ALBERTS et al., 2011; DOXIE; IRISH, 2014). As características que diferenciam os tipos de câncer são explicadas pela velocidade de multiplicação das células, capacidade metastática e natureza morfológica celular (INCA, 2018a, b).

1.2.2. Desenvolvimento e causas

As células anormais de câncer se desenvolvem fora de sua homeostasia tornando-se imortalizadas. Além da imortalidade, outras características que o difere de neoplasias benignas são: crescimento rápido, potencial metastático e agressividade da doença. (ALBERTS et al., 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

A formação de tumores se inicia com exposição do indivíduo a agentes carcinogênicos que, a longo prazo, poderão promover danos no DNA, acumulando mutações em genes que regulam vias essenciais. As alterações genéticas promovem proliferações descontroladas responsáveis pela formação de tumores (Figura 4). Uma vez originada, a neoplasia primária (tumor no tecido original), passará por sucessivas etapas de divisão celular, promovendo mudanças morfológicas e metabólicas que, juntamente com alterações nas vias de sinalização,

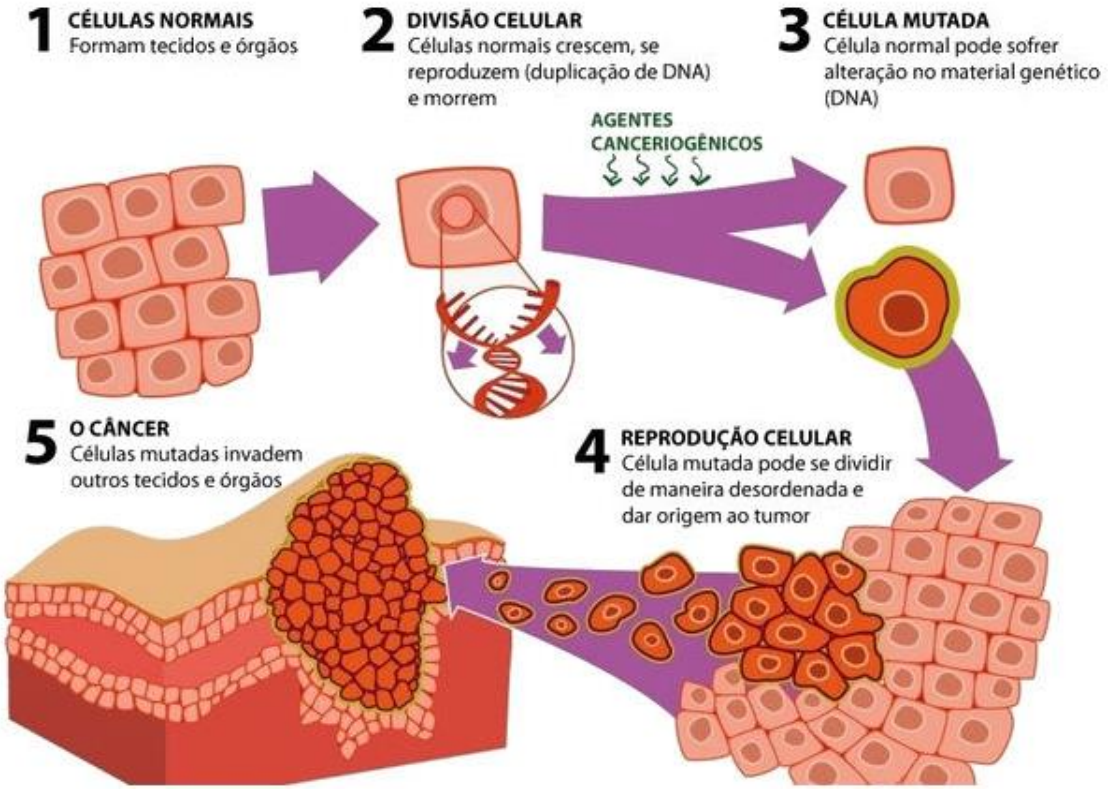
resultará em invasão, migração e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2014; VALASTYAN; WEINBERG, 2011)

As causas do câncer são variadas, podendo estar relacionados às condições (INCA, 2018b):

- Ambientais: exposição a agentes químicos, radiação solar, poluição, entre outros;
- Sociais e culturais: tabagismo, alcoolismo, dietas alimentares pobres em nutrientes, uso de drogas e medicamentos, obesidade e comportamento sexual que favoreça a contaminação por agentes sexualmente transmissíveis relacionados à incidência de câncer, como: HPV (câncer no colo do útero), HIV (sarcoma de Kaposi, câncer de língua e reto), Hepatite B (câncer de fígado), HTLV-I (leucemias e linfoma de linfócito-T);
- Fatores genéticos pré-determinados, como mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, relacionados à incidência do câncer de mama e mutações no gene supressor de tumor p53 (INCA, 2018c).

Dentre todos os fatores que podem causar câncer, 80% estão associados a contextos ambientais (INCA, 2018b).

Figura 4. Processo de formação e desenvolvimento do câncer.



Fonte: Adaptado de Maciel (2017)

Segundo Hanahan e Weinberg (2000), a complexidade do câncer pode ser explicada por *hallmarks*, que são características comuns compartilhadas e que levam a transformação de células normais em células cancerosas. Estas características compreendem aspectos como:

Autonomia em sinais de crescimento: células cancerosas têm capacidade de produzir a própria sinalização autócrina, ao contrário de células sadias que dependem de fatores de crescimento para se multiplicarem (HANAHAN; WEINBERG, 2011; LEMMON; SCHLESSINGER, 2010).

Insensibilidade aos supressores de crescimento: para monitorar a divisão celular as células sadias apresentam genes supressores de tumor que codificam proteínas que atuam rigorosamente selecionando as células viáveis para divisão e impedindo a multiplicação de células que apresentem algum tipo de dano. No câncer, as proteínas supressoras de tumor apresentam alterações que evitam a seleção de células defeituosas. Outra característica relacionada aos sinais anti-crescimento é a ausência de inibição de contato pelas células cancerosas. Em células saudáveis, ocorre a parada da divisão celular quando elas entram em contato entre si. No entanto, nas células de câncer, o processo de mitose não apresenta inibição de contato e elas crescem e se dividem independente de seu entorno (MCCLATCHEY; YAP, 2012; WITSCH; SELA; YARDEN, 2010).

Resistência à morte celular: a morte celular programada, mais conhecida como apoptose, é uma estratégia vantajosa, característica de organismos multicelulares, e que favorece a manutenção do equilíbrio celular por meio de estímulos fisiológicos (GREEN, 2011). Esse sofisticado mecanismo é responsável pela destruição de células e organelas não funcionais, estruturas anatômicas ao longo da vida e são importantes na eliminação de células danificadas, como é o caso das células cancerosas. O processo é altamente regulado e mediado por receptores FaS e cascatas de proteólise (caspases) (HANAHAN; WEINBERG, 2000), enquanto alguns membros da família de proteínas Bcl-2 inibem esse processo (ADAMS; CORY, 2007). As células cancerosas são capazes de contornar o sistema de controle, mesmo quando possuem aberrações. Esta característica ocorre pela alteração dos mecanismos detectores de danos e anormalidades, como: sinalização intracelular inadequada e alterações nas proteínas envolvidas na apoptose (ELMORE, 2007).

Potencial replicativo ilimitado: as células sadias não têm capacidade de se dividirem infinitamente 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. Células de câncer são capazes de modular a expressão e atividade de enzimas que podem aumentar o comprimento dos telômeros, tornando-se capazes de se dividir indefinidamente sem iniciar a

senescência. A desativação de proteínas supressoras de tumor pRB e p53, permite que as células cancerosas continuem se duplicando (GREENBERG, 2005).

Indução angiogênica: o processo de angiogênese é descrito pela síntese de novos vasos sanguíneos que distribuem e liberam oxigênio e nutrientes para todas as células do corpo. As células cancerígenas são capazes de orquestrar esse processo, garantindo que as células recebam um suprimento contínuo de oxigênio e nutrientes. Para isto, manipulam os fatores que inibem e ativam a produção de vasos sanguíneos, controlados pelas células sadias (BERGERS; BENJAMIN, 2003).

Invasão tecidual e metástase: um dos atributos de células cancerosas é a capacidade da célula primária em invadir o tecido adjacente, estimular a proliferação de vasos sanguíneos, migrar e sobreviver ao ambiente hostil circulatório, se alojar em diversas regiões do corpo, para então, começar a se multiplicar no novo tecido (TALMADGE; FIDLER, 2010). As células cancerosas passam por uma infinidade de alterações para estarem aptas à metástase. O processo ocorre em diversas etapas das quais participam proteínas reguladoras de transporte, invasão e adesão celular (SUN et al., 2018). O potencial metastático também configura a malignidade da doença, uma vez que neoplasias benignas possuem crescimento organizado, lento e apresentam limites bem definidos (INCA, 2018c).

Hanahan e Weinberg (2011) incluíram 4 novas características que compuseram a nova geração de *hallmarks*, são elas:

Desregulação metabólica: as células de câncer são capazes de regular a glicólise e a fermentação do ácido lático, impossibilitando as mitocôndrias de completarem a respiração aeróbica normalmente, esse processo contribui para a hiperpolarização da membrana mitocondrial impedindo o processo apoptótico (FORREST, 2015).

Instabilidade genômica e mutação: é comum células cancerosas apresentarem anormalidades cromossômicas que se acentuam à medida que a doença progride, favorecendo o crescimento e invasão tecidual, além de sofrerem mutações em uma velocidade muito maior quando comparadas às células sadias (NEGRINI; GORGOULIS; HALAZONETIS, 2010).

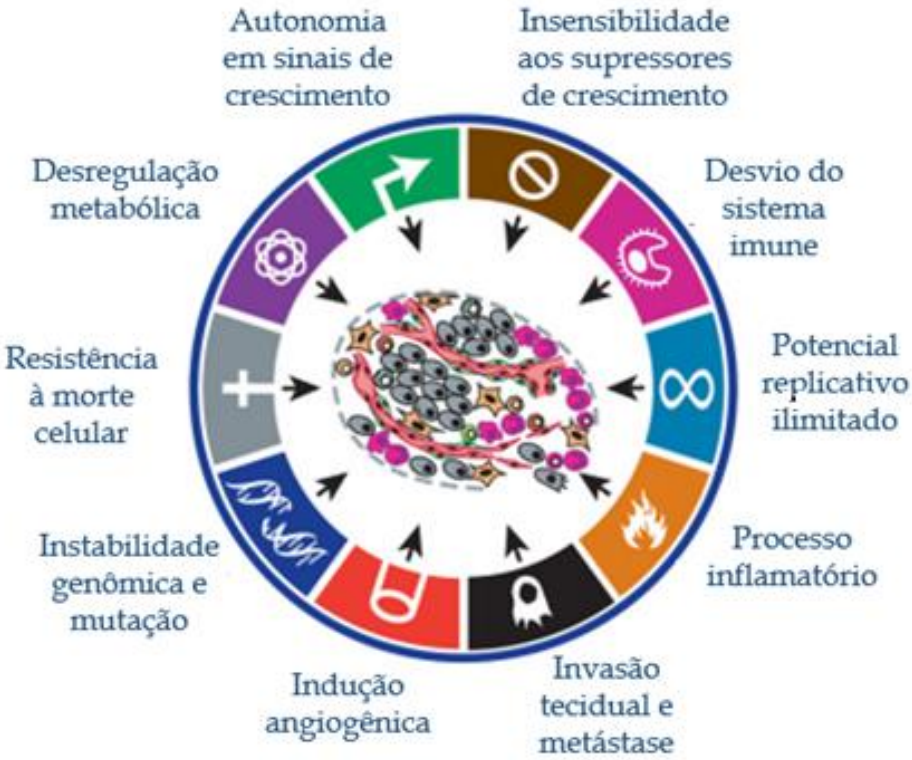
Escape do sistema imune: células cancerosas são capazes de escapar da ação do sistema imunológico, inibindo a atividade de células imunológicas secretando TGF-β e outros fatores imunossupressores (YANG; PANG; MOSES, 2010).

Inflamação: descobertas recentes destacam o papel da inflamação crônica local na indução de muitos tipos de câncer. A inflamação contribui para a angiogênese, favorecendo processos metastáticos (PAGÈS et al., 2010).

Todos esses fatores associados descrevem uma maior complexidade no desenvolvimento e crescimento de tumores. O que antes era tido como um conjunto de células alteradas em proliferação (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010), hoje é compreendido como um microambiente onde há interação de elementos celulares e moleculares que são determinantes na progressão tumoral. O microambiente tumoral inclui os vasos sanguíneos adjacentes, células do sistema imunológico, fibroblastos, linfócitos, moléculas sinalizadoras, matriz extracelular, entre outros componentes (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Os tumores têm potencial de controlar o microambiente enviando sinais extracelulares que favorecem o processo angiogênico que será determinante na formação de metástase.

A Figura 5 descreve os *Hallmarks* propostos por Hanahan e Weinberg (2011) dos quais são fundamentais para a formação e desenvolvimento de tumores, além de serem a base para a formação do microambiente tumoral.

Figura 5. *Hallmarks* que atuam na formação do microambiente tumoral.



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011)

1.2.3. Metástase

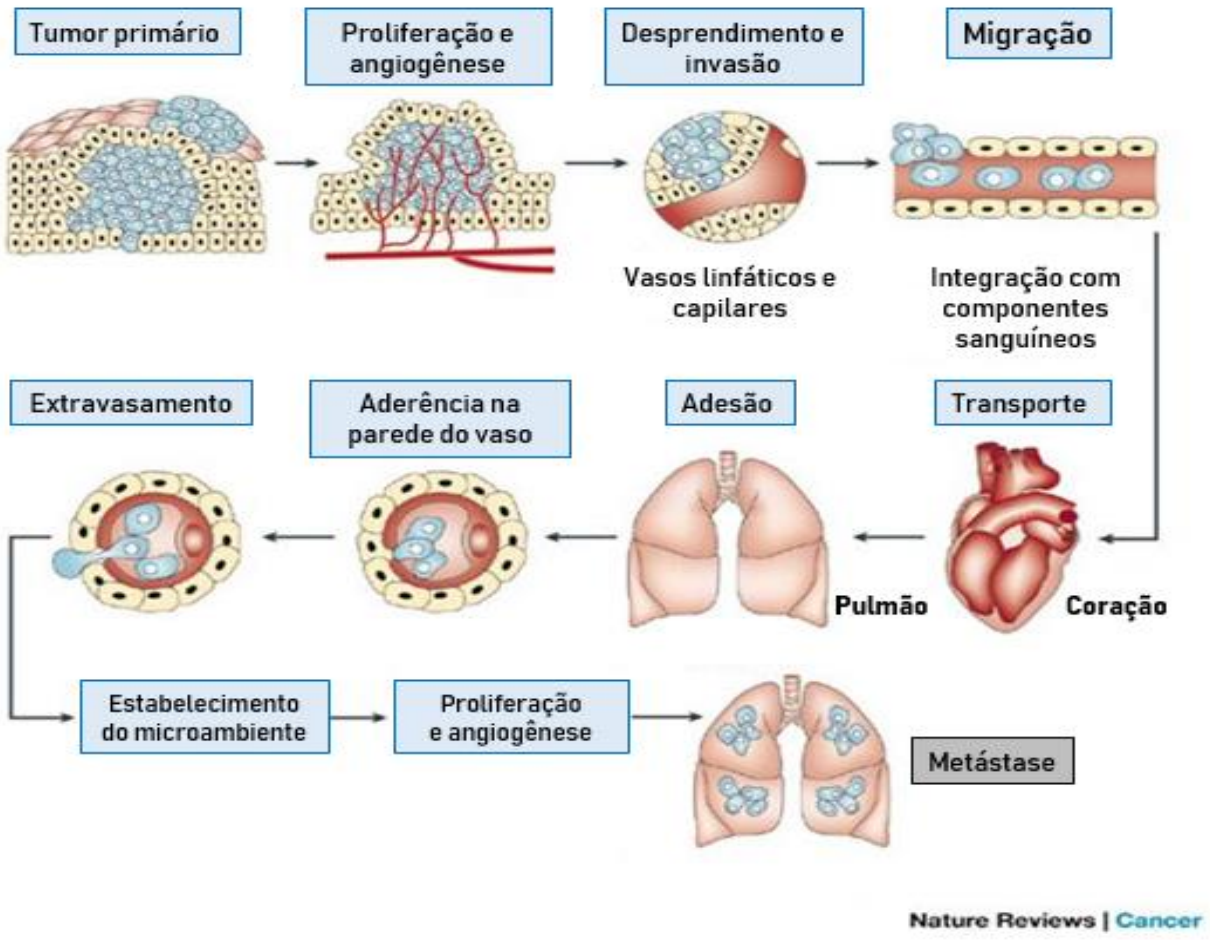
Uma vez formada a massa tumoral, as células cancerígenas, na maioria das vezes, podem se desprender do tumor original e se alojar em outros tecidos e órgãos, originando novos tumores (Figura 6). Esse novo tumor é denominado metastático (BROOKS et al., 2010; FIDLER, 2003; GEIGER; PEEPER, 2009).

A incidência e a evolução da metástase estão relacionadas com o tipo de câncer, grau da doença, tamanho e localização do tumor primário e resposta ao tratamento. A ocorrência pode se dar de forma rápida, espalhando-se por diversas regiões do corpo, ou lentamente, levando cerca de anos para ser diagnosticada (GEIGER; PEEPER, 2009; PERRET; CRÉPIN, 2008). Um dos maiores desafios atuais da quimioterapia é a eliminação de metástases, o que leva a um prognóstico desencorajador, classificando a neoplasia no seu risco mais alto (CHEN et al., 2017; COOPERBERG; BROERING; CARROLL, 2009), uma vez que a metástase compreende a maior causa de morte por câncer (PERRET; CRÉPIN, 2008).

As falhas nos pontos de controle durante a replicação celular e falhas nas vias de sinalização, são fatores biológicos associados ao surgimento de metástase.

As células cancerígenas mantêm íntimo contato com seu ambiente tumoral. As metaloproteinases (MMPs) são enzimas proteolíticas importantes para a degradação da matriz extracelular e sua ação é fundamental para a migração e invasão das células tumorais em outros tecidos (HANAHAN; WEINBERG, 2011; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2014; VALASTYAN; WEINBERG, 2011). Além das MMPs, outro mecanismo essencial para os processos metastáticos são os fatores angiogênicos que atuam como indutores na formação de vasos sanguíneos e linfáticos. Seu papel é muito importante na irrigação do tumor, invasão e migração celular na corrente sanguínea (JOYCE; POLLARD, 2009).

Figura 6. Processo de formação de metástase.



Fonte: Adaptado de Fidler (2003)

1.3. Tipos de câncer

1.3.1. Câncer de próstata

A próstata é uma glândula exócrina do tamanho de uma noz, localizada entre a bexiga e a pélvis masculina, compondo parte do sistema reprodutor do homem. A função da próstata humana é produzir e armazenar um fluido alcalino que, juntamente com o líquido seminal, compõe o sêmen (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1991)

Dados da IARC revelam que o câncer de próstata (CaP) é o segundo tipo mais comum em homens e o quarto quando são considerados ambos os sexos. Em 2012 representou o quinto lugar como principal causa de morte por câncer em homens no mundo (STEWART; WILD, 2014). A incidência é observada, com maior frequência, nos países mais desenvolvidos devido à alta expectativa de vida, uma vez que o CaP ocorre, cerca de 75% dos casos, em homens

acima dos 65 anos de idade. No Brasil, estima-se um risco de 66,12 novos casos para cada 100 mil homens no biênio 2018-2019 (INCA, 2018a).

Os hormônios andrógenos são essenciais na homeostase da próstata e a eventos que levam ao seu desenvolvimento (MARKER et al., 2003). Tumores prostáticos também são dependentes do estímulo andrógeno para crescimento, em especial a testosterona e di-hidrotestosterona, com isso, a primeira forma de tratamento da doença é a terapia de supressão androgênica, na qual se baseia na utilização de compostos antagonistas do receptor andrógeno que atuam cessando a proliferação celular (ANDERSON, 2003). No entanto, grande parte dos pacientes apresenta resistência à terapia de supressão androgênica, caracterizada pela inibição da afinidade entre o domínio de ligação do receptor andrógeno com o receptor do hormônio em questão. Neste caso, o diagnóstico passa a ser de câncer de próstata resistente a castração, descrito como crescimento tumoral progressivo independente de testosterona (BERTHOLD et al., 2008), sendo necessários outros métodos terapêuticos.

Esse cenário justifica a necessidade de avanços em pesquisas voltadas para terapias que sejam independentes da sinalização hormonal.

1.3.2. Câncer de fígado

O fígado, localizado do lado direito do abdômen, é a maior glândula e o segundo maior órgão do corpo humano, sua menor porção é composta por células epiteliais dispostas em forma de placas denominadas hepatócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). O fígado apresenta função secretora endócrina (secretando substâncias diretamente para outros órgãos) e exócrina (liberando substâncias na corrente sanguínea). Dentre as principais funções, pode-se destacar: secreção de bile; armazenamento de glicose; produção de proteínas como a albumina; desintoxicação do organismo; síntese de colesterol; transformação de amônia em ureia e filtração de microrganismos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; SHINONI, 2006).

O hepatocarcinoma (HC) é a neoplasia mais comum do fígado, deriva de células hepáticas primárias e se caracteriza por mutações genéticas que causam crescimento celular desordenado. Essas mutações podem decorrer de agentes externos ou pela multiplicação celular decorrente da regeneração crônica da hepatite, o que possibilita a ocorrência de erros durante a replicação celular (ANTÓNIO GOMES et al., 2013).

O HC está entre os tipos de câncer mais graves, pois os sintomas costumam aparecer em estágios mais avançados. Os principais fatores de risco incluem: exposição a agentes

infecciosos como hepatite B e C; cirrose hepática e abuso de álcool (OYAGBEMI; AZEEZ; SABA, 2010).

Em 2015, o câncer de fígado alcançou a sexta posição em incidência e ficou em quarto lugar no ranking de óbitos em todo o mundo. A ocorrência é observada, em sua maioria, nos países em desenvolvimento, onde há endemia do vírus da hepatite, porém é notório o aumento da incidência nos países mais desenvolvidos (GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION, 2017).

Atualmente, uma das únicas terapias conhecidas para o tratamento de pacientes com HC agressivo é o Sorafenib. Essa substância é inibidora da tirosina quinase e induz o processo de autofagia, o que favorece a supressão do crescimento tumoral (LANG, 2008). No entanto, ainda há necessidade de ampliação de estudos nessa área para que as terapias atuais sejam refinadas e novas estratégias terapêuticas sejam desenvolvidas, uma vez que o índice de mortalidade é elevado.

1.3.3. Câncer de mama

A mama é um órgão par que possui formato esférico ou cônico, mais proeminente nas mulheres devido ao volume da glândula mamária. Ela se localiza sob a musculatura peitoral e se estende da segunda à sexta costela no plano vertical e do esterno à linha axilar anterior no plano horizontal. A forma, o tamanho, a consistência e os aspectos variam em cada indivíduo (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014). A parte externa do seio é composta por uma região proeminente e mais escurecida denominada mamilo, onde convergem os canais da glândula mamária que estão dispostos no interior do órgão. Ao redor do mamilo, encontra-se uma região circular denominada aréola que apresenta coloração mais pigmentada quando comparada ao restante da pele. A região interna do seio é composta por glândulas mamárias em forma de cachos, contendo de 15 a 20 lóbulos (glândulas produtoras de leite), separados por acúmulo de tecido adiposo, por ductos que transportam o leite dos lobos ao mamilo e pelo estroma, que é uma junção de tecido adiposo e tecido conjuntivo que envolve os ductos, lóbulos, vasos sanguíneos e linfáticos (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014).

De acordo com os dados do INCA (2018a), o câncer de mama é o segundo mais incidente no mundo, totalizando 25% de novas ocorrências em 2012 com 522 mil casos de morte (14,7% do total de óbitos).

Nas mulheres, excluindo o câncer de pele não melanoma, o de mama é o líder de incidência e morte. No Brasil, estima-se cerca de 60 mil novos casos no biênio 2018-2019

(INCA, 2018a). Em homens a incidência é muito menor, cerca de 1:100 quando comparado com a incidência em mulheres (HOSPITAL DE AMOR, 2015).

Diversos fatores estão relacionados quanto ao desenvolvimento do câncer de mama. Mulheres com idade avançada são mais propensas a doença devido ao acúmulo de exposições ao longo da vida, além das próprias alterações biológicas (FERLAY et al., 2013). Mutações em determinados genes, como BRCA1 e BRCA2, que podem ser herdadas, correspondem a um histórico familiar de risco (INCA, 2018c).

Além disso, fatores endócrinos como o estímulo do hormônio estrogênio produzido pelo próprio organismo ou ingerido, também compõem os aspectos relacionados à ocorrência dessa neoplasia. Esses fatores incluem: menarca precoce (primeira menstruação antes dos 12 anos); menopausa tardia (após os 55 anos); primeira gravidez após os 30 anos; nuliparidade (ausência filhos); e uso de contraceptivos orais e de terapia de reposição hormonal pós-menopausa, especialmente se por tempo prolongado (INCA, 2018a). A IARC considera o uso de contraceptivos um fator de risco para o câncer de mama (STEWART; WILD, 2014). Além disso, fatores comportamentais e ambientais podem estar associados à incidência da doença, como ingestão de bebidas alcoólicas, tabagismo, obesidade após a menopausa e exposição à radiação ionizante.

1.4. Ensaios Celulares

A descoberta de fármacos está baseada em várias etapas de caracterização da atividade biológica de novas substâncias bioativas (LEITÃO; MONTANARI; MONTANARI 2011). Ensaios *in vitro*, além de fornecerem respostas rápidas, contribuírem para a redução de custos (SANTOS, 2009). Dentre os diversos ensaios possíveis de serem executados, os estudos celulares apresentam grande relevância e são aplicados como as primeiras triagens realizadas em um organismo vivo (LEITÃO; MONTANARI; MONTANARI, 2011).

Os ensaios celulares são importantes para o estudo de novas substâncias bioativas devido à possibilidade de identificação de estruturas químicas que atuam como novos ou inesperados mecanismos de ação, além do seu uso em ensaios para a confirmação do mecanismo inicialmente observado em estudos bioquímicos (CRUZ et al., 2017; GARCIA et al., 2017).

Neste trabalho, ensaios celulares relacionados ao estudo de substâncias antineoplásicas foram aplicados para entender a atividade e resposta biológica proveniente do estudo de terapia combinada (WALI et al., 2017).

1.5. Substâncias químicas

1.5.1. Substâncias de referência

1.5.1.1. Inibidores da via PI3K-AKT-mTOR

Algumas das substâncias químicas estudadas nesse trabalho envolvem inibidores de quinases da via PI3K-AKT-mTOR. Essa via (Figura 7) desempenha um papel estratégico em diversos processos celulares, como metabolismo, diferenciação e angiogênese (GOMEZ-PINILLOS; FERRARI, 2012). Estudos mostram que a alta expressão dessa via e sua elevada atividade estão associadas à alta capacidade proliferativa, tornando mTOR um alvo terapêutico atraente para diversos tipos de câncer (ZONCU; EFEYAN; SABATINI, 2011).

O alvo da rapamicina em mamíferos, descrita como mTOR no inglês, é uma proteína quinase (serina/treonina) que em mamíferos é codificada pelo gene mTOR e é expressa em quase todas as células. A mTOR integra parte de uma rota bioquímica que incorpora sinais intra e extracelulares. Seu papel é fundamental no crescimento, sobrevivência e regulação do metabolismo celular em resposta a hormônios, fatores de crescimento, nutrientes e sinais de estresse (FOSTER; FINGAR, 2010). Pesquisas recentes descrevem sua relação com diversas patologias, incluindo câncer de mama, próstata, pulmão, melanoma, bexiga, cérebro e carcinoma renal (XU; LIU; WEI, 2014), o que torna interessante o aprofundamento de pesquisas e uso de inibidores para essa via.

A PI3K compõe uma família de quinases importantes na fosforilação do grupo hidroxila 3’-fosfatidilinositol. Diferentes sinais estimulam a ação da PI3K por meio de receptores tirosina-quinases, receptores acoplados à proteína G e oncogênese (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010).

Quando estimulada, a unidade catalítica da PI3K converte o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP_3), que atua no recrutamento de proteínas para a membrana celular, incluindo a PDK1 e a AKT (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010). A proteína supressora de tumor PTEN desfosforila a PIP_3, revertendo o processo.

O mecanismo de recrutamento da proteína AKT faz com que a mesma seja ativada. Essa ativação permite que AKT fosforile efetores (TSC2 e TSC1, GSK3, FOXO, p27, BAD e eNOS) relacionados com processos de regulação, crescimento, sobrevivência proliferação, metabolismo e angiogênese (MANNING; CANTLEY, 2007). A PI3K também é capaz de atuar

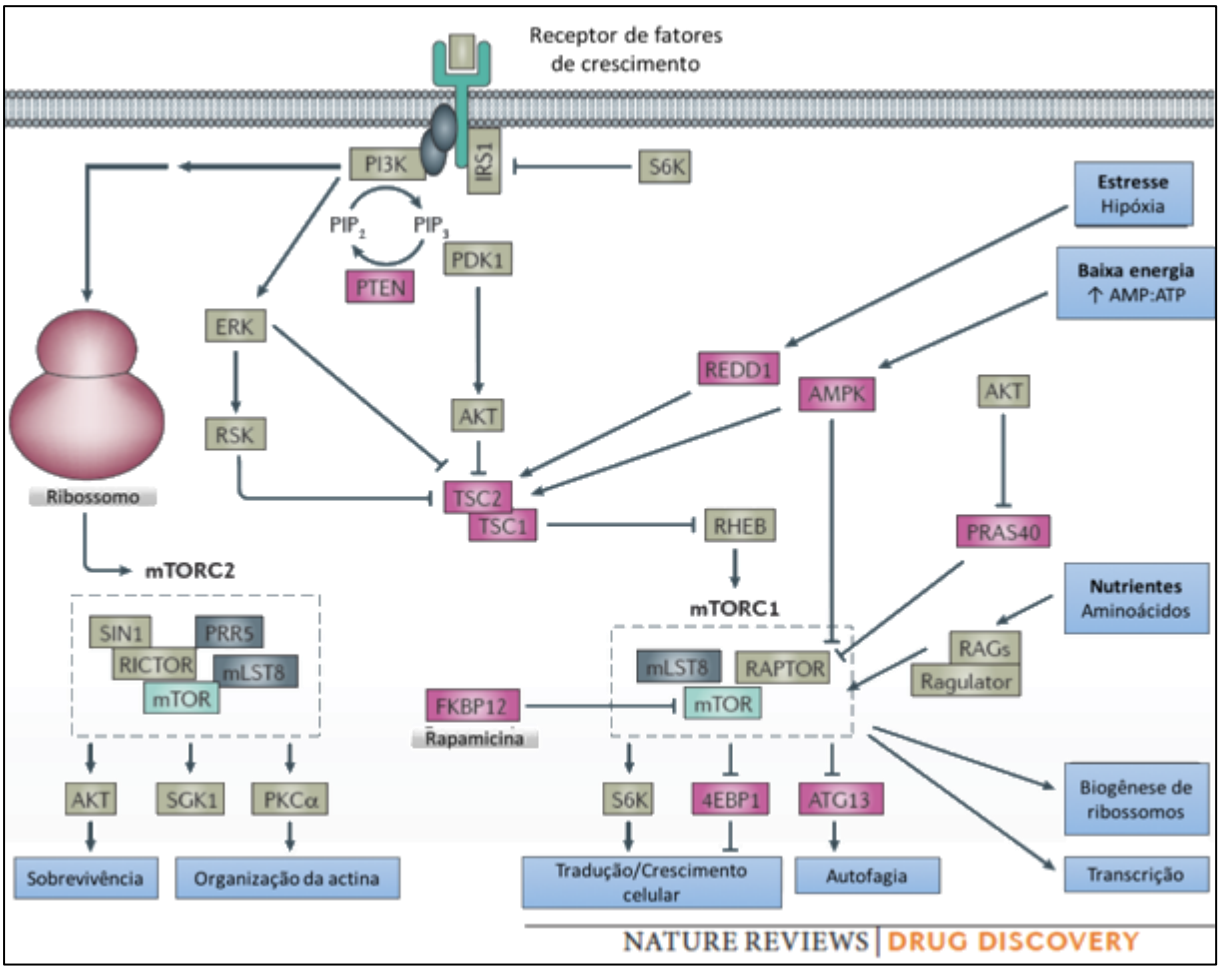
diretamente na ativação do complexo mTORC2 por meio do recrutamento de ribossomos e a promoção de sua ligação com o complexo (ZINZALLA et al., 2011).

Como já mencionado, a AKT é ativada por PIP_3, determinando sua mudança conformacional (ZINZALLA et al., 2011). AKT contém um domínio central de quinase com um resíduo de treonina (T308) que se liga à PDK1 e um domínio terminal C-terminal (S473) que, subsequentemente se liga ao complexo mTOR (SARBASSOV, 2005).

A mTOR interage com outras proteínas levando a formação de dois complexos proteicos distintos denominados mTORC1 e mTORC2 (CONCIATORI et al., 2018). O mTORC1 surge da interação mTOR com as proteínas Raptor, mLST8 e PRAS40. É responsável pela regulação de efetores como: SK6, eIF4E e 4E-BP1 ativados por fosforilação. O fosfo-S6K (p-SK6) interage com outras proteínas ribossômicas e fatores de crescimento que melhoram a ação dos mRNAs na síntese proteica. A fosforilação do inibidor 4EBP1 por mTORC1 promove a dissociação de eIF4E e, assim, facilita o início da tradução dependente de eIF4E. Essa cascata de eventos regula a proliferação celular, angiogênese, metabolismo energético e processos metastáticos (ANTONUZZO et al., 2017).

O complexo mTORC2 é composto por mTOR e as proteínas: mLST8, Protor, Rictor e mSIN1. A ativação de sua função regulatória é descrita pela ação de fatores de crescimento, ligantes do receptor acoplados a proteína G e citocinas (JACINTO et al., 2004). A mTORC2 regula a sobrevivência celular, o remodelamento do citoesqueleto e a migração celular (JACINTO et al., 2004).

Figura 7. Representação da via de sinalização mTOR.



Fonte: Adaptado de Benjamin (2011)

A descrição da mTOR ocorreu após o descobrimento da substância rapamicina, isolada em 1970 como metabólito secundário da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, proveniente de uma amostra de solo da Ilha de Páscoa (VÉZINA; KUDELSKI; SEHGAL, 1975). Notou-se que a rapamicina possuía atividade antitumoral e imunossupressora em células de mamíferos (HOUCHENS et al., 1983).

O mecanismo de ação dessa substância se dá pela inibição alostérica no domínio FRB da mTOR, essa inibição evita a fosforilação de efetores que impedem a síntese proteica e proliferação celular, fazendo que células se mantenham na fase G1 do ciclo celular (GOMEZ-PINILLOS; FERRARI, 2012).

Devido ao seu efeito, a rapamicina passou a ser utilizada como modelo clínico. Com o avanço das pesquisas sobre o mecanismo da via mTOR, outras substâncias foram sintetizadas com a finalidade de explorar o sítio ativo da via PI3K-AKT-mTOR.

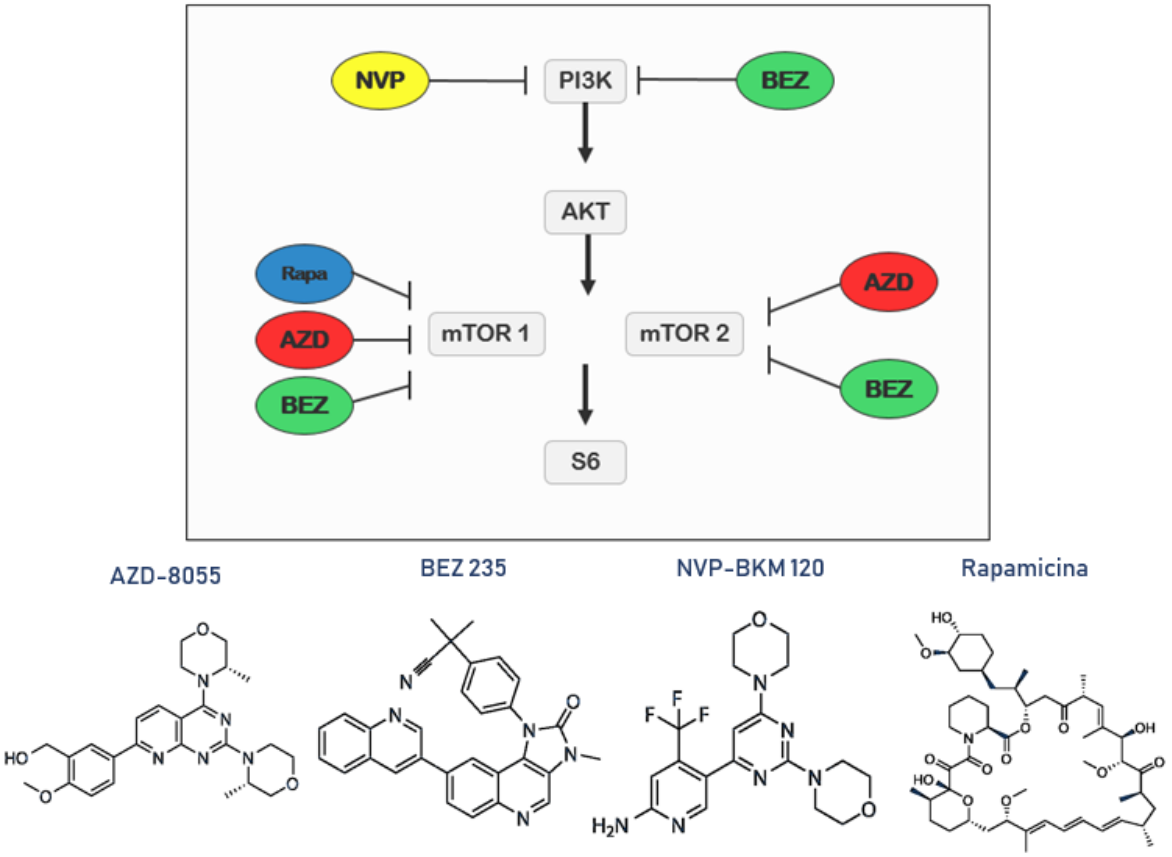
O BEZ 235 (também conhecido como dactolisib) é um potente e seletivo duplo inibidor de PI3K/mTOR classe 1. Sabe-se que esse composto se liga ao sítio do ATP na PI3K e mTOR, inibindo sua ação. Ensaios com marcação imunológica nas quinases demonstraram que o composto atua em ambos complexos da mTOR (SERRA et al., 2008). A atividade clínica de BEZ235 foi observada em hepatocarcinoma (OU et al., 2014), câncer de mama (FATEHI; SOLTANI; GHATREHSAMANI, 2018) e pulmão (XIAO et al., 2018). Um tumor possui complexas interações de múltiplas vias de sinalização e a busca por inibidores que possam atuar simultaneamente em variados alvos pode resultar em uma melhor resposta biológica e em maior potencial terapêutico, por isso inibidores duplos da via PI3K-mTOR, como BEZ 235, têm sido usados como candidatos a agentes antineoplásicos.

Assim como BEZ 235, NVP-BKM120 (buparlisib) também atua como inibidor competitivo ao ATP em PI3K classe 1 e sua ação citostática foi constatada em linhagens de câncer de próstata e mama (BURGER et al., 2011).

Uma terceira substância química relevante em estudos contra o câncer é o AZD-8055, pois sua ação ocorre diretamente no domínio ATP da mTOR. Uma característica a ser destacada é sua atividade em ambos complexos mTOR e suas proteínas efetoras (CHRESTA et al., 2010).

A Figura 8 destaca a porção em que cada inibidor avaliado nesse trabalho atua na via de sinalização PI3K-AKT-mTOR, bem como as estruturas químicas dos mesmos.

Figura 8. Esquema simplificado da atuação dos inibidores da via de sinalização PI3K-AKT-mTOR e suas estruturas químicas



Fonte: Adaptado de Selleckchem (2018)

1.5.1.2 Demais substâncias antineoplásicas

a) Doxorrubicina

A doxorrubicina (Figura 9) é uma substância química utilizada no tratamento de pacientes com câncer. O mecanismo de ação desse agente ainda não está muito claro, contudo, estudos relacionam suas atividades à produção elevada de ceramida, formação de adutos de DNA, estresse oxidativo e inibição da enzima Topoisomerase II no processo de replicação do DNA (THORN et al., 2011). No entanto, a doxorrubicina apresenta diversos efeitos colaterais como perda de cabelo, supressão da medula óssea, vômitos, erupção cutânea e inflamação na boca (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2013).

Efeitos mais graves causados por essa substância incluem: cardiopatia, reações alérgicas (anafilaxia), dano tecidual no local da injeção e leucemia relacionada ao tratamento (THORN

et al., 2011). Apesar dos efeitos colaterais, a doxorrubicina está na lista dos medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde devido a sua ação (WHO MODEL LIST OF ESSENTIAL MEDICINES, 2015). Esse agente antineoplásico induz a parada da replicação das células independente da fase do ciclo celular. Pesquisas relacionam sua forma reduzida com o dano no DNA ao liberar radicais livres e superóxidos (SENCHENKOV; LITVAK; CABOT, 2001; STRIGUN et al., 2012).

No trabalho de (EL-GOHARY; SHAABAN, 2018), foi demonstrada a potente ação da doxorrubicina em hepatocarcinoma (linhagem HepG2), câncer de mama e HeLa.

Outras pesquisas corroboram a ação da doxorrubicina em linhagem de hepatocarcinoma (GAMBARI et al., 2014; XIA et al., 2018) e câncer de próstata (PC-3) (TAGHDISI et al., 2018) relevando resultados positivos de citotoxicidade.

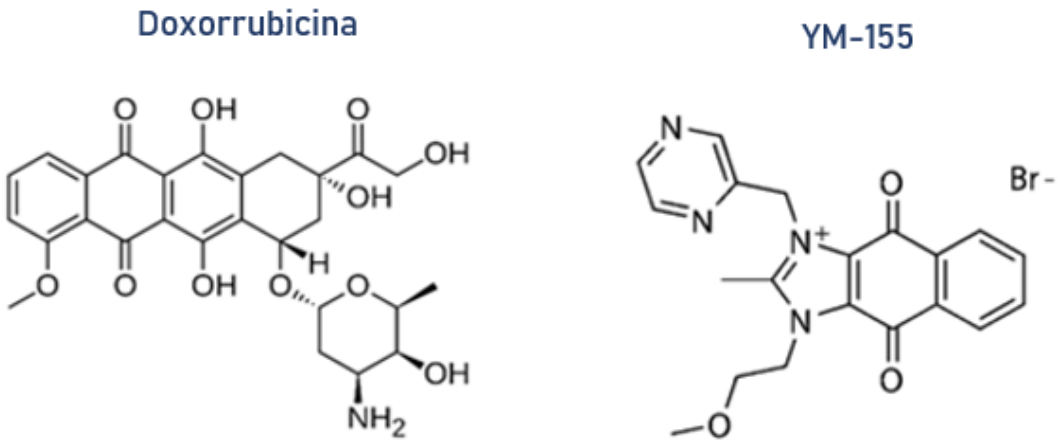
b) Brometo de sepantrônio (YM-155)

Outro agente antineoplásico utilizado em terapias contra o câncer é o YM-155 (Brometo de Sepantrônio – Figura 9). Essa substância atua na inibição da produção da proteína survivina, codificada pelo gene BIRC5, responsável por inibir a ativação de caspases, favorecendo processos apoptóticos (SAH et al., 2006). Estudos relatam que a survivina é altamente expressa em diversas linhagens de tumores malignos como: pulmão (MONZÓ et al., 1999), mama (TANAKA et al., 2000), pâncreas (LIGGINS et al., 2003) e próstata (KRAJEWSKA et al., 2003).

No câncer de próstata é observado o papel estratégico da survivina na sobrevivência do câncer, uma vez que a mesma não é expressa em células epiteliais secretoras sadias da próstata e está superexpressa em células cancerosas (MCELENY et al., 2002).

Juntamente com a doxorrubicina, o YM-155 foi utilizado como controle positivo nesse estudo.

Figura 9. Representação estrutural da doxorrubicina e YM 155.



Fonte: Adaptado de Selleckchem (2018)

1.5.2. Substâncias de interesse

O grupo de química medicinal (NEQUIMED), vinculado ao Instituto de Química de São Carlos, na Universidade de São Paulo (IQSC-USP), atua no planejamento, síntese e avaliação de substâncias bioativas com efeito antineoplásico e antiparasitário, contribuindo com o desenvolvimento de novas substâncias químicas bioativas que atuam no combate ao câncer e doenças tropicais negligenciadas (AVELAR et al., 2015).

Diversas moléculas são utilizadas como referência para o planejamento de novas substâncias químicas. Sendo assim, grupo NEQUIMED desenvolveu um painel com 25 substâncias bioativas com a finalidade de testar a atividade antineoplásica desses compostos. Todas as substâncias químicas desenvolvidas pelo grupo NEQUIMED utilizam o prefixo Neq0, seguido do número que nomeia a molécula em questão (Ex: Neq0779).

O método racional para desenvolvimento dos trabalhos é o planejamento baseado em hipótese. Neste tipo de trabalho, uma hipótese inicial é estabelecida, por exemplo, dipeptidil nitrilas que inibiem catepsina L humanas também serão inibidoras de cruzaína para o Trypanosoma cruzi. Um ciclo hipótese-síntese-teste-análise é então estabelecido. Alguns derivados mais simples são inicialmente testados. Caso a hipótese seja válida, novos derivados serão sintetizados para continuar a síntese. No nosso grupo, a síntese dos compostos é estabelecida a partir do planejamento computacional, sendo a estrutura tridimensional da enzima usada como base para observação de um possível modo de interação. O grupo já obteve estruturas cristalográficas de raios X de complexos com a enzima cruzaína e dipeptidil nitrilas

(AVELAR et al., 2015) com a identificação do modo de interação. Desta forma, novos derivados são planejados a partir da estrutura cristalográfica, observado os resíduos de aminoácidos que podem ser usados para interações intermoleculares com o ligante. Por exemplo, adicona-se um grupo doador de ligação de hidrogênio para interagir com um aminoácido aceitador de ligação hidrogênio. Um planejamento deste foi feito para um dos subsítios da cruzaína, como o S3 (CIANNI et al., 2018).

No caso dos inibidores de quinases, as substãncias foram adquiridas comercialmente da empresa *ChemDiv* e foram selecionadas a partir do método computacional estabelecido no artigo (SAIDEL et al., 2017).

Das 25 substâncias, houve uma divisão entre dois grupos dependendo da resposta fenotípica em termos da atividade citotóxica (contendo 9 substâncias) ou atividade citostática (constando 16 substâncias), baseado em dados previamente obtidos da literatura e de experimentos realizados no grupo de pesquisa. A seguir, cada série é analisada separadamente de acordo com sua finalidade.

A primeira série foi testada quanto a sua atividade citotóxica, com substâncias capazes de inibir a via PI3K-AKT-mTOR, conforme mencionado no item 1.5.1.1, compreendendo os compostos Neq0438, Neq0440, Neq0604, Neq0605, Neq0678, Neq0679, Neq0680 (Figura 10).

No caso de Neq0438 e Neq0440, a atividade anti-mTOR foi previamente estabelecida para a linhagem de câncer de próstata PC-3, bem como sua citotoxicidade (SAIDEL et al., 2017). Neste trabalho, a atividade dessas moléculas foi testada em outras linhagens com a finalidade de observar se a atividade é restrita à PC-3 ou se abrangem as demais linhagens.

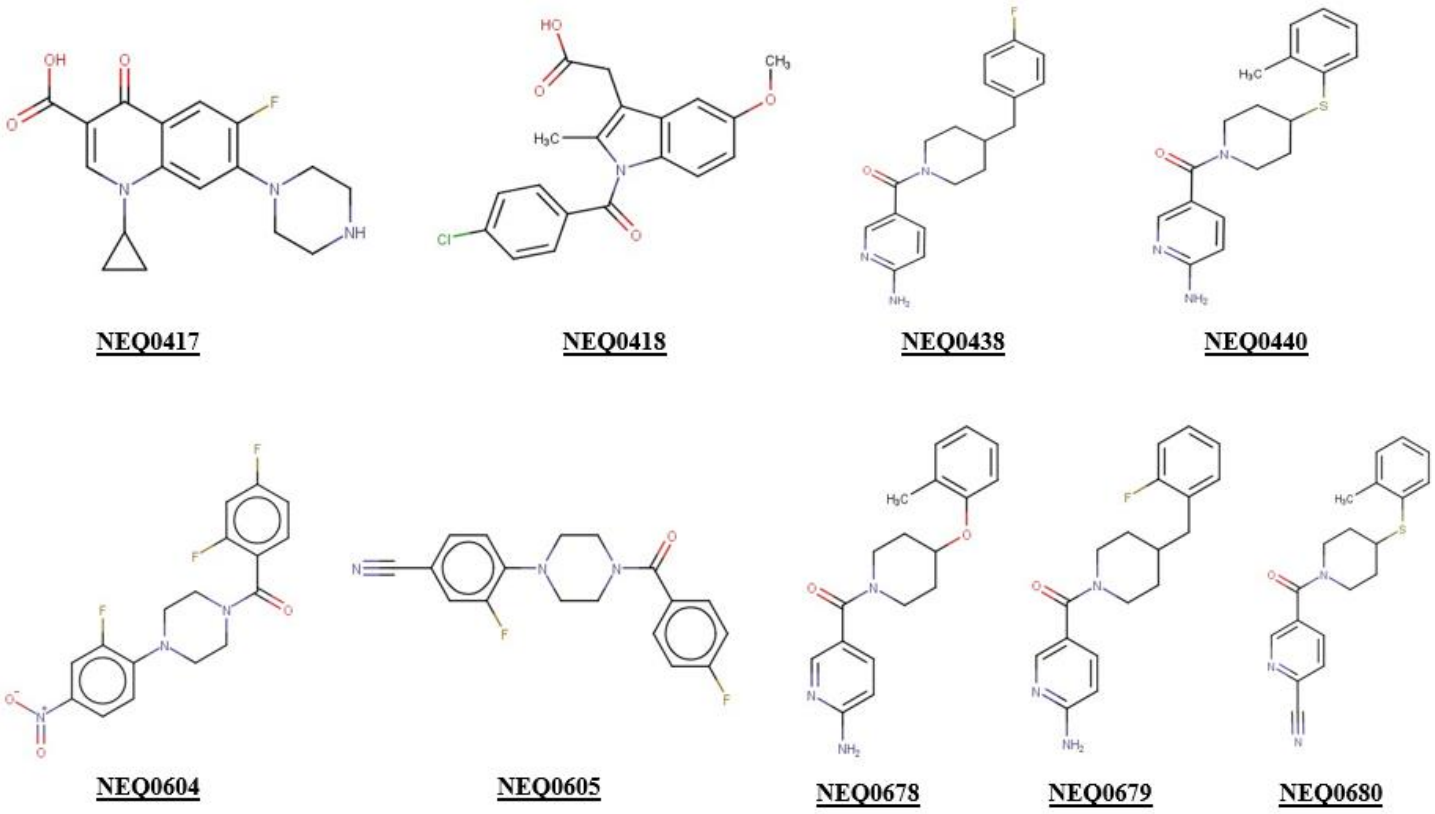
O Neq0417 é a mesma molécula que a ciprofloxacina e o Neq0418 é a indometacina, ambos são fármacos amplamente estudados em terapia combinada com o antineoplásico cisplatina. A ciprofloxacina é um composto químico que compõe a geração de fluoroquinolonas, antibióticos utilizados na medicina humana e veterinária (MA; ROW, 2019), enquanto que a indometacina apresenta atividade anti-inflamatória por meio da inibição das ciclo-oxigenases, sendo usada para o tratamento do reumatismo, dentre outras doenças. A ação terapêutica da ciprofloxacina e indometacina está relacionada com o bloqueio de metnases no processo de clivagem de DNA (MA; ROW, 2019). Por sua vez, metnases compreendem proteínas de reparo ao DNA presentes apenas em primatas antropoides e estão superexpressas em linhagens de câncer (WILLIAMSON et al., 2012).

Metnases atuam na união final não homóloga do DNA (*nonhomologous end joining*) e promovem interações genômica com o DNA exógeno devido a interação com a enzima DNA ligase. Elas também auxiliam a reinicialização da forquilha de replicação, interagem e

estimulam a decatenação do cromossomo dependente da topoisomerase II e regulam a sensibilidade celular aos inibidores da topoisomerase utilizados como quimioterápicos para o câncer (SHAHEEN et al., 2010).

Estudos demonstram que a ação da metnase diminui a sensibilidade das células cancerosas à quimioterapia. Observou-se que em células de câncer de mama a repressão de metnases tornam as células vulneráveis à antraciclina e adriamicina (WRAY et al., 2009) e em leucemia aguda as metnases diminuem a sensibilidade ao fármaco etoposídeo (MA; ROW, 2019). Assim, dado que metnases são superexpressas em células cancerosas e sua ação está relacionada com a resistência ao quimioterápico, estudos com substâncias capazes de inibir sua atividade são alvos clínicos atraentes para terapia contra o câncer. Portanto, a ciprofloxacina e a indometacina foram selecionadas para o estudo citotóxico neste trabalho, sendo adquiridas da Selleckchem.

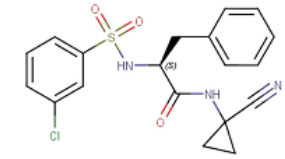
Figura 10. Estruturas químicas das substâncias testadas quanto a atividade citotóxica.



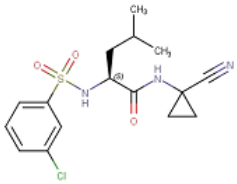
Fonte: Disponibilizada pelo grupo NEQUIMED

O segundo conjunto com 16 substâncias, previamente sintetizado pelo doutorando Lorenzo Cianni, foi testado para analisar a atividade antimetastática por meio do ensaio de fechamento de risca (*wound healing*) e compreende uma série de sulfonamidas derivadas de dipeptidil nitrilas (Figura 11). As dipeptidil nitrilas têm apresentado atividade citostática e antimetastática, inibindo a atividade de proteases que, juntamente com outros componentes de membrana, atuam na degradação de proteínas da membrana extracelular (CRUZ et al., 2017). A atividade desses inibidores foi observada em ensaios *in vitro* realizados anteriormente em nosso grupo para a linhagem de câncer de pâncreas MIA PaCa-2. Além disto, no estudo de administração combinada com gencitabina, foi observada sinergia em uma das condições testadas *in vitro* (QUILLES et al., 2019). Desta forma, o estudo para estas novas substâncias teve como foco a análise da sua atividade citostática e o seu uso combinado com agentes citotóxicos para verificar uma possível sinergia.

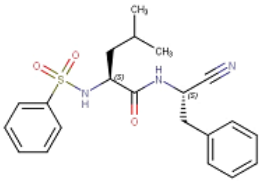
Figura 11. Derivados de dipeptidil nitrilas testados na análise citostática.



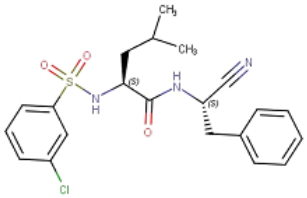
0779



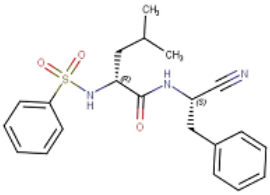
0780



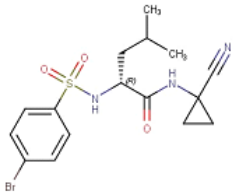
0781



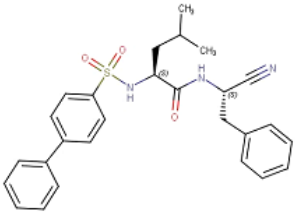
0782



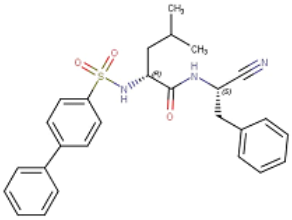
0783



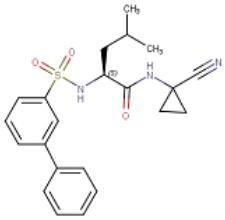
0784



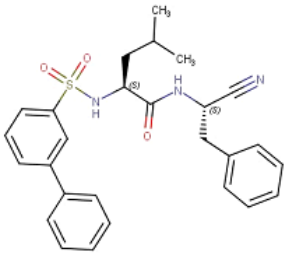
0827



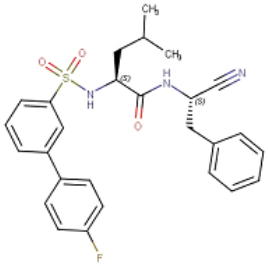
0828



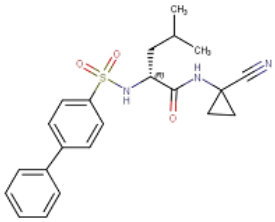
0830



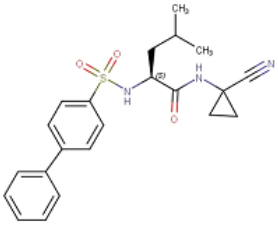
0831



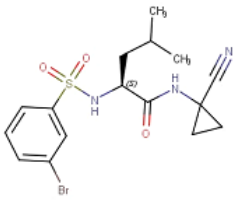
0832



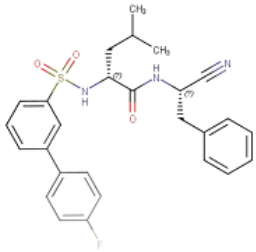
0837



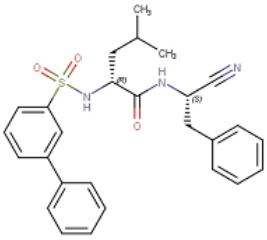
0838



0848



0850



0851

Fonte: Disponibilizado pelo grupo NEQUIMED.

2. OBJETIVOS

O objetivo central desse trabalho foi avaliar a atividade de novas substâncias bioativas com ação antineoplásica em linhagens de câncer de mama, próstata e fígado e aplicá-las em estudo de terapia combinada com substâncias químicas que já foram descritas na literatura e são amplamente utilizadas na terapia contra o câncer. Para isso foram estabelecidos objetivos secundários, como:

- Triagem de todas as amostras nas linhagens de câncer de mama, próstata e fígado para determinar a citotoxicidade;
- Obtenção da curva concentração-resposta, determinação do IC_{50} e seletividade das amostras com características citotóxicas (substâncias de referência e substâncias de interesse com efeito citotóxico);
- Análise de inibição da migração celular induzida pelas novas substâncias bioativas com atividade citostática, desenvolvidas pelo grupo NEQUIMED;
- Estudo de terapia combinada com as substâncias que se mostraram mais promissoras no ensaio de migração com as substâncias de atividade citotóxica mais seletivas para cada linhagem tumoral.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Materiais

- Meios de Cultura Celular DMEM (meio Dulbecco MEM em pó) e F12K (nutriente HAM F-12, em frasco de 500 mL), Tampão Fosfato Salino (PBS) e Penicilina/Estreptomicina – adquiridos da Cultilab®;
- Soro Feral Bovino (FBS), solução 0,25% de tripsina com EDTA e Penicilina/Estreptomicina – adquiridos da Vitrocell®;
- D-Glicose, Bicarbonato de Sódio ($NaHCO_3$), 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®);
- Micro balança Sartorius CPA26P (Sartorius®);
- Leitor de microplacas multidetector BioTek^{TM} Synergy HT (BioTek Instruments, Inc.®);
- As linhagens celulares: HepG2, DU 145, PC-3, MDA-MB-231 e Balb/C 3T3 clone A31, cultivadas no laboratório e mantidas em uma estufa úmida à 37 ºC e 5% de CO_2, foram adquiridos do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).
- As substâncias químicas (Tabela 1): doxorrubicina, YM-155 (brometo de sepantrônio), Rapamicina, AZD-8055, BEZ235 e NVP-BKM120 foram adquiridas da Selleckchem LLC, EUA. As novas substâncias testadas (codificadas como Neq, Tabela 1) foram sintetizadas e caracterizadas previamente.

Tabela 1. Substâncias químicas utilizadas nos ensaios celulares.

Substâncias de referência	Substâncias de interesse					
	Inibidores de quinase		Inibidores de Cisteíno proteases			
AZD-8055	0417	0605	0779	0784	0832	0851
BEZ 235	0418	0678	0780	0827	0837	
Doxorrubicina	0438	0679	0781	0828	0838	
NVP-BKM 120	0440	0680	0782	0830	0848	
Rapamicina	0604		0783	0831	0850	

Fonte: A autora.

3.1.1. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram: DMEM para as linhagens MDA-MB-231; DU 145; HepG2 e Balb/C 3T3 clone A31 e o meio F12-K para a linhagem PC-3. O DMEM (suplementado com 3,5 g glicose / 1,5 g $NaHCO_3$) e o F12-K (suplementado com 1,5 g $NaHCO_3$) foram preparados e complementados com 10% de soro fetal bovino (v/v) e 1% de solução penicilina/estreptomicina (v/v), em seguida filtrados e mantidos sob refrigeração à temperatura de 8 ºC.

3.1.2. Linhagens celulares

Nesse estudo foram utilizadas quatro linhagens tumorais e uma linhagem de células sadias utilizada como controle, sendo:

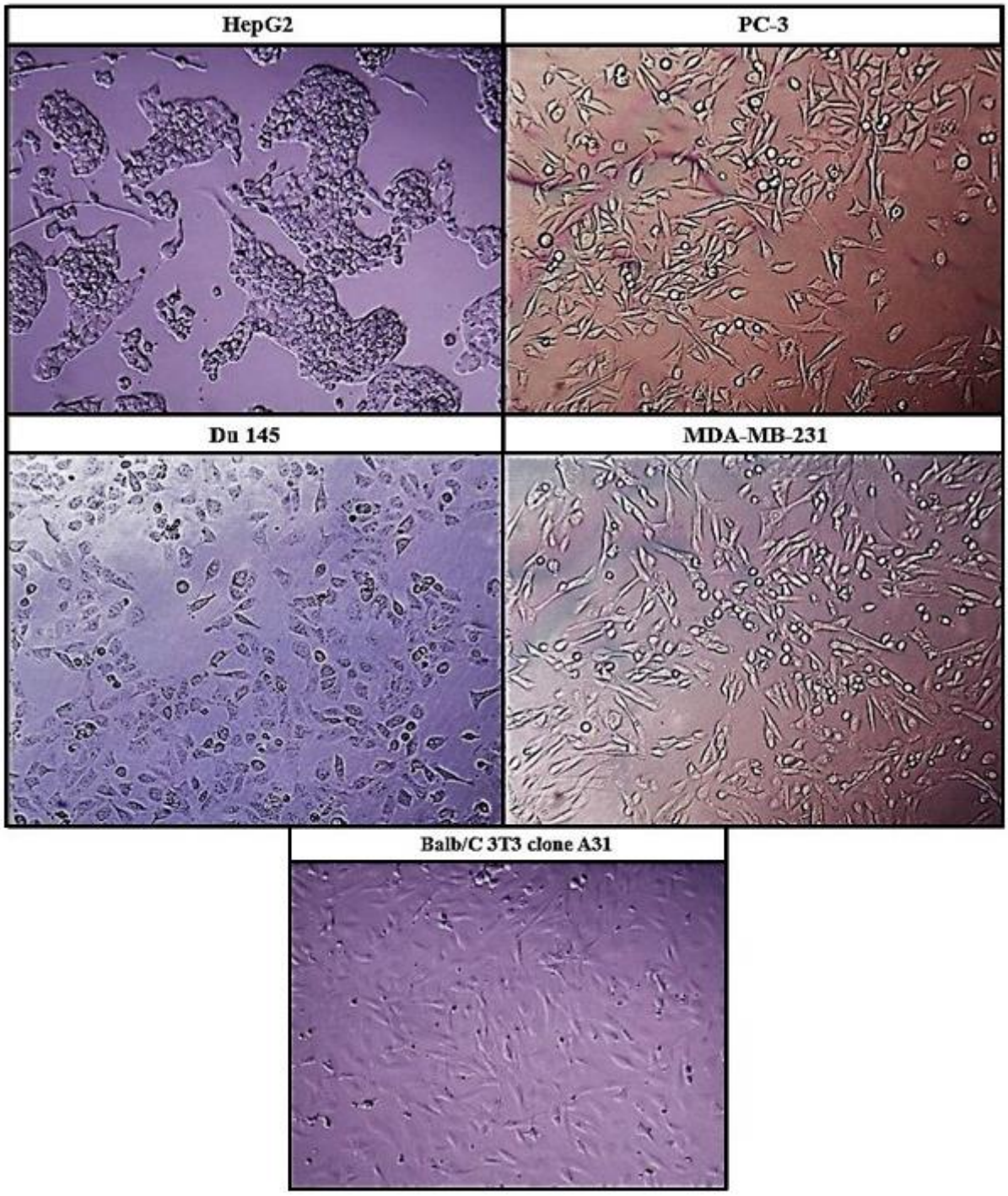
- HepG2 (linhagem humana de hepatocarcinoma de fígado); apresenta expressão gênica similar às neoplasias retiradas de pacientes, como expressão de receptores de superfície celular específicos de hepatócitos, síntese e secreção de proteínas plasmáticas, além de um alto grau de diferenciação morfológica (CHEN et al., 2015; XIA et al., 2013);
- DU 145 (linhagem de próstata humana metastática para o cérebro); PC-3 (linhagem de próstata humana metastática para o osso). Ambas hormônio independentes e de morfologia distintas (CUNNINGHAM; YOU, 2015);
- MDA-MB-231 (linhagem humana derivada de metástase pleural de um adenocarcinoma mamário). São descritas como triplo negativas, ou seja, não expressam receptores de estrógeno (ER-), receptores de progesterona (PR-) ou receptores do tipo 2 do fator de

crescimento epidérmico humano (HER2-), tendo crescimento acelerado e maior resistência às terapias convencionais, uma vez que não apresentam um alvo molecular específico (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011; MILANEZI; CARVALHO; SCHMITT, 2008);

- Balb/C 3T3 clone A31 (fibroblasto de camundongo – *Mus musculus*) utilizada como controle. A escolha do fibroblasto de camundongo como controle para essa pesquisa foi baseada testes de toxicidade *in vitro* que demonstraram sua confiabilidade para a validação de amostras (INTER-ORGANIZATIONAL PROGRAMME FOR THE SOUND MANAGEMENT OF CHECMICALS, 2010). Além disso, a linhagem Balb/C 3T3 clone A31 tem sido amplamente abordada em estudos citotoxicidade (CRUZ et al., 2017; GOMES et al., 2018; SMITH, ALEXANDER, 2005)

As linhagens celulares foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e estão descritas na Figura 12. As imagens foram feitas pela autora desse trabalho com as linhagens celulares utilizadas no estudo. Para a obtenção das imagens, foi utilizando o software *Motic Images Plus 2.0* e um microscópio invertido no aumento de 10 vezes na objetiva.

Figura 12. Morfologia das linhagens celulares utilizadas nesse estudo.



Aumento de 100x.

Fonte: A autora.

3.2. Método

3.2.1. Manutenção celular

A manutenção das células se iniciou com o descongelamento da linhagem de interesse armazenada à -80 ºC em tubos criogênicos de 1 mL (com 90% de FBS e 10% de DMSO) na concentração de $1x10^6$ células/mL. O descongelamento foi feito rapidamente em banho-maria a 37 ºC, em seguida a substância presente no tubo criogênico foi transferida para um tubo de centrífuga de 15 mL contendo 9 mL de meio de cultura e centrifugada durante 5 minutos a 1500 rpm (300 g). Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante e o *pellet* formado foi ressuspenso em meio de cultura para, então, ser transferido para frascos contendo 10 mL de meio de cultura. Os frascos contendo a cultura celular diluída em meio, foram incubados em estufa úmida a 37 ºC e 5% de CO_2. A troca do meio de cultura foi realizada a cada 2 dias, até atingirem confluência de 80%, em seguida foi feita a passagem das células para um novo frasco ou foram utilizadas para os respectivos ensaios.

3.2.2. Análise da citotoxicidade - viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT foi utilizado para a triagem das substâncias químicas; para obtenção da curva concentração-resposta e estudo de terapia combinada, que serão detalhados adiante.

O MTT é um sal de tetrazólio amarelo e solúvel em meio aquoso e quando em contato com células vivas se reduz, com o auxílio de uma enzima redutase, aos cristais de formazan, sendo este um sólido roxo e insolúvel em meio aquoso (LIU et al., 2002).

A triagem das substâncias químicas, realizada pelo ensaio de viabilidade celular, teve como objetivo analisar a atividade citotóxica das novas substâncias químicas em três concentrações (1 µM, 10 µM e 100 µM) para observar a ordem de atividade das moléculas.

Para as substâncias com características citotóxicas (substâncias de referência e substâncias de interesse com efeito citotóxico) a análise de viabilidade foi importante para determinar quais concentrações deveriam ser testadas para obtenção da curva concentração-resposta em cada linhagem, enquanto que as novas substâncias bioativas, inibidoras de cisteíno proteases, o ensaio determinou quais seriam as mais promissoras para comporem o painel de amostras a serem testadas no ensaio de migração celular.

A manutenção das células foi feita como descrito anteriormente e o ensaio de viabilidade celular se iniciou quando a confluência de células no frasco era igual ou menor a 80%.

Primeiro foi retirado o meio de cultura do frasco, seguido da lavagem com o tampão PBS e adição da tripsina com EDTA para que as células perdessem a aderência ao frasco e entre si. Em seguida, o frasco com tripsina foi incubado no período 3 a 5 minutos (dependendo da linhagem celular) em estufa úmida, com posterior adição de meio de cultura na mesma quantidade de tripsina para a inativação da mesma. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm e o sobrenadante foi retirado, com *pellet* ressuspenso com meio de cultura. A contagem celular foi feita na câmara de Neubauer utilizando um microscópio invertido para visualização e, em seguida, foram transferidos 100 µL de 10^5 células/mL com meio de cultura para os 60 poços centrais de uma placa com 96 poços. Os poços da borda foram preenchidos com meio de cultura para evitar perda de conteúdo por evaporação. A transferência do líquido para a placa foi feita pelo sistema robotizado Nimbus e, logo depois, as placas foram incubadas por 24 h em estufa úmida a 37 ºC com atmosfera a 5 % CO_2.

Após a aderência das células na placa, o meio de cultura foi retirado e foram adicionadas as substâncias químicas nas concentrações desejadas (Figura 13), em seguida as placas foram incubadas por 72 h, de acordo com protocolos estabelecidos no laboratório. Imediatamente após o período de incubação, o meio de cultura, contendo os as substâncias químicas, foi retirado da placa com auxílio de uma bomba a vácuo. Foi acrescentado 100 µL da preparação de MTT diluído em meio de cultura (20% de MTT à 1 mg/mL e 80% de meio de cultura) para cada poço, exceto para a última fileira da placa, nesta, foi adicionado apenas meio de cultura como controle para que eliminar qualquer interferência da placa durante a leitura (Figura 12). Em seguida a placa foi incubada em estufa úmida por 3 h, após esse período foi retirada a solução e foi acrescentado 100 µL de DMSO como solubilizante, pois os cristais de formazam são insolúveis em meio aquoso. A placa permaneceu por 1 hora em um agitador e em seguida foi feita a análise da viabilidade celular com um leitor microplacas Biotek Synergy HT, no qual a leitura da absorbância foi feita a 570 nM.

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

Todos os ensaios foram realizados em quintuplicata em dois ensaios independentes (N = 10) para uma conclusão mais assertiva da atividade das amostras.

PARÂMETROS ESTATÍSTICOS

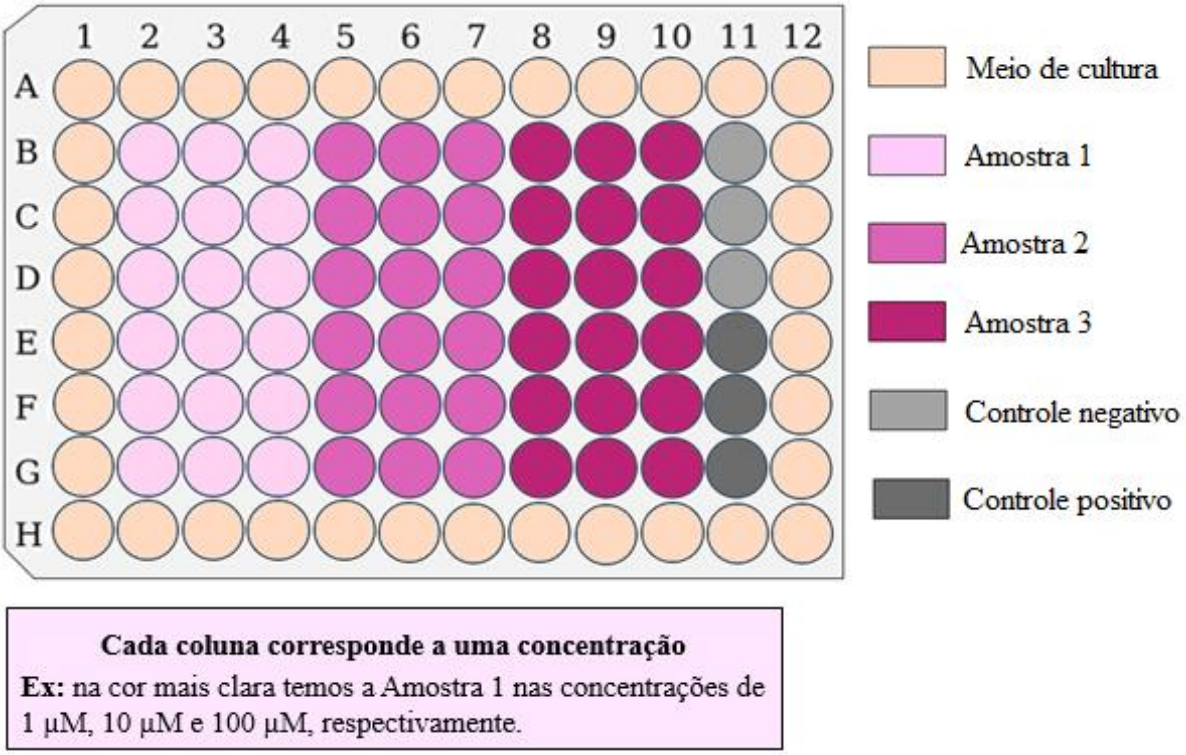
Nesse estudo foram aplicados o R^2 e Sy.x, que são dois parâmetros estatísticos globais comumente usados para mostrar o ajuste (R), ou variância para o coeficiente de determinação (R^2) e o desvio (Sy.x) do modelo. Ambos parâmetros são calculados a partir do melhor modelo em relação aos pontos que se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

CONTROLES

Na última coluna da placa foram depositados os controles negativo e positivo. Como controle negativo foram utilizados 3 poços com 100 µL de meio de cultura com 0,5% (v/v) de DMSO. Espera-se que as células desse controle se mantenham vivas durante o ensaio. A utilização de 0,5% de DMSO no controle negativo é importante para demonstrar que o DMSO utilizado na diluição das substâncias químicas não tenha relação com a morte celular (Figura 12).

Como controle positivo, foram utilizados 3 poços com a substâncias YM-155 na concentração de 1 µM em todas as placas usadas no estudo. O controle positivo para morte celular é de extrema importância para observar a uniformidade da resposta biológica (Figura 12).

Figura 13. Mapeamento da placa de 96 poços para a triagem das substâncias químicas.



Fonte: A autora.

- **Curva concentração-resposta**

Para obtenção da curva concentração-resposta, foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT, conforme descrito anteriormente. Nessa etapa, as substâncias de referência foram testadas em um número maior de concentrações: 100 µM; 10 µM; 1 µM; 333 nM; 0,1 µM; 33,3 nM; 0,01 µM, 3,3 nM e 1 nM.

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

$$SI = \frac{\mathrm{IC}_{50} \text{ da célula controle (Balb/C 3T3 clone A31)}}{\mathrm{IC}_{50} \text{ da célula de câncer}}$$

Quanto maior a seletividade do composto para aquela linhagem cancerígena, menor será a probabilidade de observar efeitos adversos na concentração que leva a atividade

farmacológica nos estudos *in vitro*, tornando o composto interessante para pesquisas posteriores.

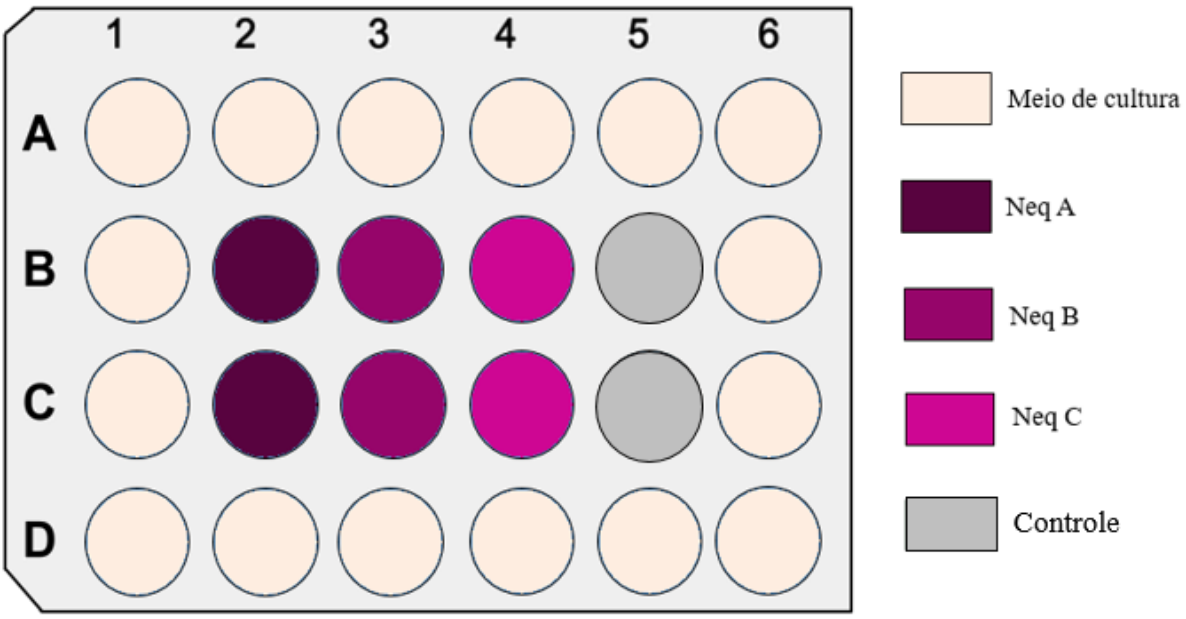
3.2.3. Ensaio de migração celular (*Wound Healing*)

De modo a avaliar o potencial antimetastático das substâncias químicas, foi realizado o ensaio de migração celular (*Wound Healing*) nas substâncias de interesse com atividade citostática (Tabela 1). O trabalho previamente realizado em nosso grupo demonstrou uma relação entre a atividade citostática e a migração celular para dipeptidil nitrilas (QUILLES et al., 2019).

A princípio, foi realizada a padronização da concentração de plaqueamento para cada linhagem celular. O plaqueamento ocorreu nas concentrações de 3, 4, 5 e 6 x10^5 células/mL, em placas de 24 poços (2 poços por concentração com volume final de 1 mL por poço). Os poços das bordas foram preenchidos apenas com meio de cultura para evitar evaporação. Após a adesão celular por 24 h, foram realizadas riscas no centro dos poços utilizando uma ponteira de 200 µL, seguido da retirada do meio de cultura, lavagem do poço com 1 mL de PBS e adição de 1 mL de meio de cultura por poço. O fechamento da risca foi monitorado no tempo de 0, 24 e 48 h. A concentração selecionada para cada linhagem foi a que apresentou melhor distribuição, homogeneidade e preenchimento de células no poço após 24 h de adesão celular.

Uma vez definida a concentração de plaqueamento, foi realizado o ensaio de migração celular para as quatro linhagens tumorais abordadas nesse trabalho. Para o plaqueamento foram utilizadas placas de 24 poços (Figura 14) e as células foram semeadas nas concentrações definidas na padronização. Após 24 h, o risco foi realizado utilizando a mesma ponteira de micropipeta (200 µL) para todos os poços com a finalidade de minimizar o viés no formato da risca. Logo depois, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com 1 mL de PBS, seguido da adição das substâncias químicas (Tabela 1) nas concentrações de 1 e 10 µM. Como controle foram utilizadas células sem tratamento. O fechamento da risca foi monitorado no tempo de 0, 24 e 48 h.

Figura 14. Mapeamento da placa de 24 poços do ensaio de fechamento da risca.



Fonte: A autora.

O ensaio foi realizado em duplicata em dois ensaios independentes (N = 4). A porcentagem de fechamento da risca foi calculada pela equação abaixo e a área (**A**) medida pelo Software *Image J* (YUE et al., 2010):

$$\%\ fechamento\ da\ risca\ = \frac{(A_{t=0\ h} - A_{t=\Delta\ h})}{A_{t=0\ h}} x100$$

3.2.4. Terapia Combinada

O estudo de terapia combinada visa identificar se a combinação da substância de atividade citotóxica com a substância de efeito citostático resultará em sinergia, ou seja, se combinação de ambas proporcionará uma redução no IC_{50} da substância citotóxica, a ponto de torná-la mais potente na célula de interesse.

A variação do valor de IC_{50} é destacada pela razão entre o IC_{50} da substância combinada pelo IC_{50} da substância isolada, como exemplificado abaixo:

$$Variação = \frac{IC_{50}\ substâncias\ combinadas}{IC_{50} substância\ isolada}$$

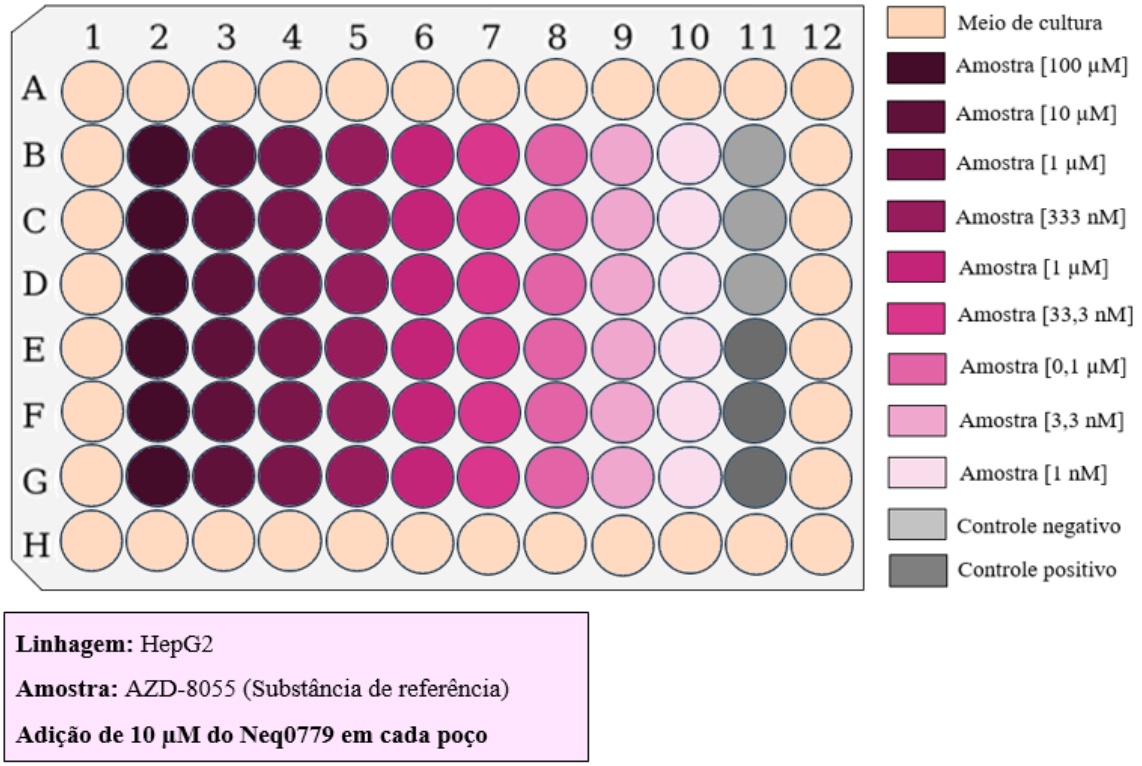
Para isso foram selecionadas substâncias de referência com distintos mecanismos de ação: AZD-8055, BEZ 235, NVP-BKM 120 e Rapamicina, todas inibidoras de quinases atuantes na via PI3K-AKT-mTOR e a Doxorrubicina, a qual interage com DNA. Esses compostos foram combinados com as novas substâncias da Tabela 1 que apresentaram maior redução da migração celular.

O estudo de terapia combinada foi realizado por meio do ensaio de viabilidade celular por MTT, como descrito anteriormente. As substâncias químicas selecionadas para serem combinadas foram aquelas que apresentaram atividade citostática (substâncias de interesse) no ensaio de migração celular com as substâncias com ação citotóxica mais seletiva para cada linhagem.

As concentrações das substâncias químicas utilizadas para essa etapa foram: 100 µM; 10 µM; 1 µM; 333 nM; 0,1 µM; 33,3 nM; 0,01 µM; 3,3 nM e 1 nM para as substâncias de referência em conjunto com 10 µM do derivado de dipeptidil nitrila de interesse em cada poço.

A Figura 15 traz um exemplo do mapeamento da placa para o ensaio de terapia combinada com a linhagem HepG2, utilizando como substância de referência o AZD-8055 combinada com a substância de interesse Neq0779.

Figura 15. Mapeamento da placa de 96 poços do ensaio para terapia combinada.



Fonte: A autora.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme discutido na introdução, os resultados serão apresentados para as séries de compostos separadamente, de acordo com o perfil de atividade buscado: agentes citotóxicos e agentes citostáticos.

4.1. Análise da citotoxicidade da primeira série de substâncias

4.1.1. Triagem nas linhagens celulares

A triagem realizada com a primeira série (substâncias de referência e substâncias de interesse inibidoras de quinase) foi um processo importante para observar a ação de cada composto químico nas linhagens cancerígenas com a finalidade de distinguir os mais ativos para serem utilizados em estudos mais detalhados. As substâncias inibidoras de quinase selecionadas foram aquelas que mantiveram a viabilidade celular das células tumorais abaixo de 40%, conforme mostrado nas Figuras 16 a 20. Em relação as substâncias de referência, todas foram selecionadas para a quantificação da resposta celular devido ao perfil citotóxico e mecanismo de ação das mesmas, que já são conhecidos e aplicados em estudos celulares.

<u>Balb/c 3T3 clone A31 (fibroblasto de camundongo)</u>

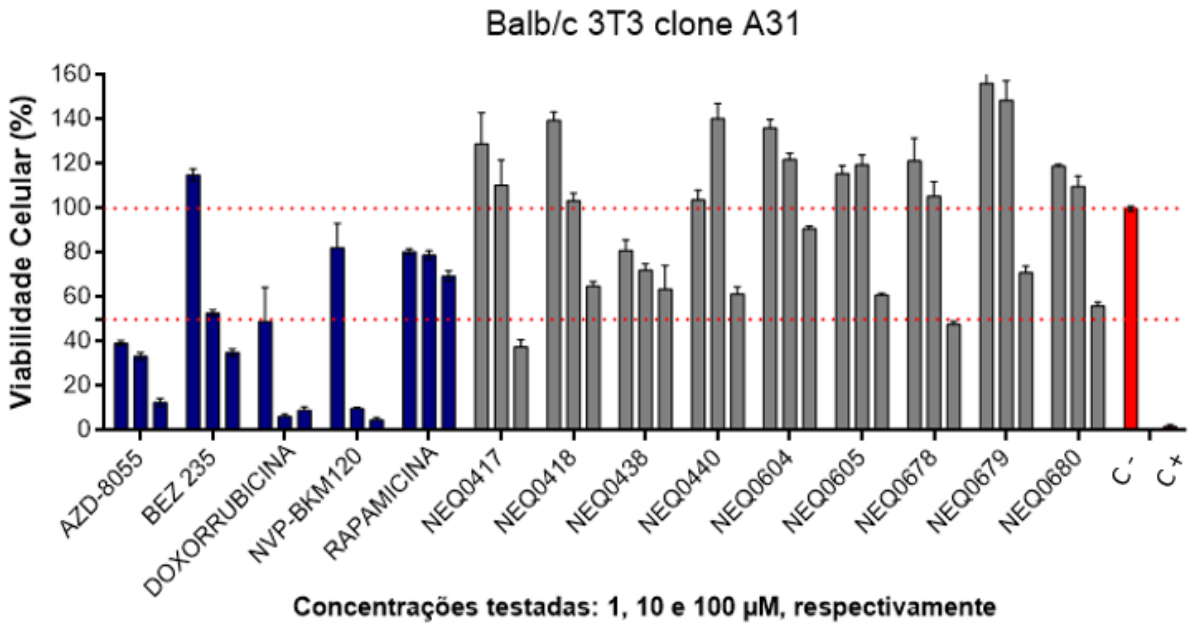
Por ser uma linhagem de células não tumoral, os fibroblastos de camundongo são utilizados como controle em testes de viabilidade, inclusive sendo validados para estudos de citotoxicidade e dose letal em animais de acordo com o comitê de coordenação interagência para a validação de métodos alternativos (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM – ICCVAM, 2018).

De acordo com os resultados obtidos, as novas substâncias estudadas apresentaram baixa citotoxicidade na linhagem controle (fibroblasto), levando a morte celular de, até, 50% somente na maior concentração testada (100 µM). Este resultado corresponde ao observado anteriormente para Neq0438 e Neq0440 (CRUZ et al., 2017).

No caso das substâncias de referência, a citotoxicidade variou bastante. Para que seja confirmada a seletividade das substâncias, os valores observados nas linhagens tumorais precisam se enquadrar em três contextos: (i) AZD-8055 e doxorrubicina devem ter

citotoxicidade elevada (abaixo de 1 µM); (ii) BEZ 235 e NVP-BKM 120 podem apresentar atividade citotóxica em torno de 1 µM e (iii) a rapamicina entre 10 e 100 µM.

Figura 16. Viabilidade celular na linhagem Balb/C 3T3 clone A31 (fibroblasto de camundongo) utilizada como controle para as substâncias da primeira série.

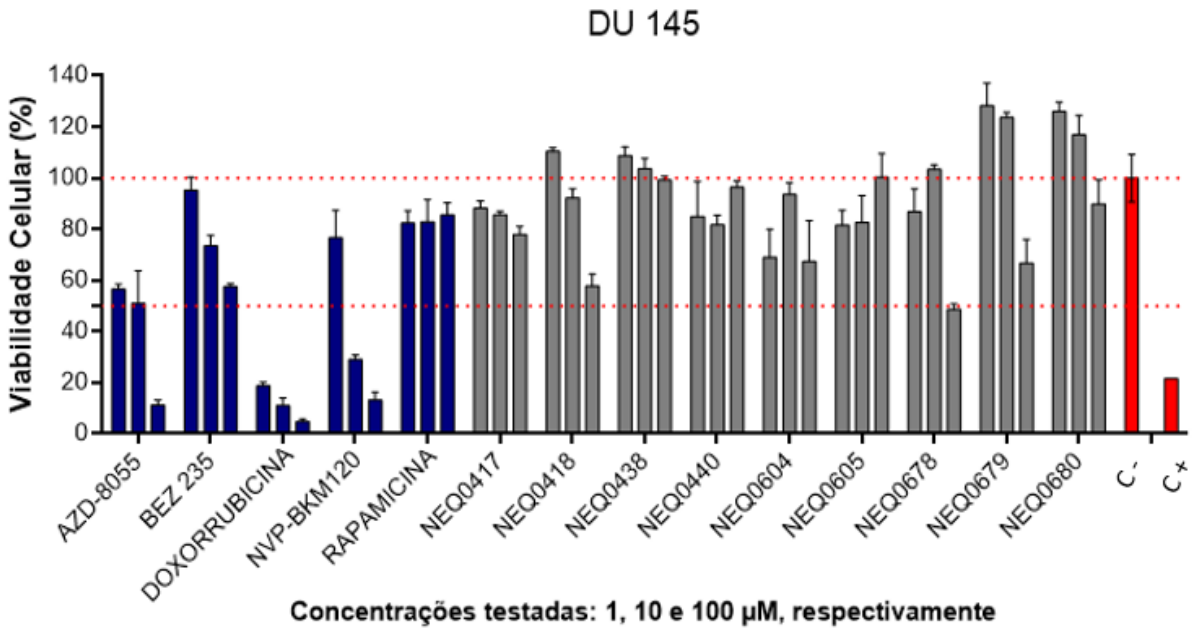


C-: controle negativo (célula sem tratamento contendo 0,5% v/v de DMSO). C+: controle positivo (YM-155 10 µM).
Fonte: A autora.

Linhagem celular de câncer de próstata metastático – DU 145

As substâncias de referência que atuam na via PI3K-AKT-mTOR, juntamente com a Doxorrubicina, apresentaram citotoxicidade elevada nesta linhagem (Figura 17). Os novos compostos bioativos não foram selecionados, pois se mostraram inativos em relação a morte celular. Este resultado é corroborado com a triagem realizada anteriormente para Neq0438 e Neq0440 (SAIDEL et al., 2017).

Figura 17. Viabilidade celular obtida usando a primeira série de substâncias na linhagem de câncer de próstata DU 145.



C-: controle negativo (célula sem tratamento contendo 0,5% v/v de DMSO). C+: controle positivo (YM-155 1 µM).

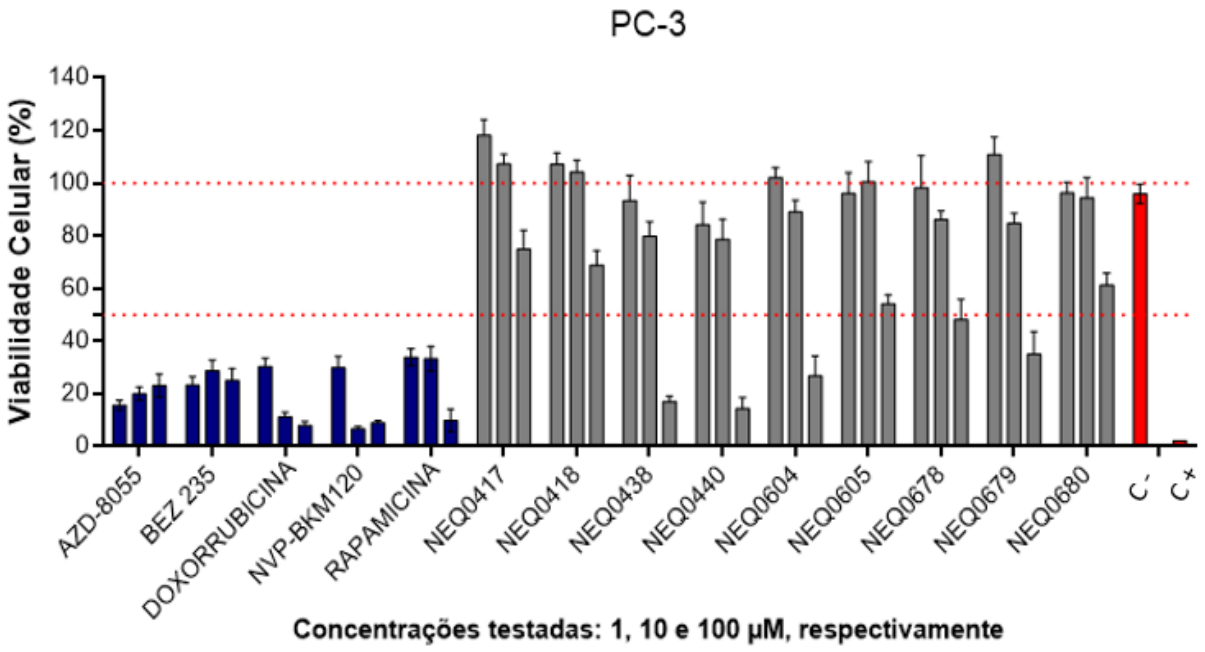
Fonte: A autora.

Linhagem celular de câncer de próstata metastático – PC-3

Esta linhagem foi a que apresentou maior sensibilidade para atividade dos inibidores da via PI3K-AKT-mTOR, além da doxorrubicina (Figura 18).

Os inibidores de quinase desenvolvidos pelo grupo NEQUIMED mais seletivos foram Neq0438, Neq0440, Neq0604 e Neq0679, sendo que as duas primeiras já foram quantificadas anteriormente para esta linhagem celular (SAIDEL et al., 2017). Conforme a hipótese previamente estabelecida para a série de substâncias em estudos computacionais com modelagem das interações intermoleculares relevantes, o derivado da Neq440 que contém uma nitrila substituindo a amina codificado como Neq0680 (Figura 10) não deveria ser citotóxico, pois não deve interagir com o sítio catalítico das quinases, o que foi confirmado neste trabalho. No caso do Neq0604 e Neq0605 (Figura 10), a diferença na resposta celular é muito pequena para poder estabelecer uma relação estrutura-atividade (SAR), Figura 18.

Figura 18. Viabilidade celular obtida usando a primeira série de substâncias na linhagem PC-3 de câncer de próstata.



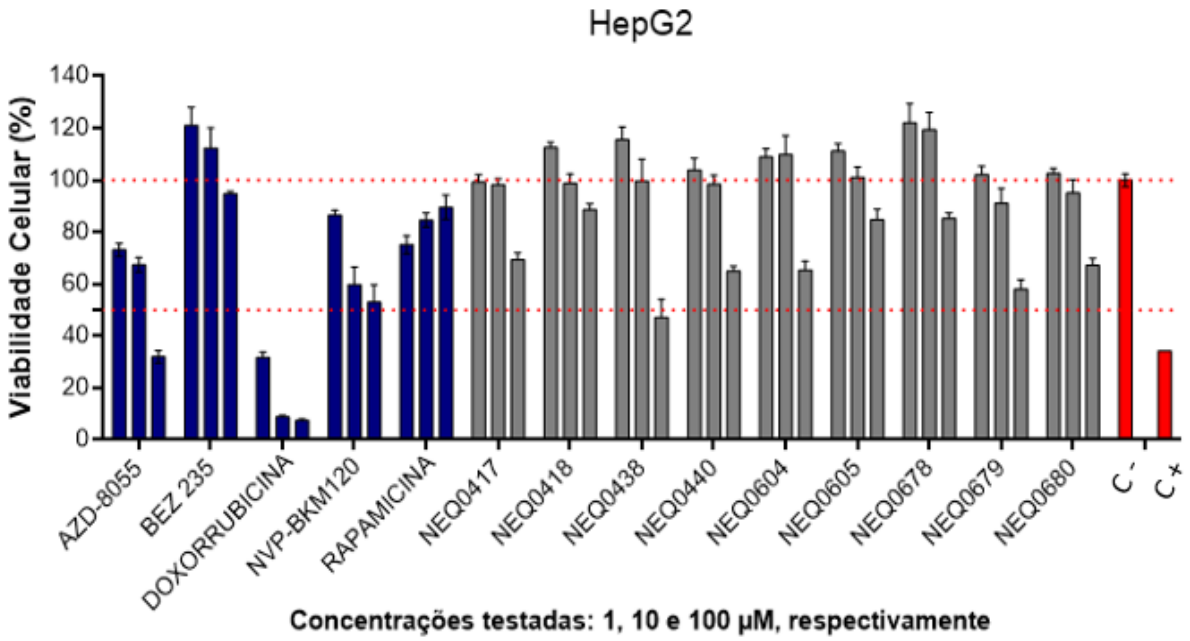
C-: controle negativo (célula sem tratamento contendo 0,5% v/v de DMSO). C+: controle positivo (YM-155 1 µM).

Fonte: A autora.

Linhagem celular de hepatocarcinoma - HepG2

Considerando-se a análise anteriormente feita para a linhagem de fibroblasto de camundongo (Balb/C), as únicas substâncias selecionadas para estudos posteriores na linhagem de fígado foram as substâncias de referência, pois foram as que demonstraram atividade para essa linhagem (Figura 19). No caso das substâncias de interesse, todas foram consideradas inativas de acordo com o valor de corte estabelecido (40% de viabilidade celular) e não procederam para a quantificação por meio da obtenção da curva concentração-resposta.

Figura 19. Viabilidade celular obtida usando a primeira série de substâncias na linhagem de hepatocarcinoma (HepG2).



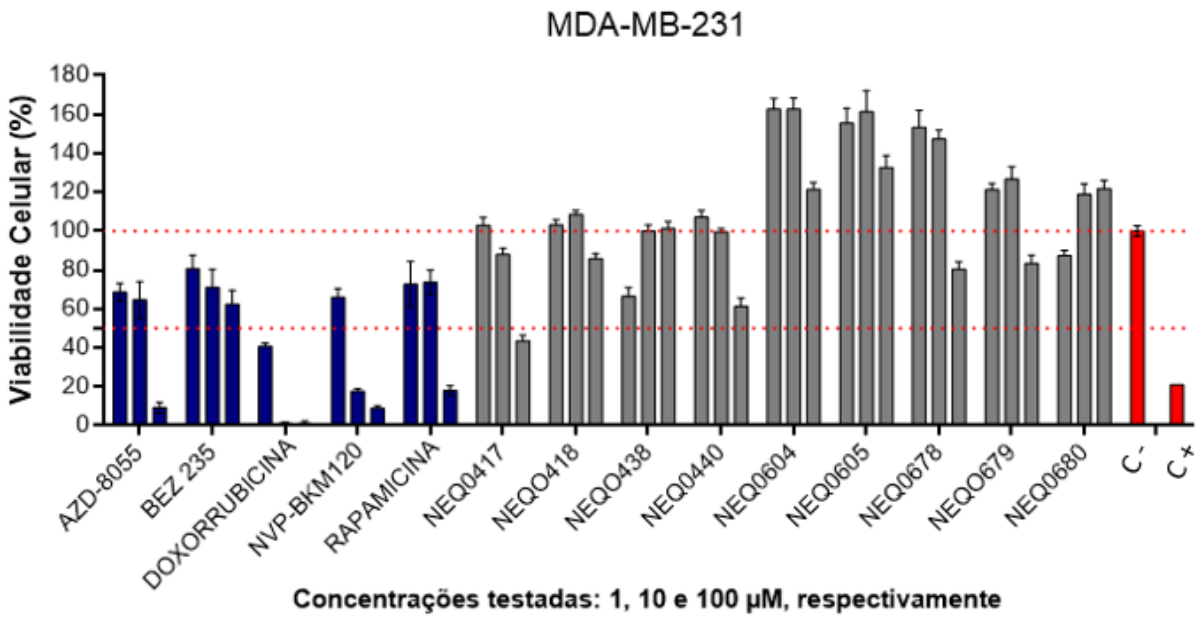
C-: controle negativo (célula sem tratamento contendo 0,5% v/v de DMSO). C+: controle positivo (YM-155 1 µM).

Fonte: A autora.

Linhagem celular de câncer de mama triplo negativo - MDA-MB-231

Conforme mencionado na introdução e confirmado na triagem, esta linhagem celular apresentou alta resistência para todas as substâncias, de acordo com os resultados alcançados (Figura 20) em comparação com as outras linhagens neoplásicas. A doxorrubicina possui seletividade associada a uma potência adequada, cujo valor de IC_{50} seria próximo a 1 µM, conforme descrito na literatura (IC_{50} = 1,24 µM) (SANGAR INSTITUTE, 2018). As substâncias de interesse foram inativas para a linhagem de mama e as demais substâncias (compostos de referências) foram selecionados para a próxima etapa. Uma observação a ser destacada é o estímulo à proliferação celular causado por algumas substâncias químicas, como os Neq 0604, 605, 678, 679 e 680.

Figura 20. Viabilidade celular obtida usando a primeira série de substâncias na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231.



C-: controle negativo (célula sem tratamento contendo 0,5% v/v de DMSO). C+: controle positivo (YM-155 1 µM).

Fonte: A autora.

Sumário dos resultados obtidos

Baseado nos resultados de triagem, foi feita uma compilação das substâncias químicas e linhagens de câncer selecionadas para a quantificação da resposta celular (Tabela 2).

Tabela 2. Substâncias e linhagens celulares selecionadas para estudos mais detalhados.

Linhagem Celular	**Substâncias de referência**					**Novas substâncias (Neq)**			
	AZD-8055	BEZ 235	Doxorrubicina	NVP-BKM120	Rapamicina	0438	0440	0604	0679
Balb/c 3T3	x	x	x	x	x	x	x	x	x
DU 145	x	x	x	x	x				
PC-3	x	x	x	x	x	x	x	x	x
HepG2	x	x	x	x	x				
MDA-MB 231	x	x	x	x	x				

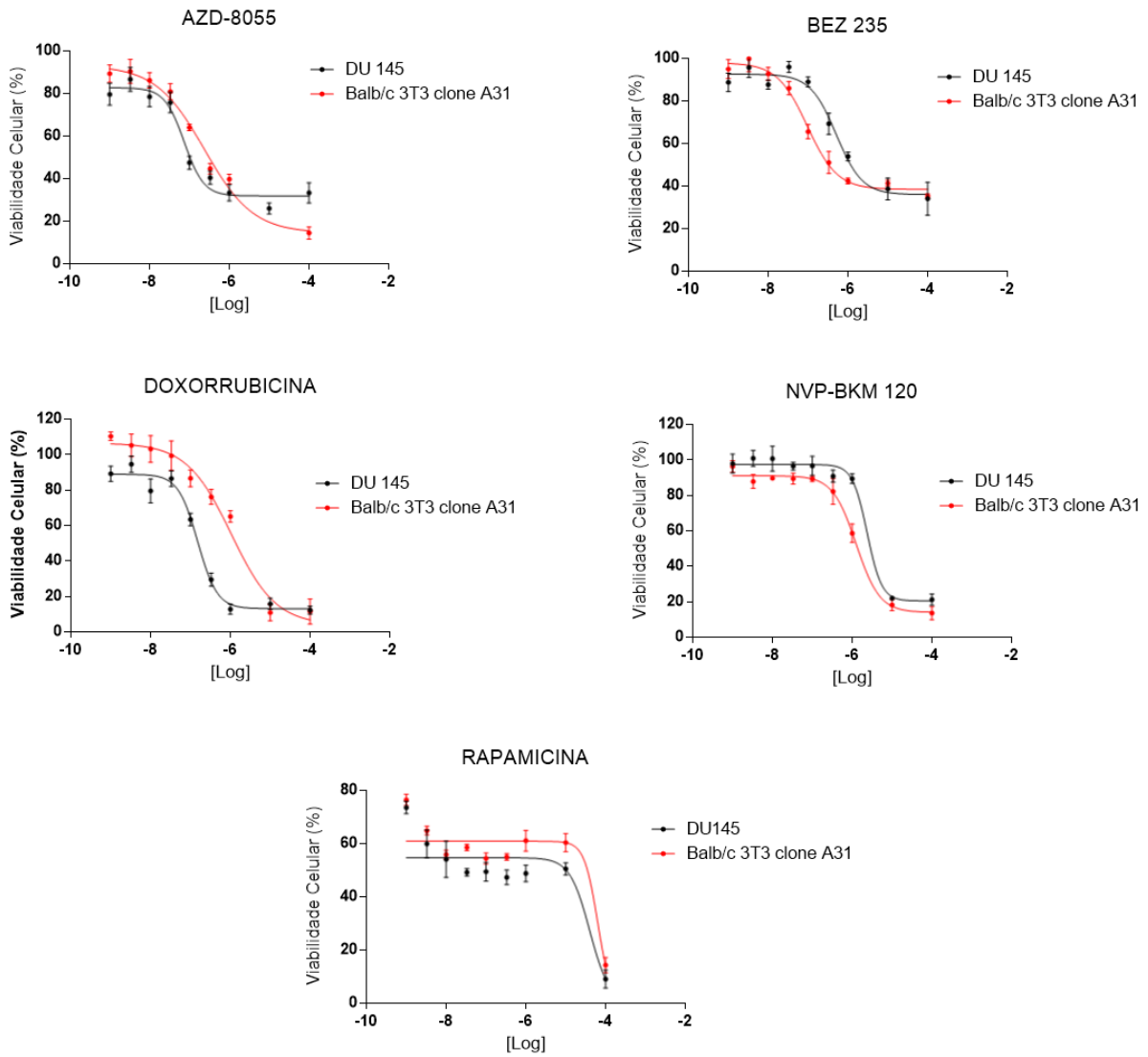
Fonte: A autora.

4.1.2. Ensaios quantitativos: curvas concentração-resposta

Linhagens celulares de neoplasia prostática metastática – DU 145 e PC-3

Os ensaios procederam para a lista de substâncias mostrada na Tabela 2. A seguir estão os gráficos das curvas concentração-resposta nas linhagens de fibroblasto de camundongo (controle) e para as linhagens de próstata (DU 145 e PC-3). As curvas concentração-resposta estão exemplificadas nas Figuras 21 e 22. Nas Tabelas 3 e 4 estão os valores de IC_{50}, os parâmetros estatísticos (valor de R^2, Sy.x) e a seletividade do composto.

Figura 21. Curvas concentração-resposta das substâncias de referência na linhagem DU 145 e no controle (Balb/C 3T3 clone A31).



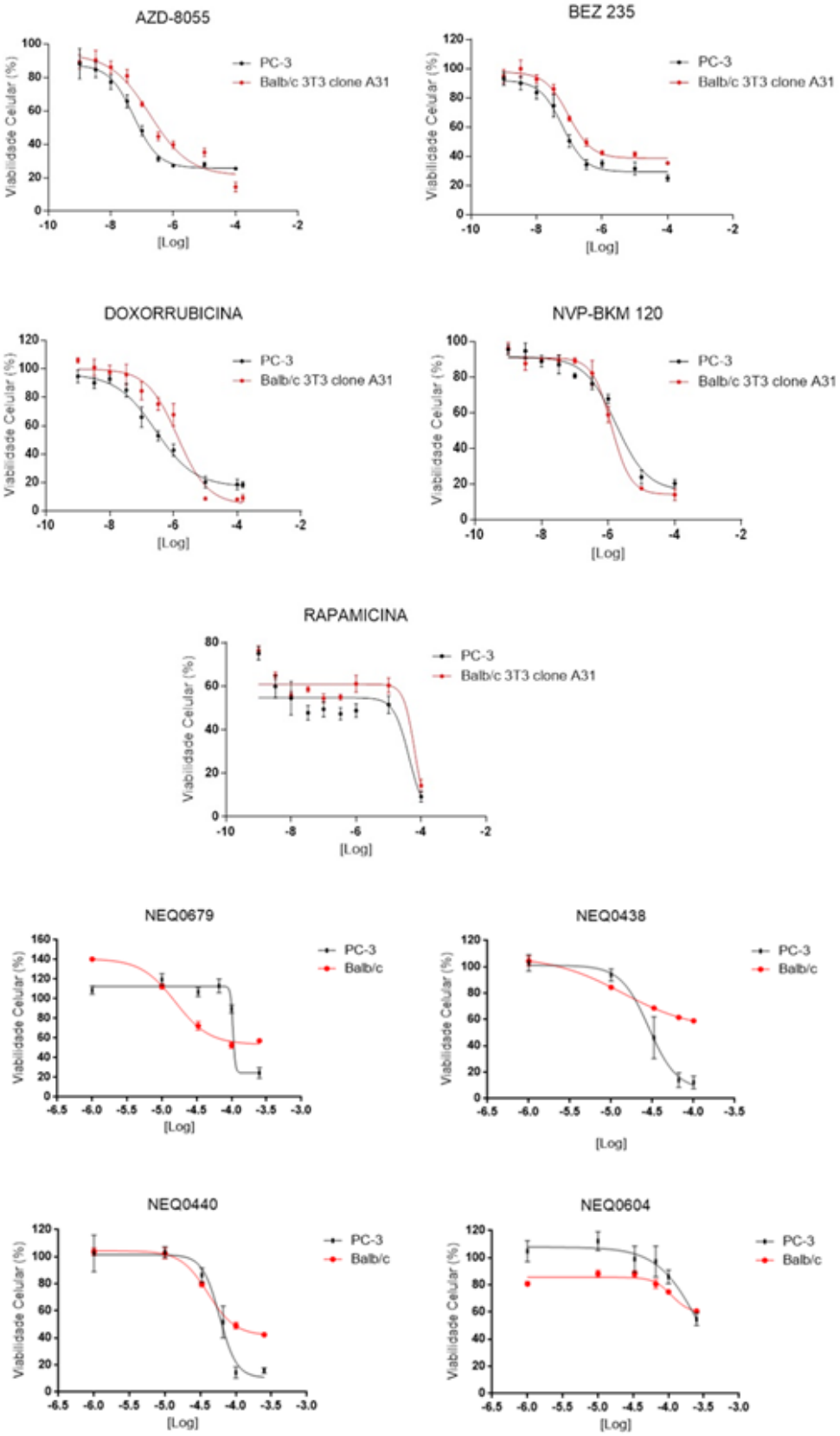
Fonte: A autora.

Tabela 3. Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}), o ajuste do modelo (R^2/Sy.x) e o índice de seletividade (SI) para as linhagens DU 145 e Balb/C.

Substâncias	**DU 145**		**Balb/C 3T3 clone A31**		**SI**
	IC_{50}	**R^2/Sy.x**	**IC_{50}**	**R^2/Sy.x**	
AZD-8055	0,07 ± 0,01 µM	0,94/5,52	0,23 ± 0,04 µM	0,97/4,39	3,3
BEZ 235	0,50 ± 0,07 µM	0,95/5,28	0,09 ± 0,01 µM	0,97/4,09	0,18
Doxorrubicina	0,15 ± 0,02 µM	0,97/5,56	1,05 ± 0,28 µM	0,96/7,39	7,0
NVP-BKM120	2,37 ± 0,46 µM	0,97/4,81	1,26 ± 0,11 µM	0,98/4,35	0,53
Rapamicina	40 ± 13 µM	0,74/8,65	63 ± 34 µM	0,82/6,96	1,6

Fonte: A autora.

Figura 22. Curvas concentração-resposta das substâncias químicas na linhagem PC-3 e no controle (Balb/C 3T3 clone A31).



Fonte: A autora.

Tabela 4. Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}), o ajuste do modelo (R^2/Sy.x) e o índice de seletividade (SI) para as linhagens PC-3 e Balb/C.

Substâncias	PC-3		Balb/C 3T3 clone A31		SI
	IC_{50}	R^2/Sy.x	IC_{50}	R^2/Sy.x	
AZD-8055	0,05 ± 0,01 µM	0,96/5,03	0,23 ± 0,04 µM	0,97/4,39	4,6
BEZ 235	0,07 ± 0,05 µM	0,95/5,76	0,09 ± 0,01 µM	0,97/4,09	1,2
Doxorrubicina	0,31 ± 0,04 µM	0,98/3,92	1,34 ± 0,28 µM	0,96/7,22	4,3
NVP-BKM120	1,72 ± 0,32 µM	0,96/5,00	1,26 ± 0,11 µM	0,98/4,10	0,73
Rapamicina	43 ± 17 µM	0,71/9,35	63 ± 34 µM	0,82/6,96	1,5
Neq0438	28,5 ± 2,13 µM	0,94/8,92	> 100	-	3,5
Neq0440	58,5 ± 4,1 µM	0,94/9,41	> 100	-	1,7
Neq0604	> 100	-	> 100	-	-
Neq0679	> 100	-	> 100	-	-

Fonte: A autora.

Em ambas as linhagens, as substâncias com maior seletividade foram AZD-8055 e Doxorrubicina (SI = 3,3 e 7,0 para DU 145, respectivamente) e (SI= 4,6 e 4,3 em PC-3, respectivamente). A Rapamicina foi seletiva, porém concentrações mais altas deveriam ser testadas para a definição do platô da curva, como concentrações acima de 100 µM, o que é desfavorável devido a alta citotoxicidade. A atividade da Rapamicina em PC-3 já havia sido relatada anteriormente em nosso grupo, com valores de IC_{50} de 43,0 µM para PC-3 e 58,3 µM para Balb/C (SAIDEL et al., 2017).

Para a linhagem DU 145, os compostos BEZ 235 e NVP-BKM 120 mostraram citotoxicidade mais elevada na linhagem controle (SI= 0,18 e 0,53; respectivamente). Já para PC-3 foi possível observar uma equivalência quanto à citotoxicidade causada por BEZ 235 na linhagem controle e cancerígena (IC_{50}= 0,09 ± 0,01 µM e 0,07 ± 0,05 µM; respectivamente. SI=1,2), enquanto que NVP-BKM 120 foi mais citotóxico para Balb/C (SI=0,73).

A via mTOR, frequentemente desregulada no câncer de próstata, devido à perda da função de PTEN, torna as células desse tipo de câncer, sensíveis aos inibidores da via mTOR. Embora a Rapamicina tenha demonstrado eficácia pré-clínica considerável, os resultados clínicos sugerem que a Rapamicina sozinha é insuficiente para inibir o crescimento do tumor em pacientes com câncer de próstata (DAI; SIEMANN, 2011). Apesar do estudo descrever a seletividade para Rapamicina (1,6 µM para DU 145 e 1,5 µM para PC-3), a faixa de potência

desse inibidor demonstra que seriam necessárias alta concentrações para levar a morte celular em 50%, o que favoreceria efeitos colaterais.

O estudo de Dai e Siemann (2011), o qual utilizou MTT para análise da atividade citotóxica em DU 145 e PC-3, comparou a inibição de AZD-8055 com a Rapamicina. Eles reportaram que a 100nM, AZD-8055 induziu a parada do ciclo celular na fase G1 com mais eficiência do que a Rapamicina e a expressão de proteases relacionadas com o progresso da fase G1 foi significativamente diminuída por AZD-8055, enquanto que com a Rapamicina a redução foi menor. Embora ambas as substâncias tenham bloqueado a fosforilação dos alvos da mTORC1 e S6, apenas AZD-8055 inibiu a fosforilação de 4E-BP1. Em conjunto, esses dados indicam que AZD-8055 é superior à Rapamicina na inibição do crescimento de células de câncer de próstata. AZD8055 é capaz de desativar complexos insensíveis à Rapamicina envolvidos na sinalização mTOR.

Chresta et al. (2010), realizaram pesquisas abordando a ação de AZD-8055 em diversas linhagens cancerígenas e reportaram atividade de inibição do crescimento tumoral *in vivo* e indução da autofagia (IC_{50}= entre 20 e 50 nM) em linhagens tumorais *in vitro*.

Já a Doxorrubicina também apresenta elevada citotoxicidade. A pesquisa de Hoseini Shafa e seus colaboradores, a qual mediu a viabilidade celular por MTT, reportou IC_{50} = 0,10 ±0,02 µM em DU 145 após 72 h de incubação nas concentrações de até 5,0 µM (HOSEINI SHAFA et al., 2018), mostrando similaridade com dados da Tabela 3. Nesse mesmo estudo, a Doxorrubicina foi combinada com a Metformina, o qual potencializou os efeitos na parada do ciclo celular na fase de reparo G1/S, que está associada ao aumento da expressão da proteína reguladora de reparo p21. Além disso, o estudo demonstra que a combinação com Doxorrubicina favorece também a indução da apoptose (HOSEINI SHAFA et al., 2018).

Os efeitos da Doxorrubicina também são relevantes na linhagem PC-3. Estudos utilizando o composto como referência para o teste de um painel com 27 amostras, revelou seu IC_{50} = 8,9 ± 0,6 µM para 48 h de incubação (FOUAD et al., 2018). Outro trabalho utilizando MTT para análise da citotoxicidade de Doxorrubicina que inclui a linhagem PC-3, relatou que o carreamento com nanoestruturas de DNA apresentou efeito antitumoral *in vivo* na diminuição do crescimento do tumor, quando comparado com o fármaco livre, minimizando os efeitos colaterais (TAGHDISI et al., 2018), o que demonstra a sua atividade em diversos ensaios celulares.

A combinação de fármacos é uma alternativa que vem sendo cada vez mais explorada no desenvolvimento de novas terapias no combate ao câncer. No estudo com DU 145 e PC-3 utilizando BEZ 235 isoladamente, foi relatada a redução do crescimento e proliferação do tumor

em estágios iniciais de CaP em um sistema andrógeno-dependente (GONÇALVES et al., 2018). Entretanto, o tumor voltou a progredir e alguns efeitos colaterais foram relacionados à BEZ 235. Por outro lado, em combinação com acetato de abiraterona (antiandrogênico) houve uma piora da resposta inflamatória, diminuição das lesões hiperplásicas e bloqueando a progressão do tumor de fase pré-maligna para maligna. Os resultados mostram que BEZ 235 administrada isoladamente podem desenvolver efeitos colaterais, de acordo a falta de seletividade descrita nas Tabelas 3 e 4 devido à alta citotoxicidade na linhagem Balb/C. Entretanto, terapias combinadas devem ser mais exploradas tendo em vista o aumento na seletividade (GONÇALVES et al., 2018).

A atividade citotóxica de NVP-BKM 120 não foi observada nas linhagens de câncer de próstata, mas estudos destacam um potente efeito citostático em células DU 145 (IC_{50} = 0,073 µM) (BURGER et al., 2011). Seu uso em terapia combinada em células de câncer de pulmão potencializa o efeito citostático de outras substâncias (BONELLI et al., 2015; YAO et al., 2015). Em PC-3, o cenário é similar, pois análises de viabilidade celular relatam atividade do composto em concentrações na ordem de 500 nM (KRAUS; PALASUBERNIAM; CHEN, 2017). No entanto, o estudo de Yadavi et al. (2016), o qual foi testada a potência de NVP-BKM 120 (inibidor de PI3K) em combinação com TKI258 (pan-inibidor de RTK) e RAD001 (inibidor de mTOR) num painel com cinco linhagens de próstata (LNCaP, VCaP, 22Rv1, PC3 e DU 145), destacou efeitos positivos da combinação para todos os alvos em todas as linhagens. Houve um destaque para a combinação NVP-BKM 120 e TKI258 que mostraram melhores resultados na inibição completa de PI3K nas linhagens hormônio independentes.

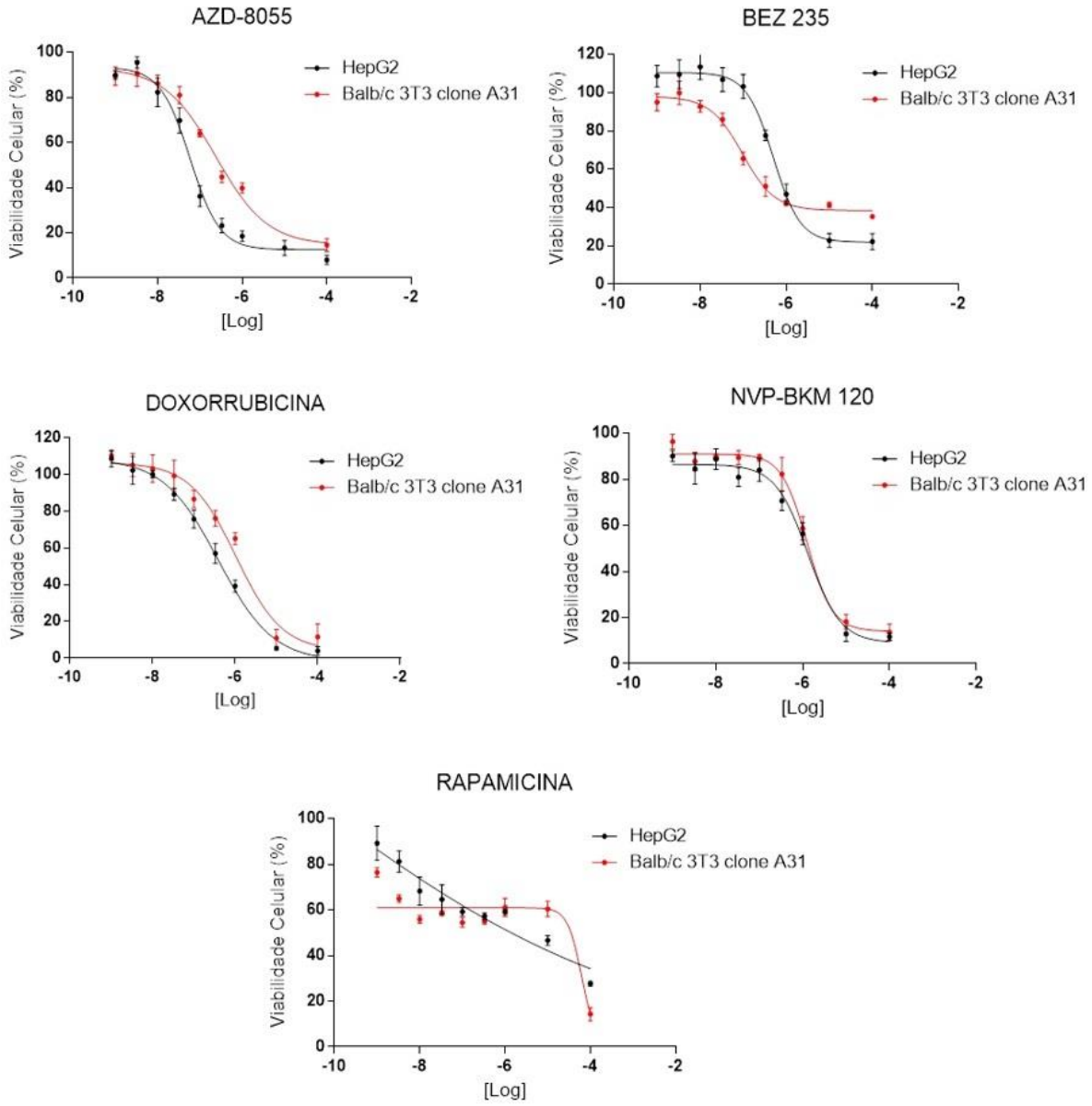
O estudo de viabilidade celular pelo método MTT na linhagem celular PC-3 destacou alta sensibilidade para os compostos de referência, conforme mencionado anteriormente. Entretanto, deve-se também considerar outras substâncias com potência menor, como no caso dos Neq0438 e Neq0440. Estes dois compostos apresentaram resultados relevantes no estudo de viabilidade, corroborando pesquisas anteriores realizadas pelo grupo NEQUIMED que reportaram ação de ambos compostos em linhagens cancerígenas (PC-3) com IC_{50} de 75 µM (Neq0438) e 60,7 µM (Neq0440) (SAIDEL et al., 2017).

A mudança da posição do átomo de flúor da posição 4 (Neq0438, Figura 10) para a posição 2 no Neq0679 levou a uma perda na potência, o que indica que a posição 2 (*orto*) não é a mais adequada para introdução de substituintes. Isto é confirmado pela própria potência de Neq0440 ser menor do que Neq0438, além do fato de Neq0678 ser considerado inativo na triagem (Figura 18). Estes resultados estimulam investigações mais aprofundadas com relação a atividades dessas substâncias e sua ação na via PI3K-AKT-mTOR.

Linhagem celular de hepatocarcinoma - HepG2

Assim como nas linhagens de próstata, as substâncias selecionadas para a quantificação da resposta celular (Tabela 2) estão destacadas na Figura 23 e Tabela 5 para a linhagem de fígado.

Figura 23. Curvas concentração-resposta das substâncias de referência na linhagem HepG2 e no controle (Balb/C 3T3 clone A31)



Fonte: A autora.

Tabela 5. Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}), o ajuste do modelo (R^2/Sy.x) e o índice de seletividade (SI) para as linhagens HepG2 e Balb/C.

Substâncias	HepG2		Balb/c 3T3 clone A31		SI
	IC_{50}	R^2/Sy.x	IC_{50}	R^2/Sy.x	
AZD-8055	0,06 ± 0,01 µM	0,98/4,41	0,23 ± 0,04 µM	0,97/4,39	3,83
BEZ 235	0,50 ± 0,06 µM	0,96/4,95	0,09 ± 0,01 µM	0,97/4,09	0,18
Doxorrubicina	0,40 ± 0,05 µM	0,98/4,10	1,05 ± 0,28 µM	0,96/7,39	2,65
NVP-BKM120	1,32 ± 0,18 µM	0,97/4,97	1,26 ± 0,11 µM	0,98/4,35	0,95
Rapamicina	ND	-	ND	-	-

ND = valores não definidos.

Fonte: a autora.

As substâncias AZD-8055 e Doxorrubicina foram as mais seletivas (SI = 3,83 e 2,65, respectivamente), BEZ 235 foi citotóxico na linhagem controle e NVP-BKM 120 não foi seletivo para a linhagem HepG2. Na linhagem primária de hepatocarcinoma, não foi possível quantificar a resposta para a Rapamicina devido a necessidade de teste em concentrações maiores, o que foi descartado devido à citotoxicidade para a linhagem controle.

O hepatocarcinoma é o sexto tipo de câncer mais comum e a segunda causa mais frequente de morte relacionada ao câncer em todo o mundo. Atualmente as substâncias químicas utilizadas como tratamento são o Sorafenib e Regorafenib. Até o momento, os resultados de ensaios clínicos com inibidores alostéricos da mTOR (como a Rapamicina) foram decepcionantes. Sendo assim, estudos que exploram as vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR são continuamente realizados, uma vez que essa via de sinalização está frequentemente desregulada em diversos tipos de câncer (EWALD et al., 2015).

No geral, os estudos incluindo AZD-8055 administrados em HepG2 que são abordados na literatura descrevem elevados valores de IC_{50}, entretanto, quando combinados com outras substâncias, o valor de IC_{50} é reduzido significativamente. Estudos *in vivo* mostraram que AZD-8055 reduziu consideravelmente uma ampla variedade de tumores, inibindo a fosforilação dos substratos da mTORC1 bem como a fosforilação do substrato mTORC2, AKT e proteases a jusante (LIU et al., 2016). Outros estudos relatam a ação eficaz de AZD-8055 (500 nM) na inibição de HepG2 pelo método colorimétrico MTT. No estudo, a substância foi testada isoladamente e também combinada com ceramida c6 (10 µM), sendo que a combinação das substâncias aumentou drasticamente a sensibilidade ao AZD-8055, com redução do IC_{50} de 485,54 ± 32,27 nM para 3,77 ± 0,54 nM (LIU et al., 2016).

No estudo de Ewald et al. (2015), o inibidor da mTOR (AZD-8055) foi testado isoladamente (IC_{50} de, aproximadamente, 1000 nM) e em combinação com o inibidor de AKT (MK-2206) ou o inibidor da via de sinalização MEK (AZD6244) na proliferação e apoptose na linhagem HepG2, além de outras duas linhagens de hepatocarcinoma. Os resultados revelaram que, mesmo as combinações inibindo sinergicamente a proliferação celular nas linhagens estudadas, a atividade quinase AKT é restaurada 24 h após o bloqueio de mTORC1 e C2 pelo aumento da fosforilação de T308. Esses resultados sugerem que combinações que abordem a inibição de AKT e mTOR simultaneamente são promissoras para aplicação futura em pacientes com carcinoma hepatocelular.

Para BEZ 235, a literatura apresenta valores de IC_{50} = 0,54 ± 0,13 µM para a análise de viabilidade celular por MTT em 72 h de incubação (XIAO et al., 2018), que é o mesmo resultado demonstrado na Tabela 5. Neste estudo, Xiao e colaboradores analisaram a atividade de BEZ 235 na via de sinalização PI3K-AKT-mTOR, concluindo que o anel de quinolona interage no sítio ativo da PI3K principalmente por meio de duas interações das ligações de hidrogênio nos resíduos Asp933 e Ser774. Essas interações foram complementadas por interações de van der Waals com resíduos hidrofóbicos conservados do sítio catalítico do ATP, incluindo Met772, Tyr836 e Met922. O estudo demonstrou ainda que as novas substâncias químicas com estrutura similares a BEZ 235, desenvolvidas por eles, apresentaram atividades promissoras na inibição de PI3K, levando a inibição da progressão de tumores em linhagens de câncer de fígado (XIAO et al., 2018).

Em relação a Doxorrubicina administrada na linhagem HepG2, no geral, a literatura apresenta diversos estudos com a substância isolada e combinada com substâncias que apresentam diferentes mecanismos de ação. Fouad e colaboradores reportaram IC_{50} da Doxorrubicina de 4,50 ± 0,2 µM para a análise por MTT após 48 h de incubação, sendo usada como controle em um painel com 27 substâncias que interagem com o DNA de forma similar a este fármaco (FOUAD et al., 2018).

A combinação da Doxorrubicina com o ácido selenoamino (selenocistina – SeC), o qual foi utilizado para sensibilizar o tumor em análises *in vivo* e *in vitro*, resultou na redução da viabilidade das células HepG2 de forma dependente da dose, favorecendo a apoptose celular e parada ciclo celular na fase G2/M (FAN et al., 2014). Valores de IC_{50} de SeC e Doxo sozinhos de 46,4 µM e 2,9 µM foram apresentados, respectivamente. Além disso, o tratamento de células com 20 µM de SeC em combinação com 0,5 µM Doxorrubicina levou a 50% de morte celular. O estudo demonstrou que a sensibilização das células pela SeC juntamente com a Doxorrubicina está associada à inativação de AKT e ERK (outra via de sinalização comumente

desregulada nesta neoplasia), além do dano ao DNA por meio da superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS). Inibidores de ERK e AKT foram efetivos na diminuição da viabilidade celular e inibição de ROS, indicando que o tratamento combinado de vias de sinalização distintas é mais eficiente para esse tipo de neoplasia. Adicionalmente, o crescimento de hepatocarcinoma de xenoenxerto foi também inibido por tratamento combinado através da indução de apoptose celular *in vivo* (FAN et al., 2014).

O composto NVP-BKM120, que inibe as diversas isoformas da PI3K (relacionada com a ativação da AKT) inibe a fosforilação de AKT de forma concentração-dependente, induzindo as células à apoptose quando administrado em linhagens de câncer de fígado tratadas com radioterapia (LIU et al., 2014). Quando combinado com a Rapamicina (NVP-BKM120 a 1 µM e Rapamicina a 100 nM), potencializou a inibição de AKT nas células sensibilizadas com radioterapia e aumentou a ativação da caspase 3 (LIU et al., 2014). Embora não tenha tido seletividade em relação à linhagem não tumoral, NVP-BKM120 pode ainda ser considerado um composto para ser utilizado em estudos posteriores nesta linhagem de hepatocarcinoma.

Portanto, a substância química que apresentou melhor potência na linhagem de hepatocarcinoma humano foi AZD-8055. Como mencionado anteriormente, AZD-8055 atua como inibidor da via PI3K-AKT-mTOR, porém sua atuação é como inibidor competitivo no sítio do ATP na mTOR. No entanto, deve-se também considerar a questão de que nenhum destes inibidores apresentou 100% de eficácia (Figura 20), pois cerca de 10-20% das células ainda permaneceram vivas para todos os inibidores de quinases testados. Isto é um dado importante, pois pode levar a resistência celular. É possível, no entanto, realizar outro tipo de ensaio de viabilidade celular para poder verificar se o resultado obtido pode ser devido a algum artefato da técnica, ou se este perfil de resposta celular é mantido para as substâncias. Em nosso grupo de pesquisa, usualmente aplicamos a citometria de fluxo como um ensaio confirmatório de viabilidade celular (CRUZ et al., 2017) e este pode ser o caso aqui novamente.

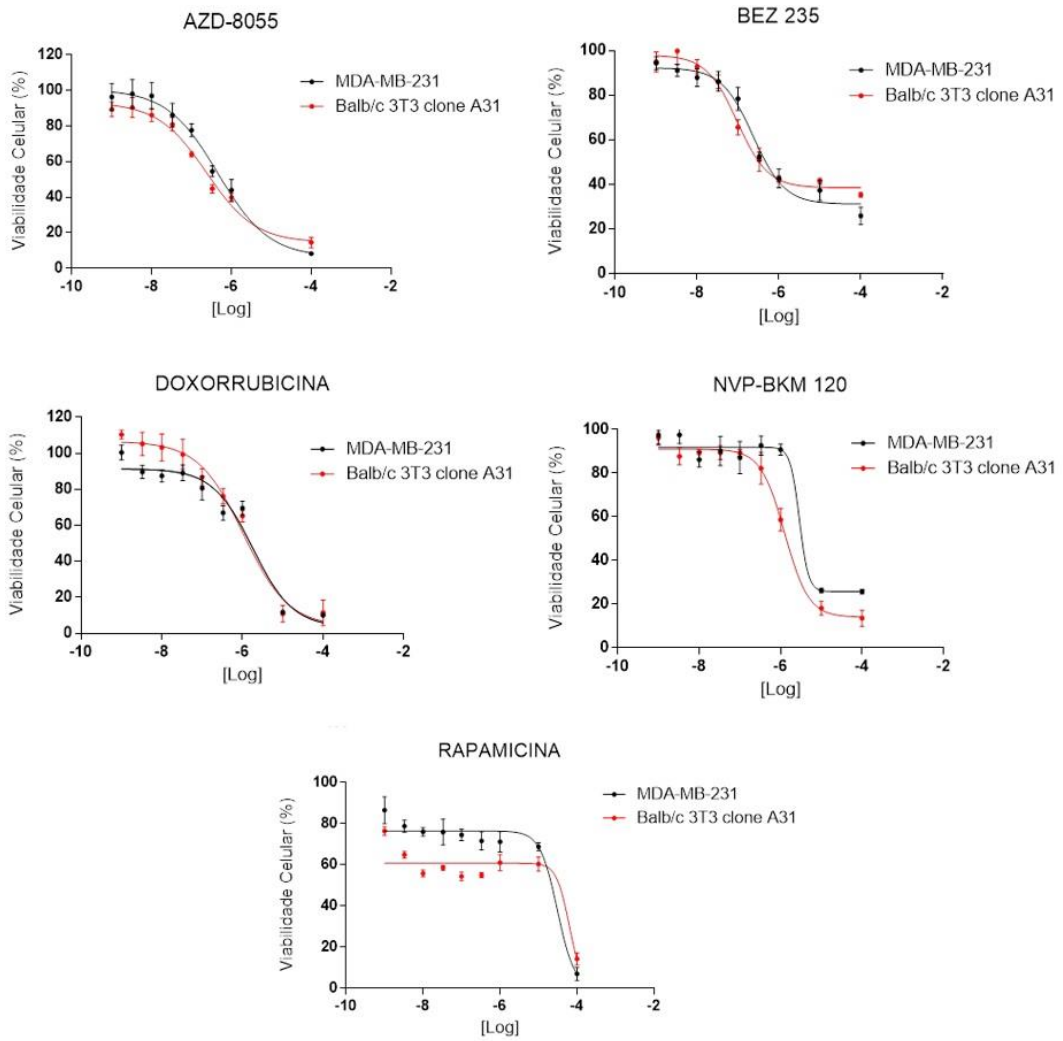
A doxorrubicina apresentou boa potência e eficácia para HepG2 (Figura 23 e Tabela 5). Mesmo que a seletividade não tenha sido muito alta (abaixo de 10 vezes), este fármaco pode ser usado para ensaios posteriores de terapia combinada como agente citotóxico para observar se poderá levar a uma melhora em seu perfil farmacológico. Além disto, elevada seletividade para antineoplásicos é usualmente difícil de ser alcançada em ensaios celulares.

Linhagem de câncer de mama triplo negativo – MDA-MB-231

As curvas concentração-resposta das substâncias de referências para a linhagem MDA-MB- 231 e para o controle (Balb/C 3T3 clone A31) estão descritas na Figura 24 e os valores de IC_{50}, bem como os parâmetros estatísticos (valor de R^2, Sy.x) e a seletividade do composto estão demonstrados na Tabela 6.

Os resultados obtidos para as duas linhagens (controle e tumoral) demonstraram que não há seletividade para quatro das cinco substâncias analisadas. A única substância que apresentou ligeira seletividade foi a Rapamicina, porém haveria a necessidade de testes em concentrações maiores para observação do platô da curva, o que foi descartado por motivos de alta citotoxicidade para a linhagem controle, como citado anteriormente.

Figura 24. Curvas concentração-resposta das substâncias de referência na linhagem MDA-MB-231 e no controle (Balb/C 3T3 clone A31).



Fonte: A autora.

Tabela 6. Sumário dos dados das curvas concentração-resposta constando a potência (IC_{50}), o ajuste do modelo (R^2/Sy.x) e o índice de seletividade (SI) para as linhagens MDA-MB-231 e Balb/C.

Substâncias	MDA-MB-231		Balb/C 3T3 clone A31		SI
	IC_{50}	R^2/Sy.x	IC_{50}	R^2/Sy.x	
AZD-8055	0,46 ± 0,07 µM	0,96/6,23	0,23 ± 0,04 µM	0,97/4,39	0,50
BEZ 235	0,23 ± 0,02 µM	0,96/5,09	0,09 ± 0,01 µM	0,97/4,09	0,39
Doxorrubicina	1,97 ± 0,48 µM	0,94/7,77	1,05 ± 0,28 µM	0,96/7,39	0,53
NVP-BKM120	2,89 ± 1,69 µM	0,95/5,63	1,26 ± 0,11 µM	0,98/4,35	0,43
Rapamicina	30,90 ± 4,90 µM	0,93/5,85	63,43 ± 33,53 µM	0,82/6,96	2,05

Fonte: A autora.

Na pesquisa de Leung et al. (2015), foi abordada a atividade de AZD-8055 e BEZ 235 individualmente e combinada com o inibidor alostérico da mTOR (everolimus) para a linhagem MDA-MB-231 e outras linhagens de câncer de mama. A viabilidade celular foi quantificada pela incorporação da Timidina e por azul de Alamar, com valores de IC_{50} próximos para os dois métodos: 130 nM para AZD-8055; 150 nM para BEZ 235. Em relação a redução da fosforilação de AKT, a análise com *Western blot* destacou atividade de AZD-8055 para a linhagem de mama e inatividade de BEZ 235. BEZ 235 revelou sinergia (valores acima de 1) no teste de Bliss quando combinado com everolimus, com valor de Bliss positivo (26 ± 5) em ensaios de proliferação celular. A ação inibitória de everolimus foi avaliada por citometria de fluxo de forma individual (100 nM) e combinado com BEZ 235 (100 nM). A combinação resultou na diminuição de células cancerígenas na fase S do ciclo celular, relatando que ambos fármacos atuam na inibição de proteínas relacionadas a entrada de células na fase S do ciclo celular. Os resultados sugerem que a combinação de inibidores da mTOR com diferentes modos de ação podem ter efeitos benéficos no tratamento do câncer de mama (LEUNG et al., 2015).

A Doxorrubicina é um composto químico que faz parte dos fármacos utilizados atualmente na terapia contra o câncer de mama. Seus efeitos na linhagem MDA-MB-231 têm sido amplamente discutidos na literatura. No geral, as pesquisas revelam que a Doxorrubicina apresenta efeitos citotóxicos relevantes em linhagens de mama, sempre dependente da concentração e do tempo de incubação. Pilco-Ferreto e colaboradores relatam uma potência entre 1,0 µM e 8 µM em 48 h de incubação, com indução da apoptose devido a atividade da família Bcl-2 (proteína reguladora de apoptose), indução de caspases e diminuição do estresse oxidativo por ROS nessas concentrações (PILCO-FERRETO; CALAF, 2016).

De acordo com o acervo de dados do Instituto Sangar do Hospital de Massachusetts, o qual disponibiliza valores de IC_{50} de variadas substâncias químicas em diversas linhagens celulares, o valor da doxorrubicina (1,24 µM) é similar ao descrito na Tabela 6 (SANGAR INSTITUTE, 2018).

Devido à alta citotoxicidade e efeitos colaterais da Doxorrubicina, diversos estudos abordam o encapsulamento dessa substância. Aroui e seus colaboradores desenvolveram um acoplamento com peptídeos de penetração de membrana com foco com aplicação em MDA-MB-231 para avaliação da indução a apoptose. Os resultados do encapsulamento foram positivos para indução quando comparados com a substâncias não conjugada. A indução da morte celular foi associada a oligomerização de Bax, liberação de citocromo c, ativação de caspases, condensação de cromatina e degradação internucleossômica, sugerindo que a ruptura mitocondrial é o principal evento induzido nessas condições (AROUI et al., 2009).

O inibidor de PI3K (NVP-BKM 120) foi testado em MDA-MB-231 no estudo de Yu e seus colaborados. Foi observada sua atividade individual (IC_{50} = 3,07 ± 0,14 µM) por MTT em 72 h de incubação e sua combinação com RAD001 (inibidor da mTOR), com valores variando entre 0,3 a 0,7 µM em ensaios *in vitro*. Testes com *Western blot* mostraram total inibição de AKT com os inibidores combinados. Além disso, testes com xenoenxerto de camundongo revelaram sinergia e baixo efeito colateral na terapia combinada (YU et al., 2016).

A Rapamicina, inibidora alostérica do domínio FRB da mTOR, foi recentemente explorada quanto seu potencial de inibição da telomerase. Apesar desses mecanismos ainda estarem pouco compreendidos, alguns autores destacam a necessidade de direcionamento desses estudos. O tratamento a curto prazo com Rapamicina (0,001 a 10 µM em 2, 24 e 48 h) inibiu a via mTOR e a atividade da telomerase e induziu a parada do ciclo celular na fase G1. Entretanto, o tratamento a longo prazo (1 nM a cada 48 h durante 3 semanas) não demonstrou atividade de inibição da telomerase (GOPALAKRISHNAN et al., 2018). Esses resultados demonstram que, além da atividade conhecida de inibição da mTOR, a Rapamicina pode estar associada a danos causados no ciclo celular, destacando a importância da abordagem de novos mecanismos de ação de substâncias já utilizadas em terapias contra o câncer.

Sumário dos resultados alcançados

Como conclusão da atividade das substâncias de referência aplicadas ao estudo de viabilidade celular nas linhagens de câncer de mama, fígado e próstata, foi possível observar seletividade para AZD-8055 e Doxorrubicina em quase todas as linhagens testadas. BEZ 235 e NVP-BKM 120 demonstraram pouca ou nenhuma seletividade nas análises, apresentando dados de toxicidade ou inatividade, dependendo da linhagem, enquanto que a Rapamicina mostrou seletividade, porém em concentrações mais altas do que as testadas nesse trabalho.

Dados da literatura relatam que as cinco substâncias de referência usadas vêm sendo estudadas em combinação com outras substâncias com diferentes mecanismos de ação em variadas linhagens celulares, com a finalidade de maximizar a eficiência do composto e diminuir os efeitos colaterais. Além disso, cada vez mais é destacada a resistência celular aos fármacos, o que torna essencial a extensão de estudos que visam o potencial das substâncias em mecanismos de ação ainda desconhecidos, como no caso da Rapamicina inibindo a Telomerase no câncer de mama triplo negativo (GOPALAKRISHNAN et al., 2018). Já vem sendo explorado o potencial sinergístico de substâncias em combinação, como discutido anteriormente. Essas estratégias visam expandir as terapias atuais de combate ao câncer e sanar o problema da resistência tumoral. Sendo assim, foram selecionadas as substâncias mais atrativas (Tabela 7) para serem combinadas com os derivados de dipeptidil nitrilas, selecionados no ensaio de migração celular (descritos no próximo item).

Tabela 7. Linhagens celulares e substâncias de referência selecionadas para serem aplicadas no estudo de terapia combinada.

DU 145	PC-3	HepG2	MDA-MB-231
Doxorrubicina	AZD-8055	AZD-8055	AZD-8055
NVP-BKM 120	BEZ 235	Doxorrubicina	BEZ 235
	Doxorrubicina		Doxorrubicina

Fonte: A autora.

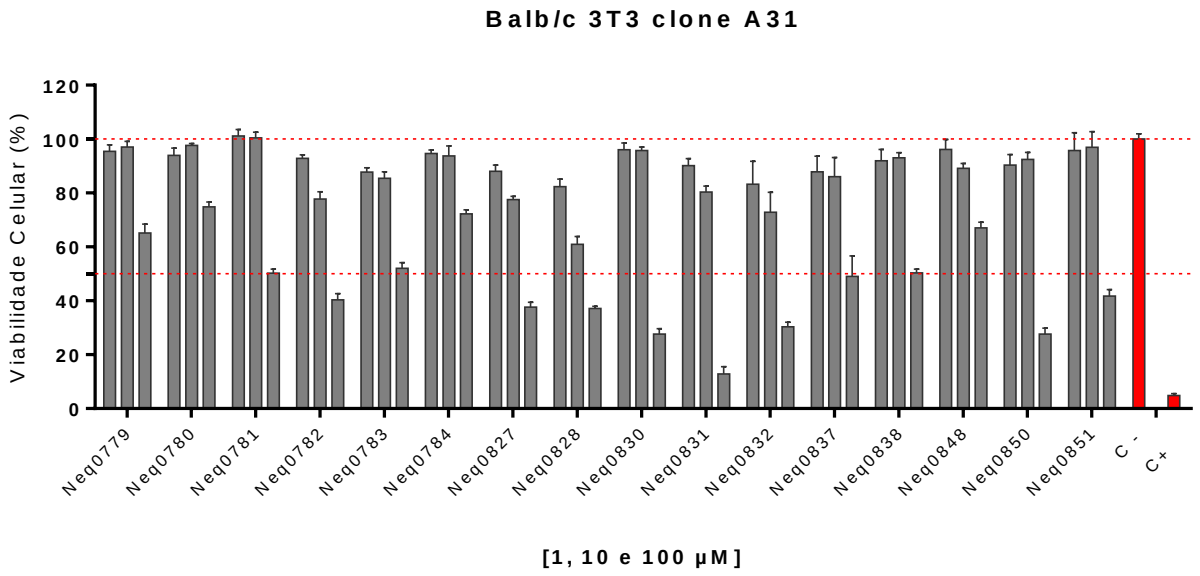
4.2. Avaliação da atividade citostática da segunda série de substâncias

4.2.1. Triagem nas linhagens celulares

O primeiro ensaio envolveu a análise da citotoxicidade, mesmo considerando que as substâncias tenham atividade citostática. Isto se faz necessário, pois é importante verificar em

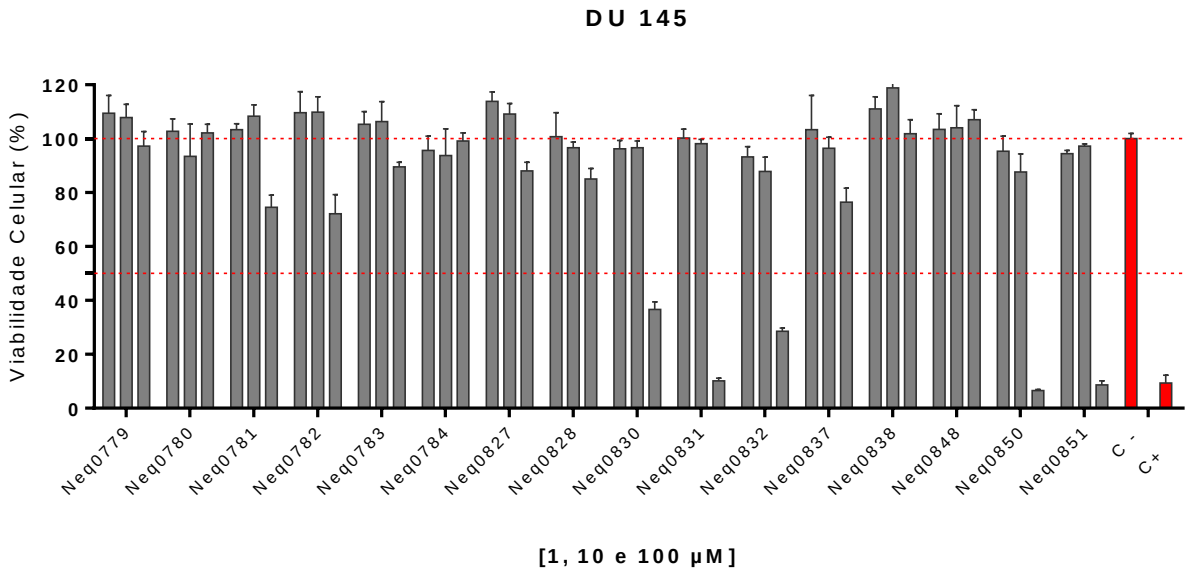
qual concentração a substância não deverá apresentar atividade citotóxica, uma vez que a resposta citostática não poderá ter influência na morte celular. Assim, as triagens para acessar a citotoxicidade foram realizadas para a linhagem controle (Figura 25) e tumorais (Figura 26).

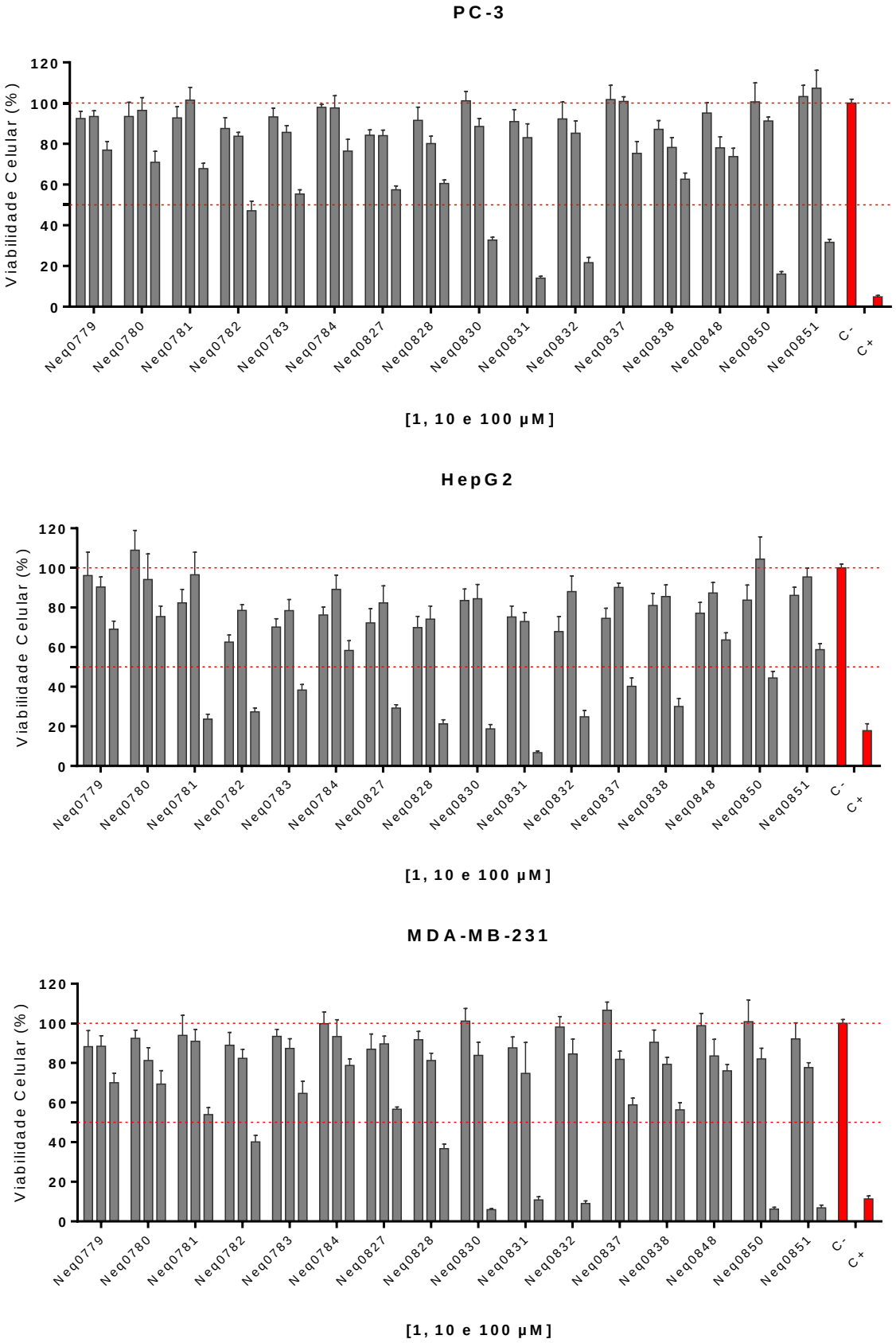
Figura 25. Triagem da segunda série de substâncias químicas na linhagem Balb/C 3T3 clone A31 para determinação da atividade citotóxica.



C-: controle negativo (célula sem tratamento contendo 0,5% v/v de DMSO). C+: controle positivo (doxorrubicina 10 µM).
Fonte: A autora.

Figura 26. Triagem da atividade citotóxica da segunda série de substâncias químicas nas linhagens tumorais de próstata (DU 145 e PC-3), fígado (HepG2) e mama (MDA-MB-231).





C-: controle negativo (célula sem tratamento contendo 0,5% v/v de DMSO). C+: controle positivo (YM-155 1 µM).

Fonte: A autora.

Conforme esperado para a linhagem Balb/C (Figura 25) e as tumorais (Figura 26), as substâncias induziram a baixa viabilidade celular (citotoxicidade) com valores abaixo de 50% somente na concentração mais alta testada (100 µM). A baixa citotoxicidade dos derivados de dipeptidil nitrilas observada anteriormente (QUILLES et al., 2019) nos estudos com a linhagem de câncer de pâncreas (MIA PaCa-2) e em linhagens como as usadas neste trabalho, foi novamente confirmada neste ensaio. Isto se deve a maior relevância da função das cisteíno proteases em processos metastáticos e replicação celular, conforme descrito na introdução. Desta forma, um subconjunto desta série de substâncias foi selecionado para realizar os próximos ensaios baseado nos resultados alcançados, apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Substâncias bioativas selecionadas para o ensaio de migração celular.

Derivados de dipeptidil nitrilas (Neq)	
0779	0827
0780	0837
0781	0848
0783	0850
0784	0851

Fonte: A autora.

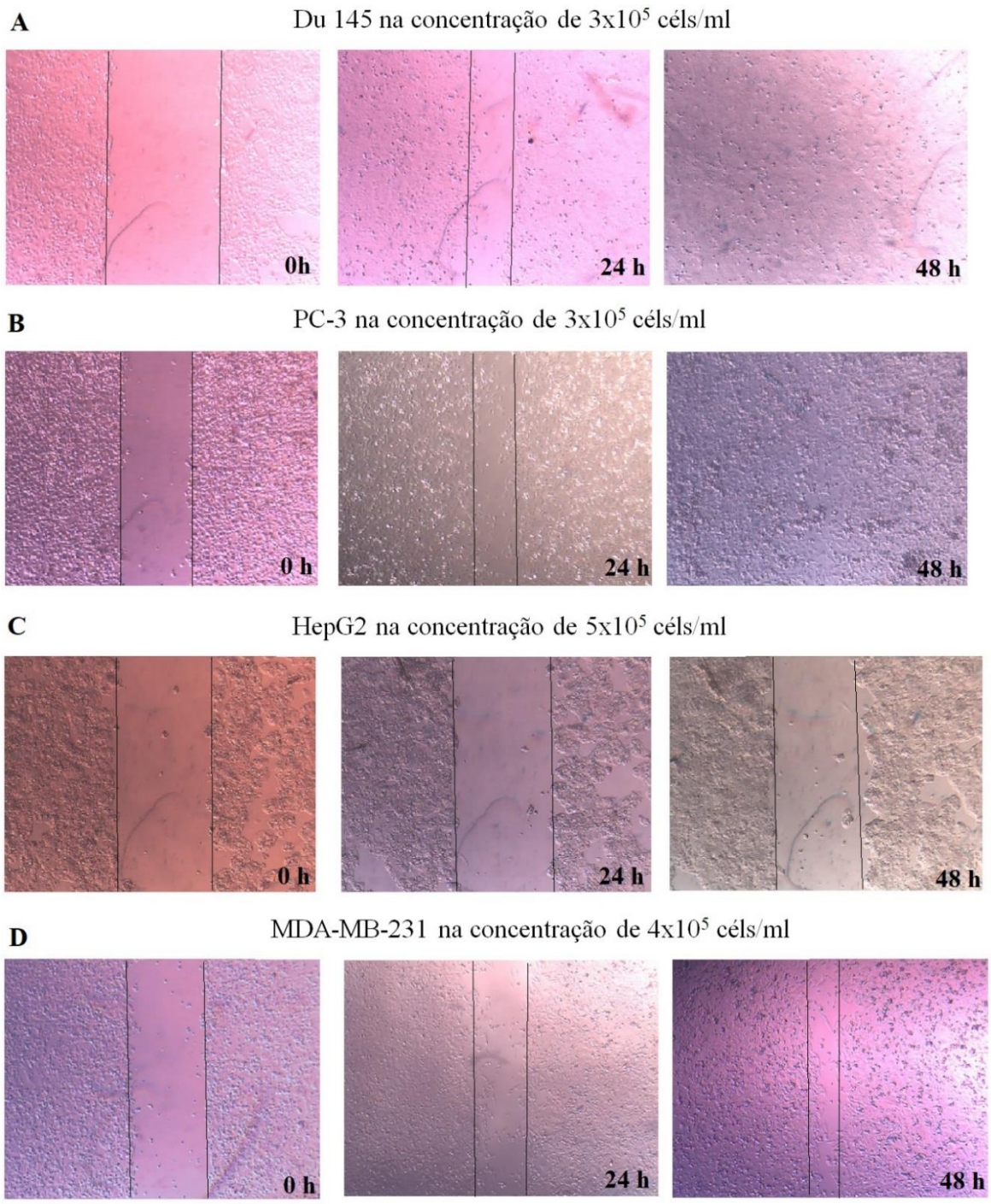
4.2.2. Ensaio de fechamento de risca (*Wound healing*)

Inicialmente foi realizada a padronização da concentração de plaqueamento para o ensaio de migração, visto que cada linhagem tumoral apresenta morfologia, metabolismo e crescimento distintos. Uma vez definida a concentração de plaqueamento, foi possível realizar o ensaio de migração para cada linhagem. A seleção das substâncias químicas de interesse para essa etapa foi baseada nos resultados da triagem das amostras (item 4.2.1). O painel foi montado considerando as amostras às quais a porcentagem de células viáveis ficou acima de 85% nas concentrações de 1 e 10 µM. O ensaio de migração celular foi feito nessas mesmas concentrações.

Para o desenvolvimento do ensaio de migração celular foi necessário determinar a concentração adequada de plaqueamento para cada linhagem. Para isso foi feito o plaqueamento em quatro concentrações distintas e foi observada a distribuição, densidade e homogeneidade celular após 24 h de adesão das células a placa. A Figura 27 ilustra um dos ensaios com análise

do fechamento da risca após 0, 24 e 48 h. Na Tabela 9 estão descritas as concentrações de plaqueamento selecionadas para cada linhagem.

Figura 27. Padronização da concentração de plaqueamento para o ensaio de migração celular (*Wound Healing*) nas linhagens DU 145 (A), PC-3 (B), HepG2 (C) e MDA-MB-231 (D), no tempo de 0, 24 e 48 h, respectivamente.



Fonte: A autora.

Tabela 9. Concentrações de células utilizadas para o plaqueamento no ensaio de fechamento de risca de acordo com cada linhagem celular.

Linhagem celular	Concentração celular (Células/mL)
DU 145	$3x10^5$
PC-3	$3x10^5$
HepG2	$5x10^5$
MDA-MB-231	$4x10^5$

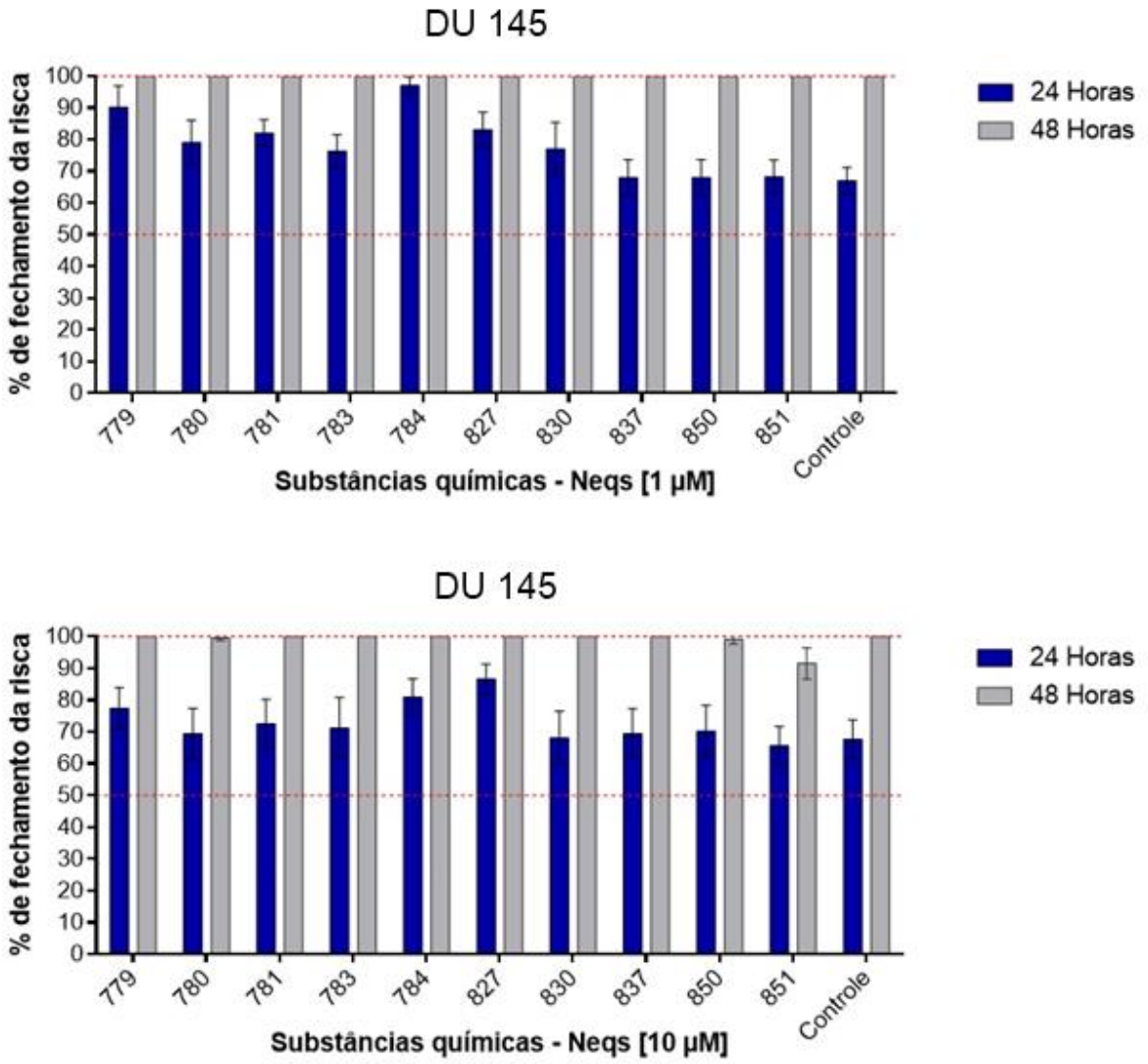
Fonte: A autora.

O protocolo de definição da concentração de plaqueamento foi importante para obter a condição adequada para alcançar a uniformidade celular após 24 h de adesão, além da observação do potencial migratório das células sem tratamento. As linhagens de neoplasia prostática (DU 145 e PC-3) foram as únicas a fecharem completamente a risca em 48 h, com alto potencial migratório, o que é condizente com as características metastáticas das mesmas (CUNNINGHAM; YOU, 2015). A linhagem MDA-MB-231 (mama), apesar de ser uma linhagem metastática, não foi capaz de fechar completamente a risca em 48 h. O mesmo perfil foi o observado para HepG2 (linhagem de hepatocarcinoma), o que já é esperado, visto que a linhagem de fígado é uma linhagem primária e não metastática (CHEN et al., 2015; XIA et al., 2013). Outra característica a ser destacada para a linhagem HepG2 é que sua morfologia se caracteriza pelo crescimento de aglomerados celulares, o que favorece a formação de grumos e dificulta o processo migratório e metastático da linhagem.

Uma vez definida a concentração de plaqueamento, foi possível realizar o ensaio de inibição da migração usando as substâncias químicas selecionadas para essa etapa (Tabela 8). Foram considerados efeitos citostáticos positivos aqueles compostos que mantiveram as porcentagens de fechamento da área da risca abaixo da porcentagem de fechamento do controle negativo.

As Figuras 28, 29, 30 e 31 apresentam a área de fechamento da risca (%) das 10 substâncias de interesse testadas nas concentrações de 1 e 10 µM para DU 145, PC-3, HepG2 e MDA-MB-231, respectivamente.

Figura 28. Análise da inibição da migração celular por meio do fechamento de risca para a linhagem de neoplasia prostática metastática DU 145 após 24 e 48 h de incubação com concentrações de 1 e 10 µM das substâncias de interesse.

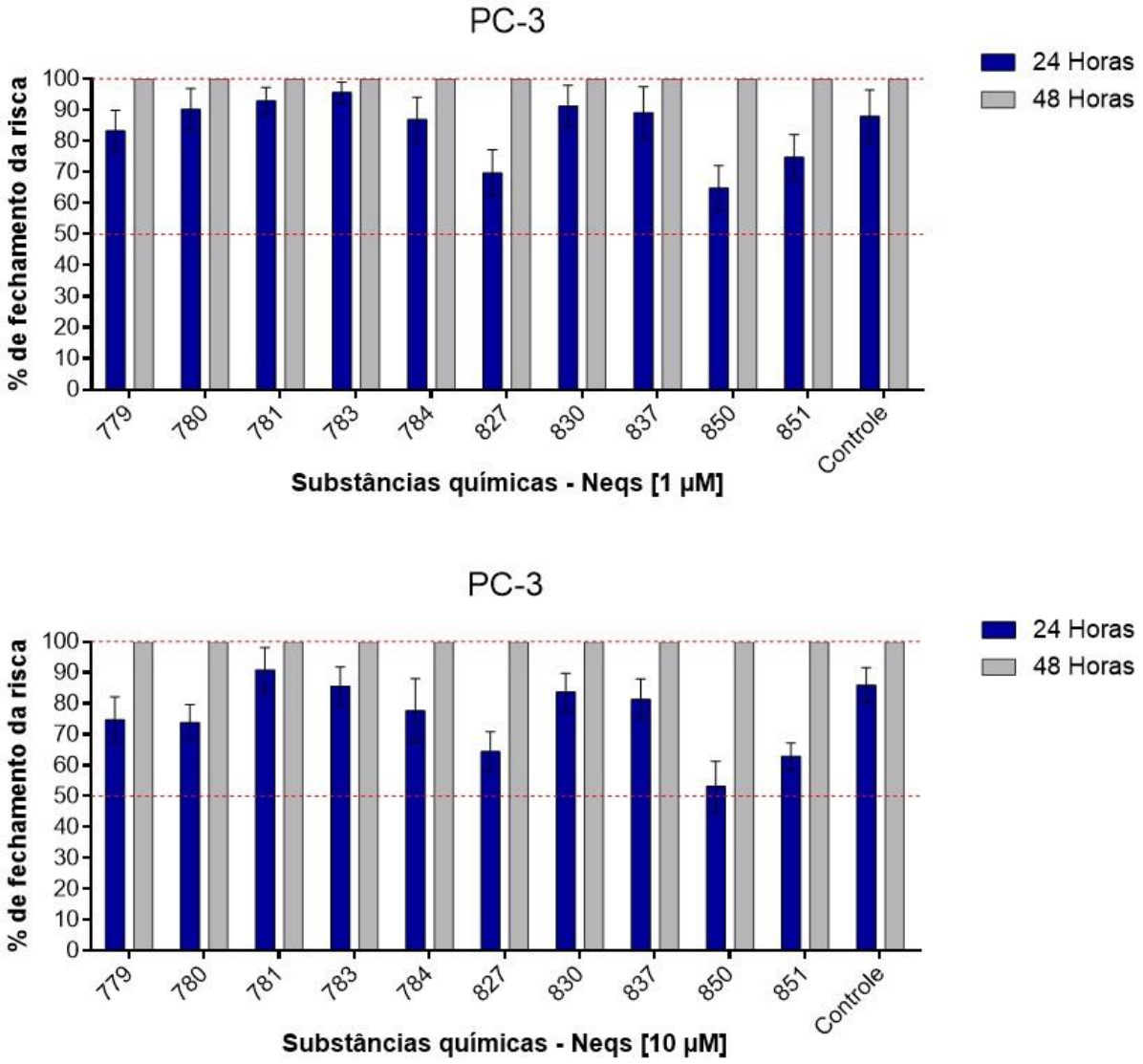


Controle: 0,5% (v/v) de DMSO.

Fonte: A autora.

Para a linhagem de próstata (DU 145) não foi observada atividade de inibição da migração celular para as substâncias testadas (Figura 28). Isto porque em ambas as concentrações testadas, todas as substâncias químicas já haviam fechado mais de 50% da risca em 24 e 48 h. Apenas a substância 0851 na concentração de 10 µM inibiu o fechamento completo da risca após 48 h, por esse motivo essa substância foi a única selecionada para o ensaio de terapia combinada.

Figura 29. Análise da inibição da migração celular por meio do fechamento de risca para a linhagem de neoplasia prostática metastática PC-3 após 24 e 48 h de incubação com concentrações de 1 e 10 µM das substâncias de interesse.

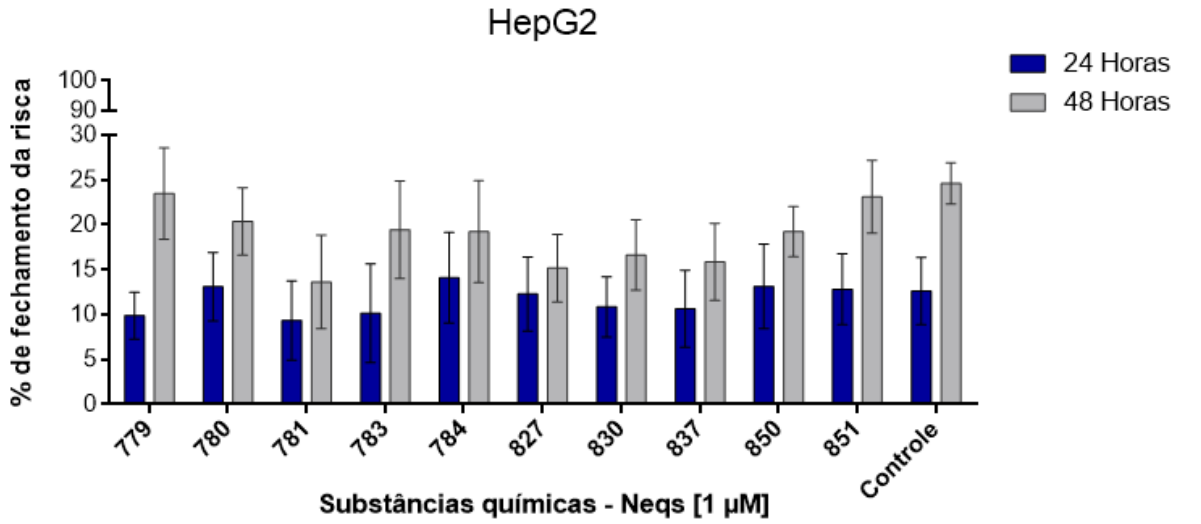


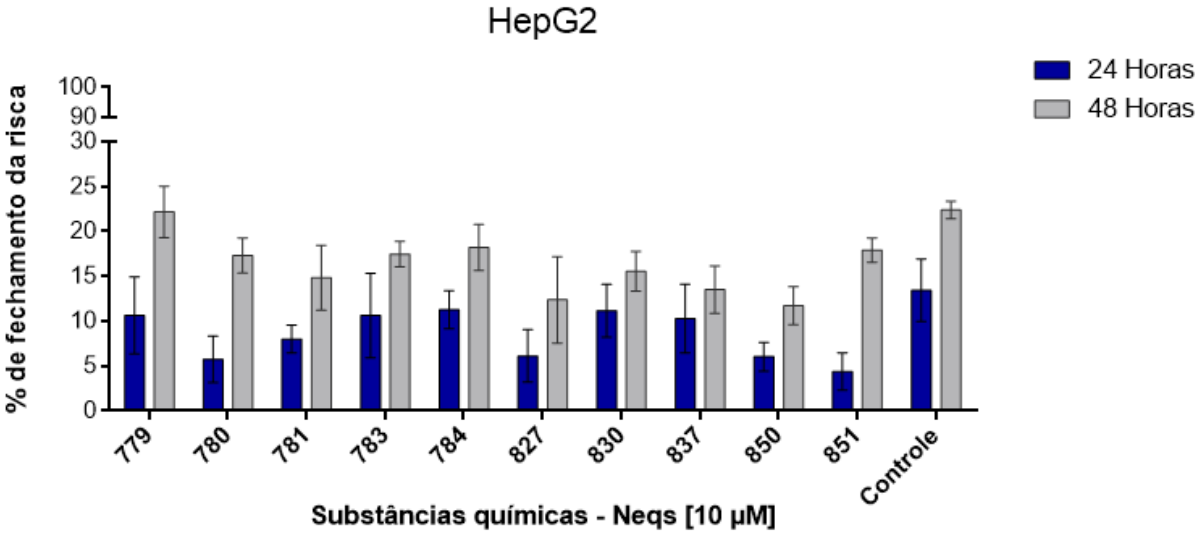
Controle: 0,5% (v/v) de DMSO.

Fonte: A autora.

Assim como na DU 145, nenhum composto apresentou efeito citostático relevante para PC-3 (Figura 29). Em 24 h houve migração acima de 50% das células independente da concentração ou da substância adicionada. As três substâncias com melhor atividade foram os Neqs 0827, 0850 e 0851. Os Neqs 0827 e 0850 foram selecionados para a etapa de combinação por apresentarem o melhor resultado para essa linhagem. O Neq0851 foi descartado devido à baixa atividade, e foi levado em conta sua elevada citotoxicidade, na concentração de 100 µM, observada na triagem das substâncias descrita no item anterior.

Figura 30. Análise da inibição da migração celular por meio do fechamento de risca para a linhagem de neoplasia prostática metastática HepG2 após 24 e 48 h de incubação com concentrações de 1 e 10 µM das substâncias de interesse.





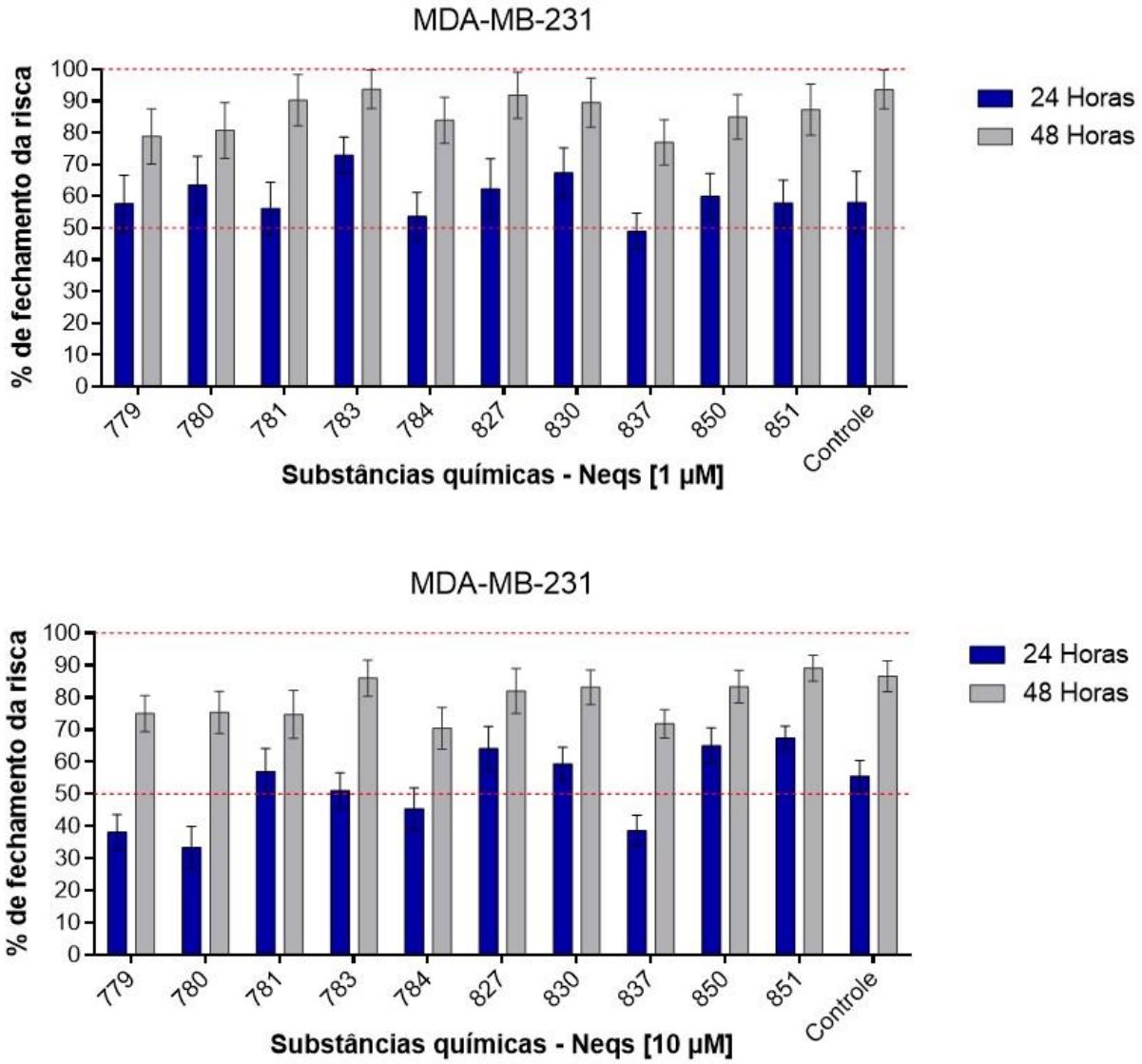
Controle: 0,5% (v/v) de DMSO.

Fonte: A autora.

A linhagem de hepatocarcinoma (HepG2), por não ser uma linhagem metastática, não reportou fechamento total da risca (Figura 30). Mesmo assim, foram selecionadas 6 substâncias químicas para serem testadas no ensaio de terapia combinada. Os poços com administração de Neq0779, Neq0781, Neq0784, Neq0827, Neq0830 e Neq0850 apresentaram significativas porcentagem de fechamento da risca quando comparadas ao valor de fechamento do controle negativo nas mesmas condições (independentemente da concentração estudada e do tempo de

incubação), por esse motivo estas substâncias foram selecionadas para o estudo de terapia combinada.

Figura 31. Análise da inibição da migração celular por meio do fechamento de risca para a linhagem de neoplasia prostática metastática MDA-MB-231 após 24 e 48 h de incubação com concentrações de 1 e 10 µM das substâncias de interesse.



Controle: 0,5% (v/v) de DMSO.

Fonte: A autora.

O ensaio de migração celular para a linhagem de mama (MDA-MB-231) exemplificado na Figura 31, mostrou atividade citostática em quatro substâncias na concentração de 10 µM

(Neq0779, Neq0780, Neq0784 e Neq0837). Além disso, na concentração de 1 µM, o Neq0837 se mostrou mais promissor dentre todos.

Em resumo, as linhagens mais sensíveis às substâncias químicas testadas foram HepG2 (fígado) e MDA-MB-231 (mama). Em ambas as linhagens foi possível estabelecer uma relação citostática considerável entre as células sem tratamento e as células na presença dos compostos.

Para as linhagens de câncer de próstata, o ensaio não revelou sensibilidade das mesmas às substâncias químicas, com porcentagem de fechamento de risca acima de 90 % em relação ao controle negativo no tempo de 48 h. Este resultado pode ser justificado devido à agressividade, resistência e alto potencial metastático do câncer de próstata (CUNNINGHAM; YOU, 2015), como é o caso de DU 145 e PC-3.

No geral, as substâncias que demonstraram melhores resultados, foram: Neq0779, Neq0780 e Neq0850 e suas atividades citostáticas foram observadas em, pelo menos, três linhagens.

Considerando a atividade anti-migratória das substâncias analisadas, foi determinado que os derivados de dipeptidil nitrilas deveriam ser aplicados na concentração de 10 µM no estudo de terapia combinada, uma vez que essa foi a concentração que destacou atividade mais significativa das substâncias químicas.

4.3. Terapia Combinada

Cada vez mais vendo sendo explorada a combinação de substâncias químicas, pois as substancias isoladas, muitas vezes, são ineficientes em baixas concentrações e em altas podem ser tóxicas.

As substâncias químicas selecionadas após o ensaio de fechamento da risca foram combinadas com as substâncias de referência mais seletivas para cada linhagem tumoral abordada nessa pesquisa. O estudo de combinação investigou dois grupos de substâncias químicas com atividade antineoplásica: os inibidores da via PI3K-AKT-mTOR e a Doxorrubicina, inibidora da Topoisomerase II. Esses dois grupos foram combinados com as novas substâncias bioativas desenvolvidas pelo grupo NEQUIMED, às quais foram planejadas conforme mencionado na introdução.

Os valores de IC_{50} do agente citotóxico administrado isoladamente foi comparado com o valor de IC_{50} da combinação do agente citotóxico com a substância de características anti-migração, com a finalidade de verificar se a combinação potencializou a substância de referência.

A razão entre os valores de IC_{50} foram interpretadas da seguinte forma: variação abaixo de 1 apresenta o efeito sinérgico (agente anti-migração sensibiliza a célula para aumentar a potência do agente citotóxico), é observada a diminuição do IC_{50} da substância combinada e a curva de combinação se desloca para a esquerda da curva com a substância isolada; acima de 1, o efeito é antagonista; e quanto menor for a variação do valor de IC_{50}, mais próximo de 1 é a razão entre os valores, destacando a não sensibilização da linhagem celular pelo agente citostático.

A Tabela 10 apresenta as substâncias químicas (compostos de referência e compostos de interesse) e as linhagens selecionadas no estudo de combinação. Nas Tabelas 11-15 descritas nos próximos subitens, está destacada a variação do valor de $IC_{50,}$ bem como os parâmetros estatísticos.

Tabela 10. Substâncias químicas selecionadas para o estudo de terapia combinada, bem como as linhagens cancerígenas às quais foram aplicadas as combinações.

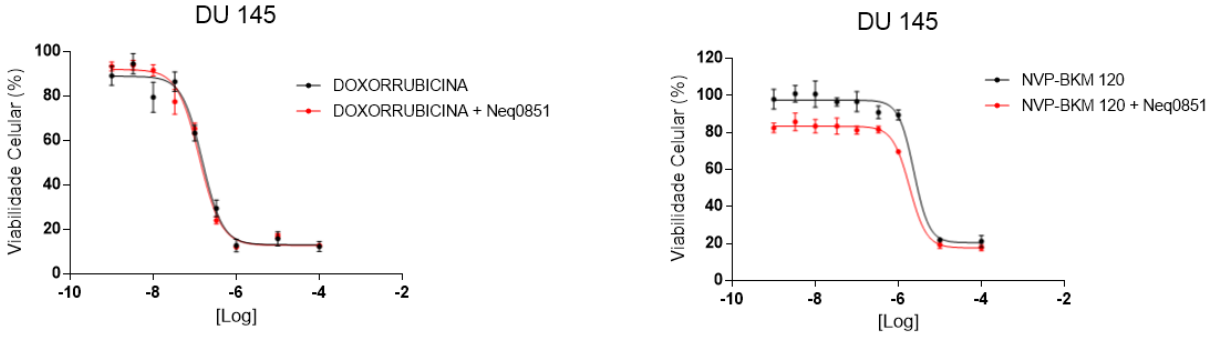
Atividade	**Linhagem celular**			
	HepG2	**PC-3**	**DU 145**	**MDA-MB-231**
Citotóxica	AZD-8055 Doxorrubicina	AZD-8055 BEZ 235 Doxorrubicina	Doxorrubicina NVP-BKM-231	AZD-8055 BEZ 235 Doxorrubicina
Anti-migração	Neq0779 Neq0780 Neq0784 Neq0827 Neq0830 Neq0850	Neq0827 Neq0850	Neq0851	Neq0779 Neq0780 Neq0784 Neq0837

Fonte: A autora.

4.3.1. Linhagens de neoplasia prostática metastática (PC-3 e DU 145)

As Figuras 32 e 33 apresentam as curvas concentração-resposta para as linhagens DU 145 e PC-3, respectivamente, usando monoterapia e combinação de duas substâncias químicas. Os valores das potências em cada caso estão presentes nas Tabelas 11 e 12, com destaque para a variação do IC_{50}.

Figura 32. Curvas concentração-resposta da combinação das substâncias de referência (Doxorrubicina ou NVP-BKM 120) com a concentração fixa de nitrila Neq0851 (10 µM) para a linhagem DU 145.



Fonte: A autora.

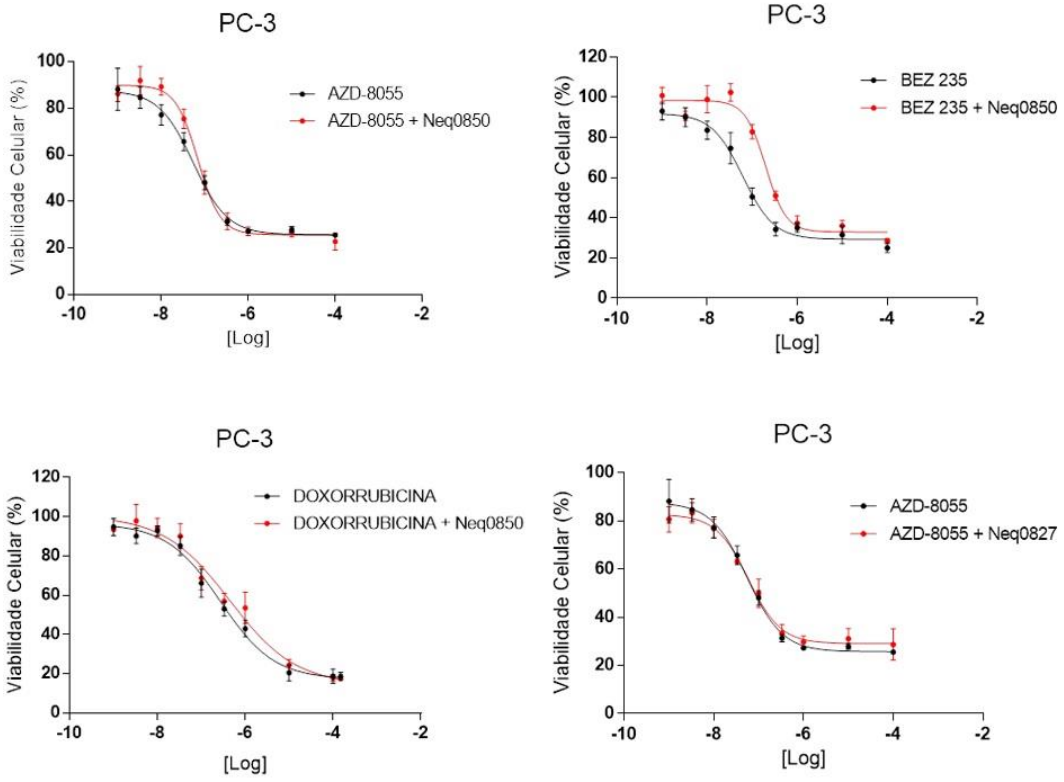
Tabela 11. Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}) e sua variação, o ajuste do modelo (R^2/Sy.x) para as substâncias de referência (Doxorrubicina e NVP-BKM 120) em monoterapia ou combinadas com o Neq0851 a 10 µM na linhagem DU 145.

Esquema terapêutico	IC_{50}	R^2/Sy.x	Variação do IC_{50}*
Doxorrubicina	0,15 ± 0,02 µM	0,97/5,56	0,80
Doxorrubicina + Neq0851	0,12 ± 0,01 µM	0,98/4,40	
NVP-BKM 120	2,37 ± 0,46 µM	0,97/4,81	0,78
NVP-BKM 120 + Neq0851	1,86 ± 0,40 µM	0,98/3,01	

* Razão entre os valores de IC_{50} da combinação dos compostos químicos em relação à substância isolada (abaixo de 1 = efeito sinérgico; acima de 1 = efeito antagonista).
Fonte: A autora.

A combinação do composto Neq0851 com as substâncias Doxorrubicina ou NVP-BKM 120 demonstrou pequena sinergia. Apesar de não representar uma variação muito grande este resultado era esperado, visto que as substâncias de interesse não tiveram efeito anti-migratório acentuado nessa linhagem. É interessante notar que esta substância é seletiva apenas para essa linhagem de câncer de próstata, visto que ela não foi selecionada para estudo na linhagem PC-3. Outro ponto a ser destacado é que a combinação demonstrou melhora no efeito, porém não houve melhora na eficácia.

Figura 33. Curvas concentração-resposta da combinação das substâncias de referência (AZD-8055, BEZ 235 ou Doxorrubicina) com a concentração fixa de nitrila Neq0850 ou Neq0827 (10 µM) para a linhagem PC-3.



Fonte: A autora.

Tabela 12. Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}) e sua variação, o ajuste do modelo (R^2/Sy.x) para as substâncias de referência (AZD-8055, BEZ 235 ou Doxorrubicina) em monoterapia ou combinadas com o Neq0850 ou Neq0827 a 10 µM na linhagem PC-3.

Esquema terapêutico	IC_{50}	R^2/Sy.x	Variação do IC_{50}*
AZD-8055 AZD-8055+ Neq0850	0,05 ± 0,01 µM 0,06 ± 0,05 µM	0,96/5,03 0,96/5,54	1,2
BEZ 235 BEZ 235 + Neq0850	0,07 ± 0,05 µM 0,19 ± 0,02 µM	0,95/5,76 0,96/5,84	2,7
Doxorrubicina Doxorrubicina + Neq0850	0,31 ± 0,04 µM 0,52 ± 0,09 µM	0,98/3,92 0,96/6,32	1,7
AZD-8055 AZD-8055 + Neq0827	0,05 ± 0,01 µM 0,06 ± 0,04 µM	0,96/5,03 0,97/4,00	1,2

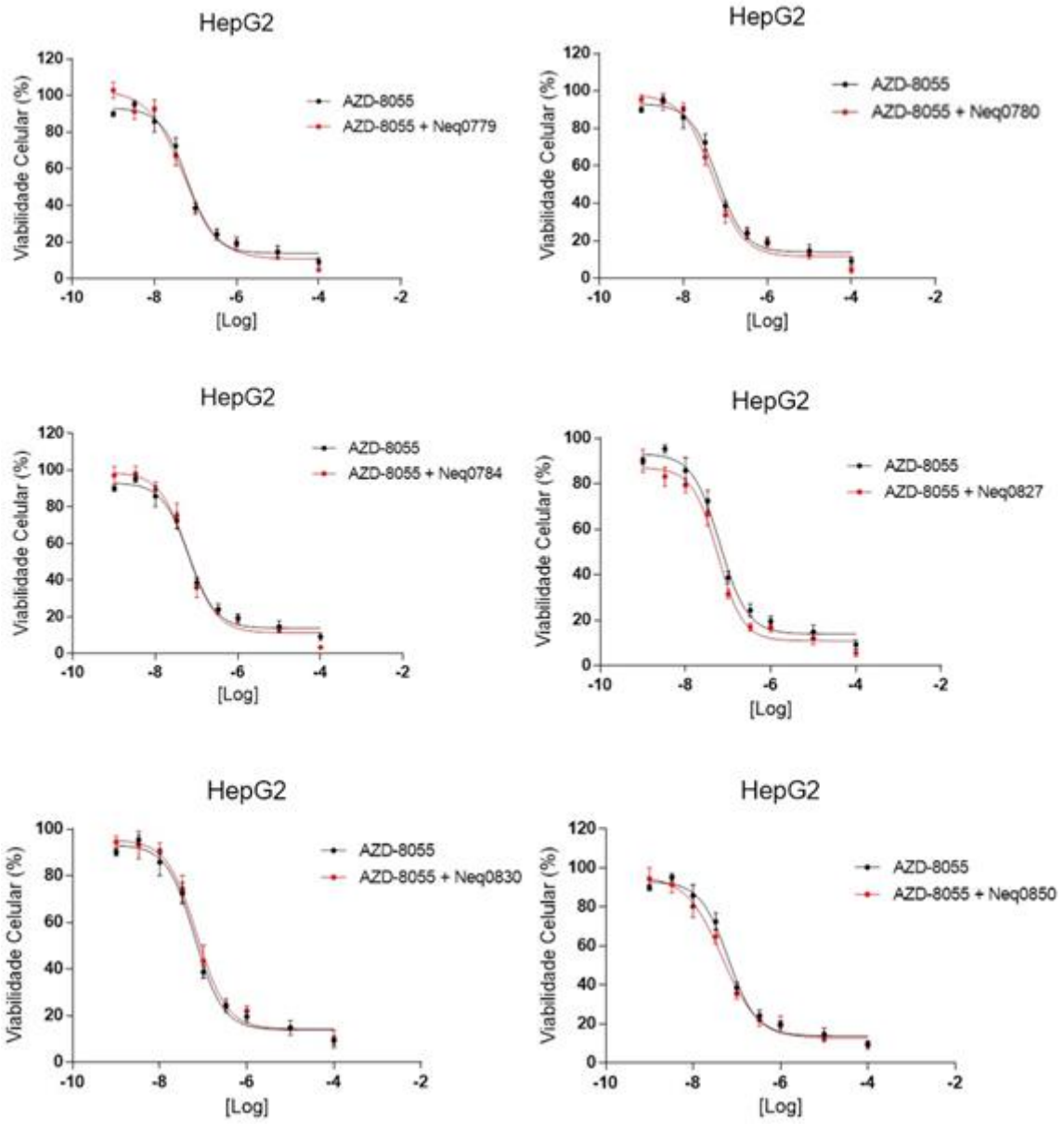
* Razão entre os valores de IC_{50} da combinação dos compostos químicos em relação à substância isolada (abaixo de 1 = efeito sinérgico; acima de 1 = efeito antagonista).
Fonte: A autora.

A partir dos resultados da Figura 33 e da Tabela 12 para a linhagem PC-3, nota-se que as combinações com AZD-8055 não tiveram efeito, enquanto que as combinações com BEZ 235 ou Doxorrubicina foram antagonistas. Não foi possível identificar uma terapia combinada favorável para esta linhagem celular, apesar de estudos de combinação demonstrarem resultados promissores, com sinergia nas combinações de PC-3 e DU 145 com substâncias associadas a vias de sinalizações reguladores de migração e proliferação (YADAV et al., 2016). Devido ao antagonismo nas combinações para essa linhagem, a análise com o da combinação com o Neq0827 foi feita apenas com a substância AZD-8055.

4.3.2. Linhagem de hepatocarcinoma (HepG2)

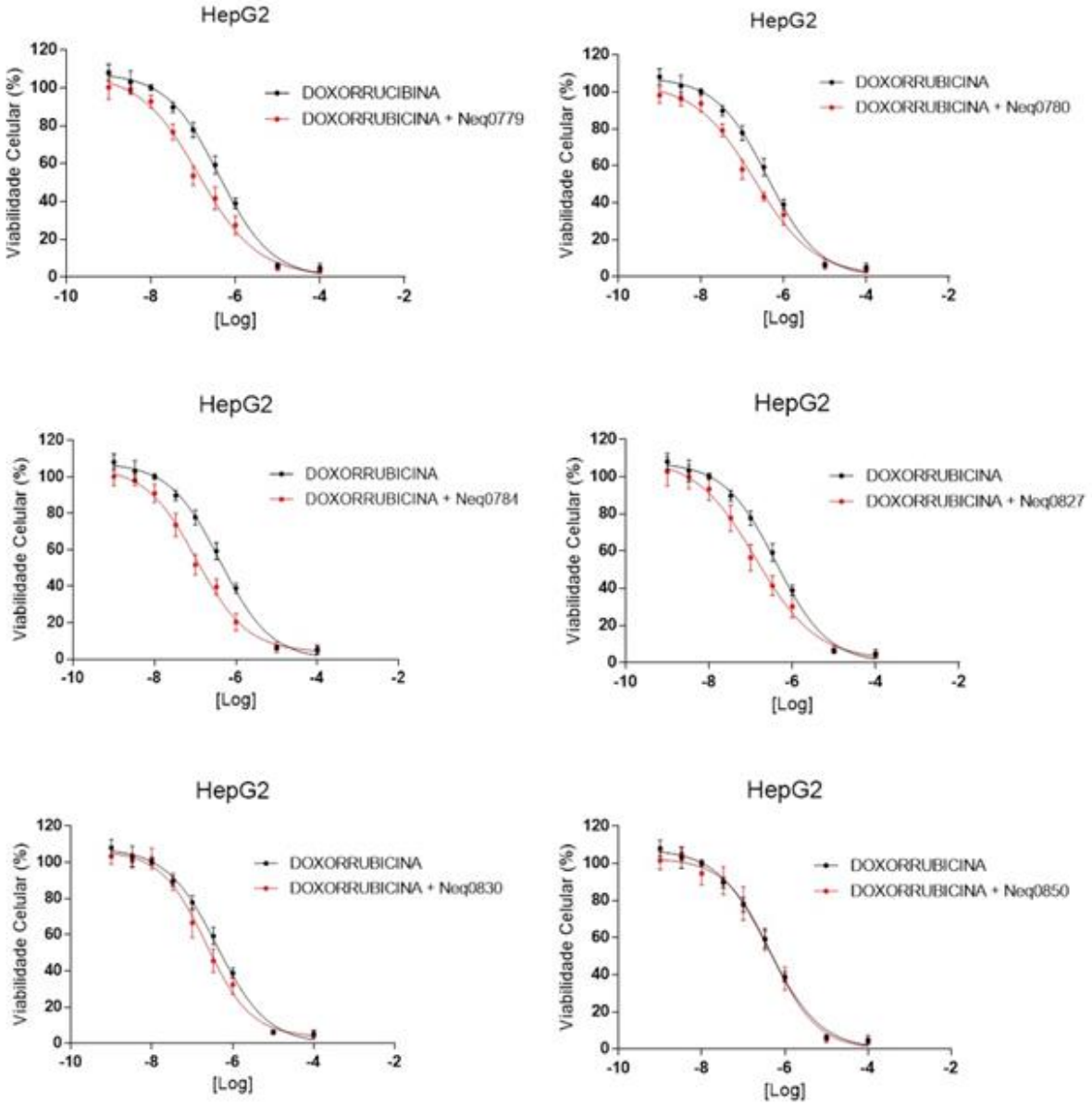
As Figuras 34 e 35 apresentam as curvas concentração-resposta para a linhagem HepG2 com as substâncias de referência AZD-8055 e Doxorrubicina, respectivamente, com resultados sumarizados na Tabela 13.

Figura 34. Curvas concentração-resposta da combinação da substância de referência (AZD-8055) com a concentração fixa das nitrilas (10 µM) para a linhagem HepG2.



Fonte: A autora.

Figura 35. Curvas concentração-resposta da combinação da substância de referência (Doxorrubicina) com a concentração fixa das nitrilas (10 µM) para a linhagem HepG2.



Fonte: A autora.

Tabela 13. Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}) e sua variação, o ajuste do modelo (R^2/Sy.x) para as substâncias de referência (AZD-8055 ou Doxorrubicina) em monoterapia ou combinadas com as nitrilas a 10 µM na linhagem HepG2.

Esquema terapêutico	IC_{50}	R^2/Sy.x	Variação do IC_{50}
AZD-8055	0,06 ± 0,01 µM	0,98/4,41	0,83
AZD-8055+ Neq0779	0,05 ± 0,01 µM	0,97/5,37	
AZD-8055	0,06 ± 0,01 µM	0,98/4,41	0,67
AZD-8055 + Neq0780	0,04 ± 0,01 µM	0,98/4,93	
AZD-8055	0,06 ± 0,01 µM	0,98/4,41	1
AZD-8055 + Neq0784	0,06 ± 0,01 µM	0,97/5,76	
AZD-8055	0,06 ± 0,01 µM	0,98/4,41	0,83
AZD-8055 + Neq0827	0,05 ± 0,01 µM	0,98/4,58	
AZD-8055	0,06 ± 0,01 µM	0,98/4,41	1,2
AZD-8055 + Neq0830	0,07 ± 0,01 µM	0,98/4,78	
AZD-8055	0,06 ± 0,01 µM	0,98/4,41	0,67
AZD-8055 + Neq0850	0,04 ± 0,01 µM	0,98/4,35	
Doxorrubicina	0,40 ± 0,05 µM	0,98/4,10	0,33
Doxorrubicina + Neq0779	0,13 ± 0,01 µM	0,98/4,98	
Doxorrubicina	0,40 ± 0,05 µM	0,98/4,10	0,48
Doxorrubicina + Neq0780	0,19 ± 0,01 µM	0,98/4,82	
Doxorrubicina	0,40 ± 0,05 µM	0,98/4,10	0,25
Doxorrubicina + Neq0784	0,10 ± 0,01 µM	0,98/4,89	
Doxorrubicina	0,40 ± 0,05 µM	0,98/4,10	0,33
Doxorrubicina + Neq0827	0,13 ± 0,01 µM	0,97/5,95	
Doxorrubicina	0,40 ± 0,05 µM	0,98/4,10	0,55
Doxorrubicina + Neq0830	0,22 ± 0,02 µM	0,98/5,58	
Doxorrubicina	0,40 ± 0,05 µM	0,98/4,10	1,2
Doxorrubicina + Neq0850	0,47 ± 0,05 µM	0,97/5,87	

* Razão entre os valores de IC_{50} da combinação dos compostos químicos em relação à substância isolada (abaixo de 1 = efeito sinérgico; acima de 1 = efeito antagonista).
Fonte: A autora.

No geral, as combinações das substâncias com Doxorrubicina demonstraram um perfil melhor do que para o AZD-8055 na linhagem HepG2. Todas as substâncias foram inativas na combinação com AZD-8055, enquanto várias substâncias tiveram sinergia com Doxorrubicina. Esta diferença se deve basicamente ao mecanismo da substância de referência, sendo a doxorrubicina um composto que atua na interação com DNA e topoisomerase II, além de levar ao aumento de ROS, enquanto que AZD-8055 é inibidor da mTOR com atuação no sítio do ATP.

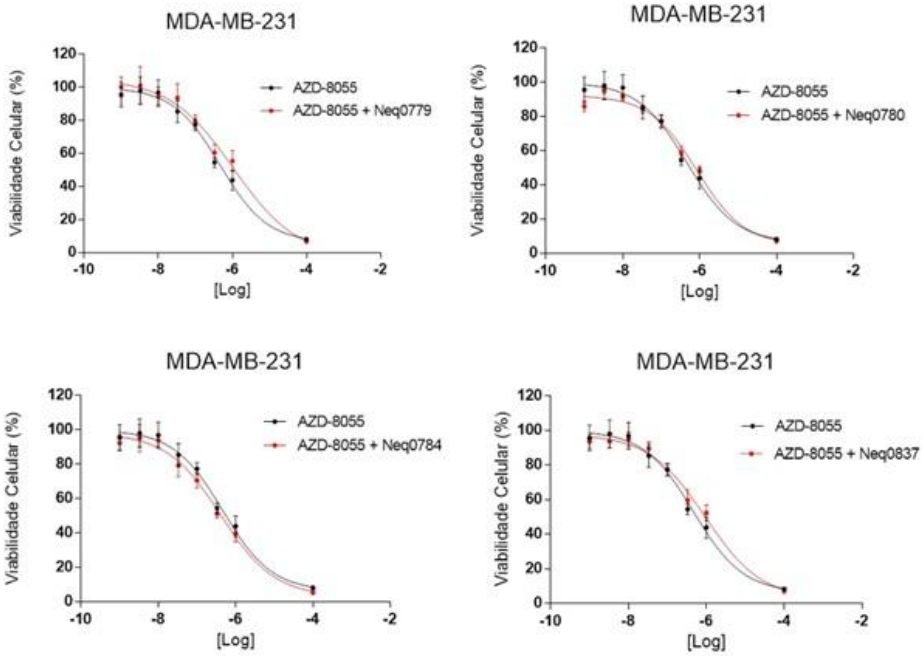
É interessante notar que o ensaio de migração da HepG2 levou a seleção do maior número de derivados de dipeptidil nitrilas dentre todas as linhagens, apesar dos resultados de terapia combinada terem sido, em sua maioria, desalentadores. Isto demonstra o quão empírico o estudo de combinações de substâncias com mecanismos distintos ainda é, quando comparado com substâncias em monoterapia.

A partir dos dados da Tabela 13, pode-se estabelecer alguns padrões estruturais para os derivados testados em combinação com a Doxorrubicina. Por exemplo, Neq0779 e Neq780 se diferem pela fenila e isopropila, mas ambas substâncias apresentaram sinergia. Por outro lado, a estereoisomeria do aminoácido central não parece ser essencial para a resposta celular, pois a combinação com Neq0784 apresentou o melhor resultado da série.

4.3.3. Linhagem de câncer de mama (MDA-MB-231)

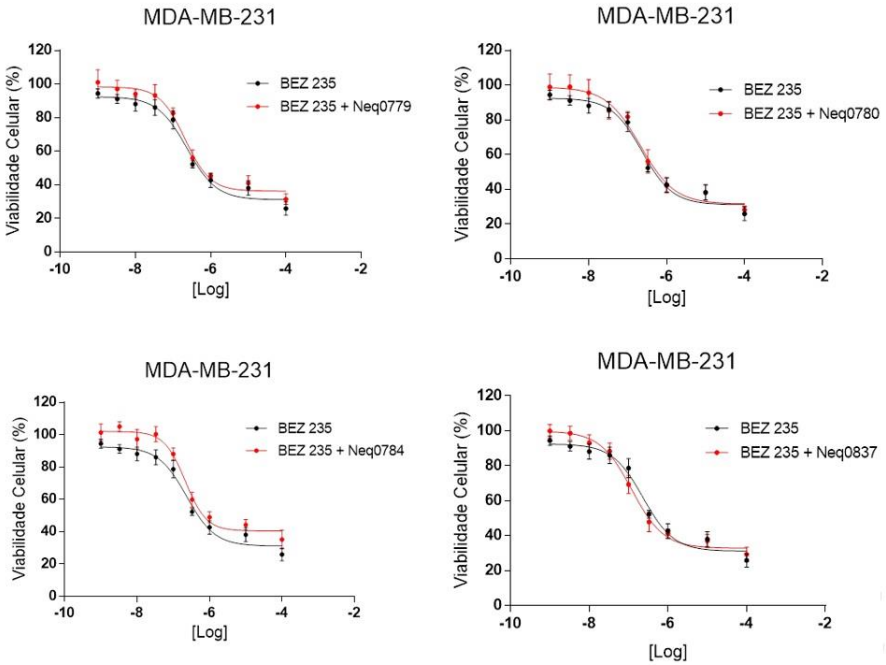
As Figuras 36, 37 e 38 representam as curvas concentração-resposta para a linhagem MDA-MB-231 com as substâncias de referência AZD, BEZ e Doxorrubicina, respectivamente, com o sumário descrito na Tabela 14.

Figura 36. Curvas concentração-resposta da combinação da substância de referência (AZD-8055) com a concentração fixa das nitrilas (10 µM) para a linhagem MDA-MB-231.



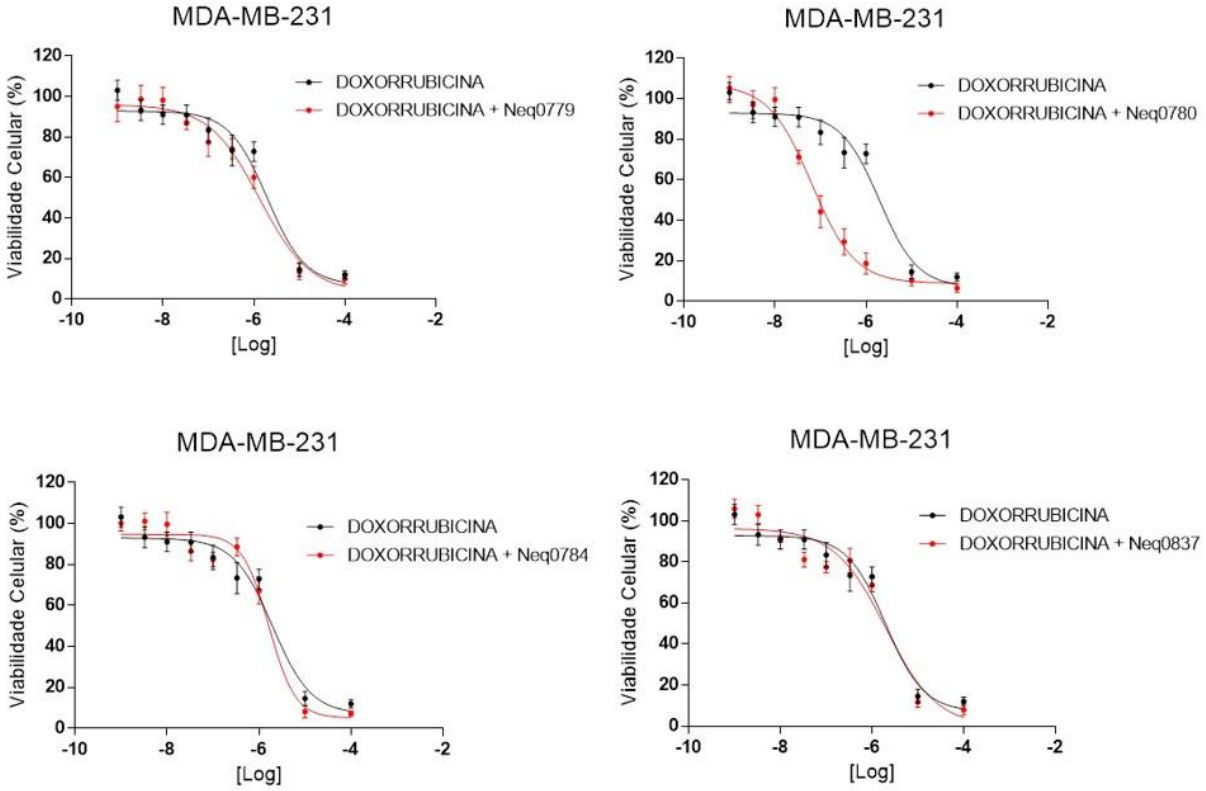
Fonte: A autora.

Figura 37. Curvas concentração-resposta da combinação da substância de referência (BEZ 235) com a concentração fixa das nitrilas (10 µM) para a linhagem MDA-MB-231.



Fonte: A autora.

Figura 38. Curvas concentração-resposta da combinação da substância de referência (Doxorrubicina) com a concentração fixa das nitrilas (10 µM) para a linhagem MDA-MB-231.



Fonte: A autora.

Tabela 14. Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}) e sua variação, o ajuste do modelo (R^2/Sy.x) para as substâncias de referência (AZD-8055, BEZ 235 ou Doxorrubicina) em monoterapia ou combinadas com as nitrilas a 10 µM na linhagem MDA-MB-231.

Esquema terapêutico	IC_{50}	R^2/Sy.x	Variação do IC_{50}
AZD-8055	0,46 ± 0,07 µM	0,96/6,23	2,3
AZD-8055+ Neq0779	1,06 ± 0,31 µM	0,95/7,14	
AZD-8055	0,46 ± 0,07 µM	0,96/6,23	1,8
AZD-8055 + Neq0780	0,84 ± 0,06 µM	0,97/4,22	
AZD-8055	0,46 ± 0,07 µM	0,96/6,23	0,87
AZD-8055 + Neq0784	0,40 ± 0,04 µM	0,97/5,36	
AZD-8055	0,46 ± 0,07 µM	0,96/6,23	2,0
AZD-8055 + Neq0837	0,93 ± 0,10 µM	0,97/4,87	
BEZ 235	0,23 ± 0,02 µM	0,96/5,09	0,87
BEZ 235 + Neq0779	0,20 ± 0,02 µM	0,96/5,43	
BEZ 235	0,23 ± 0,02 µM	0,96/5,09	0,91
BEZ 235 + Neq0780	0,21 ± 0,01 µM	0,95/6,25	
BEZ 235	0,23 ± 0,02 µM	0,96/5,09	0,91
BEZ 235 + Neq0784	0,21 ± 0,01 µM	0,96/5,41	
BEZ 235	0,23 ± 0,02 µM	0,96/5,09	0,52
BEZ 235 + Neq0837	0,12 ± 0,01 µM	0,97/4,72	
Doxorrubicina	1,97 ± 0,48 µM	0,94/7,77	0,68
Doxorrubicina + Neq0779	1,33 ± 0,24 µM	0,95/7,11	
Doxorrubicina	1,97 ± 0,48 µM	0,94/7,77	0,03
Doxorrubicina + Neq0780	0,06 ± 0,01 µM	0,97/6,21	
Doxorrubicina	1,97 ± 0,48 µM	0,94/7,77	0,83
Doxorrubicina + Neq0784	1,64 ± 0,21 µM	0,96/7,15	
Doxorrubicina	1,97 ± 0,48 µM	0,94/7,77	1,0
Doxorrubicina + Neq0837	1,98 ± 0,48 µM	0,93/8,86	

* Razão entre os valores de IC_{50} da combinação dos compostos químicos em relação à substância isolada (abaixo de 1 = efeito sinérgico; acima de 1 = efeito antagonista).
Fonte: A autora.

Na linhagem de mama (MDA-MB-231), o perfil de resposta celular foi completamente distinto para cada agente citotóxico usado. Todas as combinações com AZD-8055 foram inativas ou antagonistas. No caso de BEZ 235, somente a combinação com Neq0837 foi sinergística, enquanto as outras foram inativas.

Para a Doxorrubicina, a combinação com Neq0780 demonstrou a maior sinergia dentre todos os ensaios realizados, com aumento na potência de 33 vezes. A grande diferença em termos de resposta celular entre Neq0779 e Neq0780 para MDA-MB-231 somente pode ser compreendida em termos moleculares devido à diferença do aminoácido central na molécula, embora este resultado seja bem distinto ao alcançado para HepG2 no item anterior, essa diferença pode estar associada ao próprio metabolismo celular da linhagem.

Contudo, a doxorrubicina foi a substância de referência que apresentou o melhor efeito sinergístico no estudo em combinação. Dados da literatura corroboram atividade desta substância em combinação com outros agentes que interajam com mecanismos de ação distintos ao da Doxo, como foi abordado nesse trabalho. Estudos revelam eficiência no tratamento de pacientes com câncer de mama em estágios avanços combinando 1,250 mg/m2 de Gencitabina com 60 mg/m2 de Doxorrubicina em até 6 ciclos de 21 dias (EL SERAFI et al., 2006) e também foi reportada, para o mesmo cenário de pacientes, a combinação de 800 mg/m2 de Gencitabina com 25 mg/m2 de Doxo em ciclo semanais de combinação (PÉREZ-MANGA et al., 2000). Além disso, foi observada a sinergia na combinação de Doxo com antimetabólitos em linhagem de mama. O Fluorouracil, o qual atua interferindo a síntese de DNA, foi descrito em combinação com a Doxo. Foi reportado Ic_{50} de 0,25 µg/mL na combinação dos compostos, aumento de 11,2 vezes para Doxo isolada e 6,1 vezes para Fluorouracil isolado na linhagem MDA-MB-231 (DRUGBANK, 2018b).

Esse cenário justifica a aplicação da Doxorrubicina em combinação, uma vez que a Doxo sozinha apresenta citotoxicidade elevada e já foi reportado efeitos colaterais significativos dessa substância. Sendo assim, estudos cujo foco seja explorar os efeitos da Doxo em combinação, com o objetivo de diminuir sua dosagem, se mostram promissores na terapia contra o câncer.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A triagem das substâncias químicas utilizadas nesse estudo foi uma abordagem bem-sucedida, com a identificação de novas substâncias citotóxicas, compreensão da relação entre mecanismo de ação dos compostos de referência e a resposta fenotípica celular, análise da inibição de migração de novas substâncias bioativas e sua terapia combinada em linhagens de células de câncer de mama (MDA-MB-231), fígado (HepG2) e próstata (PC-3 e DU 145).

Os estudos com os inibidores de diversas etapas da via PI3K-AKT-mTOR levaram a identificação da AZD-8055 (um inibidor da mTOR que interage no sítio do ATP) como a substância mais promissora para o desenvolvimento de derivados com perfil farmacológico similar, devido a sua maior potência e seletividade para a maioria das linhagens testadas. No entanto, deve-se levar em consideração que estes inibidores de quinases não levam a 100% de morte celular, o que pode ocasionar em resistência.

Os resultados de citotoxicidade obtidos para as substâncias Neq0438 e Neq0440 corroboraram estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, sendo que houve uma expansão no número e tipo de tumores avaliados. Deve-se salientar que estes dois compostos apresentam seletividade para PC-3 em relação a todas as outras linhagens estudadas.

Conforme esperado, os derivados de dipeptidil nitrilas estudados não são citotóxicos, ainda sim alguns foram inibidores da migração celular no ensaio de fechamento de risca. Ensaios complementares, com o uso da câmara de Boyden para avaliação da migração e também da análise da atividade citostática por meio da formação de colônias são estudos complementares importantes para serem estabelecidos.

No geral, a substância de referência que apresentou maior sinergia em terapia combinada *in vitro* foi a Doxorrubicina em todas as linhagens testadas, destacando a combinação com Neq0780, a qual apresentou atividade sinergística elevada. Este resultado estimula novos estudos que possam compreender melhor o fenômeno observado e porque este caso se difere tanto dos anteriores. Marcadores moleculares e de sinalização celular poderão ser usados para tal. Em resumo, este trabalho encoraja novos estudos de terapia combinada, uma vez que estes têm gerado um interesse significativo no cenário clínico.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1324–1337, Feb. 2007.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula.** 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 945–1223.

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, fev. 2005.

ANDERSON, J. The role of antiandrogen monotherapy in the treatment of prostate cancer: ANTIANDROGEN MONOTHERAPY IN PROSTATE CANCER. **BJU International**, v. 91, n. 5, p. 455–461, 26 fev. 2003.

ANTÓNIO GOMES, M. et al. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies. **Revista da Associação Médica Brasileira (English Edition)**, v. 59, n. 5, p. 514–524, Jan. 2013.

ANTONUZZO, L. et al. Critical focus on mechanisms of resistance and toxicity of m-TOR inhibitors in pancreatic neuroendocrine tumors. **Cancer Treatment Reviews**, v. 57, p. 28–35, June 2017.

AROUI, S. et al. Efficient induction of apoptosis by doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides compared to unconjugated doxorubicin in the human breast cancer cell line MDA-MB 231. **Cancer Letters**, v. 285, n. 1, p. 28–38, Nov. 2009.

AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J.C. Antimetqabolites. In: _____. **Medicinal chemistry of anticancer drugs**. Amsterdã: Elsevier, 2008. Cap.2, p.9-52. DOI: https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52824-7.00002-0.

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, e0003916, July 2015. DOI: https://doi.org/101371/journal.pntd.0003926.

BENJAMIN, D. et al. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 11, p. 868–880, nov. 2011.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch: angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 401–410, June 2003.

BERTHOLD, D. R. et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 2, p. 242–245, Jan. 2008.

BONELLI, M. A. et al. Inhibition of PI3K pathway reduces invasiveness and epithelial-to-mesenchymal transition in squamous lung cancer cell lines harboring PIK3CA gene alterations. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 14, n. 8, p. 1916–1927, Aug. 2015.

BROOKS, S. A. et al. Molecular interactions in cancer cell metastasis. **Acta Histochemica**, v. 112, n. 1, p. 3–25, Jan. 2010.

BURGER, M. T. et al. Identification of NVP-BKM120 as a potent, selective, orally bioavailable class i pi3 kinase inhibitor for treating cancer. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, n. 10, p. 774–779, Oct. 2011.

CHEN, B. et al. Relating hepatocellular carcinoma tumor samples and cell lines using gene expression data in translational research. **BMC Medical Genomics**, v. 8, n. S2, Dec. 2015.

CHEN, M.-T. et al. Comparison of patterns and prognosis among distant metastatic breast cancer patients by age groups: a SEER population-based analysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, dez. 2017.

CHRESTA, C. M. et al. AZD8055 Is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. **Cancer Research**, v. 70, n. 1, p. 288–298, Jan. 2010.

CIANNI, L. et al. Leveraging the cruzain S3 subsite to increase affinity for reversible covalent inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 79, p. 285–292, Sept. 2018.

CONCIATORI, F. et al. mTOR Cross-talk in cancer and potential for combination therapy. **Cancers**, v. 10, n. 1, p. 23, Jan. 2018.

COOPERBERG, M. R.; BROERING, J. M.; CARROLL, P. R. Risk Assessment for Prostate Cancer Metastasis and Mortality at the Time of Diagnosis. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 12, p. 878–887, 16 jun. 2009.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

CRUZ, E. C. S. et al. In silico selection and cell-based characterization of selective and bioactive compounds for androgen-dependent prostate cancer cell. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 3, p. 546–550, Feb. 2017.

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, June 2015.

DAI, Y.; SIEMANN, D. Abstract 4495: treatment effects of the novel mTOR kinase inhibitor AZD8055 in prostate cancer cell models. **Cancer Research**, v. 71, n. 8 Supplement, p. 4495–4495, Apr. 2011.

DOXIE, D. B.; IRISH, J. M. High-dimensional single-cell cancer biology. **Current Topics in Microbiology and Immunology,** v.377, p.1-21, 2014. DOI: 10.1007/82_2014_367.

DRUGBANK**. Gemcitabine**. 2018a. v.5.1.1. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00441> Acesso em: 24 nov. 2018.

_____. **Fluorouracil**. 2018b. v.5.1.1. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00544> Acesso em: 24 nov. 2018.

EL-GOHARY, N. S.; SHAABAN, M. I. New pyrazolopyridine analogs: Synthesis, antimicrobial, antiquorum-sensing and antitumor screening. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 152, p. 126–136, maio 2018.

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

EL SERAFI, M. M. et al. Gemcitabine plus doxorubicin as first-line treatment in advanced or metastatic breast cancer (MBC), a phase II study. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v. 18, n. 3, p. 209–215, Sept. 2006.

EWALD, F. et al. Vertical targeting of AKT and mTOR as well as dual targeting of AKT and MEK signaling is synergistic in hepatocellular carcinoma. **Journal of Cancer**, v. 6, n. 12, p. 1195–1205, 2015.

FAN, C. et al. Strategy to enhance the therapeutic effect of doxorubicin in human hepatocellular carcinoma by selenocystine, a synergistic agent that regulates the ROS-mediated signaling. **Oncotarget**, v. 5, n. 9, p. 2853–2863, May 2014.

FARBER, S. et al. Clinical studies of actinomycin D with special reference to Wilms' tumor in children. 1960. **The Journal of Urology**, v. 168, n. 6, p. 2560–2562; discussion 2563, Dec. 2002.

FATEHI, D.; SOLTANI, A.; GHATREHSAMANI, M. SRT1720, a potential sensitizer for radiotherapy and cytotoxicity effects of NVB-BEZ235 in metastatic breast cancer cells. **Pathology** - research and practice, v. 214, n. 6, p. 889–895, June 2018.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 6, p. 1374–1403, Apr. 2013.

FIDLER, I. J. The Pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 453–458, June 2003.

FORREST, M. D. Why cancer cells have a more hyperpolarised mitochondrial membrane potential and emergent prospects for therapy. 2015. Doi: https://doi.org/10.1101/025197.

FOSTER, K. G.; FINGAR, D. C. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 19, p. 14071–14077, May 2010.

FOUAD, M. M. et al. Synthesis and in vitro antitumor evaluation of some new thiophenes and thieno[2,3-d]pyrimidine derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 81, p. 587–598, Dec. 2018.

GAMBARI, R. et al. Sensitization of Hep3B hepatoma Cells to Cisplatin and Doxorubicin by Corilagin: sensitization of HEP3B hepatoma cells to cddp and dox by corilagin. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 5, p. 781–783, May 2014.

GARCIA, F. P. et al. A3K2A3-induced apoptotic cell death of leishmania amazonensis occurs through caspase- and ATP-dependent mitochondrial dysfunction. **Apoptosis**, v. 22, n. 1, p. 57–71, Jan. 2017.

GEIGER, T. R.; PEEPER, D. S. Metastasis mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta -** reviews on cancer, v. 1796, n. 2, p. 293–308, Dec. 2009.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. **JAMA Oncology**, v. 3, n. 4, p. 524-548, Apr. 2017.

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

GOMEZ-PINILLOS, A.; FERRARI, A. C. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer therapy. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 483–505, June 2012.

GONÇALVES, B. F. et al. Combinatorial effect of abiraterone acetate and NVP-BEZ235 on prostate tumor progression in rats. **Hormones and Cancer**, v. 9, n. 3, p. 175–187, June 2018.

GOPALAKRISHNAN, K. et al. Effects of rapamycin on the mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway and telomerase in breast cancer cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 836, p. 103–113, Dec. 2018.

GREEN, D. **Means to an end**: apoptosis and other cell death mechanisms. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.

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

GURTOWSKA, N.; KLOSKOWSKI, T.; DREWA, T. Ciprofloxacin criteria in antimicrobial prophylaxis and bladder cancer recurrence. **Medical Science Monitor**: international medical journal of experimental and clinical research, v. 16, n. 10, p. RA218-223, Oct. 2010.

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

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, Mar. 2011.

HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 4, ago. 2011. DOI: 10.1186/bcr2889.

HORMANN, J. et al. Multiply intercalator-substituted Cu(II) cyclen complexes as DNA condensers and DNA/RNA synthesis inhibitors. **Inorganic Chemistry**, v. 57, n. 9, p. 5004–5012, May 2018.

HOSEINI SHAFA, M. et al. Efficacy of metformin in mediating cellular uptake and inducing apoptosis activity of doxorubicin. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 99, p. 200–212, Nov. 2018.

HOSPITAL DE AMOR. **Prevenção do câncer de mama**. Barretos: Hospital do câncer de Barretos, 2015. Disponível em:<https://www.hcancerbarretos.com.br/cancer-de-mama>. Acesso: 21 out. 2018.

HOUCHENS, D. P. et al. Human brain tumor xenografts in nude mice as a chemotherapy model. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, v. 19, n. 6, p. 799–805, June 1983.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da Saúde. **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2018a. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf >. Acesso em: 10 out. 2018.

_____. **O que é câncer?** Rio de Janeiro: INCA, 2018b. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 13 out. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da Saúde. **Fatores de risco.** Rio de Janeiro: INCA, 2018c. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/fatores_de_risco_1>. Acesso em: 21 out. 2018.

_____. **Perguntas e respostas sobre o câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2018d. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=83>. Acesso em: 28 out. 2018.

INTER-ORGANIZATION PROGRAMME FOR THE SOUND MANAGEMENT OF CHECMICALS. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. Paris: Organisation for Economic co-operation and development, 2010. (OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, nº 129).

JACINTO, E. et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 1122–1128, Nov. 2004.

JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 4, p. 239–252, Apr. 2009.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Biologia celular e molecular. In: **_____. A Célula cancerosa**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap.16, p.288-297.

_____. **Histologia básica**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. Cap.16, p.318-330.

KRAJEWSKA, M. et al. Elevated expression of inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 13, p. 4914–4925, Oct. 2003.

KRAUS, D.; PALASUBERNIAM, P.; CHEN, B. Targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway for therapeutic enhancement of vascular-targeted photodynamic therapy. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 16, n. 11, p. 2422–2431, Nov. 2017.

KUMAR, S. et al. Design, synthesis and in vitro evaluation of novel anti-HIV 3-pyrazol-3-yl-pyridin-2-one analogs. **Medicinal Chemistry**, v. 14, Nov. 2018. Doi: 10.2174/1573406414666181106125539.

LANG, L. FDA Approves sorafenib for patients with inoperable liver cancer. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 379, Feb. 2008.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1117–1134, June 2010.

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

LEUNG, E. Y. et al. Potentiation of growth inhibitory responses of the mTOR inhibitor everolimus by Dual mTORC1/2 inhibitors in cultured breast cancer cell lines. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0131400, july 2015. DOI: https://doi.org/101371/journal.pone.0131400.

LIGGINS, C. et al. Developmentally regulated expression of survivin in human pancreatic islets. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 6, n. 5, p. 392–397, Oct. 2003.

LIU, M. et al. C6 ceramide sensitizes the anti-hepatocellular carcinoma (HCC) activity by AZD-8055, a novel mTORC1/2 dual inhibitor. **Tumor Biology**, v. 37, n. 8, p. 11039–11048, Aug. 2016.

LIU, W.-L. et al. Targeting phosphatidylinositide3-kinase/akt pathway by BKM120 for radiosensitization in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 5, n. 11, p. 3662–3672, June 2014.

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

LOMBARDI, G. et al. Pegylated liposomal doxorubicin and gemcitabine in patients with advanced hepatocellular carcinoma: results of a phase 2 study. **Cancer**, v. 117, n. 1, p. 125–133, Jan. 2011.

MA, W.; ROW, K. H. Simultaneous determination of levofloxacin and ciprofloxacin in human urine by ionic liquid-based, dual-template molecular imprinted coated graphene oxide monolithic solid-phase extraction. **Journal of Separation Science**, v.42, n.3, p.642-649, Feb. 2019.

MACIEL, S. **Câncer**: conhecer, prevenir e vencer. 2017. Disponível em:<http://estudandocienciasebiologia.blogspot.com/2017/05/nucleo-celular.html >. Acesso em: 14 out. 2018.

MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1261–1274, June 2007.

MARKER, P. C. et al. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental Biology**, v. 253, n. 2, p. 165–174, Jan. 2003.

MESTRE YODA; George Lucas. Universo Star Wars. 1980.

MCCLATCHEY, A. I.; YAP, A. S. Contact inhibition (of proliferation) redux. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 24, n. 5, p. 685–694, Oct. 2012.

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

MILANEZI, F.; CARVALHO, S.; SCHMITT, F. C. EGFR/HER2 in breast cancer: a biological approach for molecular diagnosis and therapy. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 8, n. 4, p. 417–434, July 2008.

MONZÓ, M. et al. A Novel anti-apoptosis gene: re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non–small-cell lung cancers. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 7, p. 2100–2100, July 1999.

MOORE, K.L.; DALLEY, A.F.; AGUR, A.M.R. **Anatomia orientada para clínica**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM; U.S. Departament of Health and Human Services. Disponível em: < https://ntp.niehs.nih.gov/>. Acesso em: 19 0ut 2018.

NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 220–228, Mar. 2010.

OATES, J. A. et al. Clinical pharmacology of 3’-Azido-2’,3’-Dideoxythymidine (Zidovudine) and related dideoxynucleosides. **New England Journal of Medicine**, v. 321, n. 11, p. 726–738, Sept. 1989.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 1, p. 21–31, Mar. 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Cancer**. Brasília: OMS, 2018. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 08 out. 2018.

OU, D.-L. et al. Vertical blockade of the IGFR- PI3K/Akt/mTOR pathway for the treatment of hepatocellular carcinoma: the role of survivin. **Molecular Cancer**, v. 13, n. 1, p. 2, 2014.

OYAGBEMI, A. A.; AZEEZ, O. I.; SABA, A. B. Hepatocellular carcinoma and the underlying mechanisms. **African Health Sciences**, v. 10, n. 1, p. 93–98, Mar. 2010.

PAGÈS, F. et al. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. **Oncogene**, v. 29, n. 8, p. 1093–1102, Feb. 2010.

PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Tackling the cancer stem cells — what challenges do they pose? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 7, p. 497–512, July 2014.

PÉREZ-MANGA, G. et al. Gemcitabine in combination with doxorubicin in advanced breast cancer: final results of a phase II pharmacokinetic trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 13, p. 2545–2552, July 2000.

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

PILCO-FERRETO, N.; CALAF, G. M. Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. **International Journal of Oncology**, v. 49, n. 2, p. 753–762, Aug. 2016.

PINTO, A. C.; MOREIRA, J. N.; SIMÕES, S. Ciprofloxacin sensitizes hormone-refractory prostate cancer cell lines to doxorubicin and docetaxel treatment on a schedule-dependent manner. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, n. 3, p. 445–454, July 2009.

QUILLES, 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.

SAH, N. K. et al. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. **Cancer Letters**, v. 244, n. 2, p. 164–171, Dec. 2006.

SAIDEL, M. É. et al. Novel anti-prostate cancer scaffold identified by the combination of in silico and cell-based assays targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 17, p. 4001–4006, set. 2017.

SANGAR INSTITUTE. **Genomics of drug sensitivy in cancer**. Massachusett General Hospital – Cancer center. Disponível em:<https://www.cancerrxgene.org/translation/Drug/133>. Acesso em: 22 Nov. 2018.

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

SARBASSOV, D. D. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, v. 307, n. 5712, p. 1098–1101, Feb. 2005.

SCHINONI, M.I. Fisiologia hepática. **Gazeta Médica da Bahia**, v.76, Supl.1, p.S5-S9, 2006. Disponível em:<http://www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/viewFile/305/296>. Acesso em: 21 out. 2018

SELLECKCHEM. COM; Inhibitor Expert. Disponível em: <https://www.selleckchem.com/>. Acesso em: 15 out:2018.

SENCHENKOV, A.; LITVAK, D. A.; CABOT, M. C. Targeting Ceramide Metabolism--a Strategy for Overcoming Drug Resistance. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 5, p. 347–357, 7 mar. 2001.

SERRA, V. et al. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. **Cancer Research**, v. 68, n. 19, p. 8022–8030, Oct. 2008.

SHAH, N. et al. Investigational chemotherapy and novel pharmacokinetic mechanisms for the treatment of breast cancer brain metastases. **Pharmacological Research**, v. 132, p. 47–68, June 2018.

SHAHEEN, M. et al. Metnase/SETMAR: a domesticated primate transposase that enhances DNA repair, replication, and decatenation. **Genetica**, v. 138, n. 5, p. 559–566, May 2010.

SHAHZADI, A.; YAZICI, Z. Effect of ciprofloxacin on the plasma concentration of doxorubicin, following acute and chronic dose protocol in sprague dawley rats. **International Journal of Pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 69–77, Jan. 2014.

SMITH, A. D. (Ed.). **Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology**. Oxford: Oxford University Press, 1997.

SMITH, C. N.; ALEXANDER, B. R. The Relative cytotoxicity of personal care preservative systems in Balb/C 3T3 clone A31 embryonic mouse cells and the effect of selected preservative systems upon the toxicity of a standard rinse-off formulation. **Toxicology in Vitro**, v. 19, n. 7, p. 963–969, Oct. 2005.

STEWART, B.W.; WILD, C. P. **World cancer report 2014**. Lyon: International Agency for Research on Cancer; WHO Press, 2014.

STRIGUN, A. et al. Doxorubicin Increases Oxidative Metabolism in HL-1 Cardiomyocytes as Shown by 13C Metabolic Flux Analysis. **Toxicological Sciences**, v. 125, n. 2, p. 595–606, fev. 2012.

SUN, L. et al. Rab34 regulates adhesion, migration, and invasion of breast cancer cells. **Oncogene**, v. 37, n. 27, p. 3698–3714, July 2018.

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

TAGHDISI, S. M. et al. A Novel AS1411 aptamer-based three-way junction pocket DNA nanostructure loaded with doxorubicin for targeting cancer cells in vitro and in vivo. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, n. 5, p. 1972–1978, May 2018.

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, July 2010.

TANAKA, K. et al. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. **Clinical Cancer Research**: an official journal of the american association for cancer research, v. 6, n. 1, p. 127–134, Jan. 2000.

THIMMAIAH, K. et al. Drug–DNA interaction studies of acridone-based derivatives. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 34, n. 5, p. 309–331, May 2015.

THORN, C. F. et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 21, n. 7, p. 440–446, July 2011.

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

VÉZINA, C.; KUDELSKI, A.; SEHGAL, S. N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. **The Journal of Antibiotics**, v. 28, n. 10, p. 721–726, 1975.

WALI, V. B. et al. Systematic drug screening identifies tractable targeted combination therapies in triple-negative breast cancer. **Cancer Research**, v. 77, n. 2, p. 566–578, Jan. 2017.

WHO MODEL LIST OF ESSENTIAL MEDICINES (19TH LIST). **World health organization**. 2015. Disponível em:<http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML2015_8-May-15.pdf>. Acesso em: 20 out. 2018

WILLIAMSON, E. A. et al. Targeting the transposase domain of the DNA repair component metnase to enhance chemotherapy. **Cancer Research**, v. 72, n. 23, p. 6200–6208, Dec. 2012.

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

WRAY, J. et al. Metnase mediates resistance to topoisomerase ii inhibitors in breast cancer cells. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, e5323, Apr. 2009. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone. 0005323.

XIA, J. et al. Shufeng jiedu capsule and its active ingredients induce apoptosis, inhibit migration and invasion, and enhances doxorubicin therapeutic efficacy in hepatocellular carcinoma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 99, p. 921–930, Mar. 2018.

XIA, J. F. et al. Flavonoids as potential anti-hepatocellular carcinoma agents: recent approaches using HepG2 cell line. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 7, n. 1, p. 1–8, Feb. 2013.

XIAO, Z. et al. Design, synthesis, and antitumor evaluation of quinoline-imidazole derivatives. **Archiv der Pharmazie**, v. 351, n. 6, e1700407, June 2018. DOI: 10.1002/ardp.201700407.

XU, K.; LIU, P.; WEI, W. mTOR signaling in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta** - reviews on cancer, v. 1846, n. 2, p. 638–654, Decz. 2014.

YADAV, S. S. et al. Combination effect of therapies targeting the PI3K- and AR-signaling pathways in prostate cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 46, p.76181-76196, Nov. 2016.

YANG, L.; PANG, Y.; MOSES, H. L. TGF-β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. **Trends in Immunology**, v. 31, n. 6, p. 220–227, June 2010.

YAO, W. et al. Enhancing therapeutic efficacy of the MEK inhibitor, MEK162, by blocking autophagy or inhibiting PI3K/Akt signaling in human lung cancer cells. **Cancer Letters**, v. 364, n. 1, p. 70–78, Aug. 2015.

YU, F. et al. The Combination of NVP-BKM120 with trastuzumab or RAD001 synergistically inhibits the growth of breast cancer stem cells in vivo. **Oncology Reports**, v. 36, n. 1, p. 356–364, July 2016.

YUE, P. Y. K. et al. A Simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 15, n. 4, p. 427–433, Apr. 2010.

ZIMPFER, A. et al. Ciprofloxacin-induced acute liver injury: case report and review of literature. **Virchows Archiv**: an international journal of pathology, v. 444, n. 1, p. 87–89, Jan. 2004.

ZINZALLA, V. et al. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 757–768, Mar. 2011.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 21–35, Jan. 2011.