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

Daiane Yukie Tezuka

Caracterização *in vitro* da atividade de inibidores de cisteíno proteases em parasitos (*Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*) e células de câncer de próstata (DU-145 e a PC-3)

São Carlos

2019

Daiane Yukie Tezuka

Caracterização *in vitro* da atividade de inibidores de cisteína proteases em parasitos (*Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*) e células de câncer de próstata (DU-145 e a PC-3)

VERSÃO CORRIGIDA

Tese 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 Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Andrei Leitão

São Carlos

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, 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

T356c Tezuka, Daiane Yukie
 Caracterização *in vitro* da atividade de inibidores de
 cisteíno proteases em parasitos (*Trypanosoma cruzi* e
 Leishmania infantum) e células de câncer de próstata (DU-145
 e a PC-3) / Daiane Yukie Tezuka ; orientador Andrei Leitão.
 -- São Carlos, 2019.

 Tese (Doutorado) - 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. Doença de Chagas. 2. Leishmaniose.
 3. Ensaios celulares. 4. Derivados de dipeptidil nitrila.
 5. Atividade antineoplásica. I. Título.

Elena Luzia Palloni Gonçalves – CRB 8/4464

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Daiane Yukie Tezuka

TÍTULO: " Caracterização in vitro da atividade de inibidores de cisteíno proteases em parasitos (Trypanosoma cruzi e Leishmania infantum) e células de câncer de próstata (DU-145 e a PC-3)"

Data da defesa: 24/09/2019

Comissão Julgadora	Assinatura	Resultado
Prof(a). Dr(a). Andrei Leitão IQSC/USP		Não votante
Prof(a). Dr(a). Sérgio de Albuquerque FCFRP/USP		aprovada
Prof(a). Dr(a). Fernanda de Freitas Anibal UFSCar		aprovada
Prof(a). Dr(a). José Clóvis do Prado Junior FCFRP/USP		Aprovada
Prof(a). Dr(a). João Agostinho Machado Neto ICB/USP		Aprovada
Prof(a). Dr(a). Mara Cristina Pinto UNESP		Aprovada

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e a minha irmã, que sempre foram meu exemplo, por todo apoio e incentivo a nunca desistir dos meus sonhos e por serem a minha inspiração de bondade, amor, dedicação e determinação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela vida, pela família maravilhosa que me concedeu, pelas amizades ao longo dessa jornada, pelas pessoas que conheci nesse período e pela oportunidade de chegar até aqui.

Aos meus pais Orlando e Rosa pelo exemplo de determinação, companheirismo, respeito, união, coragem, do amor pela vida, pelas palavras de consolo e incentivo, por todo apoio durante a vida, por existirem e serem meus pais.

A minha irmã Érika e ao seu marido Fernando, pela fraternidade, amizade, pelas palavras de carinho, por momentos de alegrias e descontração, e pelo apoio moral. As minhas sobrinhas Emily e Livia que foram à inspiração da minha alegria a cada amanhecer. Ao meu futuro marido Leandro pelos momentos de carinho, de diversão, descontração, pelas palavras de apoio e incentivo a nunca desistir dos meus objetivos, por aguentar cada reclamação e enxugar cada lágrima nos momentos difíceis e por estar sempre ao meu lado, isso só me fez ter a certeza que é com você que quero passar o resto dos meus dias.

Ao Prof. Dr. Andrei Leitão pela excelente orientação e pelo voto de confiança por ter me aceitado em seu laboratório, ao Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari, por conceder o laboratório para o uso de alguns equipamentos, ao Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque (Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto-FCFRP) por me aceitar em seu laboratório para finalizar alguns experimentos com parasitos e compartilhar sua experiência comigo, em especial a Dra. Carla Lopes pela disposição e dedicação em me passar seus conhecimentos, pela amizade e por todo o apoio durante minha passagem por Ribeirão. Um agradecimento especial aos técnicos do laboratório, Cristiana e Georgius, que cuidavam do laboratório e de nós alunos. Aos alunos do laboratório de parasitologia Maiara, Gisele, Naira, Bruna, Amanda e Pedro, que me proporcionaram dias muito divertidos, compartilharam comigo momentos de alegria, de descontração, companhia no almoço, e me ensinaram muito sobre os ensaios realizados no lab.

Às minhas amigas Karen Cristina dos Santos, Isadora Malavolta, Letícia Schwerz que compartilharam comigo momentos de alegria, tristeza, e que mesmo longe, sempre estiveram presentes me apoiando. Aos amigos José Quilles Júnior, Camila Melo, Murilo Bernardi, Talita Alvarenga, Fabiana Rosini, Fernanda Ribeiro,

Ariel Viscardi por me ajudarem a crescer pessoal e profissionalmente, pela companhia em almoçar no RU, pelas discussões de projeto, por todas as comemorações de aniversário e passeios.

Ao Grupo NEQUIMED pelas jornadas de trabalho, pelos momentos de descontração, congressos e pela cooperação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

EPÍGRAFE

*“Sonhos determinam o que
você quer. Ação determina o que
você conquista.”*

(Aldo Novak)

RESUMO

Tezuka, D. Y. **Caracterização *in vitro* da atividade de inibidores de cisteíno proteases em parasitos (*Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*) e células de câncer de próstata (DU-145 e a PC-3).** 2019. 132 f. Tese (Doutorado) – 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, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

As cisteíno proteases (CP) compõem uma classe de enzimas presentes em vários organismos e sua importância está bem definida em algumas doenças como câncer (catepsina L), doença de Chagas (cruzaína) e leishmaniose (CPB).

Considerando a similaridade entre as CP's presentes nessas patologias, foi investigada a importância dessas enzimas para o desenvolvimento dessas doenças a partir da atividade biológica *in vitro* de novas dipeptidil nitrilas reversíveis de CP. A atividade dessas substâncias foi avaliada através de ensaios celulares nessas três doenças, na busca por novas alternativas terapêuticas. No estudo realizado com as linhagens de câncer de próstata DU-145 e PC-3, os compostos NEQ0677 e NEQ0681 foram os mais promissores, com maior potência citotóxica tanto quanto citostática nessas células. Além disso, foram eficazes em inibir a migração e a formação de colônias, processos importantes para o processo metastático. Em *T. cruzi*, o teste com as três formas do parasito levou a distintas respostas biológicas para Neq0677 e Neq0690. Além disso, estudos de terapia combinada das substâncias Neq0827 e Neq0831 combinadas com o Benznidazol levaram a um efeito sinérgico na forma amastigota.

Essa série de substâncias foram seletivas para a forma amastigota de *Leishmania* spp. De maneira geral, os resultados obtidos mostraram respostas distintas para as diferentes doenças abordadas neste trabalho.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Leishmaniose. Ensaio celulares. Derivados de dipeptidil nitrila. Atividade antineoplásica.

ABSTRACT

Tezuka, D. Y. **In vitro characterization of cysteine protease inhibitor activity on parasites (*Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*) and prostate cancer cells (DU-145 and PC-3).** 2019. 132 f. Tese (Doutorado) – 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, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Cysteine proteases (CP) are a class of enzymes present in many organisms and their importance is well defined in some diseases such as cancer (cathepsin L), Chagas disease (cruzain) and leishmaniasis (CPB).

Considering the similarity between the PC's present in these pathologies, the importance of these enzymes for the development of these diseases was investigated from the in vitro biological activity of new reversible PC dipeptidyl nitriles. The activity of these substances was evaluated through cellular assays in these three diseases, searching for new therapeutic alternatives. In the study performed with prostate cancer strains DU-145 and PC-3, the compounds NEQ0677 and NEQ0681 were the most promising, with higher cytotoxic and cytostatic potency in these cells. In addition, they were effective in inhibiting migration and colony formation, important processes for the metastatic process. In *T. cruzi*, testing with the three parasite forms led to distinct biological responses to Neq0677 and Neq0690. In addition, combined therapy studies of Neq0827 and Neq0831 combined with Benznidazole have led to a synergistic effect on amastigote form.

This series of substances were selective for the amastigote form of *Leishmania* spp. In general, the results obtained showed different responses to the different diseases addressed in this paper.

Keywords: Chagas disease. Leishmaniasis. Cell assays. Dipeptidyl nitrile derivatives. Antineoplastic activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição da Doença de Chagas pelo mundo	30
Figura 2. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	32
Figura 3. Estrutura química dos fármacos de referência para doença de Chagas: Benznidazol e Nifurtimox.....	33
Figura 4. Distribuição geográfica de novos casos de leishmaniose visceral em 2016	35
Figura 5. Ciclo de vida da leishmania.....	36
Figura 6. Estrutura química dos fármacos utilizados no tratamento para leishmaniose	38
Figura 7. Estimativa dos cinco principais tipos de câncer em homens e mulheres em 2018 no Brasil	39
Figura 8. Processo de formação e desenvolvimento do câncer	40
Figura 9. Processo de formação da metástase	42
Figura 10. Estrutura molecular base para a síntese de novos inibidores reversíveis.	54
Figura 11. Triagem de substâncias contra a forma epimastigota cepa Y de <i>T. cruzi</i>	62
Figura 12. Curvas concentração-resposta com as melhores substâncias de acordo com a triagem com a forma epimastigota da cepa Y do <i>T. cruzi</i>	63
Figura 13. Curvas concentração-resposta das substâncias contra <i>T. cruzi</i> na forma amastigota intracelular da cepa Tulahuen LacZ e citotoxicidade na célula hospedeira LLCMK ₂	65
Figura 14. Curva concentração-resposta com os compostos Neq0677 e Neq0690 contra a forma tripomastigota da cepa Y de <i>T. cruzi</i>	69
Figura 15. Curvas concentração-resposta com os compostos Neq0677 e Neq0690 contra a forma amastigota extracelular da cepa Y de <i>T. cruzi</i>	70
Figura 16. Curva concentração-resposta das substâncias para a forma amastigota intracelular da cepa Y do <i>T. cruzi</i> e citotoxicidade na célula hospedeira C ₂ C ₁₂	77
Figura 17. Triagem de substâncias contra a forma promastigota de <i>L. infantum</i>	87
Figura 18. Triagem de substâncias contra a forma amastigota intracelular de <i>Leishmania infantum</i>	88
Figura 19. Triagem de substâncias contra a linhagem de câncer de próstata DU-145	97
Figura 20. Curvas concentração-resposta com as melhores substâncias obtidas com o resultado da triagem contra a linhagem de câncer de próstata DU 145. .	98
Figura 21. Triagem de substâncias contra a linhagem de câncer de próstata PC-3.	100
Figura 22. Curvas concentração-resposta com as melhores substâncias obtidas com o resultado da triagem contra a linhagem de câncer de próstata PC-3....	101
Figura 23. Triagem de substâncias para avaliar a citotoxicidade utilizando a linhagem Balb/C 3T3 clone A31.	103

Figura 24. Curvas concentração-resposta para as substâncias mais citotóxicas de acordo com o resultado da triagem contra a linhagem não tumoral Balb/C 3T3 clone A31.	104
Figura 25. Estruturas químicas dos compostos testados nas linhagens de câncer com os códigos NEQUIMED.	107
Figura 26. Efeito citostático das substâncias Neq0677 e Neq0681 na linhagem PC-3	109
Figura 27. Efeito citostático das substâncias Neq0677 e Neq0681 na linhagem DU-145.	109
Figura 28. Ensaio de migração celular na linhagem DU 145 com os compostos Neq0677 (A-gráfico e B-imagens do fechamento da risca) e Neq0681 (C-gráfico e D-imagens do fechamento da risca).	110
Figura 29. Ensaio de migração transwell com a linhagem DU 145 e PC-3 com a substância Neq0681	114
Figura 30. Ensaio clonogênico com a linhagem DU 145 com as substâncias Neq0677 e Neq0681	115
Figura 31. Ensaio clonogênico com a linhagem PC-3 com as substâncias Neq0677 e Neq0681	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados das curvas concentração-resposta com os valores de potência (IC_{50}) e os parâmetros estatísticos (r^2 e $Sy.x$) para as substâncias selecionadas na triagem para a forma epimastigota da cepa Y do <i>T. cruzi</i>	63
Tabela 2. Valores de potência (IC_{50}) para a forma amastigota do <i>T. cruzi</i> Tulahuen e citotoxicidade (CC_{50}) para a célula hospedeira LLCMK ₂ , com os respectivos valores do índice de seletividade (SI).	67
Tabela 3. Dados das curvas concentração-resposta com os valores de potência (IC_{50}) e os parâmetros estatísticos (r^2 e $Sy.x$) para as substâncias selecionadas na triagem para a forma tripomastigota da cepa Y do <i>T. cruzi</i>	69
Tabela 4. Dados das curvas concentração-resposta com os valores de potência (IC_{50}) e os parâmetros estatísticos (r^2 e $Sy.x$) para as substâncias selecionadas na triagem para a forma amastigota extracelular da cepa Y do <i>T. cruzi</i>	70
Tabela 5. Valores de potência (IC_{50}) para a forma amastigota intracelular da cepa Tulahuen do <i>T. cruzi</i> e citotoxicidade (CC_{50}) para a célula hospedeira C ₂ C ₁₂ , com os respectivos valores do índice de seletividade (SI).	71
Tabela 6. Valores de potência (IC_{50}) para a forma amastigota intracelular da cepa Y do <i>T. cruzi</i> e citotoxicidade (CC_{50}) para a célula hospedeira C ₂ C ₁₂ , com os respectivos valores do índice de seletividade (SI).	77
Tabela 7. Dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}) e os parâmetros estatísticos (r^2 e $Sy.x$) para as melhores substâncias selecionadas na triagem da linhagem DU-145.	99
Tabela 8. Dados das curvas concentração-resposta com os valores de potência (IC_{50}) e os parâmetros estatísticos (r^2 e $Sy.x$) para as melhores substâncias selecionadas na triagem da linhagem PC-3.	102
Tabela 9. Dados das curvas concentração-resposta com os valores de potência (IC_{50}) e os parâmetros estatísticos (r^2 e $Sy.x$) para as substâncias selecionadas na triagem da linhagem BalbC/3T3 clone A31.	105
Tabela 10. Valores de IC_{50} das seis melhores substâncias com as três linhagens e o índice de seletividade (SI) para DU 145 e PC-3.	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bz/bz Benznidazol

CPRG Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranósido

DMSO Dimetilsulfóxido

IC₅₀ Atividade da substância para inibir 50% da viabilidade dos parasitos/células de câncer

EC₅₀ Capacidade da substância em eliminar 50% da célula de mamífero

HCS High Content Screening

L. infantum *Leishmania infantum*

LIT Meio de cultura com infuso de fígado e triptose para crescimento de *T. cruzi*

MTT Brometo azul de tetrazólio/ 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium brometo

PMS Metasulfato de fenazina

PBS Tampão Fosfato Salino

SI Índice de seletividade

T. cruzi *Trypanossoma cruzi*

VEGF Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Sumário

1. Introdução.....	27
1.1. Doença de Chagas.....	29
1.1.1. Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
1.1.2. Tratamento.....	33
1.2. Leishmaniose	33
1.2.1. Ciclo de vida da leishmania.....	35
1.2.2. Tratamento.....	36
1.3. Câncer de próstata	38
1.3.1. Desenvolvimento e causas	39
1.3.2. Metástase.....	41
1.3.3. Tratamento do câncer de próstata	44
1.4. Ensaios celulares aplicados ao estudo de substâncias bioativas para o câncer e para as parasitoses.	44
2. Objetivos.....	51
3. Materiais	53
3.1. Linhagens de células de mamíferos.....	53
3.2. Parasitos (<i>T. cruzi</i> e <i>Leishmania infantum</i>)	53
3.3. Substâncias bioativas	53
3.4. Análises estatísticas.....	54
4. Capítulo 1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	57
4.1. Métodos.....	57
4.1.1. Cultura de <i>T. cruzi</i>	57
4.1.2. Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> com a morfologia epimastigota da cepa Y.....	58
4.1.3. Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> com a morfologia amastigota intracelular da cepa Tulahuen LacZ	58
4.1.4. Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> com a morfologia tripomastigota da cepa Y.....	59
4.1.5. Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> com a morfologia amastigota extracelular da cepa Y.....	59
4.1.6. Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> com a morfologia amastigota intracelular da cepa Y.....	60
4.2. Resultados.....	60

4.2.1. Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> com a morfologia epimastigota	60
4.2.2. Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> com a morfologia amastigota intracelular da cepa Tulahuen LacZ	63
4.2.3. Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> com a morfologia tripomastigota da cepa Y de <i>T. cruzi</i>	68
4.2.4. Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> com a morfologia amastigota extracelular da cepa Y do <i>T. cruzi</i>	69
4.3. Discussão	77
5. Capítulo 2. <i>Leishmania infantum</i>	85
5.1. Métodos	85
5.1.1. Cultura de <i>Leishmania infantum</i>	85
5.1.2. Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vitro</i> com a morfologia promastigota	85
5.1.3. Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vitro</i> com a morfologia amastigota intracelular	86
5.2. Resultados	86
5.2.1. Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vitro</i> com a morfologia promastigota	86
5.2.2. Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vitro</i> com a morfologia amastigota intracelular	88
5.3. Discussão	88
6. Capítulo 3. Câncer de próstata	93
6.1. Métodos	93
6.1.1. Culturas das células	93
6.1.2. Viabilidade das células de mamífero	94
6.1.3. Ensaio citostático	94
6.1.4. Migração <i>Wound Healing</i>	95
6.1.5. Migração <i>transwell</i>	95
6.1.6. Clonogênico	96
6.2. Resultados	96
6.2.1. Avaliação da atividade antineoplásica com as linhagens DU 145 e PC-3 e citotoxicidade com a Balb/C 3T3 clone A31	96
6.2.2. Ensaio citostático	108
6.2.3. Migração por fechamento de risca (<i>Wound Healing</i>)	110
6.2.4. Migração <i>transwell</i>	114

6.2.5. Ensaio clonogênico	114
6.3. Discussão	116
7. Conclusão e perspectivas	121
7.1. Conclusão	121
7.2. Perspectivas	121
Referências	123
Anexo A	130
Artigos publicados	130

1. Introdução

Cisteíno proteases compõem um vasto grupo de enzimas que atuam no metabolismo de proteínas. Estas enzimas são ubiquamente expressas em diversos tipos celulares em organismos distintos, dentre eles parasitos e células de mamíferos¹. Essas proteases são sintetizadas sob a forma inativa e são ativadas em meio ácido nos lisossomos. Possuem em comum um sítio ativo conservado formado por resíduos de cisteína e histidina.

Essas enzimas possuem propriedades únicas no sítio ativo e são expressas durante todo o ciclo de vida do protozoário. São essenciais em vários processos celulares, como nutrição, reprodução², na invasão de células do hospedeiro e no controle do processo de escape do parasito no interior da célula hospedeira. Essa fase pode ser caracterizada como uma etapa posterior ao reconhecimento hóspede-hospedeiro³, onde um fagolisossomo intracelular é formado. As principais descritas na literatura são: cruzaina (*T. cruzi*) e CPB⁴ (*Leishmania* spp.).

Na célula de mamífero, a catepsina L é uma cisteíno protease ortóloga a de parasitos e encontra-se com a expressão aumentada nas células cancerosas. As catepsinas extracelulares clivam os principais constituintes da matriz extracelular, tais quais laminina, fibronectina e colágeno, permitindo a invasão e metástase de células cancerosas⁵. Dentre outras cisteíno proteases, a catepsina L está envolvida em processos de degradação proteica e tem sido estudada juntamente com catepsina B na migração e metástase de células cancerosas.

Sudhan e colaboradores descrevem que citocinas como Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e interferon gama são secretadas do tumor e têm sido amplamente implicadas na progressão maligna, além de aumentarem a atividade e a síntese da catepsina L. Pacientes com leucemia mieloide crônica exibem mRNA de catepsina L e atividade enzimática significativamente mais elevados quando comparados com indivíduos saudáveis⁶.

Sabe-se que a atividade proteolítica está associada à característica invasiva das células cancerosas em tecidos vizinhos, a partir da degradação da matriz extracelular⁷. Além disso, a metástase está associada ao processo de saída desta célula do local de origem e transporte por vasos sanguíneos ou linfáticos para a fixação em outro órgão, que compreende etapas da metástase.

A triagem de novas substâncias bioativas inibidoras de proteases tem grande relevância para que sejam identificadas novas alternativas terapêuticas para o tratamento de diversas patologias. Alguns tratamentos envolvendo a inibição de proteases já se encontram no mercado, por exemplo, os inibidores de aspartato protease do HIV em uso clínico (darunavir, nelfinavir, ritonavir, loprenavir, dentre outras)⁸. Outras substâncias chegaram a fase de ensaios clínicos, por exemplo, os antineoplásicos (como Marimastat, inibidor de metaloproteases com atividade para o câncer de mama que chegou a fase inicial dos ensaios clínicos),⁹ e os candidatos para o tratamento de osteoporose (Odanacatib, inibidor de cathepsina K, uma cisteína protease, que alcançou a fase clínica III)¹⁰. Além disso, uma substância anti-chagásica atingiu estudos pré-clínicos avançados (K777, inibidor da cisteína protease cruzafina)^{11,12}. Isto demonstra um grande potencial para a descoberta e o desenvolvimento de inibidores de cisteína proteases até as fases pré-clínicas avançadas e estudos clínicos.

Tanto a leishmaniose como a doença de Chagas são doenças que acompanham o desenvolvimento cultural, ambiental e socioeconômico, sendo ambas endêmicas em diferentes países de acordo com sua transmissão. Estas são doenças tropicais negligenciadas causadas por protozoários intracelulares da família Trypanosomatidae, afetando milhares de pessoas mundialmente. Os tratamentos existentes não são eficazes devido a fatores limitantes como alto custo, número limitado de drogas, longo período de tratamento, potencial de resistência às drogas, significantes efeitos colaterais e modos de administração tornando-se inadequadas ao campo de trabalho em países endêmicos.

O alto custo no desenvolvimento de um novo fármaco, aliado às perspectivas do retorno financeiro inadequado, tem como consequência o reduzido interesse por parte da indústria farmacêutica em desenvolver novos compostos para tratar uma parasitose endêmica de países pouco desenvolvidos. Isso destaca a importância de desenvolver novos tratamentos mais seguros, baratos, efetivos, e que todos tenham acesso.

Outra doença que afeta milhões de pessoas mundialmente é o câncer. O câncer pode ser definido como um conjunto de inúmeras doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células. Esta doença apresenta uma multiplicidade de fatores desencadeantes que podem ser externos ou ambientais ou internos como alterações hormonais, condições imunológicas e mutações genéticas. A principal

característica é o crescimento desordenado das células que podem invadir outros tecidos e órgãos. Devido à sua intensa divisão, essas células tendem a ser agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores e levando a formação de metástase (invasão em outros tecidos). Atualmente o câncer é uma das doenças que mais afeta e mata as pessoas em todo mundo. Esse cenário ressalta a importância em desenvolver novas terapias para o tratamento dessa doença.

Essas doenças têm em comum a presença de uma classe de proteínas denominadas cisteíno proteases que são essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência destas doenças. Cisteíno proteases compõem uma classe de enzimas responsáveis por clivar ligações peptídicas, com as mais descritas por autores: cruzaina (*Trypanosoma cruzi*)¹³, cisteína proteinase B (CPB) (*Leishmania* spp.)¹⁴ e catepsina L (câncer)¹⁵. Elas são expressas durante todo o ciclo de vida do parasito, sendo importantes em vários processos celulares, e estando relacionadas principalmente como mecanismo de evasão frente a resposta imune do hospedeiro, o que facilita a progressão e manutenção das doenças parasitárias. No câncer, essas proteases estão com expressões aumentadas¹, e são importantes principalmente na invasão e migração das células, fator essencial para o desencadeamento das metástases considerada a mais importante causa de mortalidade por câncer ¹⁶.

A partir do conhecimento da importância dessas cisteíno proteases na manutenção e progressão dessas três doenças, aliado a uma nova abordagem com o emprego de nitrilas como grupos reativos (*warheads*) para formar uma ligação covalente reversível de dipeptidil nitrilas com as cisteíno proteases atuando como inibidores, o presente trabalho busca por novas substâncias bioativas através da realização de ensaios com 55 substâncias e utilizando as melhores para investigações mais aprofundadas.

1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, foi descrita pelo médico brasileiro Carlos Justiniano Chagas em 1909, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. É uma doença que pode evoluir para um quadro fatal e atualmente afeta 21 países da América latina^{17,18} (Figura 1).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS)¹⁷ 8 milhões de pessoas encontram-se infectadas, com mais de 10 mil mortes anualmente e 25 milhões de pessoas vivem em área de risco de contrair a doença.

Figura 1. Distribuição da Doença de Chagas pelo mundo

Fonte: Drugs for Neglected Diseases initiative – DNDi (2019)¹⁹

Por muitos anos a doença de Chagas era uma problemática estritamente rural, afetando primordialmente os animais silvestres e depois foi se espalhando para animais doméstico e seres humanos, havendo um aumento acentuado no início do século XX. Devido às mudanças socioeconômicas juntamente com o êxodo rural, o desmatamento e a urbanização alteraram o perfil epidemiológico da doença, transformando-a em um fenômeno mais urbano¹⁷.

A doença de Chagas é causada pelo parasito protozoário flagelado *T. cruzi* (Família: Trypasonomatidae, Ordem: Kinetoplastida). A doença de Chagas via vetorial é transmitida só por triatomíneos pertencentes ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae sendo popularmente conhecido no Brasil como barbeiro.

A contaminação vetorial é a mais frequente no Brasil e ocorre quando o triatomíneo faz a hematofagia, libera nas fezes a forma tripomastigota metacíclica. Após a retirada da probóscida do vetor o hospedeiro normalmente se coça levando à infecção através de formas metacíclicas do trypanossomo que entram por solução de continuidade. A infecção também pode ser transmitida por transfusão de sangue e de órgãos, infecção transplacentária e acidentes de laboratório. Atualmente no Brasil a forma mais

frequente de contaminação é via oral, através do consumo de alimentos contaminados. Na Venezuela foram notificados casos da doença de Chagas após o consumo de suco de goiaba afetando 103 crianças em 2010²⁰. O açaí é outra fonte de contaminação muito comum na Região Norte e Nordeste do Brasil, onde foram confirmados mais de dois mil casos de infecção após o consumo dessa fruta entre 2000 e 2006 no Pará^{21,22}.

Nas últimas décadas a infecção tem sido cada vez mais relatada em países não endêmicos. A presença da doença de Chagas em países que não possuíam relatados deve-se à mobilidade populacional, principalmente os fluxos migratórios. A infecção crônica por *Trypanosoma cruzi* tornou-se relativamente comum em países não endêmicos¹⁷.

A doença de Chagas é caracterizada por duas manifestações clínicas: a fase aguda e a crônica. Na maioria dos indivíduos, a fase aguda geralmente é assintomática quando a transmissão é vetorial. O hospedeiro apresenta múltiplos sintomas que não são específicos de doença de Chagas. Ela ocorre nas primeiras semanas após a inoculação do parasito, que é capaz de infectar qualquer célula nucleada²³, apresenta parasitos circulantes na corrente sanguínea e pode apresentar sintomas como febre prolongada, aumento do fígado, baço e de nódulos infáticos²⁴. Na transmissão pelo vetor, o hospedeiro pode apresentar um sinal de inflamação na porta de entrada do parasito conhecido como chagoma de inoculação, quando a hematofagia é realizada na região palpebral a inflamação é conhecida como sinal de Romanã (edema bipalpebral)²⁴. Após 2-3 meses de infecção inicia-se a fase crônica que normalmente é desprovida de sintomas evidentes. Somente 30-40% das pessoas infectadas irão desenvolver a forma sintomática da doença, que compreende cardiomiopatia ou alterações do trato digestório (megacólon e megaesôfago)^{18,24}.

A doença de Chagas é considerada uma doença negligenciada¹⁸, com baixo investimento das empresas farmacêuticas na pesquisa, o que culmina na falta de um tratamento eficaz mesmo após mais de 100 anos de sua descrição.

1.1.1. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

O ciclo biológico de *T. cruzi* é heteroxênico com passagens por um hospedeiro invertebrado pertencente à família Triatominae, e um hospedeiro vertebrado

mamífero. Este protozoário apresenta diversos estágios de desenvolvimento que incluem as formas epimastigota e tripomastigota metacíclica, presentes no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, além das formas amastigota e tripomastigota sanguínea presentes no hospedeiro vertebrado²³.

Figura 2. Ciclo de vida do *T. cruzi*

Fonte: Center for Disease Control and Prevention – CDC (2019)²⁵

O ciclo biológico está representado na Figura 2. Sucintamente, a infecção dos mamíferos ocorre pelo contato das formas tripomastigotas metacíclicas eliminadas nas fezes de triatomíneos durante o repasto sanguíneo. A fricção do local pelo vertebrado contribui para a entrada do parasito através do local da picada, atingindo o sistema circulatório. Esses parasitos invadem células e se diferenciam para a forma amastigota, com replicação por fissão binária. Posteriormente, voltam a se diferenciar para tripomastigota durante o rompimento da célula e estão disponíveis para infectar novas células ou outro hospedeiro²³. No invertebrado, o inseto hematófago entra em contato com o sangue de mamíferos infectados e obtêm a forma tripomastigota sanguínea que migra para o estômago do inseto e se diferencia para a forma epimastigota. Estes parasitos se reproduzem por fissão binária no intestino do

invertebrado e, quando a fonte de nutrientes se torna escassa, as formas epimastigotas migram para o tubo digestivo do inseto e se diferenciam para tripomastigota metacíclicos e migram para o tubo digestivo do inseto, prontos para infectar o hospedeiro vertebrado no próximo repasto sanguíneo¹⁸.

1.1.2. Tratamento

Os tratamentos disponíveis há mais de 50 anos estão limitados a dois fármacos nitro-heterocíclicos tóxicos: o Benznidazol (Rochagan/Abarax/ELEA) e o Nifurtimox (LAMPIT/Bayer)¹⁷ (Figura 3). Ambos possuem eficácia apenas na fase aguda da doença, ou seja, esses fármacos curam apenas um percentual muito baixo de pacientes crônicos, visto que possuem severos efeitos colaterais, longos períodos de tratamento e, principalmente, resistência em áreas endêmicas. Somente o Benznidazol é aprovado para uso no Brasil. Atualmente uma substância conhecida como Posaconazol foi reprovada nos teste clínicos²⁶. A Doença de Chagas permanece incurável. A indústria farmacêutica tem interesse limitado no desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos, principalmente devido à falta de incentivos comerciais²⁷. Assim, a busca por novos tratamentos contra a doença de Chagas é de suma importância e deve ser enfatizada.

Figura 3. Estrutura química dos fármacos de referência para doença de Chagas: Benznidazol e Nifurtimox

Fonte: Modificado de Soeiro et al. (2009)²⁸.

1.2 Leishmaniose

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas causadas por parasitos protozoários hemoflagelados, intracelulares, pertencentes à ordem Kinetoplastidae,

da família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania*²⁹. Algumas espécies conhecidas de *Leishmania* incluem *L. tropica*, *L. donovani*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. aethiopica*, *L. infantum*, *L. infantum*³⁰. As leishmanioses representam um grave problema de saúde pública mundial, sendo a segunda forma de infecção mais importante causada por protozoários, superadas apenas pela malária³¹.

A principal forma de transmissão é pelo inseto vetor flebótomo (80-90% dos casos) pertencente a ordem *Diptera*, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia* (nas Américas), conhecidos popularmente como mosquito palha, dependendo da região geográfica. Também pode ser transmitida por transfusão de sangue (5-20%) e por via congênita (0,5-0,8%)³².

A transmissão ocorre em 88 países tropicais e subtropicais onde o inseto vetor está presente. Estima-se que 12 milhões de pessoas estão infectadas e mais de um bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas, correndo o risco de serem infectadas, com mais de 2 milhões de novos casos anuais registrados^{29,31}. Existem três formas clínicas para a leishmaniose: I) cutânea, conhecida também como ferida brava ou úlcera de Bauru, que pode ter uma ou mais lesões que evoluem de pápulas para nódulos e lesões ulcerativas, com uma depressão central e borda elevada e endurecida; II) muco-cutânea, causa uma lesão desfigurante nas mucosas, principalmente boca, nariz e garganta, III) visceral, conhecida também como febre negra ou Kalazar, afeta principalmente fígado e baço³³ e, se não tratadas independentemente da idade, pode produzir caquexia profunda, doença multissistêmica, sangramento por trombocitopenia, suscetibilidade a infecções secundárias e morte³⁴. De acordo com a Organização Mundial da Saúde a forma visceral causa 20 mil mortes anualmente, com 300 mil novos casos anuais registrados. A leishmaniose visceral é a forma mais grave das leishmanioses, representando um sério problema em vários países. Estudos mostram que 90% dos casos viscerais ocorrem na Índia, Nepal, Sudão do Sul, Sudão, Bangladesh, Brasil e Etiópia^{29,31} (Figura 4). As leishmanioses continuam sendo um grave problema em todo o mundo resultando em altos níveis de morbidade e mortalidade. Visto esse cenário desfavorável para a saúde mundial o presente trabalho enfatiza a busca por novas alternativas terapêuticas para a leishmaniose visceral.

Figura 4. Distribuição geográfica de novos casos de leishmaniose visceral em 2016

Fonte: World Health Organization – WHO (2019)³¹

1.2.1. Ciclo de vida da leishmania

O ciclo biológico geral do protozoário causador da leishmaniose também é heteroxênico, com passagens por um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado mamífero. Este protozoário apresenta dois estágios de desenvolvimento que incluem: a forma amastigota, que é ovalada, não apresenta flagelo visível (imóvel) e é encontrada dentro dos fagolisossomos dos macrófagos; e a forma promastigota, que é flagelada (móvel), fusiforme, com núcleo central e está presente no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado ¹⁸ (Figura 5).

A infecção dos mamíferos ocorre pelo contato das formas promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo. O parasito é regurgitado pelo inseto atingindo o sistema circulatório. Esses parasitos invadem células, se diferenciam para a forma amastigota e replicam-se por fissão binária, rompem a célula e estão disponíveis para infectar novas células ou um novo hospedeiro. No invertebrado, o inseto hematófago entra em contato com o sangue de mamíferos infectados, que se transforma da forma amastigota para a forma promastigota procíclica. Estes se reproduzem por fissão binária no intestino do invertebrado. Após sucessivas

replicações, os parasitos se diferenciam para a forma promastigota metacíclica e migram para a válvula faríngea do inseto, prontos para infectar um novo hospedeiro no próximo repasto sanguíneo.

Figura 5. Ciclo de vida da leishmania

Fonte: Frézard (2019)³⁵

1.2.2. Tratamento

O tratamento de primeira escolha é baseado em antimoniais pentavalentes desenvolvidos há mais de 70 anos, Figura 6. Dois fármacos estão disponíveis, o estibogluconato de sódio (Pentostam®, GlaxoSmithKline) e o antimoniato de meglumina (Glucantime®, Aventis)^{36–38}. O tempo de meia-vida dos antimoniais na corrente sanguínea é muito pequeno (cerca de duas horas), o que requer altas doses diárias, por um período longo (20-40 dias), levando ao mecanismo de resistência contra esses fármacos. O tratamento utilizando os antimoniais pentavalentes ainda representa um grande problema devido aos seus efeitos adversos como o acúmulo de substâncias no baço e no fígado, mialgia, pancreatite, arritmia cardíaca e hepatite³⁶.

Outros fármacos como pentamidina e anfotericina B são utilizados como uma segunda opção de escolha em casos de resistência, apesar da sua alta toxicidade. A

pentamidina (Pentacarinat®, Rhodia Farma) é uma diamina aromática e foi aprovada para uso na década de 50. Seu mecanismo de ação ainda não está bem definido, mas autores relatam que ela atua como ligante na fenda menor do DNA do cinetoplasto, interferindo na replicação e transcrição³⁹. Contudo, devido à taxa crescente de ineficácia do tratamento e a toxicidade severa levaram a uma diminuição do seu uso⁴⁰. Seus principais efeitos adversos incluem taquicardia, hipertensão, dor de cabeça, vômitos, náuseas, erupção cutânea, disfunção renal, entre outros³⁹. A anfotericina B é um antibiótico natural isolado do *Streptomyces noclosus* com propriedades antifúngica e antiparasitária^{40,41}. Apresenta eficácia por atuar nas formas promastigota e amastigota do parasito a partir da ligação aos ésteres (ergosterol ou episterol) presentes na membrana plasmática do parasito⁴⁰. A administração é via endovenosa, sendo o seu uso limitado devido a sua alta toxicidade, apresentando efeitos colaterais como anafilaxia, trombocitopenia, anorexia, anemia, dor muscular, febre, tremor, calafrio, nefrotoxicidade e hematotoxicidade⁴¹.

A formulação lipídica da anfotericina B (AmBisome) foi desenvolvida para melhorar a biodisponibilidade e as propriedades farmacocinéticas, reduzindo seus efeitos colaterais. Estudos mostraram que o lipossoma tem acúmulo hepático e atingem níveis terapêuticos mais rápido e o tempo de meia-vida do fármaco é mais longo. As principais limitações de uso são seu alto custo, a via de administração e a falta de estabilidade em altas temperaturas³⁸.

A miltefosina (Impavido) é o primeiro tratamento por via oral para leishmaniose em alguns países⁴². Ela é eficaz contra a forma visceral e cutânea, inclusive em casos de resistência ao antimônio, porém sua eficácia é limitada a algumas espécies de leishmania^{38,42}. Esse tratamento foi registrado na Índia em 2002 e tem como a principal desvantagem o potencial teratogênico, impedindo o uso em mulheres grávidas⁴².

As alternativas terapêuticas disponíveis não são ideais para o tratamento devido à alta toxicidade, problemas sérios de resistência, preços proibitivos, longo tempo de tratamento e modo inadequado de administração não adaptado ao local. Esses fatores caracterizam a importância emergencial da busca por novos tratamentos.

Figura 6. Estrutura química dos fármacos utilizados no tratamento para leishmaniose

Fonte: Guido (2008)⁴³

1.3 Câncer de próstata

A próstata é uma glândula exócrina pequena que faz parte do sistema genital masculino e se localiza na parte inferior do abdômen, abaixo da bexiga e a frente do intestino grosso. A função da próstata é armazenar e secretar parte do sêmen, líquido que contém os espermatozoides⁴⁴.

O câncer é um grande problema de saúde pública mundial. O conceito de câncer mais de 100 tipos de doenças que possuem em comum o crescimento desordenado de células anormais, com potencial invasivo ou não^{44,45}. O câncer é uma doença heterogênea, com diferentes características moleculares, comportamentos e resposta as terapias⁴⁵.

Ao longo de anos de pesquisa foram descobertos novos quimioterápicos que têm levado a um significativo progresso no tratamento de vários tipos de câncer, com um aumento na taxa de sobrevivência de pacientes.

De acordo com a organização mundial da saúde (WHO), o câncer é a segunda principal causa mundial de morte, com estimativa de 9,6 milhões de óbitos em 2018⁴⁶. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), os cinco principais tipos de câncer que afetam a população masculina (exceto o câncer de pele não melanoma)

são: câncer de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral. Dentre as mulheres podemos citar o câncer de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e tireoide⁴⁴. A Figura 7 descreve os números da expectativa dos principais tipos de câncer, em homens e mulheres, em 2018, previstos para a população brasileira.

Nos Estados Unidos foram diagnosticados 180.890 novos casos de câncer de próstata em 2016⁴⁷. No Brasil, a estimativa referente a 2018 prevê a detecção de 68.220 novos casos, com 14.484 mortes. Além disso, os dados do INCA mostram que o câncer de próstata apresenta a segunda maior incidência de entre os homens, além de ter um impacto de milhões de reais na saúde pública. Com essas razões, o cenário justifica novos investimentos em ações para o controle da doença.

Figura 7. Estimativa dos cinco principais tipos de câncer em homens e mulheres em 2018 no Brasil

Taxa de incidência						
Mulheres					Homens	
Órgão	Nº casos	%			Órgão	%
Mama	59.700	29,5			Próstata	31,7
Cólon e reto	18.980	9,4			Pulmão	8,7
Colo do útero	16.370	8,1			Cólon e reto	8,1
Pulmão	12.530	6,2			Estômago	6,3
Tireoide	8.040	4			Cavidade Oral	5,2

Fonte: Adaptado do Instituto Nacional do Câncer – INCA (2018)⁴⁴

1.3.1. Desenvolvimento e causas

No câncer, as células que apresentam um comportamento fisiológico fora dos padrões homeostáticos, replicam-se intensamente. Além disso, algumas características de neoplasias são importantes, como: crescimento rápido, potencial metastático e agressividade da doença.

O câncer é formado pela exposição do indivíduo aos agentes carcinogênicos, que a longo prazo acarretam dano ao DNA e transformam células normais em altamente malignas. Essas alterações levam ao crescimento descontrolado das células responsáveis pela formação do tumor. Uma vez formado o tumor primário, ocorrem sucessivas etapas de divisão celular, causando mudanças morfológicas e metabólicas que, aliados às alterações nas vias de sinalização, resultará em invasão, migração e, por fim, a metástase^{48,49} (Figura 8).

Figura 8. Processo de formação e desenvolvimento do câncer

Processo esquemático simplificado de formação do câncer.

Fonte: Maciel (2017)⁵⁰

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer, as causas do câncer de próstata podem ser variadas:

- A idade é um fator de risco muito importante, visto que a incidência e a mortalidade aumentam após os 50 anos;
- Hábitos alimentares, estilo de vida e fatores genéticos (hereditários) como pai ou irmão que tiverem câncer de próstata antes dos 60 anos⁵¹;
- Excesso de gordura corporal leva ao desenvolvimento de câncer de próstata avançado;
- Exposição a produtos químicos como: aminas aromáticas (comuns na indústria química, mecânica e de alumínio), arsênio (conservante de madeira e agrotóxico), poluição dos veículos automotores entre outros.

1.3.2. Metástase

Estima-se que 90% das mortes por câncer são consequências das disseminações metastáticas. Embora o número seja alto, a maioria dos tratamentos existentes e os que estão sendo estudados são para controlar o tumor primário⁵².

Após formar a massa tumoral, essas células cancerosas podem se desprender do tumor primário e se alojar em outros tecidos e órgãos formando um tumor secundário denominado tumor metastático. A incidência e a progressão da metástase estão relacionadas ao tipo de câncer, grau da doença, tamanho e localização do tumor primário e a resposta ao tratamento^{52,53}. Um importante passo para alimentar a massa tumoral com nutrientes e oxigênio na metástase é a angiogênese no tumor primário com a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. Sem esse mecanismo, o tumor ficaria restrito a um tamanho pequeno e as células não conseguiriam atingir a circulação para popular novos sítios^{53,54}. A proliferação exacerbada das células tumorais acaba com o suprimento de oxigênio rapidamente tornando o ambiente hipóxico. Isso ativa o HIF (Fator Indutor de Hipóxia), que induz as células tumorais e as células associadas ao tumor a produzirem e secretarem o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF). Quando o VEGF é secretado, ele induz a vascularização, suprimindo as exigências de oxigênio pelo microambiente tumoral⁵⁴.

A metástase é um processo complexo composto por várias etapas interconectadas através de relações adesivas e processos invasivos. As principais etapas são: dissociação, invasão, intravasamento, extravasamento e dormência/tumor metastático (Figura 9).

Figura 9. Processo de formação da metástase

O processo metastático inicia após a formação da massa tumoral onde algumas células do tumor primário se dissociam do grupo invadindo tecidos adjacentes, em seguida o intravasamento nos vasos sanguíneos e linfáticos. Quando estas células atingem o sítio secundário, extravasam do vaso chegando em seu novo ambiente podendo ficar em estado de dormência ou proliferar para a formação da metástase.

Fonte: Adaptado de Alizadeh et al. (2014)⁵

A seguir são apresentadas as etapas da metástase:

- **Dissociação:** Para migrar para os tecidos adjacentes, as células neoplásicas precisam invadir o tecido vizinho e um passo fundamental é a perda de adesão célula-célula no tumor primário, isso permite a desagregação das células tumorais e auxilia na disseminação inicial. As moléculas de adesão são glicoproteínas expressas na superfície das células como caderinas, integrinas, imunoglobulinas e as selectinas⁵.
- **Invasão:** As células sofrem alterações na expressão gênica e mudanças no citoesqueleto sendo capaz de aderir, degradar e migrar através da matriz extracelular. A migração pode ser de forma individual, perdendo contato com as células do tumor primário, ou coletiva, migrando em conjunto. Uma proteína muito importante para esse processo são as metaloproteases de matriz (MMP) responsáveis pela degradação da matriz extracelular formando o caminho para a migração das células^{5,55}.
- **Intravasamento:** Processo em que as células tumorais invasivas entram nos vasos linfáticos ou sanguíneos. Várias células podem atingir o sistema linfático ou

circulatório, porém poucas sobrevivem. Esse é um passo determinante na metástase, pois é ele que limita a quantidade de células tumorais que irão circular na corrente sanguínea e formar os tumores secundários. O intravasamento também é conhecido como transmigração endotelial. As células precisam sofrer importantes alterações no citoesqueleto, morfologia celular e quebrar as interações com a matriz extracelular para ocorrer esse processo. As células tumorais sofrem um grande estresse ao entrarem na corrente sanguínea, porém podem interagir com plaquetas, leucócitos e endotélio vascular, e são protegidas da destruição imunológica progredindo no processo metastático⁵.

- **Extravasamento:** É um processo complexo onde as células saem da circulação sanguínea/linfática para o tecido metastático suscetível. Primeiro as células aderem ao endotélio vascular, migram através do revestimento das células endoteliais e atingem o tecido circundante⁵. É importante ressaltar a formação de um nicho pré-metastático, ou seja, a metástase não é um acontecimento aleatório, mas sim um evento predeterminado. A vetorização das células tumorais para a medula óssea, por exemplo, ocorre após a expressão fatores de crescimento endoteliais como VEGFR-1 e no local. Há um aumento da expressão de fatores de crescimento e fibronectina no nicho pré-metastático pelas células não neoplásicas e isso marca o local do futuro tumor metastático^{55,56}.
- **Dormência/tumor metastático:** A dormência é um estágio prolongado, no qual os tumores permanecem assintomáticos por muito tempo. É observado principalmente em câncer de mama, rins, tireoide, próstata e melanoma. Esse estágio pode não existir e as células tumorais, que chegam colonizando o novo ambiente, já podem estabilizar o tumor secundário. Os genes regulados entre tumores adormecidos e os de crescimento rápido têm o mesmo padrão de expressão, mas a angiogênese é a mais diferenciada. Com isso, o final do estágio de dormência está relacionado com a formação de novos vasos sanguíneos^{5,53}.

Além dessas importantes etapas para o surgimento da metástase, outras características do câncer são fundamentais para a formação e o desenvolvimento de tumores, sendo base para a formação do microambiente tumoral. Hanahan e Weinberg⁵⁷ denominaram essas características como “*hallmarks*” do câncer. Os principais incluem a capacidade de proliferar intensamente, evitando os supressores de crescimento e do sistema imune, replicação imortal, inflamação que contribui para

o estabelecimento do tumor, invasão, metástase, indução da angiogênese, instabilidade genômica e desregulação energética das células⁵⁷. Todos esses fatores são importantes para transformar uma célula normal em uma célula cancerosa.

1.3.3. Tratamento do câncer de próstata

O tratamento envolve a prostatectomia radical ou parcial, radioterapia, hormonoterapia e a quimioterapia. A escolha para o tratamento depende da idade do paciente e da evolução do tumor⁴⁴.

Os hormônios androgênicos são importantes para a homeostase da próstata e aos aspectos relacionados ao seu desenvolvimento. Os tumores da próstata também são dependentes desses hormônios (testosterona e a di-hidrotestosterona). A testosterona entra na célula, é convertida a di-hidrotestosterona pela enzima 5-redutase, que interage com os receptores androgênicos no citoplasma, ativando-os a partir da interação com proteínas coativadoras. Os receptores são translocados para o núcleo, e ativam genes relacionados ao crescimento celular. Assim, a primeira forma de tratamento da doença envolve a supressão androgênica. Para isso são utilizados antagonistas do receptor andrógeno, que cessam a proliferação celular. O problema é que muitos dos pacientes apresentam resistência a essa terapia, principalmente pela perda da afinidade entre o receptor andrógeno e o seu antagonista⁵⁸. Com isso o diagnóstico para esses pacientes passa a ser de câncer de próstata resistente a castração, também conhecido como tumor progressivo independente de testosterona. Esse panorama justifica a necessidade da busca por novas terapias que sejam independentes da resposta hormonal.

1.4. Ensaios celulares aplicados ao estudo de substâncias bioativas para o câncer e para as parasitoses.

É de suma importância a obtenção de testes de triagem de alto rendimento. Estes devem ser rápidos, robustos e econômicos no processo de descoberta de novos candidatos a fármacos. Os estágios iniciais do processo de descoberta de fármacos baseiam-se em ensaios *in vitro* que, no caso deste trabalho, estão fundamentados

nos ensaios baseados em células. Estes ensaios são adequados para abordar esta fase precoce do processo da descoberta de novas substâncias mais eficientemente devido à sua capacidade de mimetizar alguns aspectos do sistema *in vivo*⁵⁹.

Os ensaios baseados em células incluem uma variedade de testes que medem a proliferação celular, toxicidade, produção de marcadores, motilidade, ativação de vias de sinalização específicas e alterações na morfologia. Estudos de alternativas também foram propostas para satisfazer a busca de novos fármacos. Estes objetivam melhorias de instrumentação de imagem ótica e ampla escolha de sondas bioluminescente e fluorescente que por sua vez impulsionaram a implementação para triagem em alto conteúdo⁵⁹.

Os ensaios baseados em células são frequentemente utilizados na triagem de coleções de compostos para determinar se as moléculas apresentam efeitos na proliferação celular ou mostram efeitos citotóxicos que podem conduzir a morte celular. A viabilidade celular é basicamente definida como o número de células saudáveis em uma amostra. Um dos primeiros métodos para avaliar a viabilidade celular foi o ensaio de exclusão de corante de azul de tripan, que ainda é amplamente utilizado. Esta análise é baseada no princípio de que as células viáveis possuem a membrana celular intacta que bloqueiam a entrada do azul de tripan. Células mortas permitem a entrada do corante, pois suas membranas apresentam maior permeabilidade e, como consequência, as células aparecem azuis. As células são visualizadas e contadas ao microscópio utilizando um hemocítômetro ou outros dispositivos de contagem automáticas⁶⁰. Cada vez mais corantes que dependem da atividade metabólica das células são usados, pois a célula pode estar viva, mas com uma alteração no seu metabolismo, o que indicaria uma perturbação na atividade enzimática quando da adição de uma substância, aumentando a sensibilidade do método. O corante metabólico mais conhecido é o MTT⁶¹, cuja análise está baseada na conversão do tetrazólio solúvel em cristais de formazan insolúveis. Outros corantes semelhantes têm se tornado cada vez mais populares como o 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT), ou 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS)⁶². A resazurina (Alamar blue) é outro marcador rotineiramente usado, pois fornece a vantagem de poder ser quantificado por colorimetria ou fluorimetria. O Alamar Blue não é tóxico para as células e pode ser realizado com as células vivas, diferentemente do MTT. Isso permite que as células sejam reutilizadas para futuras investigações⁶³.

Ensaio convenientes e econômicos, capazes de rastrear muitos compostos, se constituem em avanços vitais para a descoberta de novas substâncias químicas bioativas. De acordo com o cenário atual da doença de Chagas e das Leishmanioses, um dos principais desafios a ser enfrentado reside na identificação de alternativas terapêuticas eficazes e aplicáveis, considerando que para um tratamento adequado o mesmo deve i) ser eficaz na cura parasitológica em casos agudos e crônicos e nas diversas formas de manifestação clínica, ii) ser eficaz nas diversas formas envolvidas na infecção humana e na diversas cepas existentes, iii) ser acessível à população por apresentar baixo custo, iv) baixos efeitos colaterais, v) não envolver a hospitalização de pacientes durante o curso do tratamento e vi) não induzir resistência. É essencial lembrar que o ciclo de vida dessas parasitoses é muito complexo, apresenta diferentes formas evolutivas, o que resultou em uma ampla variedade de modelos experimentais para serem adotados para a triagem fenotípica⁶⁴. Os estudos *in vitro* com os parasitos são realizados com as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota para *Trypanosoma cruzi* e promastigota e amastigota para *Leishmania* spp., sendo que a forma amastigota é a mais importante e aplicada em ensaios para os dois parasitos.

O método mais comum para a triagem de compostos para a detecção da atividade em epimastigotas é através da contagem em câmara de Neubauer por meio de um microscópio ótico. Muelas-Serrano e colaboradores⁶⁵ descrevem um ensaio colorimétrico utilizando as formas epimastigotas da cepa Y que usa o sal de tetrazólio amarelo MTT como indicador da viabilidade do parasito, que é reduzido a cristais de formazan roxos por células metabolicamente ativas. Essa mesma análise pode ser realizada com outros parasitos como, por exemplo, a *Leishmania* spp. na forma promastigota. Vega e colaboradores⁶⁶ desenvolveram uma outra abordagem de triagem farmacológica para epimastigotas de *T. cruzi* (clone CL-B5) estavelmente transfectadas que expressam o gene de *Escherichia coli* LacZ. O ensaio é baseado na determinação da atividade da β -galactosidase que hidrolisa o substrato cromogênico CPRG a clorofenol vermelho. Ambos métodos são finalizados com a leitura da absorbância no espectrofotômetro a 570 nm. Outras cepas transfectadas são capazes de expressar proteínas fluorescentes vermelhas conhecidas como tdTomato⁶⁷, como a cepa Tulahuen e Colombiana, ou a proteína verde (GFP) fluorescente como a cepa Dm28c⁶⁸. Estudos na literatura também relatam essas técnicas fluorescentes para *Leishmania* spp.⁶⁹. Para estas últimas técnicas, a quantificação do parasita pode ser realizada por espectrofotometria ou citometria de

fluxo. Outros indicadores da via redox como resazurina (Alamar Blue) também são utilizados para reações colorimétricas e fluorimétricas na presença de células viáveis e foram padronizadas para triagem de compostos candidatos em epimastigota da cepa Y⁷⁰.

Experimentos realizados contra a forma não replicativa do parasita podem ser realizados com tripomastigotas metacíclicos *in vitro*, onde a avaliação da atividade é realizada na presença de MTT, resazurina⁷¹ ou contagem manual. Os parasitos modificados também são susceptíveis a serem usados nestes ensaios. A contagem por microscopia⁷² é a principal forma de análise com os tripomastigotas sanguíneos. A potencial toxicidade das moléculas deve ser explorada simultaneamente em células de mamíferos. Este estudo é essencial para descartar que a atividade surge como resultado de um efeito tóxico do composto. Assim, ensaios de citotoxicidade confirmam a seletividade de um composto, isto é, a atividade exercida em uma concentração não é prejudicial para as células⁷³.

As investigações realizadas em amastigotas intracelulares permitem explorar a atividade das substâncias contra a forma replicativa de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. em humanos. Esta análise fornece informações sobre qualquer interação dos compostos dentro da célula hospedeira e, portanto, oferecem linhas de evidências relacionadas ao impacto que esse efeito pode exercer sobre sua disponibilidade intracelular⁷³. Além disso, a suscetibilidade aos inibidores exibida pelas formas extracelulares (epimastigota e tripomastigota) pode ser maior que a do parasito intracelular, e consequentemente, é necessário fazer os testes com as substâncias mais promissoras em amastigotas intracelulares para confirmar qualquer atividade registrada ao longo das primeiras etapas da triagem⁷⁴.

Buckner e colaboradores⁷⁵ transfectaram as cepas de CL e Tulahuen com o gene da β -galactosidase de *E. coli* (LacZ), automatizando o ensaio de suscetibilidade contra as amastigotas intracelulares. Apesar da célula de mamífero apresentar uma β -galactosidase lisossômica endógena, a atividade dessa enzima não oferece interferência na análise de clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo (CPRG) sobre *T. cruzi*, que é realizado em pH 7,4, uma vez que a atividade do homólogo de mamífero é alcançada em pH ácido e a bacteriana a pH fisiológico⁷⁶.

Numerosos trabalhos na literatura confirmam a utilidade dessas cepas transfectadas com LacZ para os estudos com amastigotas intracelulares no intuito de identificar compostos ativos contra *T. cruzi*⁷⁷⁻⁸⁰. Linhagens geneticamente

modificadas com o gene luciferase como CL Brener, Dm28c ou Brasil, facilitam a triagem oxidando o substrato luciferina gerando o sinal luminescente que é proporcional ao número de parasitos vivos⁶⁷. Outra abordagem são as linhagens transgênicas expressando proteínas que não necessitam de substrato para sua detecção, como o tdTomato e o GFP. Essas são muito úteis para o monitoramento de infecções celulares, pela aplicação de ensaios baseados em imagens ou citometria de fluxo^{68,81}. No caso da *Leishmania* spp., um método muito utilizado para avaliar a atividade das substâncias na forma amastigota intracelular consiste em um sistema de câmara de slides, onde os parasitos são fixados e corados com Giemsa, de modo que a atividade da substância é avaliada microscopicamente, determinando a porcentagem de células infectadas, bem como o número de amastigotas por célula⁸². As proteínas fluorescentes apresentam vantagem entre as tecnologias por não exigirem cofatores ou substratos, uma vez que a proteína é intrinsecamente fluorescente. Várias espécies de *Leishmania* spp. foram transfectadas e expressam GFP (proteína verde)⁸² e mCherry (proteína vermelha)⁸³.

A introdução de técnicas baseadas em análise de alto conteúdo foi um avanço importante para o teste do potencial de substâncias antiparasitárias, principalmente em experimentos realizados contra o parasito intracelular⁸⁴ usando uma grande biblioteca de substâncias a ser analisada (usualmente centenas de compostos). Essas análises são baseadas em técnicas de imagens que utilizam corantes ou anticorpos ligados a fluoróforos e permitem a discriminação entre células infectadas e não infectadas, de acordo com a localização de marcadores específicos pertencentes à célula hospedeira ou parasito. Além disso, qualquer cepa do tipo selvagem pode ser usada para a realização desta análise sem a necessidade de recorrer a parasitos geneticamente modificados⁸⁵. Dessa forma, vários métodos baseados em análise de alto conteúdo foram incorporados a procedimentos de alta produtividade (HTS - *High Throughput Screening*; HCS - *High Content Screening*). Essa abordagem permite estimar o número total de células, o número total de amastigotas por célula infectada e a porcentagem de células infectadas, podendo inferir no mesmo ensaio a atividade farmacológica e a citotoxicidade^{86,87}.

A obtenção de amastigotas extracelulares *in vitro* em cultivo de *T. cruzi*, possibilitou aos pesquisadores o manejo dessa forma sem interferência da célula hospedeira. Um método comum para a indução da amastigogênese é a incubação dos parasitos em pH ácido⁸⁸ e foi demonstrado que essas formas compartilham características

morfológicas e biológicas com as amastigotas intracelulares. Devido a progressão dos experimentos realizados sobre parasitos intracelulares, o estudo com amastigotas extracelulares não são geralmente incorporados em exames farmacológicos, porém são frequentemente utilizados para exploração do mecanismo de ação desencadeados pelos compostos no parasito⁸⁹.

2. Objetivos

Este trabalho tem como finalidade testar as novas 55 substâncias derivados de dipeptidil nitrilas sintéticas para verificar sua atividade antichagásica, leishmanicida e antineoplásica a partir de ensaios celulares, usando a forma amastigota intracelular da cepa Tulahuen de *Trypanosoma cruzi* e as formas tripomastigotas e amastigotas extracelulares da cepa Y, a forma promastigota de *Leishmania infantum* e as linhagens de câncer de próstata DU 145 e PC-3.

Para alcançar o objetivo principal, alguns objetivos específicos foram necessários:

- ❖ Avaliar a atividade tripanocida nas formas epimastigota, tripomastigota e amastigota (intra e extracelular) de *T. cruzi*;
- ❖ Avaliar a atividade leishmanicida com as formas promastigota e amastigota;
- ❖ Avaliar a atividade antineoplásica dessas substâncias frente a duas linhagens de câncer de próstata: DU 145 e PC-3, utilizando o método colorimétrico (MTT);
- ❖ Avaliar a inibição da migração das células de câncer de próstata por método de *Wound Healing*;
- ❖ Avaliar a atividade citostática das melhores substâncias contra as linhagens cancerosas;
- ❖ Avaliar a atividade com o ensaio clonogênico, utilizando as melhores substâncias da triagem.

3. Materiais

3.1. Linhagens de células de mamíferos

Nesse trabalho foram estudadas duas linhagens de câncer de próstata e uma linhagem controle não tumoral, sendo:

- ✓ DU 145 (linhagem de próstata humana metastática para o cérebro) e PC-3 (linhagem de próstata humana metastática para o osso). Ambas hormônio independentes⁹⁰;
- ✓ Balb/C 3T3 clone A31 (fibroblasto de camundongo) 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. Além disso, a linhagem Balb/C 3T3 clone A31 tem sido amplamente abordada em estudos de citotoxicidade^{91,92}.

3.2. Parasitos (*T. cruzi* e *Leishmania infantum*)

Nesse trabalho foram estudados os seguintes parasitos e morfologias:

- ✓ *T. cruzi* cepa Tulahuen na forma amastigota intracelular⁹³;
- ✓ *T. cruzi* cepa Y nas formas epimastigota, tripomastigota e amastigota extracelular⁹⁴;
- ✓ *L. infantum* mCherry⁸³ nas formas promastigota e amastigota intracelular
- ✓ Para avaliar a citotoxicidade das substâncias bioativas foram usadas as células hospedeiras para cada parasito LLCMK₂ (*T. cruzi* Tulahuen), C₂C₁₂ (*T. cruzi* Y), J774 para *Leishmania infantum*.

3.3. Substâncias bioativas

Ampliando as possibilidades de novos compostos líderes, o Grupo de Química Medicinal (NEQUIMED-IQSC-USP) planeja e sintetiza compostos baseado na estrutura das enzimas cruzaina/CPB/catepsina L^{95–97}. Foi selecionada uma série de 55 substâncias planejadas e sintetizadas pelo grupo de química medicinal NEQUIMED, com alvo em cisteíno proteases. As substâncias foram diluídas em

DMSO e a concentração final nos ensaios é de 0,5% (v/v), com diluição no meio de cultura da respectiva linhagem. Os compostos de referência Benznidazol e Anfotericina B foram adquiridos da Sigma Aldrich.

O grupo possui um banco de dados onde estão organizados todos os compostos que são planejados e, na maioria das vezes, sintetizados pelo Grupo de Química Medicinal (NEQUIMED). Portanto, todos os compostos possuem a inicial NEQ e, no sufixo, um número que corresponde a ordem a qual foi adicionada ao banco de dados.

Embora esse estudo não seja inédito, propõe-se uma nova abordagem com o emprego de nitrilas como grupos reativos (*warheads*) para formar uma ligação covalente reversível de dipeptidil nitrilas com cisteíno proteases^{95,97} (Figura 10). A interação entre a síntese química e a avaliação biológica de novos compostos pode conduzir à descoberta de importantes fármacos, além do esclarecimento de alguns aspectos biológicos como mecanismo de ação e mecanismos responsáveis pela resistência.

Figura 10. Estrutura molecular base para a síntese de novos inibidores reversíveis.

Fonte: Modificado de Avelar et al. (2015)⁹⁷

A seguir, o trabalho foi dividido em capítulos para cada uma das doenças abordada neste trabalho com a finalidade de facilitar a compreensão dos dados e resultados.

3.4. Análises estatísticas

A análise dos resultados foi realizada pelo teste de variância ANOVA (ONE-WAY), seguido do teste de Bonferroni com o auxílio do programa Graph Pad Prism (Graph Pad software 5). Os níveis de significância para células de câncer de próstata variam de $P < 0,001$ e $P < 0,01$. Em contrapartida, a significância para os tratamentos utilizados

na doença de Chagas foi de $P < 0,05$. Os resultados foram plotados com o valor de IC50 ou CC50 $\pm$ o erro padrão da média das curvas concentração-resposta obtidas nesse trabalho.

4. Capítulo 1. *Trypanosoma cruzi*

Os ensaios realizados para *T. cruzi* foram feitos em dois lotes de substâncias. O primeiro lote foi composto com uma série de 55 substâncias escolhidas para realizar os testes com as três doenças abordadas neste trabalho. Com esses compostos foi realizado primeiro o ensaio das substâncias usando a cepa Y na forma epimastigota, seguido da obtenção das curvas concentração-resposta.

Em seguida foi realizado um teste com todas as substâncias na cepa Tulahuen LacZ na forma amastigota intracelular aliado a citotoxicidade na célula hospedeira LLCMK₂. Com o intuito de aprofundar os estudos, algumas substâncias que tiveram atividade sobre a forma epimastigota foram também testadas nas formas tripomastigota e amastigota extracelular da cepa Y. Estes últimos estudos tinham como finalidade confirmar a atividade contra o parasito, nas três morfologias: epimastigota, tripomastigota e amastigota. Além disto, este tipo de estratégia teve como princípio analisar a atividade direta no parasito em relação à atividade quando o parasito se encontra dentro da célula hospedeira.

O segundo conjunto de substâncias também foi planejado e sintetizado pelo grupo NEQUIMED, porém não foram realizados testes com as outras doenças (Câncer de próstata e Leishmaniose) desse trabalho, somente com *T. cruzi*. O intuito dessa nova abordagem foi realizar a triagem com as 118 substâncias isoladas e em combinação com o Benznidazol. O primeiro teste ocorreu com a cepa Tulahuen LacZ de *T. cruzi* na forma amastigota intracelular. Deste ensaio, as melhores substâncias foram selecionadas para realizar curvas concentração-resposta contra a cepa Y de *T. cruzi*, forma amastigota intracelular. Além disto, o estudo comparativo com a célula hospedeira C₂C₁₂ foi feito para a determinação da seletividade.

4.1. Métodos

4.1.1. Cultura de *T. cruzi*

As cepas utilizadas foram: Tulahuen LacZ de *T. cruzi*, geneticamente modificada para a expressão da enzima β -galactosidase, oriunda da bactéria *Escherichia coli*, para o ensaio colorimétrico com a substância CPRG (vermelho de clorofenol β -D-

galactopiranosida), além da cepa Y para o ensaio com as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota.

As células de rim de macaco (LLCMK₂) foram infectadas com tripomastigotas de ambas as cepas e foram mantidas em cultura celular para os ensaios em estufa com meio RPMI1640 em 90% de umidade, 37 °C e atmosfera a 5% de CO₂.

4.1.2. Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* com a morfologia epimastigota da cepa Y

Para analisar a atividade das substâncias frente a forma epimastigota de *T. cruzi*, utilizou-se o método colorimétrico (MTT). A solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) foi preparada na concentração de 5 mg/mL junto com PMS 0,22 mg/mL (um carreador de elétrons) em tampão fosfato salino (PBS, Cultilab)⁶⁵. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços de fundo chato e transparente, onde 90 µL de parasitos foram adicionados na concentração de 1x10⁷ parasitos/mL. No primeiro experimento foi realizado uma triagem de substâncias na concentração única de 100 µM. Posteriormente, com as melhores substâncias, foram obtidas as curvas concentração-resposta para determinar o valor de IC₅₀ e avaliar o potencial dessas substâncias.

Após cinco dias de tratamento foram adicionadas 10 µL de MTT. As placas foram incubadas por 4 horas (no escuro). Em seguida os cristais de formazan formados foram solubilizados com 100 µL de agente solubilizante contendo uma solução de 70% de SDS a 10% (Amresco) e 0,01 mol/L de HCl (Vetec), adicionando 30% (v/v) de DMSO. Após 90 minutos de incubação foi realizada a leitura no espectrofotômetro BioTek Synergy HT em 570 nm. A análise dos dados foi feita com o GraphPad Prism v. 5 e ExcelTM.

4.1.3. Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* com a morfologia amastigota intracelular da cepa Tulahuen LacZ

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. As células da linhagem LLCMK₂ foram plaqueadas na concentração de 5x10⁴ céls/mL. As formas tripomasigotas da cepa Tulahuen LacZ foram adicionadas na concentração de 5x10⁵

parasitos/mL e incubadas na estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 48 h⁹⁸. Após o período de incubação, as formas tripomastigotas presentes no sobrenadante foram retiradas por meio de sucessivas lavagens com PBS, permanecendo apenas as formas amastigotas intracelulares. As substâncias bioativas foram adicionadas em concentrações seriadas (250 µM a 1,95 µM) e incubadas por 72 h. Ao final deste período o substrato CPRG a 400 µM em 0,3% Triton X-100 (pH 7,4) foi adicionado. Após 4 h de incubação na estufa a 37°C, as placas foram analisadas em espectrofotômetro a 570 nm. Foram utilizados como controle positivo o Benznidazol nas mesmas concentrações das substâncias e, como controle negativo, o DMSO (solvente utilizado para os compostos). A análise dos dados foi obtida pelo programa estatístico Graph Pad Prism v. 5.

4.1.4. Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* com a morfologia tripomastigota da cepa Y

As formas tripomastigotas foram obtidas de frascos T75 com células LLCMK₂ infectadas com tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*. Decorridos 5 a 7 dias essas células liberam no meio as formas tripomastigotas. Em sequência realizou-se várias centrifugações. As formas tripomastigotas foram contadas e a concentração ajustada para 2x10⁶ parasitos/mL. E seguida, as formas tripomastigotas foram plaqueadas em placas de 96 poços, e incubadas com as substâncias por 24 h. Após esse período, as formas tripomastigotas viáveis foram contadas com o auxílio da câmara de Neubauer⁷⁸.

4.1.5. Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* com a morfologia amastigota extracelular da cepa Y

As formas amastigotas foram obtidas por meio da utilização de frascos T75 com células LLCMK₂ infectadas por formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y. Decorridos 5-7 dias essas células liberaram as formas tripomastigotas no meio, que foram coletadas em um novo frasco com meio de cultivo acidificado (pH 5), sendo posteriormente incubadas por 24 h para a diferenciação para a forma amastigota⁹⁹.

Após as centrifugações, a concentração das formas foi ajustada para 2×10^6 parasitos/mL. Em seguida, essas formas amastigotas foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas com as substâncias por 24 h. Após esse período as amastigotas viáveis foram contadas com o auxílio da câmara de Neubauer.

4.1.6. Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* com a morfologia amastigota intracelular da cepa Y

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. Os mioblastos de camundongo da linhagem C₂C₁₂ foram plaqueados na concentração de 5×10^4 céls/mL. As formas tripomastigotas da cepa Y foram adicionadas na concentração de $2,5 \times 10^5$ parasitos/mL e incubadas na estufa a 37°C com 5% de CO₂ a noite. Após esse período, as formas tripomastigotas presentes no sobrenadante foram retiradas com sucessivas lavagens com PBS, permanecendo apenas as formas amastigotas intracelulares. As substâncias bioativas foram adicionadas em diferentes concentrações (250 µM a 1,95 µM) e incubadas por 72 h. Ao final deste período as placas foram lavadas sucessivamente com PBS, fixadas com 4% de formaldeído, coradas com DAPI e analisadas no equipamento ImageXpress da Molecular Devices por meio de HCS (*High Content Screening*). Como controle positivo utilizou-se o Benznidazol nas mesmas concentrações das substâncias e, como controle negativo, o DMSO (solvente usado para os compostos). A análise dos dados foi realizada no programa estatístico Graph Pad Prism v. 5.

4.2. Resultados

4.2.1. Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* com a morfologia epimastigota

A forma epimastigota é a única morfologia replicativa de *T. cruzi* encontrada no triatomíneo. O intuito deste trabalho foi investigar se as substâncias planejadas e sintetizadas pelo NEQUIMED interferem na viabilidade desse estágio morfológico do parasito. Para isso, o ensaio inicial foi um teste com as 55 substâncias selecionadas

para serem estudadas neste trabalho. Para realizar esse estudo, as epimastigotas ficaram em contato com as substâncias por cinco dias em concentração única de 100 μ M. Para verificar a viabilidade dos parasitos foi utilizado o método colorimétrico MTT, com leitura da absorbância realizada no espectrofotômetro a 570 nm.

Dos 55 inibidores testados nesse experimento, Neq0677, Neq0689 e Neq0690 inibiram mais de 80% da viabilidade das formas epimastigotas, sendo as melhores substâncias dessa série, com resultado semelhante ao Benznidazol (Figura 11). Para o composto Neq0633 houve inibição de 50% da viabilidade desse parasito, enquanto as outras substâncias não foram ativas contra essa morfologia de *T. cruzi*.

É interessante notar que E64 e E64d (conhecidos inibidores irreversíveis de cisteíno proteases) foram inativos nestes ensaios. Isto é inesperado, especialmente para o composto E64d, que é permeável à célula. Ainda não há uma hipótese adequada para explicar tal fenômeno^{100–102}.

Figura 11. Triagem de substâncias contra a forma epimastigota cepa Y de *T. cruzi*.

As

barras representam a média e o desvio padrão de dois experimentos em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância ANOVA seguido do teste de Boferroni. A análise comparativa foi realizada entre a média do NEQ0677, NEQ0689, NEQ0690 e o Benznidazol * ($p < 0,05$). O controle é composto por células com meio de cultura contendo 0,5% (v/v) de DMSO, que também foi usado como co-solvente para os compostos usados.

Fonte: autoria própria.

Para analisar os dados e comparar a potência das substâncias Neq0677, Neq0689 e Neq0690 com o Benznidazol, foram realizados estudos de curvas concentração-resposta desses inibidores. De acordo com os dados apresentados na Figura 12 e Tabela 1, as substâncias Neq0677 e Neq0690 ($IC_{50} = 10,8 \mu M$ e $14,2 \mu M$) foram duas vezes mais potentes que o Benznidazol ($IC_{50} = 22,5 \mu M$). No caso do composto Neq0689 ($IC_{50} = 25,3 \mu M$) a viabilidade das epimastigotas foi reduzida com perfil similar à substância de referência.

Figura 12. Curvas concentração-resposta com as melhores substâncias de acordo com a triagem com a forma epimastigota da cepa Y do *T. cruzi*

Fonte: autoria própria.

Tabela 1. Dados das curvas concentração-resposta com os valores de potência (IC_{50}) e os parâmetros estatísticos (r^2 e $Sy.x$) para as substâncias selecionadas na triagem para a forma epimastigota da cepa Y do *T. cruzi*.

Substâncias	IC_{50} (SE) µM	r^2	$Sy.x$
Benznidazol	22,5 (1,4)	0,963	6,46
NEQ0677	10,8 (0,40)	0,971	6,75
NEQ0689	25,3 (2,01)	0,97	6,25
NEQ0690	14,2 (0,66)	0,964	5,5

SE: erro padrão.

Fonte: autoria própria.

4.2.2. Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* com a morfologia amastigota intracelular da cepa Tulahuen LacZ

O estágio de vida replicativo de *T. cruzi* denominado amastigota é o principal alvo considerando os hospedeiros vertebrados. Desta forma, a busca por novos fármacos tem sido uma constante nesta área. Com o propósito de investigarmos e selecionarmos substâncias potentes contra essa forma, a abordagem adotada para os ensaios foi inicialmente o ensaio celular baseado em séries de compostos sintetizados no grupo NEQUIMED. Para realizar esses ensaios, a linhagem de células LLCMK₂ foi infectada com tripomastigotas por 48 h anteriormente a incubação com os compostos. Esse tempo é necessário para o parasito entrar na célula, alterar sua morfologia para amastigota e se multiplicar no interior da célula hospedeira sem

rompê-la. Após esse período, os tripomastigotas extracelulares foram removidos por lavagens sucessivas com PBS. As substâncias foram adicionadas em concentrações seriadas, iniciando em 250 μM e finalizando em 1,95 μM , com análise da atividade tripanocida após 72 h de incubação.

Concomitantemente, foi realizado um ensaio colorimétrico de MTT com as mesmas condições e células hospedeiras utilizadas no ensaio tripanocida para avaliar a citotoxicidade dessas substâncias frente as células do hospedeiro mamífero. Os valores de potência tripanocida e citotóxica inespecífica devem ser analisados de forma integrada por meio da análise do índice de seletividade (SI).

De acordo com os dados apresentados na Figura 13 e Tabela 2, os compostos que apresentaram melhor potência tripanocida foram Neq0629 e Neq0782 (IC_{50} = 32,2 e 18,55 μM , com SI = 5,17 e 7,76, respectivamente). O intuito do estudo para busca de novas substâncias, é que elas tenham atividade melhor do que a substância de referência, que neste caso é o Benznidazol (IC_{50} = 5,5 μM e SI = 49). Analisando esses dados, as concentrações para inibir 50% da viabilidade dos parasitos para os novos inibidores são 5,85 e 3,37 respectivamente maiores do que o composto de referência, apesar de não serem citotóxicos, não são substâncias mais potentes que o de referência.

Outro dado importante, as substâncias que tiveram atividade contra a forma epimastigota de *T. cruzi* (Neq0677, Neq0689 e Neq0690) não apresentaram atividade contra a forma amastigota intracelular. Uma provável hipótese seria baseada na dificuldade dessas substâncias em atravessarem três barreiras/membranas e atingir o parasito dentro do vacúolo parasitóforo.

A maioria dos compostos não apresentaram citotoxicidade contra a célula hospedeira LLCMK₂, porém o baixo índice de seletividade está relacionado com a seletividade da substância em relação aos parasitos.

Figura 13. Curvas concentração-resposta das substâncias contra *T. cruzi* na forma amastigota intracelular da cepa Tulahuen LacZ e citotoxicidade na célula hospedeira LLCMK₂.

Fonte: autoria própria.

Tabela 2. Valores de potência (IC₅₀) para a forma amastigota do *T. cruzi* Tulahuen e citotoxicidade (CC₅₀) para a célula hospedeira LLCMK₂, com os respectivos valores do índice de seletividade (SI).

Substância	IC ₅₀ (SE) µM	CC ₅₀ (SE) µM	SI
Benznidazol	5,5 (0,6)	271 (21,3)	49,3
NEQ0409	181 (13,6)	-	-
NEQ0410	157 (4,6)	38,3 (7,5)	0,25
NEQ0570	170 (5,4)	308 (24)	1,82
NEQ0587	>500	>500	1
NEQ0629	32,2 (5,4)	167 (6,4)	5,17
NEQ0630	21,3 (1,9)	41,8 (2,1)	1,96
NEQ0631	176 (8,1)	>500	10,5
NEQ0633	35,4 (2,4)	26 (4,3)	0,73
NEQ0636	61,3 (1,4)	70 (4,9)	1,14
NEQ0641	185 (20)	>500	2,7
NEQ0643	126 (7,4)	33,6 (1,2)	0,27
NEQ0658	82 (9,9)	6,18 (0,4)	0,07
NEQ0664	205 (7,2)	352 (6,4)	1,72
NEQ0665	16,3 (0,53)	36,5 (1,2)	2,23
NEQ0668	178 (7,6)	>500	2,85
NEQ0669	58,2 (2,7)	48,4 (5,1)	0,83
NEQ0670	~238	154,5 (11,1)	0,65
NEQ0677	21,7 (1,6)	43,48 (2,2)	2,0
NEQ0678	163 (13,5)	82,8 (2)	0,5
NEQ0680	~220	95,4 (13,8)	0,43
NEQ0681	121 (10)	145 (10,3)	1,2
NEQ0682	205 (7,6)	433 (10,9)	2,11
NEQ0683	174 (6,2)	182 (9,6)	1,04
NEQ0690	100 (6,7)	168 (4,9)	1,67
NEQ0691	~231	-	-
NEQ0692	~231	-	-
NEQ0705	176 (6,7)	193 (7,9)	1,1
NEQ0706	189 (5,8)	237 (7)	1,25
NEQ0707	153 (7)	288 (4,1)	1,88
NEQ0708	151 (6,3)	182 (13,2)	1,2

Continua

Conclusão			
Substância	IC ₅₀ (SE) µM	CC ₅₀ (SE) µM	SI
NEQ0709	193 (9,3)	24,4 (13,2)	0,12
NEQ0714	198 (7,4)	279 (28,8)	1,41
NEQ0715	55,2 (3,2)	111 (8,9)	2
NEQ0716	63,4 (3,4)	119 (10)	1,88
NEQ0718	204 (24,8)	105 (11)	0,51
NEQ0719	175 (12,3)	87,8 (3,3)	0,5
NEQ0770	46,2 (5,3)	59,1 (3,8)	1,27
NEQ0775	148 (10,4)	-	-
NEQ0779	105 (10,6)	246 (6)	2,35
NEQ0780	102 (9,4)	179 (5,6)	1,75
NEQ0781	74,1 (7)	~239	3,21
NEQ0782	18,6 (1,6)	144 (4,4)	7,76
NEQ0783	135 (6,4)	229 (6)	1,69
NEQ0784	~224	257 (8,6)	1,15
NEQ0785	103 (4,4)	213 (7,8)	2,07
E64	105 (8,2)	226 (6,6)	2,16
E64D	103 (4,6)	179 (19,6)	1,75

SE: erro padrão.

Fonte: autoria própria

Para investigar se as substâncias Neq0677 e Neq0690 possuem atividade tripanocida contra as formas tripomastigota e amastigota encontradas no ciclo de vida do hospedeiro vertebrado, outros experimentos foram realizados. Foram analisadas a atividade dos compostos diretamente nas formas tripomastigotas e amastigotas, como descrito nos tópicos a seguir.

4.2.3. Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* com a morfologia tripomastigota da cepa Y de *T. cruzi*

A fim de investigarmos o perfil bioativo das substâncias Neq0677 e Neq0690 com o parasito, realizamos o teste diretamente com a forma tripomastigota da cepa Y. As substâncias foram adicionadas em concentrações seriadas de 100 µM a 0,39 µM e foram incubadas por 24 horas. Após esse período os parasitos foram contados na câmara de Neubauer. Ambas as substâncias foram eficazes contra essa morfologia

do parasito (Tabela 3). Observando os valores para que a substância consiga inibir a viabilidade do parasito em 50%, os inibidores foram 5,3 e 1,7 vezes mais potente do que o Benznidazol, respectivamente (Figura 14).

Figura 14. Curva concentração-resposta com os compostos Neq0677 e Neq0690 contra a forma tripomastigota da cepa Y de *T. cruzi*

Fonte: autoria própria.

Tabela 3. Dados das curvas concentração-resposta com os valores de potência (IC_{50}) e os parâmetros estatísticos (r^2 e $Sy.x$) para as substâncias selecionadas na triagem para a forma tripomastigota da cepa Y do *T. cruzi*.

Substâncias	IC_{50} (SE) µM	r^2	$Sy.x$
Benznidazol	13,2 (2,3)	0,993	4,33
Neq0677	2,48 (0,1)	0,992	4,24
Neq0690	7,63 (0,3)	0,996	2,97

SE: erro padrão.

Fonte: autoria própria

4.2.4. Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* com a morfologia amastigota extracelular da cepa Y do *T. cruzi*

A forma amastigota, é o alvo de muitos estudos, visto ser a forma que se encontra dentro das células de órgãos parasitados causando lesões teciduais severas. Este experimento analisou a atividade das substâncias diretamente na forma amastigota livre, na ausência da célula hospedeira. Os testes foram com os compostos Neq0677 e Neq0690. As concentrações seriadas foram de 0,097 µM a 100 µM e foram

incubadas com a amastigota por 24 h. Após esse período, os parasitos foram contados na câmara de Neubauer. Neq0677 apresentou atividade tripanocida, com $IC_{50} = 2,22 \mu M$ (Tabela 4), muito próximo da substância de referência, o Benznidazol ($IC_{50} = 1,49 \mu M$) (Figura 15). No caso do composto Neq0690, a potência foi muito baixa ($IC_{50} = 142 \mu M$), sendo considerado inativo quando o valor de corte de $100 \mu M$ é considerado.

Figura 15. Curvas concentração-resposta com os compostos Neq0677 e Neq0690 contra a forma amastigota extracelular da cepa Y de *T. cruzi*

Fonte: autoria própria.

Tabela 4. Dados das curvas concentração-resposta com os valores de potência (IC_{50}) e os parâmetros estatísticos (r^2 e $Sy.x$) para as substâncias selecionadas na triagem para a forma amastigota extracelular da cepa Y do *T. cruzi*.

Substância	IC_{50} (SE) μM	r^2	$Sy.x$
Benznidazol	1,49 (0,1)	0,992	3,78
Neq0677	2,22 (0,1)	0,996	3,16
Neq0690	142 (9)	0,995	3,14

SE: erro padrão.

Fonte: autoria própria.

Aliado a esse trabalho, foram testadas substâncias planejadas e estudadas pelo NEQUIMED. O objetivo foi analisar a atividade tripanocida contra a forma amastigota de *T. cruzi*. Devido à dificuldade de encontrar novos tratamentos efetivos contra a doença de Chagas, a terapia combinada pode ser uma abordagem interessante para melhorar a eficácia do tratamento e reduzir os níveis de toxicidade

e resistência do medicamento atual. Para esse teste, as substâncias foram analisadas de forma isolada e em combinação com 1 μM do Benznidazol contra as formas amastigotas da cepa Tulahuen Lac Z do parasito (Tabela 5). De acordo com essa triagem, as melhores substâncias foram: Neq0827, Neq0831 e Neq0902.

Das substâncias testadas, duas apresentaram melhora na atividade tripanocida, bem como melhora na citotoxicidade celular quando combinados ao fármaco de referência para *T. cruzi* demonstrando uma possível ação sinérgica e seletiva dos compostos teste quando combinados com uma concentração sub-ótima *in vitro* do Benznidazol. Os compostos Neq0827 e Neq0831 mostraram alta seletividade quando combinado ao Benznidazol. O IC_{50} do Neq0827 passou de 45/ μM para 1,35, ou seja, 63 vezes mais seletivo (Tabela 5). Já Neq0831 passou de 9,62 para 0,39, ou seja, 48 vezes mais seletivo. O próximo passo realizado com essas substâncias foi testar a atividade delas na cepa Y na forma amastigota intracelular, utilizando como célula hospedeira a linhagem C₂C₁₂.

Tabela 5. Valores de potência (IC_{50}) para a forma amastigota intracelular da cepa Tulahuen do *T. cruzi* e citotoxicidade (CC_{50}) para a célula hospedeira C₂C₁₂, com os respectivos valores do índice de seletividade (SI).

Substâncias	IC_{50} (SE) μM	CC_{50} (SE) μM	SI
NEQ0631	184 (13,2)	177 (8,8)	0,96
NEQ0631+Bz	191 (11,2)	168 (9,1)	0,87
NEQ0641	175 (9,1)	90,5 (8,8)	0,52
NEQ0641+Bz	95,2 (9,4)	119 (8,7)	1,25
NEQ0779	172 (13)	165 (8,9)	0,96
NEQ0779+Bz	186 (12,4)	157 (9,9)	0,84
NEQ0780	180 (13)	158 (14,7)	0,88
NEQ0780+Bz	169 (14)	158 (10,1)	0,94
NEQ0781	~60,6	154 (10)	2,54
NEQ0781+Bz	72,4 (3,3)	-	-
NEQ0782	12,8 (1)	151 (8,5)	11,8
NEQ0782+Bz	15,0 (1,3)	145 (9,2)	9,68
NEQ0783	140 (6,2)	167 (9,7)	1,19
NEQ0783+Bz	126 (3,8)	153 (8)	1,2
NEQ0784	177 (14,9)	174 (11)	0,98
NEQ0784+Bz	147 (4,6)	169 (9,3)	1,15
NEQ0821	216 (6,6)	230 (8,3)	1,06
NEQ0821+bz	194 (5,2)	345 (19,6)	1,77
NEQ0827	45,0 (3,2)	103 (4,7)	2,05
NEQ0827+bz	1,35 (0,04)	84,9 (8,1)	62,9
NEQ0828	17,1 (0,4)	37,7 (5,1)	2,2
NEQ0828+bz	-	11,4 (2,2)	-
Continua			

Conclusão			
Substâncias	IC₅₀ (SE) µM	CC₅₀ (SE) µM	SI
NEQ0830	22,9 (2)	52,4 (4,2)	2,29
NEQ0830+bz	8,60 (0,7)	98,2 (7,5)	11,4
NEQ0831	9,62 (0,5)	48,0 (3)	4,99
NEQ0831+bz	0,389 (0,02)	19,0 (3,7)	48,8
NEQ0837	208 (9,3)	50,5 (4,6)	0,24
NEQ0837+bz	53,5 (4)	37,0 (4)	0,69
NEQ0838	196 (6)	44,4 (7,8)	0,22
NEQ0838+bz	-	66,9 (2,3)	-
NEQ0840	196 (10,6)	103 (7,7)	0,52
NEQ0840+bz	129 (9,3)	160 (3,6)	1,24
NEQ0841	~29,5	68,7 (3)	2,32
NEQ0841+bz	8,59 (0,5)	69,7 (3)	8,11
NEQ0842	122 (3,7)	52,6 (3,6)	0,43
NEQ0842+bz	40,8 (2,1)	63,5 (3)	1,56
NEQ0844	~233	103 (4)	0,44
NEQ0844+bz	111 (11,1)	49,0 (5,3)	0,44
NEQ0845	23,3 (5,1)	11,2 (1,7)	0,48
NEQ0845+bz	2,43 (0,3)	4,04 (0,3)	1,66
NEQ0847	58,2 (6,5)	38,7 (3,4)	0,66
NEQ0847+bz	8,77 (0,4)	34,9 (2)	3,98
NEQ0849	227 (8,7)	219 (14)	0,97
NEQ0849+bz	127 (11,6)	126 (11)	0,99
NEQ0850	8,72 (0,7)	15,1 (1,3)	1,73
NEQ0850+bz	1,60 (0,3)	16,7 (1,8)	10,4
NEQ0851	13,2 (0,8)	17,1 (1)	1,29
NEQ0851+bz	6 (0,6)	17,6 (2,6)	2,92
NEQ0858	235 (18)	147 (4,7)	0,63
NEQ0858+bz	146 (8,7)	147 (9,9)	1,01
NEQ0859	~237	137 (3,9)	0,58
NEQ0859+bz	158 (11,5)	144 (8,4)	0,92
NEQ0864	240 (4,6)	127 (10,5)	0,53
NEQ0864+bz	112 (7,5)	154 (4)	1,37
NEQ0865	~230	96,6 (6,7)	0,42
NEQ0865+bz	111 (6,6)	155 (7,5)	1,4
NEQ0866	163 (12,8)	120 (14)	0,74
NEQ0866+bz	36,6 (2,4)	149 (7,2)	4,06
NEQ0867	155 (7,5)	119 (2,8)	0,77
NEQ0867+bz	15,7 (09)	83,2 (2,1)	5,3
NEQ0869	~234	121 (11,3)	0,52
NEQ0869+bz	141 (6)	142 (9,1)	1
NEQ0870	~240	161 (10,4)	0,67
NEQ0870+bz	22,6 (2,3)	126 (5,7)	5,58
NEQ0871	174 (11,3)	169 (13,1)	0,97
NEQ0871+bz	46,9 (5,4)	134 (10,5)	2,86
NEQ0872	-	226 (7)	-
NEQ0872+bz	17 (1,5)	21,0 (1,6)	1,23
NEQ0873	30,3 (2,5)	45,0 (2,7)	1,48
Continua			

Conclusão			
Substâncias	IC₅₀ (SE) µM	CC₅₀ (SE) µM	SI
NEQ0873+bz	6,45 (1,2)	44,4 (1,8)	6,89
NEQ0874	116 (7,7)	199 (6)	1,72
NEQ0874+bz	6,5 (1,2)	137 (4)	21
NEQ0875	135 (13)	171 (14,7)	1,27
NEQ0875+bz	94,8 (6)	101 (5,7)	1,06
NEQ0876	44,4 (3,5)	126 (6,9)	2,84
NEQ0876+bz	29,7 (2,8)	62,3 (4)	2,1
NEQ0880	194 (5,1)	138 (12,5)	0,71
NEQ0880+bz	167 (8,9)	161 (10,7)	0,96
NEQ0881	77,5 (3,7)	113 (5,4)	1,46
NEQ0881+bz	33,9 (3)	46,2 (4,2)	1,36
NEQ0882	152 (6,3)	117 (10,8)	0,77
NEQ0882+bz	66,9 (4)	90,8 (3,6)	1,36
NEQ0885	~232	191 (14)	0,82
NEQ0885+bz	77,7 (6)	191 (5,5)	2,46
NEQ0886	~230	215 (8,4)	0,94
NEQ0886+bz	59,9 (1,3)	182 (10,9)	3,04
NEQ0888	108 (6,2)	189 (8,7)	1,74
NEQ0888+bz	-	163 (3,8)	-
NEQ0891	~239	220 (7)	0,92
NEQ0891+bz	149 (11,3)	90,3 (3)	0,6
NEQ0896	~59,4	167 (10)	2,82
NEQ0896+bz	28,7 (1,8)	107 (7,3)	3,7
NEQ0897	98,0 (8,3)	168 (11,6)	1,71
NEQ0897+bz	36,5 (3)	117 (9,3)	3,21
NEQ0898	30,0 (2,1)	183 (15,6)	6,09
NEQ0898+bz	205 (17,6)	121 (9,4)	0,59
NEQ0899	29,8 (3,2)	165 (10,1)	5,55
NEQ0899+bz	28,4 (2,3)	99,2 (3,5)	3,5
NEQ0900	~58,4	79,8 (1,8)	1,37
NEQ0900+bz	15,8 (1,5)	70,2 (5,5)	4,43
NEQ0901	29,6 (1,4)	76,3 (4)	2,58
NEQ0901+bz	29,8 (4,8)	77,0 (4,9)	2,58
NEQ0902	7,20 (0,9)	71,1 (3,2)	9,88
NEQ0902+bz	51,6 (5)	50,2 (5,2)	0,97
NEQ0903	28,0 (1,4)	45,4 (6,3)	1,62
NEQ0903+bz	51,5 (2,8)	0,86 (0,1)	0,01
NEQ0905	230 (15)	123 (9,3)	0,53
NEQ0905+bz	158 (3,7)	141 (11,6)	0,89
NEQ0906	117 (8,3)	86,0 (2)	0,73
NEQ0906+bz	53,6 (5,2)	125 (6,1)	2,33
NEQ0907	56,3 (3,4)	122 (7,3)	2,17
NEQ0907+bz	11,6 (2,2)	136 (2,2)	11,7
NEQ0908	228 (12)	130 (11,1)	0,57
NEQ0908+bz	63,4 (4,8)	109 (6,8)	1,71
NEQ0909	226 (12,7)	110 (2,6)	0,48
NEQ0909+bz	163,5 (3,9)	90,8 (3,8)	1,09
Continua			

Conclusão			
Substâncias	IC₅₀ (SE) µM	CC₅₀ (SE) µM	SI
NEQ0910	34,7 (2,5)	15,1 (1,2)	0,43
NEQ0910+bz	58,0 (1,2)	20,6 (1,5)	0,35
NEQ0911	120 (10,4)	52,7 (1,4)	4,3
NEQ0911+bz	39,8 (2,7)	111 (7,3)	2,8
NEQ0912	163 (13,8)	39,6 (1)	0,24
NEQ0912+bz	175 (14,9)	141 (6,8)	0,8
NEQ0913	59,1 (4,3)	52,0 (2,6)	0,88
NEQ0913+bz	18,4 (1)	62,4 (1,6)	3,4
NEQ0914	123 (11,3)	152 (7,3)	1,24
NEQ0914+bz	28,2 (1,8)	119 (7,3)	4,23
NEQ0915	-	113 (10,8)	-
NEQ0915+bz	42,7 (2,9)	144 (10,9)	3,36
NEQ0916	25,5 (1,5)	63,2 (7,1)	2,47
NEQ0916+bz	12,1 (0,5)	45,2 (2,7)	3,73
NEQ0917	225 (16,4)	162 (12,8)	0,72
NEQ0917+bz	85,3 (6,4)	108 (7,4)	1,27
NEQ0918	~222	149 (9)	0,67
NEQ0918+bz	79,9 (3,8)	121 (11)	1,51
NEQ0919	~58,1	69,2 (8,8)	1,2
NEQ0919+bz	30,5 (2,9)	76,3 (3,8)	2,5
NEQ0920	168 (16,2)	122 (9,5)	0,72
NEQ0920+bz	-	104 (8,7)	-
NEQ0921	220 (4)	125 (9,4)	0,57
NEQ0921+bz	35,5 (1,7)	>500	2,1
NEQ0922	114 (6,4)	167 (13,2)	1,47
NEQ0923	~254	185 (4,8)	0,73
NEQ0923+bz	101 (10,3)	79,9 (6,8)	0,79
NEQ0924	~228	-	-
NEQ0924+bz	60,9 (6)	132 (5)	2,17
NEQ0925	79,7 (3,7)	69,4 (1,9)	0,87
NEQ0925+bz	77 (3,7)	117 (2,6)	3,37
NEQ0926	68,9 (7,7)	238 (12,3)	3,45
NEQ0926+bz	113 (11,8)	152 (8,5)	1,34
NEQ0927	45,2 (3,9)	170 (16,8)	3,73
NEQ0927+bz	92,6 (2,7)	-	-
NEQ0928	47,0 (5,5)	169 (6,7)	3,59
NEQ0928+bz	~62,9	72,5 (4,7)	1,15
NEQ0929	74,1 (3,5)	215 (14,3)	2,9
NEQ0929+bz	39,6 (3,9)	74,7 (3,4)	1,89
NEQ0930	165 (11,7)	177 (14)	1,07
NEQ0930+bz	51,5 (4,8)	79,6 (5,8)	1,55
NEQ0931	109 (8,9)	101 (8,5)	0,92
NEQ0931+bz	49,8 (8,6)	86,2 (7,5)	1,73
NEQ0932	76,3 (5,6)	123 (11,6)	1,62
NEQ0932+bz	43,5 (3,3)	90,1 (8,3)	2,07
NEQ0937	63,3 (5,3)	83,1 (5,6)	1,31
NEQ0937+bz	16,5 (1,1)	40,7 (3,5)	2,46
Continua			

Conclusão			
Substâncias	IC₅₀ (SE) µM	CC₅₀ (SE) µM	SI
NEQ0939	120 (9,2)	235 (15,2)	1,95
NEQ0939+bz	6,5 (0,4)	49,3 (2,8)	7,58
NEQ0941	70,8 (7,9)	105 (2,5)	1,47
NEQ0941+bz	94,5 (4,3)	92,4 (2,4)	0,97
NEQ0942	24,4 (2,2)	116 (10)	4,75
NEQ0942+bz	96,5 (5)	100 (2,2)	1,04
NEQ0943	30,0 (2,7)	141 (11,8)	4,7
NEQ0943+bz	173 (11,5)	111 (7,9)	0,64
NEQ0944	16,4 (3,2)	140 (12,1)	8,5
NEQ0944+bz	168 (13,6)	158 (11,1)	0,94
NEQ0945	67,6 (7,44)	181 (13,8)	2,68
NEQ0945+bz	170 (12,6)	162 (12,5)	0,95
NEQ0946	52,4 (5,3)	133 (7,6)	2,53
NEQ0946+bz	168 (11,7)	155 (8,5)	0,93
NEQ0947	19,0 (1,9)	117 (9)	6,17
NEQ0947+bz	168 (10,5)	112 (9,3)	0,66
NEQ0948	30,6 (2,8)	126 (11,3)	4,11
NEQ0948+bz	90,0 (4,3)	105 (8,9)	1,16
NEQ0949	18,5 (2,5)	53,1 (3,7)	2,87
NEQ0949+bz	47,5 (2)	59,7 (6)	1,25
NEQ0950	6,67 (0,4)	22,5 (1,1)	3,36
NEQ0950+bz	10,8 (0,6)	34,1 (2,5)	3,17
NEQ0952	26,0 (2,4)	132 (3,3)	5,07
NEQ0952+Bz	20,0 (1,7)	102 (2,7)	5,09
NEQ0953	15,8 (1,4)	44,8 (4,6)	2,83
NEQ0953+Bz	17,9 (2,6)	66,2 (3,4)	3,7
NEQ0954	144 (6,9)	170 (13,3)	1,18
NEQ0954+bz	140 (13,7)	150 (12,7)	0,1
NEQ0955	202 (14,8)	167 (14,6)	0,83
NEQ0955+Bz	12,3 (1,3)	197 (11,1)	16
NEQ0956	32,7 (3,2)	172 (5)	5,26
NEQ0956+Bz	13,9 (0,7)	186 (16,1)	13,3
NEQ0958	160 (10,5)	198 (16,3)	1,24
NEQ0958+Bz	191 (16,9)	277 (7,8)	1,45
NEQ0959	157 (10,5)	119 (6,9)	0,75
NEQ0959+Bz	102 (9,5)	98,4 (2,3)	0,96
NEQ0960	163 (15,2)	160 (3,7)	0,97
NEQ0960+Bz	112 (7,5)	99,6 (4,2)	0,89
NEQ0961	151 (8,9)	203 (10)	1,34
NEQ0961+Bz	119 (9,2)	185 (14)	1,56
NEQ0962	180 (15)	191 (8,4)	1,06
NEQ0962+Bz	132 (6,6)	197 (14,5)	1,49
NEQ0963	184 (11)	178 (4,4)	0,96
NEQ0963+Bz	11,1 (1,2)	241 (8)	21,7
NEQ0964	122 (6,4)	175 (3,9)	1,43
NEQ0964+Bz	16,9 (0,6)	161 (5,9)	9,55
NEQ0965	153 (11,4)	197 (4,7)	1,29
Continua			

Conclusão			
Substâncias	IC₅₀ (SE) µM	CC₅₀ (SE) µM	SI
NEQ0965+Bz	182 (12,6)	468 (22,4)	2,57
NEQ0966	197 (16,3)	180 (12)	0,91
NEQ0966+Bz	139 (3,6)	181 (9,4)	1,3

SE: erro padrão.

Fonte: autoria própria.

Três compostos foram selecionados para ensaios com outra cepa de *T. cruzi* de acordo com o resultado obtido com o ensaio realizado com as 118 substâncias: um composto isolado (Neq0902) e dois em combinação com o Benznidazol (Neq0827 e Neq0831).

Para investigarmos a atividade tripanocida com uma cepa mais resistente, avaliamos a atividade dessas substâncias em amastigota intracelular da cepa Y utilizando como célula hospedeira a linhagem C₂C₁₂. Neste experimento, as células C₂C₁₂ permaneceram infectadas *overnight* antes da administração dos compostos. O tempo de incubação é importante, pois permite que o parasito entre e comece a se multiplicar no interior da célula hospedeira.

Os compostos foram adicionados em concentrações seriadas iniciando em 250 µM e, após 72 horas, a atividade tripanocida foi avaliada. As amostras foram fixadas e coradas com o fluoróforo DAPI e analisadas no equipamento de HCS (*High Content Screening*).

De acordo com os resultados obtidos e demonstrados na Figura 16 e Tabela 6, as duas substâncias usadas de forma combinada (Neq0827+Bz e Neq0831+Bz) apresentaram respostas distintas entre a cepa Tulahuen e Y de *T. cruzi*, uma vez que a combinação com Neq0827 foi mais potente para a cepa Tulahuen, enquanto que para a cepa Y, Neq0831 foi o mais potente. Deve-se observar que as duas combinações também tiveram um índice de seletividade menor para a cepa Y em relação a Tulahuen, o que reflete a maior resistência a primeira em relação à segunda forma de *T. cruzi*. O mesmo resultado foi observado para Neq0902, que foi menos potente para a cepa Y, com menor índice de seletividade. Além disto, vale observar também que Neq0902 apresenta uma diferença importante quando comparado com Neq0827 e Neq0831. Neq0902 foi mais potente de forma isolada, o que é totalmente distinto quando Neq0827 e Neq0831 foram estudados (Tabela 5). Isto reflete, por um lado, a possibilidade de um mecanismo de ação distinto para Neq0902 em relação aos outros dois compostos. Por outro lado, há a necessidade de realizar testes

independentes da substância isolada e em combinação, pois não há como trasladar a resposta biológica de um tipo de ensaio para outro, mesmo que dentre de uma série de substâncias, como foi o caso apresentado.

Figura 16. Curva concentração-resposta das substâncias para a forma amastigota intracelular da cepa Y do *T. cruzi* e citotoxicidade na célula hospedeira C₂C₁₂

Fonte: autoria própria.

Tabela 6. Valores de potência (IC₅₀) para a forma amastigota intracelular da cepa Y do *T. cruzi* e citotoxicidade (CC₅₀) para a célula hospedeira C₂C₁₂, com os respectivos valores do índice de seletividade (SI).

Substâncias	IC ₅₀ (SE) μM	CC ₅₀ (SE) μM	SI
Benznidazol	5,74 (0,7)	74,8 (5,3)	13
Neq0827+Bz	34,2 (2,8)	114 (9,4)	3,34
Neq0831+Bz	6,99 (0,5)	24,4 (2,3)	3,48
Neq0902	34,8 (3,7)	38,8 (4)	1,15

SE: erro padrão.

Fonte: autoria própria.

4.3. Discussão

A pesquisa e o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da doença de Chagas ainda são uma missão desafiadora, mesmo após mais de 100 anos da descrição da doença, onde só existem dois fármacos: o Benznidazol e o Nifurtimox (não comercializado em vários países, inclusive o Brasil). Estas substâncias são eficazes no tratamento de pacientes nos estágios iniciais da doença, mas falham drasticamente em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica avançada¹⁰³. As modificações causadas no tecido cardíaco como consequência da permanência parasitária nesse local são os principais responsáveis pelas altas taxas de mortalidade

dos pacientes¹⁰⁴. Partindo-se do pressuposto que um alvo macromolecular no interior do parasito deverá ser modulado por um inibidor, torna-se necessário que estes compostos sejam capazes de atravessar a membrana celular e a membrana celular da amastigota para matar o parasito. Visto que o alvo de estudo pelo grupo a cruzaina é homóloga a catapsina L humana, o ideal é que esse processo seja seletivo para não afetar alguma via de sinalização essencial para a sobrevivência da célula hospedeira. A aprovação de um novo fármaco pode demorar muitos anos, sendo que o foco para a descoberta de um novo tratamento para doenças negligenciadas ou envolvem a aplicação em parcelas mais pobres da sociedade incluem o baixo custo, melhores regimes de administração, a redução da toxicidade do hospedeiro e, consequentemente, na seletividade da substância para o parasito, além de ser capaz de curar os pacientes independentemente do estágio de infecção. A grande complexidade está na interação parasito-hospedeiro e na diversidade genética entre as diversas cepas de *T. cruzi*. Esses fatores corroboram com a falha terapêutica e com a dificuldade do surgimento de novos tratamentos, principalmente relacionados aos ensaios clínicos^{105,106}. Devido a esses aspectos, é necessário e importante investigar uma nova terapia para o mercado farmacêutico, principalmente para as doenças tropicais negligenciadas. O trabalho propôs o estudo com inibidores de cisteína proteases com uma nova abordagem, o emprego de nitrilas como grupos reativos (*warheads*) para formar uma ligação covalente reversível de dipeptidil nitrilas com essa classe de proteases. Este tipo de mecanismo é estudado por outros membros do grupo em ensaios enzimáticos.

As cisteína proteases desempenham numerosos papéis indispensáveis na vida do parasito. São fundamentais para a proliferação, imunoevasão do parasito e invasão de células e tecidos¹⁰⁷. Para *T. cruzi*, a enzima cruzaina é uma peça importante para o desenvolvimento de inibidores potentes com atividade tripanocida. A cruzaina está presente nas diversas etapas do ciclo de vida do parasito e pode estar localizada em diferentes compartimentos dependendo do estágio de vida¹². Na forma epimastigota, essa protease é confinada aos lisossomos e, provavelmente, está relacionada a degradação de proteínas durante o repasto sanguíneo. No estágio tripomastigota sanguíneo, a cruzaina é secretada no momento da invasão da célula hospedeira¹⁰⁸. Na amastigota, fase de interesse para o direcionamento dos compostos, a enzima está localizada em dois compartimentos celulares diferentes. Uma amostra menor é detectada em compartimentos intracelulares semelhantes ao lisossomo, enquanto

que a maior parte está presente na superfície do parasito, diretamente em contato com o citoplasma da célula hospedeira^{12,109}.

A vinil sulfona K777 é o melhor inibidor de cruzaina descrito na literatura. Ela inibe a cisteíno protease em concentrações na ordem de nanomolar e atua via inibição irreversível da enzima. Um estudo piloto em cães tratados com K777 na dose de 50mg/kg, administrada via oral a cada 12 horas, levou a uma melhora significativa da doença cardíaca demonstrado por uma melhora na histopatologia, sem apresentar toxicidade aparente. No entanto, os estudos com K777 para doença de Chagas foi interrompido na fase pré-clínica em 2005 devido à toxicidade hepática apresentada em cães^{11,110}.

No presente trabalho avaliamos o efeito de 55 substâncias planejadas e sintetizadas pelo grupo de química medicinal NEQUIMED sobre as três formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*, visto que a substância de referência é efetiva para todas as formas, e sobre células de mamífero usadas como hospedeiras nos ensaios *in vitro*.

Inicialmente investigamos o efeito dessa série sobre a viabilidade das formas epimastigota (cepa Y) e amastigota intracelular da cepa Tulahuen LacZ, apesar dessa cepa apresentar menor virulência, os ensaios com ela são mais rápido e barato. A citotoxicidade para células de mamífero e o índice de seletividade sobre as formas amastigotas foi estimado.

Os dados obtidos levaram a seleção de três substâncias (Neq0677, Neq0689 e Neq0690) que foram efetivas para inibir a viabilidade na forma epimastigota, mas nenhuma substância da série foi ativa contra a forma amastigota intracelular. Os inibidores Neq0677 e Neq0690 foram os mais potentes contra forma epimastigota, com respectivos valores de IC₅₀ de 10,8 µM e 14,2 µM. Essas substâncias foram duas vezes mais seletivas do que o Benznidazol (IC₅₀ = 22,5 µM) para essa morfologia.

É interessante notar que, ao analisarmos os dados com a célula de mamífero Balb/C, essas substâncias apresentaram citotoxicidade. Já para a linhagem LLCMK₂, estas não foram tóxicas. Este tipo de resultado salienta uma discussão sobre os parâmetros a serem usados nos estudos de linhagens celulares relevantes à análise da citotoxicidade de substâncias bioativas. A linhagem Balb/C 3T3 clone A31 de camundongo é comumente aplicada para analisar a atividade citotóxica, com implicações para o modelo em animal mais usado para os ensaios de antitripanossomatídeos, que é o camundongo. Por outro lado, as células LLCMK₂ de

rim de macaco verde são comumente usadas em modelos *in vitro* para infecção de tripanossomatídeos, uma vez que levam a muitas células infectadas que apresentam um número elevado de amastigotas intracelulares. Obviamente, que ambas linhagens podem e devem ser usadas visando a análise de etapas distintas para o desenvolvimento dos ensaios biológicos. LLCMK₂ deve ser testada para observar o índice de seletividade *in vitro* no modelo em questão, enquanto Balb/C 3T3 é um modelo relevante para as próximas etapas do estudo, que envolvem a análise *in vivo* das substâncias bioativas mais relevantes provenientes dos ensaios *in vitro*.

Visto que as substâncias Neq0677 e Neq0690 foram as mais potentes contra a forma epimastigota e, infelizmente, não tiveram atividade sob a forma amastigota intracelular, avaliamos seu potencial nas formas tripomastigota e amastigota extracelular da cepa Y. Os resultados mostraram que, na forma tripomastigota, Neq0677 e Neq0690 foi obtido valores de IC₅₀ de 2,48 µM e 7,63 µM, respectivamente, sendo mais potentes do que o Benznidazol (IC₅₀ = 13,2 µM).

Houve uma grande diferença para a forma amastigota extracelular da cepa Y, pois Neq0677 foi equipotente ao Benznidazol (IC₅₀ = 2,22 µM e 1,49 µM, respectivamente). No entanto, Neq0690 foi inativo quando considerado o valor de corte de 100 µM, pois apresentou valor de IC₅₀ = 141,6 µM. Isto indica duas situações bem distintas: (i) Neq0677 tem alta potência contra amastigota extracelular, mas não o é para a forma intracelular, o que pode indicar um problema relacionado a permeabilidade celular; (ii) Neq0690 não é ativo para a forma amastigota, o que é completamente distinto do perfil bioativo para Neq0677 e pode atuar via outro mecanismo. Estes pontos estão agora em aberto e poderão ser explorados pelos parasitologistas e pesquisadores de áreas afins.

As diferenças de suscetibilidade a substâncias químicas entre as formas evolutivas de tripanossomatídeos têm sido relatadas na literatura e provavelmente são devidas às características bioquímicas distintas existentes entre essas formas^{111,112}. Por isto, é tão necessário fazer a análise na forma de interesse, uma vez que não há uma correlação entre elas, conforme descrito na literatura.

Wiggers e colaboradores¹¹³, em nosso grupo de pesquisa, concentraram os estudos em identificar novas classes moleculares inibidores de cruzafina com uma abordagem diferente em ligantes não covalentes não peptídicos. Realizaram estudos de triagem virtual do banco de dados ZINC (um banco de dados aberto com compostos comercialmente disponíveis para uma triagem virtual) seguido de ensaios

enzimáticos e *in vitro*. Dos nove inibidores da cruzaina testados, cinco apresentaram atividade tripanocida contra a forma tripomastigota da cepa Tulahuen LacZ. As substâncias codificadas como Neq0176 e Neq0177 foram agentes tripanocidas menos citotóxicos para as células estudadas. As potências em relação a *T. cruzi* diminuíram junto com a diminuição das potências contra a cruzaina. Por outro lado, o composto Neq0042 teve a maior potência dessa série contra a cruzaina, paralelamente à sua maior potência tripanocida, mas com maior citotoxicidade. A sua atividade tripanocida apresentou $EC_{50} = 10,66 \mu M$, dez vezes menor do que a obtida para o Benznidazol, utilizado como controle positivo, com $EC_{50} = 49,9 \mu M$. Apesar da citotoxicidade apresentada, vale ressaltar que o índice de seletividade ($SI = CC_{50}/EC_{50}$) para o Neq0042 e o Benznidazol está dentro dos mesmos valores de amplitude (5 e 8, respectivamente). Esses estudos podem ampliar oportunidades de otimização para novos compostos bioativos.

Alguns estudos realizados com o reposicionamento de fármacos mostraram os efeitos tripanocidas da clofazimina e da benidipina. Estes compostos apresentaram efeitos inibitórios sobre a enzima cruzaina, a principal protease cisteínica de *T. cruzi*. A benidipina é um agente bloqueador dos canais de cálcio e atualmente é utilizada no tratamento da hipertensão e da angina de peito, enquanto a clofazimina é um antibiótico indicado principalmente para o tratamento da hanseníase. Essas substâncias foram selecionadas nos estudos *in silico* pela sua potencial interação com a cruzaina e seus efeitos foram confirmados *in vitro* e *in vivo*. Estudos bioquímicos realizados por Bellera e colaboradores¹¹⁴ mostraram que benidipina e a clofazimina inibiram a atividade da cruzaina em mais de 50% na concentração de 100 μM . Eles ainda testaram o efeito dessas substâncias no crescimento da forma epimastigota, mostrando que os compostos interferiram na proliferação da epimastigota de *T. cruzi* de forma dependente da concentração, com IC_{50} igual a 10,6 μM para clofazimina e 19,5 μM para benidipina. Variando as concentrações entre 2,5 μM e 10 μM , as substâncias inibiram 80% da invasão da tripomastigota na célula hospedeira, além de interferirem na multiplicação das amastigotas, reduzindo em 90% o número de amastigota por célula. É interessante notar que a potência das substâncias para a cruzaina é menor do que nos ensaios celulares, o que indica que estas substâncias podem e devem estar atuando via outro alvo macromolecular.

Sbaraglini e colaboradores¹¹⁵ mostraram os estudos *in vivo* realizados com camundongos C3H/HeN infectados com *T. cruzi* e que foram tratados na fase crônica

da doença. Os grupos foram tratados com Benznidazol (100 mg/kg/dia), benidipina (15mg/kg/dia) e clofazimina (30 mg/kg/dia). Durante o tratamento farmacológico não foram observadas variações significativas em relação ao peso inicial dos animais tratados com benidipina, clofazimina e não tratados. Já os tratados com Benznidazol sofreram redução progressiva de peso, que atingiu 25% sem recuperação de peso. Isso está compatível com os efeitos colaterais relatados em pacientes tratados com esse fármaco. Ambos compostos foram superiores ao Benznidazol na redução dos níveis de parasitos no músculo cardíaco. O tecido esquelético de animais infectados que não foram tratados mostrou infiltrados mononucleares difusos e focais, enquanto os animais tratados com benidipina, clofazimina e Benznidazol mostraram redução (18%, 42% e 38%, respectivamente) no número de infiltrados difusos neste músculo. Em suma, essas substâncias foram capazes de reduzir a carga parasitária no músculo cardíaco e esquelético de camundongos cronicamente infectados em comparação com camundongos não tratados, bem como diminuir o processo inflamatório nesses tecidos. Esses aspectos fazem deles candidatos a fármacos promissores contra a doença.

Burtoloso e colaboradores¹¹⁶, em outro estudo do grupo NEQUIMED, estudaram a atividade tripanocida de inibidores à base de nitrila, baseados em duas estruturas químicas conhecidas por estarem associadas à inibição da catepsina K. Três substâncias apresentaram efeitos anti-tripanosoma sobre a cepa CL Brener de *T. cruzi* (amastigota intracelular), com potência na faixa de 0,1 μ M a 1 μ M e baixos níveis de citotoxicidade ($CC_{50} > 128 \mu$ M).

Apesar da necessidade de estudos futuros para elucidar melhor os efeitos tripanocidas das substâncias estudadas neste trabalho sobre *T. cruzi in vitro*, os resultados do primeiro lote da série apontam os compostos Neq0677 e Neq0690 como agentes promissores contra o parasito.

A terapia combinada tem sido considerada um tratamento promissor para reduzir os efeitos adversos, melhorar a eficácia terapêutica e para minimizar ou retardar o desenvolvimento de resistência ao tratamento. Neste contexto, estudar os efeitos de uma combinação de substâncias, a fim de fornecer evidências benéficas significativas em comparação com cada uma individualmente é de fundamental interesse¹¹⁷. Como exemplo podemos citar o Advair/Seretide, com este medicamento desenvolvido para tratar os componentes inflamatórios e broncoconstritores da asma, administrando uma dose de propionato de fluticasona (ICS) e uma dose do broncodilatador β 2-

adrenérgico de longa duração (LABA), salmeterol. Esse tratamento em combinação (ICS+LABA) proporcionou maior controle da asma do que o aumento da dose de ICS sozinha¹¹⁸.

Aliado a essa ideia da terapia combinada, estudos com um segundo lote de aproximadamente 118 substâncias foram realizados com os compostos isolados e combinados com o Benznidazol. Os efeitos desses inibidores foram determinados na forma amastigota intracelular da cepa Tulahuen LacZ de *T. cruzi*, com a citotoxicidade obtida em paralelo com a célula hospedeira LLCMK₂. Deste estudo, duas combinações foram analisadas, além de um composto isolado. Isto demonstra que este composto isolado (Neq0902) deve apresentar um mecanismo distinto das duas substâncias combinadas (Neq0827 e Neq0831). Além disto, a cepa Y apresentou maior resistência do que a Tulahuen, conforme esperado. As estruturas químicas destes compostos não são mostradas neste trabalho, pois constituem agora de um estudo com propriedade intelectual envolvida.

Martins e colaboradores¹¹⁹ avaliaram a terapia combinada como uma abordagem para a otimização do regime terapêutico atual para a doença de Chagas. A combinação entre Benznidazol e Itraconazol (utilizado como antimicótico) foi estudada. Os efeitos desses fármacos combinados foram explorados em camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* para avaliar a resposta da parasitemia e mortalidade nesses animais. Os animais não tratados apresentaram níveis mais elevados de parasitemia (que atingiram o pico no 8º dia) e a mortalidade ocorreu 15 dias após a infecção. A administração de Benznidazol/Itraconazol na combinação de 75 mg/Kg (dose subótima) eliminou os parasitos do sangue de forma mais eficiente do que cada um deles sozinho, com a taxa de sobrevida de 100% mesmo 30 dias após o tratamento. Houve uma redução significativa do número de dias de tratamento necessários para reduzir a parasitemia, e também foram capazes de diminuir as lesões típicas associadas à fase crônica da doença, ilustrado por níveis de células inflamatórias e fibrose no tecido muscular cardíaco. Estes resultados indicaram claramente os efeitos benéficos destas substâncias em combinação e enfatizaram a importância de explorar o potencial de tratamentos combinados para tratar a doença de Chagas, demonstrando a eficácia e a tolerância do tratamento.

Pelizzaro-Rocha e colaboradores¹²⁰ estudaram um produto natural (partinolídeo) uma lactona sesquiterpênica previamente isolada de *Tanacetum vulgare*, que exibe propriedades anti-inflamatórias e é utilizado clinicamente para o tratamento da

enxaqueca. Investigaram o efeito dessa substância quando combinado *in vitro* com o Benznidazol. O efeito da combinação pode ser demonstrado por um isoblograma, que usa a concentração inibitória fracional (FIC). Quando a soma dessas frações é 1, a combinação é aditiva; quando a soma é < 1 , a combinação é sinérgica; e quando a soma é > 1 , a combinação é antagônica. A combinação dessas substâncias mostrou uma forte atividade sinérgica contra as formas epimastigotas, reduzindo 23 vezes a concentração do Benznidazol necessária para inibir 50% do crescimento celular ($IC_{50} = 1,6$ a $0,07 \mu\text{g/mL}$ e $FIC = 0,35$). Além disso, a combinação apresentou efeito aditivo contra as formas tripomastigotas ($FIC = 1,06$) e um efeito antagônico sobre a citotoxicidade ($FIC = 2,36$). A combinação de partinolídeo com Benznidazol demonstrou que, além de controlar o desenvolvimento da infecção pelo parasita, a terapia combinada é essencial para reduzir o dano nas células hospedeiras.

Ainda neste contexto, estudos anteriores relatam forte atividade tripanocida *in vitro* do composto tetra-hidro-N-butil-1-(4-dimetilamino)fenil-1,2,3,4-tetra-hidro-carbolina-3-carboxamida, denominada C4. Valdez e colaboradores¹²¹ analisaram o efeito dessa substância combinada com o Benznidazol. Os estudos *in vitro* foram realizados com as formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, com posterior estudo *in vivo*. Os resultados com a forma epimastigota mostraram que a associação entre C4 ($10 \mu\text{g/mL}$) e Benznidazol ($5 \mu\text{g/mL}$) teve efeito sinérgico, com $FIC = 0,47$. A atividade contra a forma infecciosa apresentou efetividade quando comparado com a substância isolada, mas não foi considerado sinérgico ($FIC = 0,71$). Nos estudos *in vivo* essa combinação levou a uma redução de 99% no pico parasitêmico, além de reduzir o número de parasitas no curso da infecção. Deve-se destacar também o aumento de sobrevivência dos animais em 100% e no aumento do peso de 11,8%. Houve diminuição do infiltrado inflamatório cardíaco em 80% dos animais tratados com 100 mg/kg do Benznidazol combinado com 5 mg/kg de C4. Foi constatado também uma redução em 60% dos ninhos de amastigotas e uma redução da carga parasitária no tecido cardíaco.

Esses trabalhos corroboram com os resultados observados neste estudo, onde as substâncias Neq0827 e Neq0831, quando combinadas com o Benznidazol, aumentaram a potência em 37 e 24 vezes na forma amastigota de *T. cruzi*. Desta forma, os compostos Neq0827 e Neq0831 combinados com o Benznidazol são promissores candidatos para uma investigação mais aprofundada.

5. Capítulo 2. *Leishmania infantum*

A leishmaniose é uma doença causada por diferentes espécies do protozoário *Leishmania*. A dificuldade do surgimento de novas terapias é devido ao complexo ciclo de vida e as diferentes espécies e cepas existentes, que culmina em manifestações clínicas diversas. Os tratamentos existentes não são eficazes em vários casos e apresentam alta toxicidade, problemas de resistência, longo tempo de tratamento, preços proibitivos e modo de administração inadequado ao local. Devido a esses fatores, os tratamentos disponíveis até o momento estão longe de serem ideais para a cura dessa enfermidade. A busca de novas terapias é de ordem emergencial.

No presente trabalho foi realizada uma triagem com 55 substâncias contra a forma promastigota e amastigota de *Leishmania infantum*. O planejamento dessas moléculas foi baseado com alvo em cisteíno proteases, especificamente a CPB por apresentar homologia com a catepsina L (câncer) e a cruzaina (*T. cruzi*). Para o ensaio com a forma promastigota foi utilizado o método colorimérico MTT. O estudo inicial com a forma amastigota foi realizado na espécie *L. infantum* transfectada com o gene mCherry e analisado por HCS.

5.1. Métodos

5.1.1. Cultura de *Leishmania infantum*

As formas promastigotas de *L. infantum* foram cultivadas em meio Schneider a 25 °C na estufa. O repique foi realizado uma vez por semana. Para uma nova cultura utilizou-se 5 mL de meio e 10 µL da cultura antiga. Esse trabalho foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

5.1.2. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* com a morfologia promastigota

Para analisar a atividade das substâncias frente a *L. infantum* utilizou-se o método colorimétrico. A solução de MTT foi preparada na concentração de 5 mg/mL junto com PMS 0,22 mg/mL em tampão fosfato salino (PBS, Cultilab)⁶⁵. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços de fundo chato e transparente, onde 90 µL de parasitos foram

adicionados na concentração de 1×10^7 parasitos/mL. No primeiro experimento foi realizado um teste das substâncias na concentração única de 100 μ M. Posteriormente, as melhores substâncias foram testadas para a obtenção de curvas concentração-resposta para determinar o valor de IC_{50} e avaliar a potência dessas substâncias.

Após 72 horas de tratamento, as placas foram incubadas com MTT por 4 horas, seguido da adição 100 μ L de agente solubilizante contendo uma solução de 70% de SDS a 10% (Amresco), 0,01 mol/L de HCl (Vetec) e 30 % (v/v) de DMSO. Após 90 minutos de incubação foi realizada a leitura no espectrofotômetro BioTek Synergy HT em 570 nm. A análise dos dados foi feita no programa GraphPad Prism v. 5 e Excel™.

5.1.3. Avaliação da atividade leishmanica *in vitro* com a morfologia amastigota intracelular

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, com as células hospedeiras da linhagem J774 plaqueadas na concentração de 1×10^5 céls/mL. As formas promastigotas de *Leishmania infantum* (M. cherry) foram adicionadas na concentração de 1×10^6 parasitos/mL e incubadas *overnight* na estufa a 37°C, com atmosfera a 5% de CO₂. Após esse período, as formas promastigotas metacíclicas presentes no sobrenadante foram retiradas com sucessivas lavagens com PBS, permanecendo apenas as formas amastigotas intracelulares. As substâncias bioativas foram adicionadas em concentração única de 10 μ M e incubadas por 48 horas. Ao final deste período as placas foram lavadas sucessivamente com PBS, fixadas com 4% de formaldeído, coradas com DAPI e analisadas no equipamento de HCS da Molecular Discovery. A análise dos dados foi realizada com o programa estatístico GraphPad Prism v.5.

5.2. Resultados

5.2.1. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* com a morfologia promastigota

O ensaio de novas substâncias é comumente realizado com a forma promastigota, morfologia muito importante para a infecção humana. Para isso, os 55 compostos

foram incubados por três dias com a *Leishmania infantum* em concentração única de 100 μ M. O método colorimétrico (MTT) foi usado para avaliar a viabilidade e assim quantificar a citotoxicidade dessas substâncias contra o parasito (Figura 17).

Figura 17. Triagem de substâncias contra a forma promastigota de *L. infantum*

Fonte: autoria própria.

Nove substâncias (Neq0630, Neq0643, Neq0677, Neq0681, Neq0689, Neq0690, Neq0712, Neq0715, Neq0716 e Neq0776) foram capazes de inibir 50% da viabilidade dos parasitos, sendo que a melhor substância foi o NEQ0681, que inibiu 80%. O composto de referência Anfotericina B inibiu mais de 90% da viabilidade. Este estudo inicial demonstrou que várias substâncias bioativas tinham atividade antileishmióticas ao menos para a forma infectiva (promastigota), o que é algo relevante, especialmente considerando que a identificação de substâncias antileishmaniose é mais difícil do que para *T. cruzi*.

5.2.2. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* com a morfologia amastigota intracelular

Para realizar o teste com as substâncias selecionadas para este trabalho contra a *Leishmania infantum*, utilizamos a linhagem de macrófago J774 como célula hospedeira. As promastigotas de *Leishmania infantum* foram incubadas *overnight* para infectar os macrófagos. Após esse período as substâncias foram adicionadas e incubadas por 48 horas. Ao final desse processo as amostras foram fixadas, coradas com DAPI e analisadas no equipamento de HCS.

Na Figura 18 estão representadas as substâncias que tiveram atividade contra a *Leishmania infantum* na forma amastigota intracelular. Desses dados, doze substâncias (Neq0587, Neq0631, Neq0643, Neq0664, Neq0665, Neq0666, Neq0669, Neq0681, Neq0708, Neq0782, Neq0783 e Neq0785) inibiram em torno de 50% a viabilidade do parasito. As substâncias Neq0630, Neq0636 e Neq0781 não foram seletivas para o parasito, sendo citotóxicas para a célula hospedeira.

Figura 18. Triagem de substâncias contra a forma amastigota intracelular de *Leishmania infantum*

Fonte: autoria própria.

5.3. Discussão

Alguns aspectos subjacentes da biologia dos parasitos do gênero *Leishmania* tornam o desenvolvimento de novos tratamentos bem difícil. Independente da manifestação clínica, os fatores que dificultam o surgimento de novos fármacos incluem: I) a localização intracelular da forma do patógeno, a amastigota, no

fagolisossomo de pH baixo em diferentes populações de macrófagos, II) a diversidade genética derivada de variáveis espécies, compostas por suas interrelações com a resposta imune do hospedeiro, que em algumas circunstâncias tornam os candidatos a fármacos ineficazes¹²².

Não há vacina disponível contra leishmaniose e os tratamentos atualmente disponíveis estão longe de serem ideais. O surgimento de resistência aos medicamentos atualmente disponíveis, a eficácia variável devido à variedade de espécies, a toxicidade, os preços inacessíveis, a necessidade de administração parenteral e de longos períodos de tratamento representam os principais problemas das atuais substâncias leishmanicidas disponíveis no mercado farmacêutico mundial. Estes pontos ressaltam a urgente necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos, as quais afetam principalmente pessoas que vivem em países em desenvolvimento¹²³. Analisando todos esses fatores, é de suma importância continuar a busca por novos tratamentos contra a leishmaniose, considerando principalmente a eficácia terapêutica e a baixa toxicidade. Para essa abordagem foi proposto neste trabalho o estudo com substâncias sintéticas derivadas de dipeptidil nitrilas com alvo em cisteíno proteases, especificamente na CPB, com interação reversível com essa enzima.

Avaliamos o efeito de 55 substâncias planejadas e sintetizadas pelo NEQUIMED sobre as duas formas evolutivas da *Leishmania infantum*: promastigota e amastigota intracelular. Os resultados mostram que a forma amastigota foi mais suscetível a essas substâncias do que a forma promastigota. Nasereddin¹²⁴ e Coombs¹²⁵ relatam que, apesar da ocorrência do gene da CPB em diferentes espécies de *Leishmania*, sua expressão ou atividade pode ser menor em promastigota quando comparada com a amastigota, o que pode estar associado a maior sensibilidade desta última forma.

A capacidade de triagem de compostos com alto rendimento é essencial no processo de descoberta de medicamentos de pequenas moléculas. Muylder e colaboradores¹²⁶ comparam a eficiência de métodos de triagem, sendo que um era direcionado para o estágio extracelular facilmente cultivado de (promastigota), enquanto que o outro era clinicamente relevante, porém mais difícil de ser trabalhado (a amastigota intracelular). Uma triagem com 909 compostos (Iconix Biosciences) testados contra *L. donovani* revelou 59 substâncias interessantes para a forma promastigota e 27 para a forma amastigota, com 26 coincidentes em ambos. Isso mostra que o rastreamento contra o estágio promastigota, embora mais fácil, não

identifica todos os compostos ativos. Visto que a busca por novos tratamentos para leishmaniose é de caráter emergencial, o trabalho ressalta a importância de utilizar métodos com alto rendimento para uma rápida avaliação de uma biblioteca maior de substâncias. Há também a necessidade de realizar a investigação nas diversas formas evolutivas da *Leishmania* para um estudo comparativo, com vista a elucidação do mecanismo de ação das substâncias.

O estudo com dipeptidil nitrilas já é relatado na literatura. Quilles, Tezuka e colaboradores¹²⁷ (em nosso grupo de pesquisa) estudaram o efeito de 18 derivados de dipeptidil nitrila de interação covalente reversível na atividade citostática de *Leishmania* spp. Os inibidores não foram citotóxicos para a forma promastigota. Foi observado que esses inibidores foram eficazes em inibir o crescimento celular após 48 horas da retirada dos compostos, com inibição da atividade proteolítica em 30% para a *Leishmania infantum* intacta. Os compostos foram efetivos para inibir a atividade proteolítica do extrato enzimático obtido da lise de *Leishmania*, com promoção da retenção do ciclo celular na fase G1 em que a síntese proteica é crítica. Além disto, nenhuma das substâncias foi tóxica em linhagem de células de mamífero. Este estudo apontou que os inibidores de dipeptidil nitrila podem não apresentar atividade citotóxica para o parasito, porém investigações mais aprofundadas demonstraram a atividade citostática, o que é muito importante para a retenção da doença e aplicação de estudos de terapia combinada. Este trabalho foi recentemente publicado e a primeira página consta como anexo nesta tese.

Diversos estudos mostram atividade leishmanicida usando as formas promastigota e amastigota. Bruno e colaboradores¹²⁸ estudaram um substância natural, o pentadecano, que é um composto orgânico composto por átomos de carbono e hidrogênio presente em volátil floral encontrado em muitas plantas e óleos essenciais; e também em extratos brutos de algumas plantas que têm atividade antimicrobiana. Os autores observaram, através de estudos *in vitro*, os efeitos do pentadecano em parasitos de *Leishmania infantum* e foi constatado que a substância era citotóxica, com $EC_{50} = 65,3 \mu M$ para as promastigotas e $IC_{50} = 60,5 \mu M$ para as amastigotas extracelulares. Em amastigotas intracelulares, a concentração necessária para inibir 50% da sobrevivência celular foi de $195 \mu M$ com inibição do crescimento de 77% a $300 \mu M$ (o que é considerada uma elevada concentração). Uma rápida análise do ciclo celular sugeriu que as células estavam retidas nas fases sub-G0/G1 do ciclo celular, sem outras informações sobre o possível mecanismo de ação.

A partir destes estudos, pode-se notar que algumas substâncias apresentam relevância para serem exploradas com determinação da concentração-resposta. No entanto, é especialmente importante considerar a otimização da potência das novas substâncias bioativas, devido à baixa potência que estas apresentam nas triagens *in vitro* iniciais. Os estudos nesta direção estão atualmente em desenvolvimento e serão descritos em breve. Por isto, as estruturas químicas das substâncias não foram apresentadas.

6. Capítulo 3. Câncer de próstata

Observando o cenário mundial, o câncer de próstata apresenta a segunda maior incidência entre os homens, perdendo apenas para o câncer de pele não melanoma, com 90% das causas de morte relacionadas com a formação de metástase.

Existem vários fármacos aprovados para o câncer de próstata. No entanto em sua maioria estes são aplicados para as fases iniciais da doença, que são dependentes do hormônio andrógeno. Desta forma, é de extrema importância a busca por novas substâncias para o tratamento do câncer metastático.

Os estudos deste projeto foram realizados com duas linhagens metastáticas do câncer de próstata altamente invasivas provenientes de metástase: DU 145 e PC-3. No primeiro passo, o potencial antineoplásico destas substâncias foi avaliado usando 55 substâncias nas linhagens tumorais, além da análise de citotoxicidade com uma linhagem não tumoral por meio do método colorimétrico MTT.

Além da atividade antitumoral citotóxica, ensaios citostáticos realizados através da contagem celular por microscopia com essas moléculas mostraram um retardamento na sua replicação, atuando como agentes citostáticos.

Visto que a metástase é a maior causa de morte nas pessoas afetadas por essa enfermidade, estudos de migração celular (*Wound Healing*) e formação de colônias mimetizam esse processo *in vitro*. As substâncias mais promissoras foram usadas para avaliar o fenótipo celular nestas técnicas e mostraram ser eficazes em reduzir o processo migratório. Além disto, houve a redução do número de colônias.

6.1. Métodos

6.1.1. Culturas das células

Durante o desenvolvimento deste estudo foram utilizadas duas linhagens de câncer de próstata (DU 145 e PC-3, esta considerada a mais agressiva) além de uma linhagem de fibroblasto (Blab/C 3T3 clone A31). As linhagens DU 145 e Balb/C 3T3 clone A31 foram cultivadas em meio DMEM e a PC-3 em F12-K, todos suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS) e penicilina/estreptomicina (1% v/v). Ambas linhagens de células cancerosas foram mantidas na estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

As linhagens de células estudadas neste trabalho foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

6.1.2. Viabilidade das células de mamífero

Para realizar a triagem com as substâncias do grupo estudadas neste projeto foi utilizado o método colorimétrico, que é comumente utilizado para verificar a viabilidade das células. O método consiste basicamente em um sal de tetrazol, MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), que é convertido a cristais de formazan pelas células viáveis¹²⁹. Para as células de mamífero, em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de 5×10^4 céls/mL. Após a aderência das células na placa (24 horas) adiciona-se 100 µL de composto solubilizado em meio com 0,5% (v/v) de DMSO. Foram utilizadas a concentração de 100 µM para a triagem e nas variações de 500 a 1,95 µM nas curvas concentração-resposta. As células ficaram incubadas por 72 horas com as substâncias. O meio foi então removido, e adicionado 100 µL de solução de MTT (5 mg/mL) com incubação por três horas. O meio foi então novamente removido e houve a adição de 100 µL de DMSO, sendo posteriormente incubado por uma hora, com a realização da leitura da absorbância em 570 nm no equipamento Biotek Synergy HT. Os resultados foram avaliados posteriormente no programa GraphPad Prism v. 5.

6.1.3. Ensaio citostático

O ensaio citostático¹³⁰ foi realizado para analisar se a substância de interesse, além de ser citotóxica, altera a replicação das linhagens cancerosas DU-145 e PC-3. Para esse estudo 100 µL com as células na concentração de 1×10^4 céls/mL foram pipetados em placas de 96 poços. As placas foram incubadas por 24 horas para aderência, com remoção do meio para a posterior adição das substâncias. Para a linhagem DU 145 foram utilizadas as concentrações de 1 e 2 µM e para a PC-3 as concentrações analisadas foram 500 e 100 nM, para ambas substâncias testadas (Neq0677 e Neq0681). A contagem celular foi realizada a cada 24 horas em microscópio ótico usando a câmara de Neubauer.

6.1.4. Migração *Wound Healing*

A linhagem de câncer de próstata DU 145 foi distribuída em placas de 24 poços (3×10^5 céls/mL) mantidas na estufa com 5% de CO₂ até obter 100% de confluência¹³¹. Com o auxílio de uma ponteira de micropipeta foram realizados riscos nas placas, com 3 lavagens usando o meio de cultura para a remoção das células que se soltaram. O Neq0677 foi testado na faixa de concentração de 30-15 µM e o Neq0681 na faixa de 20-35 µM. As substâncias de interesse foram adicionadas e as imagens dos riscos foram obtidas em no tempo 0, 24 e 48 horas. Com o auxílio do software Image J foi possível medir a área do risco nos diferentes tratamentos e tempos e sua porcentagem foi calculada com a seguinte fórmula¹³²:

$$\% \text{ fechamento da risca} = \frac{(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h})}{A_{t=0h}} \times 100$$

Onde $A_{t=0h}$ é a área no tempo inicial e $A_{t=\Delta h}$ é a área após o intervalo de tempo de incubação.

6.1.5. Migração *transwell*

Para o ensaio de migração *transwell* insertos¹³³ com poro de 8 µm (em placas de 24 poços) foram utilizados para verificar a capacidade migratória das células na presença das substâncias estudadas neste trabalho. As diferentes linhagens de câncer de próstata (DU 145 e PC-3) foram plaqueadas na concentração de 5×10^4 céls/poço na parte superior dos insertos as quais foram atraídas pela presença do quimioatraente presente na parte inferior do inserto (FBS). As placas foram incubadas por 24 horas (37°C, 5% CO₂). As células invasoras foram fixadas em metanol (100%) e em seguida coradas com azul de toluidina (1%) diluído em borato de sódio (1%). Foram escolhidos e fotografados 10 campos aleatórios em cada inserto e a análise foi realizada pela contagem das células dos diferentes campos de cada tratamento.

6.1.6. Clonogênico

Para avaliar com mais detalhes o potencial efeito antimetastático causado pelas substâncias, foi realizado o ensaio clonogênico¹³⁴. Para isso, células em baixo número (300 células por poço) das linhagens DU 145 e PC-3 foram adicionadas em placas de 6 poços e incubadas 24 horas para aderência. Após esse período foi adicionado 1,0 mL das substâncias diluídas em meio com incubação por 72 horas. Para a linhagem DU 145 as concentrações das substâncias analisadas variaram de 10-15 μ M, para a linhagem PC-3 as concentrações variaram de 1-6 μ M. O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 5 mL de meio, seguido da incubação por 7 dias, com troca de meio a cada 2 dias. Ao final, as colônias foram fixadas com uma solução de formaldeído a 4% e coradas com 10% de Giemsa. Os dados estatísticos foram obtidos pelo programa Graph Pad Prism v.5.

6.2. Resultados

6.2.1. Avaliação da atividade antineoplásica com as linhagens DU 145 e PC-3 e citotoxicidade com a Balb/C 3T3 clone A31

O ensaio com as 55 substâncias foi um processo importante para observar a ação de cada composto químico nas diversas linhagens com o princípio de distinguir os mais seletivos dentro de uma grande série de substâncias e, com eles, realizar um estudo mais aprofundado. Foram selecionadas as substâncias que apresentaram maior porcentagem de morte celular das linhagens tumorais em comparação com a linhagem controle de fibroblasto conforme mostrado nas Figuras 19, 21 e 23. A Rapamicina foi utilizada como composto de referência.

Figura 19. Triagem de substâncias contra a linhagem de câncer de próstata DU-145

As barras representam a média e o desvio padrão de dois experimentos em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância ANOVA seguido do teste de Bonferroni. A análise comparativa foi realizada entre as médias das substâncias e a Rapamicina, onde os compostos com asterisco (*) possuem $p < 0,0001$. O controle negativo é composto por células vivas e sem tratamento contendo somente 0,5% (v/v) de DMSO.

Fonte: autoria própria.

O ensaio inicial foi realizado em concentração única para todas as substâncias no valor de 100 µM, após 72 horas de incubação. A sobrevivência das células foi verificada pelo método colorimétrico MTT e a leitura foi realizada em um espectrofotômetro a 570 nm segundo o protocolo citado. A Rapamicina foi utilizada como controle positivo. A maioria das substâncias testadas contra a DU-145 não apresentou atividade antineoplásica. Os novos inibidores que obtiveram melhor resultado levaram a morte das células dessa linhagem em mais de 90% foram Neq0677, 0681, 0689 e 0690 (Figura 17). Alguns inibidores tiveram uma menor eficácia comparado aos citados acima como Neq0636 e Neq0669, que mataram em torno de 80 % das células. Essas substâncias foram melhores do que o composto de referência Rapamicina, que apresentou 40% de células viáveis em 100 µM.

As curvas concentração-resposta para as melhores substâncias selecionadas na linhagem tumoral DU-145 estão representadas na Figura 20, bem como na Tabela 7 estão os valores de IC_{50} e os parâmetros estatísticos (r^2 e $Sy.x$).

As concentrações para cada substância foram escolhidas de acordo com o perfil do composto podendo variar de 0,562 a 500 μM . Por exemplo, as substâncias Neq0677, 0689 e 0690 possuem o mesmo perfil e variaram suas concentrações entre 0,562 e 21,5 μM ; para Neq0636 de 10 a 500 μM , o Neq0669 e a Rapamicina de 1,95 a 500 μM ; Neq0681 de 1 a 100 μM . Estas concentrações não foram escolhidas aleatoriamente, pois foram necessários vários ensaios até a obtenção dos gráficos finais nesse trabalho. O valor de IC_{50} da Rapamicina para essa linhagem foi de 12,4 μM , similar aos compostos Neq0677, 0681 e 0689. Neq0636 foi menos potente dentre todos, com $IC_{50} = 125 \mu M$, enquanto Neq0690 foi o mais potente ($IC_{50} = 6,93 \mu M$). Os parâmetros estatísticos (r^2 e $Sy.x$) foram semelhantes para todas as substâncias.

Figura 20. Curvas concentração-resposta com as melhores substâncias obtidas com o resultado da triagem contra a linhagem de câncer de próstata DU 145.

Fonte: autoria própria.

Tabela 7. Dados das curvas concentração-resposta com a potência (IC_{50}) e os parâmetros estatísticos (r^2 e $Sy.x$) para as melhores substâncias selecionadas na triagem da linhagem DU-145.

Substância	IC_{50} (SE) μM	r^2	$Sy.x$
Rapamicina	12,4 (0,28)	0,988	3,43
Neq0636	125 (10,4)	0,937	6,56
Neq0669	25,8 (1,64)	0,988	3,37
Neq0677	12,6 (1,33)	0,976	5,26
Neq0681	14,4 (0,32)	0,990	3,15
Neq0689	11,3 (0,59)	0,974	5,46
Neq0690	6,93 (0,2)	0,987	4,55

SE: erro padrão.

Fonte: autoria própria.

A mesma série de substâncias foi analisada na linhagem tumoral PC-3. Os compostos ficaram em contato com as células por 72 horas e a sobrevivência foi obtida com o método colorimétrico MTT. A absorbância foi quantificada em espectrofotômetro em 570 nm segundo o protocolo citado acima.

Esse primeiro ensaio foi realizado em concentração única a 100 μ M. A Rapamicina foi utilizada como controle positivo. As seis substâncias que foram as melhores inibidoras com viabilidade abaixo de 20% foram Neq0636, 0669, 0677, 0681, 0689 e 0690. Nove substâncias inibiram a viabilidade em torno de 50% (Neq0630, 0633, 0658, 0707, 0715, 0716, 0770, 0776, 0782). Todas essas substâncias apresentaram maior percentagem de inibição do que o composto de referência Rapamicina (Figura 21).

Figura 21. Triagem de substâncias contra a linhagem de câncer de próstata PC-3.

As barras representam a média e o desvio padrão de dois experimentos em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância ANOVA seguido do teste de Bonferroni. A análise comparativa foi realizada entre as médias das substâncias e a Rapamicina, onde os compostos com asterisco (*) possuem $p < 0,0001$. O controle negativo é composto por células vivas e sem tratamento contendo somente 0,5% (v/v) de DMSO.

Fonte: autoria própria.

Para a linhagem tumoral PC-3, as curvas concentração-resposta para as melhores substâncias obtidas com o resultado da triagem de substâncias estão representadas

na Figura 22, bem como na Tabela 8 estão os valores de IC_{50} e os parâmetros estatísticos (r^2 e $Sy.x$).

A faixa de concentração estudada para cada substância foi selecionada de acordo com o perfil do composto podendo variar de 0,562 μM a 500 μM , de acordo com a mesma estratégia estabelecida anteriormente. O valor de IC_{50} da substância de referência Rapamicina para essa linhagem foi de 37,5 μM , sendo que Neq0681, 0677, 689 e 690 foram mais potentes (IC_{50} igual a 2,62, 5,48, 5,66, e 5,9 μM , respectivamente). Dois outros compostos (Neq0636 e Neq0669) foram menos potentes (71,2 μM e 145 μM , respectivamente). Os parâmetros estatísticos (r^2 e $Sy.x$) foram semelhantes para todas as substâncias.

Figura 22. Curvas concentração-resposta com as melhores substâncias obtidas com o resultado da triagem contra a linhagem de câncer de próstata PC-3.

Fonte: autoria própria.

Tabela 8. Dados das curvas concentração-resposta com os valores de potência (IC_{50}) e os parâmetros estatísticos (r^2 e $S_{y.x}$) para as melhores substâncias selecionadas na triagem da linhagem PC-3.

Substância	IC_{50} (SE) μM	r^2	$S_{y.x}$
Rapamicina	37,5 (2,59)	0,938	5,86
NEQ0636	71,2 (2,67)	0,971	5,1
NEQ0669	145 (4)	0,991	2,88
NEQ0677	5,48 (0,17)	0,988	4,26
NEQ0681	~2,6	0,981	4,64
NEQ0689	5,66 (0,22)	0,982	5,23
NEQ0690	5,90 (0,21)	0,986	4,57

SE: erro padrão.

Fonte: autoria própria.

A linhagem Balb/C 3T3 clone A31 foi importante para avaliar a citotoxicidade e, com isso, a seletividade das substâncias estudadas neste trabalho. A série de 55 substância também foi analisada nesta linhagem através do método colorimétrico MTT, incubadas por 72 horas com as substâncias de interesse de acordo com o protocolo. Nesse primeiro estudo, todas as substâncias foram testadas em

concentração de 100 μ M, inclusive a substância de referência a Rapamicina. De acordo com esse primeiro dado, cinco compostos foram os mais citotóxicos (Neq0669, 677, 681, 689 e 690), pois levaram a morte das células não tumorais em torno de 90%. Seis substâncias reduziram a viabilidade dessas células em 70% (Neq0587, 630, 636, 678, 680 e 715), e três substâncias levaram a morte de 50% dessas células (Neq0716, 0719 e 0783), dados observados na Figura 23. Das 55 substâncias testadas, quatorze foram citotóxicas, inibindo no mínimo 50% da viabilidade dessa linhagem.

Para certificar o quão citotóxico era a substância e poder comparar sua seletividade com as outras linhagens foi necessária uma segunda análise. Para a linhagem não tumoral Balb/C as curvas concentração-resposta foram obtidas para as seis substâncias mais citotóxicas e os dados de IC₅₀ e os parâmetros estatísticos (r^2 e Sy.x) estão representados na Figura 24 e na Tabela 9.

Figura 23. Triagem de substâncias para avaliar a citotoxicidade utilizando a linhagem Balb/C 3T3 clone A31.

As barras representam a média e o desvio padrão de dois experimentos em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância ANOVA seguido do teste de Bonferroni, a análise comparativa foi realizada entre as médias das substâncias e a Rapamicina, onde os asteriscos definem os limites de confiança: * ($p < 0,0001$) ** ($p < 0,01$). O controle é composto por células vivas e sem tratamento contendo apenas 0,5% (v/v) de DMSO.

Fonte: autoria própria.

Da mesma forma que foi realizado com as outras linhagens, as concentrações variam de 500 μM a 0,562 μM . Três substâncias apresentaram baixa citotoxicidade, com valores de IC_{50} iguais a 86,5, 235 e 91,8 μM (Neq0636, 0669 e 0681, respectivamente). O composto Neq0677 apresentou potência próxima a Rapamicina (19,5 e 26,7 μM , respectivamente). As substâncias mais tóxicas foram Neq0689 e 0690, com IC_{50} na ordem de baixo micromolar (10,9 e 5,05 μM).

Figura 24. Curvas concentração-resposta para as substâncias mais citotóxicas de acordo com o resultado da triagem contra a linhagem não tumoral Balb/C 3T3 clone A31.

Fonte: autoria própria.

Tabela 9. Dados das curvas concentração-resposta com os valores de potência (IC_{50}) e os parâmetros estatísticos (r^2 e $Sy.x$) para as substâncias selecionadas na triagem da linhagem BalbC/3T3 clone A31.

Substância	IC_{50} (SE) μM	r^2	$Sy.x$
Rapamicina	26,7 (2,75)	0,925	8,96
Neq0636	86,5 (1,29)	0,956	4,96
Neq0669	235 (14)	0,931	6,57
Neq0677	19,5 (1,12)	0,974	6,26
Neq0681	91,8 (0,9)	0,900	12,4
Neq0689	10,9 (0,17)	0,955	5,87
Neq0690	5,05 (1,38)	0,989	3,4

SE: erro padrão.

Fonte: autoria própria.

O índice de seletividade (SI) é expresso pela razão entre os valores de IC_{50} da linhagem não tumoral pela linhagem tumoral. Quanto maior for o valor desse índice, melhor é a seletividade da substância pela linhagem de interesse. A Tabela 10 resume todos os dados apresentados acima. As substâncias mais seletivas para DU 145 foram Neq0669 e Neq0681 (SI = 9,09 e 6,37, respectivamente). Analisando a composição dos dados para DU 145, a Rapamicina é duas vezes mais potente do que

Neq0669, enquanto Neq0677 e Neq0681 são equipotentes a molécula de referência. Desta forma, destas duas últimas moléculas foram usadas para os ensaios complementares.

Tabela 10. Valores de IC₅₀ das seis melhores substâncias com as três linhagens e o índice de seletividade (SI) para DU 145 e PC-3.

Substância	IC ₅₀ DU 145 (μM)	IC ₅₀ PC-3 (μM)	IC ₅₀ Balb/C 3T3 (μM)	SI (DU 145)	SI (PC-3)
Rapamicina	12,4	37,5	26,7	2,15	0,71
Neq0636	125	71,2	86,5	0,69	1,21
Neq0669	25,8	145	235	9,09	1,62
Neq0677	12,8	5,48	19,5	1,52	3,55
Neq0681	14,4	2,62	91,8	6,37	35
Neq0689	11,3	5,66	10,9	0,97	1,93
Neq0690	6,93	5,9	5,05	0,73	0,86

SI = IC₅₀ Balb/C/IC₅₀ DU 145 ou PC-3.

Fonte: autoria própria.

Para a linhagem tumoral PC-3 as substâncias mais seletivas e potentes foram Neq0677 e Neq0681 (SI = 3,55 e 35 respectivamente), sendo que estas também foram selecionadas para estudos posteriores com a DU 145. Estas foram seguidas de Neq0689, que teve SI = 1,93.

Neq0636 e Neq0669 apresentaram seletividade para a linhagem PC-3 em relação a Balb/C, mas tiveram baixa potência. Neq0690 não apresentou seletividade, ou seja, ela foi citotóxica para todas as linhagens testadas.

A série analisada (Figura 25) apresentou uma diversidade química maior do que usualmente observado nos estudos de relação estrutura-atividade (SAR). Isto se deve à condição única estabelecida ao início deste estudo proveniente da análise da diversidade química proveniente de compostos que haviam demonstrado atividade biológica frente a *T. cruzi* em ensaios *in vitro*, sendo utilizados para avaliar a potência nos ensaios contra as células cancerosas.

Os compostos Neq0636 e 0669 foram usados para avaliar a presença de substituintes no anel aromático e a mudança da estereoquímica na porção da trifluorometila (Figura 23). O composto Neq0681 é o K777, um conhecido inibidor

irreversível de cruzafina, que também tem atividade anti-catepsina L, conforme estudos descritos na literatura e confirmados no grupo. Finalmente, Neq0677, 0689 e 0690 são azanitrilas que haviam sido citotóxicas para todas as linhagens testadas no ensaio contra o parasito.

Neq0636 e Neq0669 mostraram um perfil de atividade completamente distinto para DU 145 e PC-3, pois a primeira foi seletiva e com baixa potência para PC-3, mas a segunda apresentou maior potência e seletividade para DU 145 (Tabela 10). Desta forma, este estudo abriu caminho para que uma série de compostos baseados na estrutura e estereoquímica de Neq0636 seja testada nestas linhagens, especialmente visando a análise nas células DU 145.

Neq0681 (K777) foi um inibidor potente e seletivo para as células PC-3. A atividade antineoplásica deste composto tem sido demonstrada em ensaios enzimáticos contra catepsinas L e B, além de ensaios celulares¹³⁵, sendo aqui observada a atividade antineoplásica com elevada seletividade para PC-3 e, em menor extensão, para DU145.

Conforme visto, algumas azanitrilas apresentam seletividade para as linhagens cancerígenas em determinados casos. Neq0677 foi a que apresentou o melhor potencial, Neq0689 foi interessante para PC-3, enquanto a substância Neq0690 não foi seletiva. Isto mostra que a alteração de fenilalanina para leucina deve ser evitada para as azanitrilas nestas linhagens de células.

Figura 25. Estruturas químicas dos compostos testados nas linhagens de câncer com os códigos NEQUIMED.

Neq0677

Neq0681

Neq0689

Neq0690

Fonte: autoria própria.

6.2.2. Ensaio citostático

O interesse principal consiste na busca por substâncias que levam a morte as células tumorais, porém um conceito bem fundamentado que foi abordado neste trabalho envolve a identificação de compostos com atividade citostática. Nesse intuito, os compostos Neq0677 e Neq0681 foram testados na linhagem PC-3 nas concentrações de 100 e 500 nM. Uma concentração baixa de células foi plaqueada, adicionado os compostos em suas respectivas concentrações, com contagem diária das células até formar um platô na curva de crescimento, indicando que as células entraram na fase estacionária (Figura 26). Com esse dado foi possível afirmar que as substâncias retardaram o crescimento dessas células em dois dias, ou seja, no dia 6 as células sem tratamento atingiram o máximo de crescimento, enquanto as células tratadas atingiram esse patamar no dia 8, dois dias depois do controle.

Figura 26. Efeito citostático das substâncias Neq0677 e Neq0681 na linhagem PC-3

No eixo X representado os dias e no eixo Y o número de células. As substâncias foram testadas nas concentrações de 100 e 500 nM.

Fonte: autoria própria.

Com a linhagem DU 145 as substâncias testadas foram as mesmas, nas concentrações de 2 μ M e 1 μ M. As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 céls/mL, e foram contadas a cada 24 h (Figura 27). De acordo com os dados obtidos, as células sem tratamento novamente atingiram seu crescimento máximo em seis dias, enquanto os poços tratados atrasaram dois dias para atingir o crescimento máximo. Além dessas alterações, para o Neq0681 em ambas as concentrações as células atingiram o máximo de crescimento em 2×10^5 céls/mL, o que difere das células controle que o pico máximo de células é em torno de $3,3 \times 10^5$ céls/mL.

Figura 27. Efeito citostático das substâncias Neq0677 e Neq0681 na linhagem DU-145.

No eixo X representado os dias e no eixo Y o número de células. As substâncias foram testadas nas concentrações de 1 e 2 μ M.

Fonte: autoria própria.

6.2.3. Migração por fechamento de risca (*Wound Healing*)

Sabendo-se as concentrações e os tempos de incubação que levam a atividade citotóxica dos compostos Neq0677 e Neq0681 por meio da triagem e das curvas concentração-resposta, foram selecionadas concentrações que não causaram a morte celular para verificar se os mesmos seriam capazes de inibir a migração celular. A concentração de células para realizar esse ensaio foi de 3×10^5 por poço, com uso de quatro concentrações das substâncias Neq0677 (15, 20, 25, e 30 μM) e Neq0681 (20, 25, 30 e 35 μM). O composto Neq0677 apresentou atividade inibitória de 20% na migração após 24 h de incubação, aumentando para 40% após 48 h (Figura 28 A e B). No caso do composto Neq0681 a migração foi inibida em 20% após 24 h, com posterior aumento para 50% após 48 h (Figura 28 C e D). Os inibidores agiram de forma dependente da concentração, com efeito diretamente relacionado à concentração usada no ensaio. Ensaios com a PC-3 não foram possíveis de realizar.

Figura 28. Ensaio de migração celular na linhagem DU 145 com os compostos Neq0677 (A-gráfico e B-imagens do fechamento da risca) e Neq0681 (C-gráfico e D-imagens do fechamento da risca).

A)

Os dados representados nesse gráfico foram obtidos com as análises realizadas através das imagens representados em B. A substância Neq0677 foi testada numa faixa de concentração que variou de 15 a 30 μM , acompanhadas por 24 e 48 horas, com a linhagem DU-145, até o completo fechamento da risca pela amostra controle.

Fonte: autoria própria.

B)

As imagens foram obtidas no tempo zero, logo após realizado o risco, e também em 24 e 48 horas para acompanhar o fechamento completo do risco na amostra controle.

Fonte: autoria própria.

C)

Os dados representados nesse gráfico foram obtidos com as análises realizadas através das imagens representados em D. A substância Neq0681 foi testada numa faixa de concentração que variou de 20 a 35 μM , acompanhadas por 24 e 48 horas, com a linhagem DU-145, até o completo fechamento da risca pela amostra controle.

Fonte: autoria própria.

D)

As imagens foram obtidas no tempo zero, logo após realizado o risco, e também em 24 e 48 horas para acompanhar o fechamento completo do risco na amostra controle.

Fonte: autoria própria.

6.2.4. Migração *transwell*

O ensaio foi realizado com a substância Neq0681 para ambas as linhagens tumorais. Com a linhagem DU 145 foi realizado a análise utilizando duas concentrações 10 μ M e 1 μ M, para a PC-3 as concentrações foram de 500 nM e 100 nM e a concentração de células foi de 5×10^4 células por poço. De acordo com o resultado obtido com a linhagem DU 145 (Figura 29), a concentração de 10 μ M inibiu 65% da migração das células e 1 μ M inibiu 30%. Com a PC-3, a concentração de 500 nM inibiu 60% da migração e com 100 nM a inibição foi em torno de 40%. A taxa da inibição da migração foi concentração-depende para ambas as linhagens.

Figura 29. Ensaio de migração *transwell* com a linhagem DU 145 e PC-3 com a substância Neq0681

Fonte: autoria própria.

6.2.5. Ensaio clonogênico

Dois compostos, previamente selecionados contra as linhagens tumorais de câncer de próstata DU-145 e PC-3, foram testados quanto à capacidade antineoplásica utilizando o ensaio clonogênico. As células foram plaqueadas em baixa densidade, com 300 células por poço. As substâncias ficaram em contato com as células por 72 h e, após esse período, as substâncias foram retiradas e as células deixadas para crescimento por sete dias. Para a linhagem DU-145 as concentrações com o Neq0677 foram 12 e 10 μ M (reduzindo o número de colônias em 90 e 80% respectivamente); com o Neq0681 foram 15 e 10 μ M (com redução de 60 e 50%),

Figura 30. Com a linhagem PC-3, as concentrações foram 6 e 3 μM para o Neq0677 (redução do número de colônias de 35% e 10%) e foram 3 e 1 μM para o Neq0681 (reduzindo a formação das colônias em 40 e 10%, respectivamente), Figura 31. Essas concentrações testadas foram escolhidas avaliando outras concentrações que não tiveram êxito.

Neste ensaio, com o qual foi confirmado se o tratamento possui atividade citotóxica sobre as células tumorais, o tratamento com os compostos Neq0677 e Neq0681 reduziram o número das colônias de forma concentração-dependente para ambas as linhagens.

Figura 30. Ensaio clonogênico com a linhagem DU 145 com as substâncias Neq0677 e Neq0681

No gráfico estão representados no eixo x as diferentes concentrações e no eixo Y o número relativo de colônias. Foi analisado o comportamento das células em relação a formação de colônias com as substâncias Neq0677e Neq0681 na linhagem DU-145.

Fonte: autoria própria.

Figura 31. Ensaio clonogênico com a linhagem PC-3 com as substâncias Neq0677 e Neq0681

No gráfico estão representados no eixo x as diferentes concentrações e no eixo Y o número relativo de colônias. Foi analisado o comportamento das células em relação a formação de colônias com as substâncias Neq0677e Neq0681 na linhagem PC-3.

Fonte: autoria própria.

6.3. Discussão

O câncer é um problema de saúde pública com crescimento exponencial, sendo o câncer de próstata o primeiro que mais acomete a população masculina, sem considerar o câncer de pele não melanoma, e a quarta maior causa de morte por neoplasias no Brasil (INCA).

Atualmente os tratamentos existentes para o câncer como a radioterapia e a quimioterapia ainda apresentam diversos efeitos colaterais. Ainda não existe um tratamento específico para o processo metastático, considerando que o alto índice de mortalidade entre os pacientes com câncer está associado ao estabelecimento de metástase pelo organismo. No tocante ao processo de metástase, as etapas mais importantes são a degradação e invasão da matriz extracelular e da lâmina basal pela célula tumoral, isso envolve a ação de enzimas proteolíticas. Além de serino e metaloproteases, cujo envolvimento na progressão do câncer já está bem caracterizado, recentemente tem sido relatada uma importante associação de cisteíno proteases, principalmente as cisteíno catepsinas. Foi observado que a quantidade e a atividade de catepsina L estão consideravelmente aumentadas e estão relacionadas ao potencial invasivo destas células. Ao mesmo tempo, a quantidade dos seus inibidores endógenos, as citastinas estão consideravelmente diminuídas, gerando um desequilíbrio que contribui para o desenvolvimento do fenótipo metastático.

O cenário molecular atual do câncer revelou genes que estão expressos em tumores primários e que estão relacionadas de forma direta com o aparecimento do câncer metastático. Pressupondo que conjuntos definidos de genes como proto-oncogenes estão relacionados com o surgimento do câncer primário, outros fatores estão relacionados com os processos de metástase, como proteínas de adesão, fatores de motilidade e proteases degradadoras de matriz. É conhecido que as catepsinas extracelulares clivam os principais constituintes da membrana basal (laminina, fibronectina e colágeno tipo IV) permitindo a invasão, migração e, por fim, a metástase dessas células⁵. Tendo em vista estas informações, o comportamento das linhagens DU 145 e PC-3 frente às substâncias (Neq0677 e Neq0681) foi investigado em relação à migração e formação de colônias, processos fundamentais para o surgimento da metástase. Essas substâncias foram planejadas e sintetizadas para a cruzaina (protease de *T. cruzi*) que é homóloga a catepsina L humana. Neste sentido, inibidores seletivos de cisteíno proteases têm sido utilizados na tentativa de

atenuar a característica invasiva de linhagens tumorais metastática de próstata.

Este trabalho demonstrou os efeitos *in vitro* de 55 substâncias baseadas em derivados de dipeptidil nitrilas em duas linhagens de câncer de próstata (DU 145 e PC-3). Foram analisadas a interferência no crescimento, alterações na migração e na formação de colônias.

Inicialmente avaliamos o potencial desses inibidores com uma triagem em concentração única de 100 μ M para a DU 145, PC-3 e Balb/C 3T3 clone A 31 (linhagem não tumoral). Quatro substâncias (Neq0677, Neq0681, Neq0689 e Neq0690) inibiram 90% da viabilidade das células DU 145. Na linhagem PC-3, seis substâncias que apresentaram os melhores resultados foram Neq0636, Neq0669, Neq0677, Neq0681, Neq0689 e Neq0690, inibindo 80% da viabilidade. Para a linhagem não tumoral, algumas substâncias apresentaram citotoxicidade. No total foram quatorze substâncias que inibiram a viabilidade das células em pelo menos 50% (Neq0716, Neq0719 e Neq0783 - 50% de inibição; Neq0587, Neq0630, Neq0636, Neq0678, Neq0680 e Neq0715 - 70% de inibição; Neq0669, Neq0677, Neq0681, Neq0689 e Neq0690 - 90% de inibição). Considerando que as substâncias que tiveram potencial atividade contra as linhagens tumorais também apresentaram citotoxicidade, verificamos com as curvas concentração-resposta a potência das substâncias nas três linhagens. As melhores substâncias foram Neq0677 e Neq0681. Essas duas substâncias mostraram atividade citostática nas linhagens tumorais, retardando o crescimento dessas linhagens e não permitiram atingir o mesmo número de células do que o controle sem tratamento.

Utilizando o método de fechamento de risca, as substâncias apresentaram efeitos sobre a migração das linhagens tumorais, com inibição da migração de DU 145 em 40% para Neq0677 após 48 h de incubação utilizando 30 μ M. Na mesma linhagem, Neq0681 inibiu 50% da migração após 48 h de incubação e 35 μ M da substância.

No método de migração *transwell*, Neq0681 mostrou inibição de 60% da migração na linhagem PC-3 na concentração de 500 nM, enquanto para DU 145 a inibição de foi de 65% com 10 μ M da substância. Além disso, estudos de formação de colônia confirmaram os efeitos sobre ambas as linhagens, reduzindo o número de colônias ao final do experimento. Para a linhagem DU 145, os compostos Neq0677 e Neq0681 reduziram em 90% e 60% a formação das colônias nas concentrações de 12 μ M e 15 μ M, respectivamente. Na linhagem PC-3, Neq0677 reduziu em 35% o número de colônias em 6 μ M, enquanto Neq0681 reduziu em 40 % o número de colônias na

concentração de 3 μ M. Estes estudos revelaram que Neq0681 foi a substância mais promissora no tratamento do processo metastático.

Em busca por novas opções de tratamento para o câncer, estudos de inibidores de cisteíno proteases têm sido cada vez mais relevantes. Vários trabalhos relatam a atividade de inibidores de cisteíno proteases com potencial atividade antineoplásica, mas, em sua maioria, ficam restritos a descrição da atividade inibitória frente às enzimas de interesse. Uma abordagem usando derivados de dipeptidil nitrilas mostrou atividade contra linhagens de câncer de pâncreas em nosso grupo de pesquisa. Quilles e colaboradores¹³⁶ observaram a atividade citostática de dipeptidil nitrilas contra linhagem de câncer de pâncreas MIA Paca-2. Utilizando o extrato celular foi possível verificar a inibição das cisteíno proteases em 65-90% da atividade enzimática. As substâncias inibiram a formação de colônias sem apresentar efeitos tóxicos. Além disso mostraram inibir a migração em mais de 50% das células dessa linhagem e uma parada do ciclo celular principalmente na fase S, indicando uma alteração na etapa da síntese de DNA. A catepsina L está relacionada com a degradação de fatores de transcrição, replicação do DNA e metástase em células cancerígenas. A retenção na fase S indica pode ser resultado da inibição da catepsina L alterando a progressão do ciclo celular. Esse trabalho mostrou a relevância de estudos com alvo em cisteíno proteases para o tratamento do câncer, dos efeitos das dipeptidil nitrilas em relação a atividade citostática, e os ensaios de migração e formação de colônia como método para estudos de uma possível inibição da metástase.

Uma das características mais importantes das células malignas é a capacidade de invadir tecidos adjacentes e promover metástase em órgãos adjacentes. Esse processo envolve a criação de um microambiente específico, adequado para proliferação, migração e invasão de células tumorais. A catepsina L tem sido secretada por vários tipos de câncer e tem sido implicada no processo metastático. Realizou-se estudos com as células das linhagens PC-3 e DU 145 que mostrou a importância da catepsina L na habilidade da célula em invadir a membrana basal. Colella e colaboradores¹³⁷ estudando essas mesmas linhagens de câncer de próstata observaram que quanto maior a densidade da célula, maior é a atividade enzimática das catepsinas L e B, tanto no extrato celular, quanto no meio condicionado, e menor é a atividade do inibidor de cisteíno proteases. Além disso, essas linhagens apresentaram características invasivas e foi observado que com o uso do inibidor E64

(inibidor conhecido de cisteíno proteases) a invasão foi inibida em 90% para a linhagem DU 145 e em 50% para PC-3, corroborando com as observações anteriores que a catepsina L é importante para o potencial invasivo das linhagens DU 145 e PC-3.

A finasterida bloqueia a conversão de testosterona em dihidrotestosterona e tem sido amplamente utilizada em pacientes diagnosticados com hiperplasia prostática benigna. Estudos de Moroz e colaboradores¹³³ verificaram a interferência do tratamento com finasterida na migração e no potencial invasivo das linhagens de câncer de próstata DU 145 e PC-3. Mesmo após 72 horas de incubação com as linhagens cancerosas, a finasterida não ocasionou a morte dessas células. A partir do ensaio de migração *transwell* foi observado que a DU 145 e a PC-3 apresentam alto potencial migratório e o uso da finasterida não inibiu a migração significativamente. Além disso, estudos de invasão foram realizados e mostraram que ambas as linhagens têm alto potencial invasivo e, com o uso da finasterida, houve diminuição em 30% da invasão em ambas as linhagens de câncer de próstata. A finasterida pode atenuar a agressividade e a invasão do tumor, porém essas características e efeitos podem variar de acordo com o fenótipo dos pacientes. Estudos com as linhagens DU 145 e PC-3 são importantes, visto o potencial altamente invasivo e migratório que elas possuem e a falta de tratamento no processo metastático.

Apesar das substâncias estudadas neste trabalho apresentarem uma boa e promissora potência e eficácia para o câncer de próstata, mesmo que a seletividade não tenha sido muito alta (abaixo de 10 vezes), estudos futuros poderão analisar a terapia combinada para observar se poderá levar a uma melhora no perfil farmacológico.

7. Conclusão e perspectivas

7.1. Conclusão

Neste projeto, verificamos de forma inédita que:

- ✓ O modo de ação das substâncias testadas foi distinto para as diferentes formas morfológicas de *T. cruzi* bem como variaram de acordo com a cepa envolvida. A substância NEQ0902 apresentou capacidade citotóxica para a forma amastigota com atividade melhor quando testada de forma isolada. Associações com o medicamento disponível Benznidazol apresentou uma sinergia e seletividade elevada para as formas amastigotas com duas substâncias inéditas (NEQ0827 e NEQ0831).
- ✓ A atividade citotóxica apresentou uma variação no índice de seletividade dependendo da linhagem de câncer de próstata testada. As substâncias NEQ0677 e NEQ0681 apresentaram atividade citostática e anti-migratória variando com a linhagem de células utilizada.
- ✓ Houve diferença de suscetibilidade dos derivados de dipeptidil nitrilas quanto as formas morfológicas de *Leishmania* onde a forma amastigota foi mais suscetível.

7.2. Perspectivas

Em vista dos resultados alcançados neste trabalho, outras análises poderão ser realizadas para um melhor entendimento do mecanismo de ação das dipeptidil nitrilas sobre os efeitos nas linhagens cancerosas e nos parasitos:

- ✓ Estudos de terapia combinada para os compostos Neq0677 e Neq0681 combinados com a substância de referência Enzalutamida poderão ser aprofundados para melhorar o perfil farmacológico da atividade dessas substâncias contra o câncer de próstata;
- ✓ Análise do ciclo celular e apoptose poderão complementar a investigação sobre os efeitos da dipeptidil nitrilas nas células de câncer;
- ✓ Experimentos com microscopia de fluorescência serão úteis para verificar a inibição da catepsina L diretamente na célula;

- ✓ Estudos *in vivo* com o Neq0831+Bz poderão demonstrar o efeito sistêmico contra a doença de Chagas;
- ✓ Análise da via NFkB através de microscopia de fluorescência poderão demonstrar a inibição da cruzaina em *T. cruzi* ocasionada pelas substâncias, além da correlação com a inibição da cruzaina;
- ✓ Estudos de curva concentração-resposta com o Neq0681 na forma promastigota de *Leishmania* e com 11 substâncias para a forma amastigota.

Referências

1. Mohamed MM, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(10):764-775. doi:10.1038/nrc1949
2. Ferreira LG, Andricopulo AD. Targeting cysteine proteases in trypanosomatid disease drug discovery. *Pharmacol Ther*. 2017;180:49-61. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.06.004
3. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(8):604-615. doi:10.1038/nrmicro2608
4. Mottram JC, Coombs GH, Alexander J. Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. *Curr Opin Microbiol*. 2004;7:375-381. doi:10.1016/j.mib.2004.06.010
5. Alizadeh AM, Shiri S, Farsinejad S. *Metastasis Review: From Bench to Bedside*. Vol 35.; 2014. doi:10.1007/s13277-014-2421-z
6. Sudhan DR, Siemann DW. Cathepsin L targeting in cancer treatment. *Pharmacol Ther*. 2015;155:105-116. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.08.007
7. Qin G, Cai Y, Long J, et al. Cathepsin L is involved in proliferation and invasion of breast cancer cells. *Neoplasma*. 2016;1:30-36. doi:10.4149/neo
8. Aids Info. <https://aidsinfo.nih.gov/drugs>.
9. Sparano JA, Bernardo P, Stephenson P, et al. Randomized phase III trial of marimastat versus placebo in patients with metastatic breast cancer who have responding or stable disease after first-line chemotherapy: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2196. *J Clin Oncol*. 2004;22(23):4631-4638. doi:10.1200/JCO.2004.08.054
10. Bone HG, Dempster DW, Eisman JA, et al. Odanacatib for the treatment of postmenopausal osteoporosis: development history and design and participant characteristics of LOFT, the Long-Term Odanacatib Fracture Trial. *Osteoporos Int*. 2015;26(2):699-712. doi:10.1007/s00198-014-2944-6
11. Barr SC, Warner KL, Kornreic BG, et al. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(12):5160-5161. doi:10.1128/AAC.49.12.5160-5161.2005
12. Mckerrrow JH, Doyle PS, Engel JC, et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:263-269. doi:10.1590/S0074-02762009000900034
13. Martinez-mayorga K, Byler KG, Ramirez-hernandez AI, Terrazas-alvares DE. Cruzain inhibitors : efforts made , current leads and a structural outlook of new hits. *Drug Discov Today*. 2015;20:890-898. doi:10.1016/j.drudis.2015.02.004
14. Caroselli EE, Assis DM, Barbiéri CL, et al. Leishmania (L .) amazonensis peptidase activities inside the living cells and in their lysates. *Mol Biochem Parasitol*. 2012;184(2):82-89. doi:10.1016/j.molbiopara.2012.04.012
15. Lankelma JM, Voorend DM, Barwari T, et al. Cathepsin L, target in cancer treatment? *Life Sci*. 2010;86(7-8):225-233. doi:10.1016/j.lfs.2009.11.016
16. Khan N, Mukhtar H. Cancer and metastasis: prevention and treatment by green tea. *Cancer Metastasis Rev*. 2011;29(3):435-445. doi:10.1007/s10555-010-9236-1.Cancer
17. WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). <https://www.who.int/chagas/disease/en/>.
18. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375(9723):1388-1402. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X
19. DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE: América Latina. Doença de Chagas. Rio de Janeiro. <https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas>. Published 2019. Accessed September 9, 2019.
20. Noya BA De, Díaz-bello Z, Colmenares C, et al. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela : epidemiological , clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):377-386. doi:10.1590/0074-02760140285

21. Santos V, Meis J De, Savino W, et al. Acute Chagas disease in the state of Pará , Amazon Region : is it increasing ? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(5):1-6. doi:10.1590/0074-02760170298
22. Shikanai-Yasuda M, Carvalho N. Oral Transmission of Chagas Disease. *Emerg Infect*. 2012;54:845-852. doi:10.1093/cid/cir956
23. Pérez-Molina J, Molina I. Chagas Disease. *The LancetLancet*. 2018;391:82-94. doi:10.1016
24. Jr AR, Rassi A, De Rezende JM. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26(2):275-291. doi:10.1016/j.idc.2012.03.002
25. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. American trypanosomiasis. cdc.gov/dpdx/contact.html. Accessed September 10, 2019.
26. Molina I, Salvador F. The use of posaconazole against Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis*. 2015;28(5):397-407. doi:10.1097/QCO.0000000000000192
27. Man CC, Ferreira EI, Santos JL, et al. Prodrugs for the treatment of neglected diseases. *Molecules*. 2008;13(3):616-677. doi:10.3390/molecules13030616
28. Soeiro MNC, de Castro SL. Trypanosoma cruzi targets for new chemotherapeutic approaches . *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13(1):105-121. doi:10.1517/14728220802623881
29. Sangshetti JN, Khan FAK, Kulkarni A, Arote R, Patil RH. Antileishmanial drug discovery: a comprehensive review of least 10 years. *R Soc Chem*. 2015;(41):1-100. doi:10.1039/C5RA02669E
30. Adebayo OL, Suleman D, Samson AA. Natural products in antileishmanial drug discovery : A Review. *J Asian Sci Res*. 2013;3(2):157-173.
31. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. who.int/leishmaniasis/burden/en. Accessed August 28, 2019.
32. Oliveira G, Figueiró E, Andrade G, Araújo L, Oliveira M, Cunha R. Flebotomíneos (diptera: Psychodidae:Phlebotominae) no município de Três Lagoas, área de transmissão intensa de leishmaniose visceral, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2010;1(3):83-94. doi:10.5123/S2176-62232010000
33. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999;354:1191-1199. doi:10.1016/S0140-6736(98)10178-2
34. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366:1561-1577. doi:10.1016/S0140-6736(05)67629-5
35. FRÉZARD FJG. A Caminho da cura da leishmaniose visceral canina.
36. Santos DO, Coutinho CER, Madeira MF, et al. Leishmaniasis treatment - A challenge that remains: A review. *Parasitol Res*. 2008;103:1-10. doi:10.1007/s00436-008-0943-2
37. Monge-Maillo B, López-Vélez R. Therapeutic options for visceral leishmaniasis. *Drugs*. 2013;73:1863-1888. doi:10.1007/s40265-013-0133-0
38. Freitas-junior LH, Chatelain E, Andrade H, Siqueira-neto JL. Visceral leishmaniasis treatment : What do we have , what do we need and how to deliver it ? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2012;2:11-19. doi:10.1016/j.ijpddr.2012.01.003
39. Coelho AC, Messier N, Ouellette M, Cotrim PC. Role of the ABC Transporter PRP1 (ABCC7) in Pentamidine Resistance in Leishmania Amastigotes . *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(8):3030-3032. doi:10.1128/AAC.00404-07
40. No JH. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. *Acta Trop*. 2016;155:113-123. doi:10.1016/j.actatropica.2015.12.016
41. Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol*. 2009;26(4):223-227. doi:10.1016/j.riam.2009.06.003
42. Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Nakamura C V. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis*. 2011;15. doi:10.1016/j.ijid.2011.03.021
43. GUIDO RVC. Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de Trypanosoma cruzi: biologia estrutural e química medicinal. 2008.
44. INCA (Instituto Nacional de Câncer).
45. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics , 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7-30.

- doi:10.3322/caac.21442
46. WHO. Cancer.
 47. Perner CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. Epidemiology of prostate cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2015;16(13):5137-5141. doi:10.7314/APJCP.2015.16.13.5137
 48. Hanahan D, Weinberg R a. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100:57-70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
 49. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells-what challenges do they pose? The Cancer Stem Cell paradigm A semantic dispute? *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(7):497-512. doi:10.1038/nrd4253
 50. MACIEL S. Estudando ciências e biologia: sugestões, textos, atividades, vídeos e imagens sobre ciências e biologia. <http://estudandocienciasbiologia.blogspot.com/2017/05/nucleo-celular.html>. Published 2017. Accessed July 16, 2019.
 51. Grönberg H. Prostate Cancer Epidemiology-Review. 2003;361:859-864. doi:10.1016/S0140-6736(03)12713-4
 52. Perret GY, Crépin M. New pharmacological strategies against metastatic spread. *Fundam Clin Pharmacol*. 2008;22(5):465-492. doi:10.1111/j.1472-8206.2008.00614.x
 53. Johanna J, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):239-252. doi:10.1177/0004867416654010
 54. Kubota Y. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy. *keio J Med*. 2012;61(2):47-56. doi:10.3233/HAB-130267
 55. Yilmaz M, Christofori G, Lehenbre F. Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Trends Mol Med*. 2007;13(12):535-541. doi:10.1016/j.molmed.2007.10.004
 56. Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: Old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol*. 2011;21(2):139-146. doi:10.1016/j.semcancer.2011.01.002
 57. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
 58. Pienta KJ, Smith DC. Advances in prostate cancer chemotherapy: a new era begins. *CA Cancer J Clin*. 55(5):300-318; quiz 323-325. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16166075>.
 59. Michelini E, Cevenini L, Mezzanotte L, Coppa A, Roda A. Cell-based assays: Fuelling drug discovery. *Anal Bioanal Chem*. 2010;398(1):227-238. doi:10.1007/s00216-010-3933-z
 60. Riss TL, Moravec RA. Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate the Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, and Plating Density in Cell-Based Cytotoxicity Assays. *Assay Drug Dev Technol*. 2004;2(1):51-62. doi:10.1089/154065804322966315
 61. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
 62. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, et al. Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Res*. 1988;48:4827-4833.
 63. Brien JO, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000;267:5421-5426.
 64. Fonseca-berzal C, Arán VJ, Escario JA, Gómez-barrio A. Experimental models in Chagas disease : a review of the methodologies applied for screening compounds against *Trypanosoma cruzi*. 2018:3367-3380.
 65. Muelas-Serrano, S. Nogal-Ruiz, J.J., Gómez-Barrio A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res*. 2000;86:999-1002. doi:10.1007/PL00008532
 66. Vega C, Rolón M, Martínez-Fernández AR, Escario JA, Gómez-Barrio A. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing β -galactosidase. *Parasitol Res*. 2005;95(4):296-298. doi:10.1007/s00436-005-1300-3
 67. Canavaci AMC, Bustamante JM, Padilla AM, et al. In Vitro and In Vivo High-throughput assays for the testing of Anti-trypanosoma cruzi compounds. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(7).

- doi:10.1371/journal.pntd.0000740
68. Kessler RL, Gradia DF, de Pontello Rampazzo RC, et al. Stage-Regulated GFP Expression in *Trypanosoma cruzi*: Applications from Host-Parasite Interactions to Drug Screening. *PLoS One*. 2013;8(6). doi:10.1371/journal.pone.0067441
 69. Chan MM, Bulinski JC, Chang KP, Fong D. A microplate assay for *Leishmania amazonensis* promastigotes expressing multimeric green fluorescent protein. *Parasitol Res*. 2003;89(4):266-271. doi:10.1007/s00436-002-0706-4
 70. Rolón M, Vega C, Escario JA, Gómez-Barrio A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res*. 2006;99(2):103-107. doi:10.1007/s00436-006-0126-y
 71. Miguel DC, Ferraz ML, Alves R de O, et al. The anticancer drug tamoxifen is active against *Trypanosoma cruzi* in vitro but ineffective in the treatment of the acute phase of Chagas disease in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(7):945-948. doi:10.1590/S0074-02762010000700021
 72. Nefertiti ASG, Batista MM, Batista DGJ, et al. In Vitro and In Vivo Studies of the Trypanocidal Effect of Novel Quinolines. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(2):1-11.
 73. Miranda CG, Solana ME, Curto MA, Lammel EM, Schijman AG, Soto CDA. A flow cytometer-based method to simultaneously assess activity and selectivity of compounds against the intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2015;152:8-16.
 74. Fonseca-Berzal C, Escario JA, Arán VJ, Gómez-Barrio A. Further insights into biological evaluation of new anti-*Trypanosoma cruzi* 5-nitroindazoles. *Parasitol Res*. 2014;113(3):1049-1056. doi:10.1007/s00436-013-3740-5
 75. Buckner FS, Verlinde CLMJ, Flamme ACL a, Voorhis WCV a N. Efficient Technique for Screening Drugs for Activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β -galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(11):2592-2597.
 76. Ablett EM, Sturm RA, Parsons PG. Improved β -galactosidase reporter assays: optimization for low activity in mammalian cells. *Tech Tips Online*. 1998;3(1):29-31. doi:10.1016/s1366-2120(08)70090-4
 77. Planer JD, Hulverson MA, Arif JA, Ranade RM, Don R, Buckner FS. Synergy Testing of FDA-Approved Drugs Identifies Potent Drug Combinations against *Trypanosoma cruzi*. Pollastri MP, ed. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(7):e2977. doi:10.1371/journal.pntd.0002977
 78. Timm BL, Da Silva PB, Batista MM, et al. In vitro and in vivo biological effects of novel arylimidamide derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(7):3720-3726. doi:10.1128/AAC.02353-14
 79. Lavorato SN, Sales PA, Murta SMF, Romanha AJ, Alves RJ. In vitro activity of 1,3-bisaryloxypropanamines against *trypanosoma cruzi*-infected L929 cultures. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):566-568. doi:10.1590/0074-02760150007
 80. NEFERTITI ASDG, BATISTA MM, DA SILVA PB, et al. Anti-parasitic effect of novel amidines against *Trypanosoma cruzi*: phenotypic and in silico absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity analysis. *Parasitol Open*. 2017;3:1-8. doi:10.1017/pao.2017.5
 81. Villalta F, Dobish MC, Nde PN, et al. VNI cures acute and chronic experimental chagas disease. *J Infect Dis*. 2013;208(3):504-511. doi:10.1093/infdis/jit042
 82. Sereno D, Cordeiro da Silva A, Mathieu-Daude F, Ouaisi A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int*. 2007;56(1):3-7. doi:10.1016/j.parint.2006.09.001
 83. Vacchina P, Morales MA. In Vitro Screening Test Using *Leishmania* Promastigotes Stably Expressing mCherry Protein . *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(3):1825-1828. doi:10.1128/aac.02224-13
 84. Bustamante JM, Tarleton RL. Methodological advances in drug discovery for Chagas disease. *Expert Opin Drug Discov*. 2011;6(6):653-661. doi:10.1517/17460441.2011.573782
 85. Don R, Ioset JR. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology*. 2014;141(1):140-146.

- doi:10.1017/S003118201300142X
86. Alonso-Padilla J, Cotillo I, Presa JL, et al. Automated High-Content Assay for Compounds Selectively Toxic to *Trypanosoma cruzi* in a Myoblastic Cell Line. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(1):1-17. doi:10.1371/journal.pntd.0003493
 87. Moraes CB, Giardini M a, Kim H, et al. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Sci Rep*. 2014;4:1-11. doi:10.1038/srep04703
 88. Tomlinson S, Vandekerckhove F, Frevert U, Nussenzweig V. The induction of *trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology*. 1995;110(5):547-554. doi:10.1017/S0031182000065264
 89. Veiga-Santos P, Desoti VC, Miranda N, et al. The natural compounds piperovatine and piperlonguminine induce autophagic cell death on *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2013;125(3):349-356. doi:10.1016/j.actatropica.2012.11.014
 90. Cunningham D, You Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *J Biol Methods*. 2015;2(1):1-28. doi:10.1097/CCM.0b013e31823da96d.Hydrogen
 91. Cruz ECS, Carecho AR, Saidel ME, Montanari CA, Leitão A. In silico selection and cell-based characterization of selective and bioactive compounds for androgen-dependent prostate cancer cell. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2017;27(3):546-550. doi:10.1016/j.bmcl.2016.12.022
 92. Gomes FER, Bergo PLS, Trap MA, et al. Photolysis of parabens using medium-pressure mercury lamps: Toxicity effects in MCF7, Balb/c 3T3 cells and *Ceriodaphnia dubia*. *Chemosphere*. 2018;208:325-334. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.05.135
 93. Buckner FS, Verlinde CL, La Flamme AC, Van Voorhis WC. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(11):2592-2597. doi:10.1128/AAC.40.11.2592
 94. DaMatta R a., Seabra SH, Deolindo P, et al. *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;266:29-33. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00495.x
 95. Burtoloso ACB, de Albuquerque S, Furber M, et al. Anti-trypanosomal activity of non-peptidic nitrile-based cysteine protease inhibitors. Satoskar AR, ed. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(2):1-16. doi:10.1371/journal.pntd.0005343
 96. Silva DG, Rocha JR, Sartori GR, Montanari CA. Highly predictive hologram QSAR models of nitrile-containing cruzain inhibitors. *J Biomol Struct Dyn*. November 2016:1-18. doi:10.1080/07391102.2016.1252282
 97. Avelar LAA, Camilo CD, De Albuquerque S, et al. Molecular design, synthesis and trypanocidal activity of dipeptidyl nitriles as cruzain inhibitors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(7):1-24. doi:10.1371/journal.pntd.0003916
 98. Saraiva J, Vega C, Rolon M, et al. In vitro and in vivo activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 2007;100:791-795. doi:10.1007/s00436-006-0327-4
 99. Castro SL, Meirelles MN. Mechanism of action of nitroimidazole-thiadiazole derivate upon *Trypanosoma cruzi* tissue culture amastigotes. 1990:95-99.
 100. Ashall F. Characterisation of an alkaline peptidase of *Trypanosoma cruzi* and other trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol*. 1990;38(1):77-87. doi:10.1016/0166-6851(90)90207-3
 101. Braga SFP, Martins LC, da Silva EB, et al. Synthesis and biological evaluation of potential inhibitors of the cysteine proteases cruzain and rhodesain designed by molecular simplification. *Bioorg Med Chem*. 2017;25(6):1889-1900. doi:10.1016/j.bmc.2017.02.009
 102. San Francisco J, Barría I, Gutiérrez B, et al. Decreased cruzipain and gp85/trans-sialidase family protein expression contributes to loss of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote virulence. *Microbes Infect*. 2017;19(1):55-61. doi:10.1016/j.micinf.2016.08.003
 103. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015;373(14):1295-1306. doi:10.1056/NEJMoa1507574

104. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104 Suppl(March):152-158. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753470>.
105. Zingales B, Miles MA, Moraes CB, et al. Drug discovery for chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(6):828-833. doi:10.1590/0074-0276140156
106. Paucar R, Moreno-Viguri E, Pérez-Silanes S. Challenges in Chagas Disease Drug Discovery: A Review. *Curr Med Chem*. 2016;23(28):3154-3170. doi:10.2174/0929867323999160625124424
107. Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol*. 2002;120:1-21. doi:10.1016/S0166-6851(02)00043-9
108. Watanabe Costa R, da Silveira JF, Bahia D. Interactions between *Trypanosoma cruzi* secreted proteins and host cell signaling pathways. *Front Microbiol*. 2016;7(MAR):1-9. doi:10.3389/fmicb.2016.00388
109. Engel JC, Torres C, Hsieh I, Doyle PS, McKerrow JH. Upregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 8):1345-1354. doi:10.5271/sjweh.1271
110. Field MC, Horn D, Fairlamb AH, et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. *Nat Rev Microbiol*. June 2017. doi:10.1038/nrmicro.2017.69
111. De Souza W. A Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: From 1909 to 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(SUPPL. 1):17-36.
112. De Carvalho EAB, Andrade PP, Silva NH, Pereira EC, Figueiredo RCBQ. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: An ultrastructural study. *Micron*. 2005;36(2):155-161. doi:10.1016/j.micron.2004.09.003
113. Wiggers HJ, Rocha JR, Fernandes WB, et al. Non-peptidic Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity Discovered by Virtual Screening and In Vitro Assay. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(8). doi:10.1371/journal.pntd.0002370
114. Bellera CL, Balcazar DE, Vanrell MC, et al. Computer-guided drug repurposing: Identification of trypanocidal activity of clofazimine, benidipine and saquinavir. *Eur J Med Chem*. 2015;93:338-348. doi:10.1016/j.eurmech.2015.03.016
115. Sbaraglini ML, Bellera CL, Fraccaroli L, et al. Novel cruzipain inhibitors for the chemotherapy of chronic Chagas disease. *Int J Antimicrob agents*. 2016;48:91-95. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.01.016
116. Burtoloso ACB, Albuquerque D, Furber M, et al. Anti-trypanosomal activity of non-peptidic nitrile-based cysteine protease inhibitors. *Neglected Trop Dis*. 2017;1-16. doi:10.1371/journal.pntd.0005343
117. Iram S, Zahera M, Khan S, et al. *Gold Nanoconjugates Reinforce the Potency of Conjugated Cisplatin and Doxorubicin*. Vol 160. Elsevier B.V.; 2017. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.09.017
118. Nelson HS. Advair: Combination treatment with fluticasone propionate/salmeterol in the treatment of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;107(2):398-413. doi:10.1016/S0092-7296(00)0033-2
119. Martins TAF, Diniz LDF, Mazzeti AL, et al. Benznidazole/itraconazole combination treatment enhances anti-*Trypanosoma cruzi* activity in experimental Chagas disease. *PLoS One*. 2015;10(6):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0128707
120. Pelizzaro-Rocha KJ, Tiunan TS, Izumi E, Ueda-Nakamura T, Filho PDF, Nakamura C V. Synergistic effects of parthenolide and benznidazole on *trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine*. 2010;18:36-39. doi:10.1016/j.phymed.2010.01.003
121. Valdez RH, Tonin LTD, Ueda-Nakamura T, et al. In Vitro and In Vivo Trypanocidal Synergistic Activity of N -Butyl-1-(4-Dimethylamino)Phenyl-1,2,3,4-Tetrahydro- β -Carboline-3-Carboxamide Associated with Benznidazole . *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(1):507-512. doi:10.1128/aac.05575-11
122. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*. 2003;19(11):502-508. doi:10.1016/j.pt.2003.09.008
123. Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new

- potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med*. 2012;485-497.
124. Nasereddin A, Schweinoch C, Schonian G, Jaffe CL. Characterization of Leishmania (Leishmania) tropica axenic amastigotes. *Acta Trop*. 2010;113:72-79. doi:10.1016/j.actatropica.2009.09.009
 125. Coombs GH. Proteinases of Leishmania mexicana and other flagellate protozoa. *Parasitology*. 1982;84:149-155.
 126. Muylder G De, Ang KKH, Chen S, Arkin MR, Engel JC, James H. A Screen against Leishmania Intracellular Amastigotes : Comparison to a Promastigote Screen and Identification of a Host Cell-Specific Hit. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(7):1-9. doi:10.1371/journal.pntd.0001253
 127. Quilles JC, Tezuka DY, Lopes CD, et al. Dipeptidyl nitrile derivatives have cytostatic effects against Leishmania spp. promastigotes. *Exp Parasitol*. 2019;200:84-91.
 128. Bruno AF, Castelli G, Migliazzo A, Piazza M. Cytotoxic Screening and In Vitro Evaluation of Pentadecane Against Leishmania infantum Promastigotes and Amastigotes CYTOTOXIC SCREENING AND IN VITRO EVALUATION OF PENTADECANE AGAINST. *J Parasitol*. 2015;101(6):701-705. doi:10.1645/15-736
 129. Liu L, Ahn KS, Shanmugam MK, et al. Oleuropein induces apoptosis via abrogating NF- κ B activation cascade in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *J Cell Biochem*. 2018;(August 2018):4504-4513. doi:10.1002/jcb.27738
 130. Jose C, Hebert-Chatelain E, Dias Amoedo N, et al. Redox mechanism of levobupivacaine cytostatic effect on human prostate cancer cells. *Redox Biol*. 2018;18(May):33-42. doi:10.1016/j.redox.2018.05.014
 131. Wang L, Ling Y, Chen Y, et al. Flavonoid baicalein suppresses adhesion, migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Lett*. 2010;297(1):42-48. doi:10.1016/j.canlet.2010.04.022
 132. Yue PYK, Leung EPY, Mak NK, Wong RNS. A Simplified Method for Quantifying Cell Migration/Wound Healing in 96-Well Plates. *J Biomol Screen*. 2010;15(4):427-433. doi:10.1177/1087057110361772
 133. Moroz A, Delella FK, Almeida R, et al. Finasteride inhibits human prostate cancer cell invasion through MMP2 and MMP9 downregulation. *PLoS One*. 2013;8(12):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0084757
 134. Martin ACBM, Fuzer AM, Becceneri AB, et al. [10]-Gingerol Induces Apoptosis and Inhibits Metastatic Dissemination of Triple Negative Breast Cancer in vivo. *Oncotarget*. 2017;8(42):72260-72271. doi:10.18632/oncotarget.20139
 135. Cartledge DM, Colella R, Glazewski L, Lu G, Mason RW. Inhibitors of cathepsins B and L induce autophagy and cell death in neuroblastoma cells. *Invest New Drugs*. 2013;31(1):20-29. doi:10.1007/s10637-012-9826-6
 136. Quilles JCJ, Bernardi MDL, Batista PHJ, et al. Biological Activity and Physicochemical Properties of Dipeptidyl Nitrile Derivatives Against Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells. *Anti-cancer Agents Med Chem*. 2018;18(0):1-9. doi:10.2174/1871520618666181029141649
 137. Colella R, Goodwyn E, Gopal P. Increased cell density decreases cysteine proteinase inhibitor activity and increases invasive ability of two prostate tumor cell lines. *Cancer Lett*. 2002;185:163-172.

Anexo A

Artigos publicados

Experimental Parasitology 200 (2019) 84–91

Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr

Dipeptidyl nitrile derivatives have cytostatic effects against *Leishmania* spp. promastigotes

José C. Quilles Jr.^a, Daiane Y. Tezuka^{a,b}, Carla D. Lopes^{a,b}, Fernanda L. Ribeiro^a, Charles A. Laughton^c, Sérgio de Albuquerque^d, Carlos A. Montanari^a, Andrei Leitão^{a,*}

^a Medicinal Chemistry Group (NEQUIMED), São Carlos Institute of Chemistry (IQSC), University of São Paulo (USP), Av. Trabalhador São-carlense, 400, São Carlos, SP, 13.566-590, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Bioengenharia, University of São Paulo (USP), Av. Trabalhador São-carlense, 400, São Carlos, SP, Brazil

^c School of Pharmacy and Centre for Biomolecular Sciences, University of Nottingham, Nottingham, NG7 2RD, UK

^d Laboratório de Parasitologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Cytostatic activity
Cell-based assays
Dipeptidyl nitriles
Leishmaniasis

ABSTRACT

Cysteine proteases are involved in critical cell processes to the protozoa from *Leishmania* genus, and their inhibition is a therapeutic alternative to treat the disease. In this work, derivatives of dipeptidyl nitriles acting as reversible covalent inhibitors of cysteine proteases were studied as cytostatic agents. The proteolytic activity inside the living and lysed parasite cells was quantified using a selective substrate for cysteine proteases (Z-FR-MCA) from *Leishmania amazonensis* and *L. infantum*. The overall proteolytic activity of intact cells and even cell extracts was only marginally affected at high concentrations, with the observation of cytostatic activity and cell cycle arrest of promastigotes. However, the cytotoxic effects were only observed for infected J774 macrophages, which impaired further analysis of the amastigote infection. Therefore, the proteolytic inhibition in intact *L. amazonensis* and *L. infantum* promastigotes had no relationship to the cytostatic activity, which emphasizes that these dipeptidyl nitriles act through another mechanism of action.

1. Introduction

Leishmaniasis is a disease caused by different species of the protozoa from genus *Leishmania* with various stages and morphologies during their life cycle (Kaye and Scott, 2011). Currently, about 350 million people are in endemic areas, becoming a major health concern all over the world (Trinconi et al., 2016). Natural transmission of leishmaniasis occurs when metacyclic promastigotes get in contact with the bite of an infected vector from genus *Phlebotomus* that feeds on mammalian blood (Sacks and Noben-Trauth, 2002). Pentavalent antimonials are the main drugs used to treat leishmaniasis (along with amphotericin B and some other drugs as a second line therapy) and commonly lead to harsh side effects in patients. New formulations of miltefosine (Vicent et al., 2014) and amphotericin B (Bruno et al., 2015) are now under development with the aim to reduce host cell toxicity, but they still have limited efficacy, often leading to the detection of resistant parasites (Trinconi et al., 2016).

Drug discovery efforts usually rely on the study of modulators of

macromolecular targets deemed as validated for a disease (Almeida et al., 2015). Proteases are essential for many cellular processes linked to virulence and parasite survival being attractive targets for drug discovery programs. Among these proteins, cysteine peptidases (CPA, CPB and CPC) are the most familiar and characterized ones (Caroselli et al., 2012). CPB is expressed by *Leishmania* spp., and it is present in many isoforms during the life cycle of the parasite (Wyllie et al., 2012). Its main role in the infection process involves the evasion of the immune system by the cleavage of digestive enzymes inside of the parasitophorous vacuole of the host cell (Brandt et al., 2016). Many works report the importance of CPB as a virulence factor for *Leishmania* sp., in which CPB-deficient parasites presented reduced infection capability using *in vitro* and *in vivo* models (Denise et al., 2003; Casgrain et al., 2016). Besides the reduced virulence, the absence of CPB led to impairment of the intracellular parasite replication (Saraiva et al., 2006). Also, other roles are played by proteases during the parasitism (Williams et al., 2006).

The decrease of protozoan growth is an approach under scrutiny,

* Corresponding author.

E-mail addresses: quilles@usp.br (J.C. Quilles), daianetezuka@yahoo.com (D.Y. Tezuka), cduquelopes@gmail.com (C.D. Lopes), felicitia.ribeiro@gmail.com (F.L. Ribeiro), charles.laughton@nottingham.ac.uk (C.A. Laughton), carlos.montanari@usp.br (S. de Albuquerque), sdalbuquerque@fcfrp.usp.br (C.A. Montanari), andleita@iqsc.usp.br (A. Leitão).

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.04.001>

Received 27 January 2018; Received in revised form 14 February 2019; Accepted 1 April 2019

Available online 05 April 2019

0014-4894/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Chitosan-laponite nanocomposite scaffolds for wound dressing application

Virgínia de A. M. Gonzaga¹ | Alessandra L. Poli¹ | Juliana S. Gabriel¹ |
 Daiane Y. Tezuka¹ | Talita A. Valdes¹ | Andrei Leitão¹ | Camila F. Rodero² |
 Taís M. Bauab³ | Marlus Chorilli² | Carla C. Schmitt¹

¹São Carlos Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brazil

²Department of Drugs and Medicine, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Araraquara, São Paulo, Brazil

³Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Araraquara, São Paulo, Brazil

Correspondence

Virgínia de A. M. Gonzaga, São Carlos Institute of Chemistry, University of São Paulo, Av. Trabalhador sancarlense, São Carlos, São Paulo, Brazil.
 Email: virginiagonzaga@usp.br

Funding information

CNPq, Grant/Award Numbers: 164349/2013-8, 304579/2016-5

Abstract

The pivotal issue of skin regeneration research is the development of effective biomaterials that exhibit biological activities as fungicide and bactericide, combining simple and low cost manufacturing technologies. In this context, nanocomposite scaffolds based on chitosan (Ch)/Laponite (Lap) were produced by using different concentrations of Lap via freeze-drying process for potential application in skin regeneration. The influence of Lap concentration on the scaffold properties was evaluated. The prepared scaffolds were characterized by x-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), porosity, swelling capacity, and mechanical analyses. The results revealed that the scaffolds exhibited a porous architecture, besides the increase in the clay content, leads to an increase in the porosity, an improvement of mechanical strength, and a decrease of swelling capacity. In vitro tests were also carried out to evaluate the biocompatibility of the materials, such as bioadhesion, antibacterial activity, viability, and cell adhesion. Viability and cell adhesion demonstrated that all scaffolds were not cytotoxic and the fibroblast cells readily attached on the surface of the scaffolds. Thereby, the results suggested that the nanocomposite scaffolds are biomaterials potentially useful as wound dressings.

KEYWORDS

chitosan, laponite, nanocomposite scaffolds, wound dressing

1 | INTRODUCTION

The skin is the largest organ of the human body and plays several essential functions, such as thermal regulation, organic defense, and protection against external agents. Additionally, it performs sensorial functions of heat protection, cold, pressure, pain, and touch (Moghaddam, Raji, Mavaffagh, Yazdi, & Mahmoudi, 2014). When a skin injury occurs, the healing process begins, involving a complex sequence of events such as hemostasis, inflammation, granulation, and tissue remodeling. Skin lesions may be acute, such as abrasions, cuts, penetration of objects, surgical incisions, burns, shocks, and

contact with corrosive substances or chronic (diabetes, persistent infections, thrombosis, and edema) (Zarrintaj et al., 2017).

Despite assorted types of wound dressings available, only a few fulfill an ideal wound dressing characteristics such as provide protection on the injured site, absorption of wound exudates, allow exchange of gases and promote the acceleration of the tissue repair process (Boateng, Matthews, Stevens, & Eccleston, 2008; Zarrintaj et al., 2017). Therefore, the development of an ideal wound dressing or modern wound dressing is a growing field that offers new perspectives in the treatment of skin lesions and it has been focused to achieve the ideal wound dressing containing the aforementioned properties.

Contents lists available at ScienceDirect

Inorganica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ica

Research paper

Crystal structure, *anti-Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of Cu(II) complexes bearing β -diketone and α -diimine ligands

Drielly A. Paixão^a, Barbara C.A. de Oliveira^a, Janaina do Couto Almeida^a, Luana M. Sousa^a, Carla D. Lopes^b, Zumira A. Carneiro^b, Daiane Y. Tezuka^b, Juan Carlos T. Clavijo^c, Javier Ellena^d, Lorena Polloni^e, Pedro H.A. Machado^e, Sérgio de Albuquerque^b, Robson J. de Oliveira Júnior^e, Silvana Guilardi^a, Wendell Guerra^{a,*}

^a Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

^b Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

^d Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

^e Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Copper(II) complexes
 β -Diketones
Cancer
Cytotoxic activity
Chagas disease

ABSTRACT

Three novel copper(II) complexes were synthesized: $[\text{Cu}(\text{tfa})_2]$ (I), $[\text{Cu}(\text{tfa})(\text{dmb})(\text{NO}_2)] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (II) and $[\text{Cu}(\text{tfa})(\text{nphen})(\text{NO}_2)]$ (III), where tfa = 4,4,4-trifluoro-1-(2-furyl)-1,3-butanedione, nphen = 5-nitro-1,10-phenanthroline and dmb = 4,4-dimethoxy-2,2-bipyridine. They were characterized by elemental analysis, conductivity measurements, FT-IR, UV–Vis and single-crystal X-ray diffraction. The X-ray crystal structures of I, II and III reveal that the β -diketone coordinates via the oxygen atoms, while the heterocyclic bases coordinate via their two nitrogen atoms. The cytotoxic activity of I, II and III was investigated in two tumor cell lines (Ehrlich tumor and sarcoma 180) and in a non-tumor cell line (myoblast C2C12). Complex III exhibited good activity (IC_{50} Ehrlich = 15.75 μM and IC_{50} sarcoma 180 = 16.90 μM) and selectivity ($\text{SI} > 4$) in both tumor cell lines. Subsequently, it was found that III also present good activity against *Trypanosoma cruzi*.

1. Introduction

Nowadays, many copper complexes are being developed as potential anticancer agents [1]. An interesting example is the family of complexes known as Casiopéinas®, recently approved for clinical trials [2,3]. As to the metal ion, copper is an essential trace element important for the function of various biologically important enzymes [4]. It is also involved in the development and progression of cancer, which makes it very interesting in the design and development of safe and effective chemotherapeutic agents [1]. In view of these facts, we have designed and carried out biological studies with Cu(II) complexes [2,5–9]. For instance, we showed that Cu(II) complexes bearing α -diimines and β -diketones as chelating ligands are very active against the K562 cell line, displaying IC_{50} values in the micromolar range [8,9]. One of them, $[\text{Cu}(\text{bta})(\text{phen})\text{ClO}_4]$, [(bta = 4,4,4-trifluoro-1-phenyl-1,3-butanedione) and (phen = 1,10-phenanthroline)], was selected for further studies due to its potential to induce DNA-damage and lead to

G0/G1 checkpoint arrest, with consequent induction of cell death. This phenomena might be a result of autophagy dysfunction, culminating in apoptosis induction [10] and would indicate that ternary copper complexes containing β -diketones are promising anticancer agents. Indeed, in recent years, other research groups have also evaluated the anticancer potential of Cu(II) complexes with β -diketones and obtained good results [11–13].

Considering other possibilities, we have verified that copper complexes containing α -diimine ligands showed potent activity against *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), the etiologic agent of Chagas disease [14,15]. For example, a copper complex containing 4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine and 4-methoxybenzhydrazide as co-ligand was able to reduce parasitemia by 64% at the peak of infection, which indicates that such compounds can be useful for the design of new antichagasic drugs [15]. Previously, we demonstrated that analogous complexes are promising anticancer agents [2,7]. In the literature, it is speculated that metabolic pathways of kinetoplastid parasites are supposed to be

* Corresponding author at: Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, João Naves de Ávila Avenue, 2121, Campus Santa Mônica, 38.400-902, Uberlândia, MG, Brazil.

E-mail address: wendell.guerra@ufu.br (W. Guerra).

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119164>

Received 18 June 2019; Received in revised form 19 September 2019; Accepted 20 September 2019

Available online 21 September 2019

0020-1693/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.