

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

BRUNO ACUÑA LAROCA

Estudo da atividade biológica de inibidores de cisteíno catepsinas
antineoplásicos em linhagens celulares de câncer de pâncreas (MIA
PaCa-2 e BxPC-3)

São Carlos
2022

BRUNO ACUÑA LAROCA

Estudo da atividade biológica de inibidores de cisteíno catepsinas antineoplásicos em linhagens celulares de câncer de pâncreas (MIA PaCa-2 e BxPC-3)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Andrei Leitão

Versão corrigida

São Carlos, 2022

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

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

Laroca Acuña, Bruno

L326 Estudo da atividade biológica de inibidores de cisteíno catepsinas antineoplásicos em linhagens celulares de câncer de pâncreas (MIA PaCa-2 e BxPC-3) / Bruno Acuña Laroca; orientador Andrei Leitão. São Carlos, 2022.

Dissertação (Mestrado) - Programa de

Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia e Área de Concentração em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 2022.

1. Câncer de pâncreas. 2. Cisteíno catepsina. 3. Composto antineoplásico. 4. Cultura celular. 5. Morte celular. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Bruno Acuña Laroca

Título: “Estudo da atividade biológica de inibidores de cisteíno catepsinas antineoplásicos em linhagens celulares de câncer de pâncreas (MIA PaCa-2 e BxPC-3)”

Data da defesa: 25/04/2022

Comissão Julgadora	Resultado
Prof(a). Dr(a). Andrei Leitão UFSCar - Orientador	<u>Não Votante</u>
Prof(a). Dr(a). Patrícia Pintor dos Reis UNESP	<u>Aprovado</u>
Prof(a). Dr(a). João Agostinho Machado Neto ICB/USP	<u>Aprovado</u>
Prof(a). Dr(a). Carolina Camargo de Oliveira UFPR	<u>Aprovado</u>

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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, devo agradecer às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro dado a mim e ao laboratório para que a pesquisa fosse feita por mim e todos os estudantes e pesquisadores.

Gostaria de agradecer e muito meu orientador, professor Andrei, que sempre esteve disponível para orientar, responder perguntas e trabalhar juntos no desenvolvimento do trabalho, certamente tornando a experiência enriquecedora.

Gostaria de agradecer a todas as pessoas com quem trabalhei durante o mestrado, que é algo que não se faz sozinho e ter a companhia e ajuda no processo tornou tudo mais fácil, além de ter criado amizades muito importantes no caminho.

Não poderia ter desenvolvido meu mestrado sem a companhia de minha namorada Pollyana, que também mestranda sabe dos desafios e juntos sempre conseguimos ir encontrando a melhor forma para vencer as dificuldades, ainda mais em tempos tão difíceis.

Tenho de agradecer a família da Pollyana, que nesses anos todos se tornaram também minha família e que sempre que precisei estavam presentes para ser um apoio.

Ao meu pai, mãe e irmã, a quem sou muito grato, sempre me apoiando em quaisquer decisões que eu tomasse e que têm um grande papel em todas as conquistas que eu realizei, sejam relacionadas aos estudos ou não.

E por último, minhas duas avós que são pessoas incríveis e que me ensinam muito em todos os momentos.

RESUMO

LAROCA, A. B. **Estudo da atividade biológica de inibidores de cisteína catepsinas antineoplásicas em linhagens celulares de câncer de pâncreas (MIA PaCa-2 e BxPC-3).** 2022. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

O câncer é um grupo de doenças heterogêneas que pode começar em qualquer órgão ou tecido quando células crescem descontroladamente, podendo sair dos limites de sua localização natural (OMS). O Câncer pancreático é o sétimo em número de mortes globalmente com 466.003 mortes e 495.773 novos casos em 2020 e a menor sobrevida após 5 anos de todos os tipos de câncersólidos. Os lisossomos são organelas conhecidas principalmente como local de digestão celular, com cerca de 40 diferentes tipos de enzimas e são chave para a degradação de proteínas, desempenhando papel importante no metabolismo e sinalização intracelular. Estão envolvidos em sinalização metabólica, regulação gênica, imunidade, apresentação de antígenos, reparo da membrana plasmática, adesão celular, migração, apoptose, invasão tumoral e metástase. As cisteína catepsinas, que estão concentradas no sistema endolisossomal, possuem importantes funções comodegradação proteica oriunda de fagocitose, endocitose, autofagia e câncer. Mudanças na sua expressão/atividade e localização estão associadas a diversos tipos de câncer. Em nosso grupo de pesquisa, derivados de dipeptidil nitrilas que atuam como inibidores covalentes reversíveis de cisteína proteases têm sido estudados com atividade antiparasitária e antineoplásica. Desta forma, foram analisados 16 compostos com o objetivo de identificar novas substâncias bioativas derivadasde dipeptidil nitrilas com atividade antineoplásica a partir de ensaio do perfil citotóxico com linhagens de câncer de pâncreas (BxPC-3 e MIA PaCa-2). Através do ensaio de viabilidade celular por MTT, dos 16 compostos, 4 apresentaram perfilcitotóxico, com destaque para o composto 831 que apresentou IC50 igual a 14,41 μM na linhagem BxPC-3 e índice de seletividade igual a 1,67 em relação a linhagem não tumoral BALB/3T3 clone A31. O estudo da morfologia celular com microscopia de epifluorescência de células administradas com o composto 831 indicou a presença de importante formação de vacúolos na linhagem BxPC- 3, negativos para o marcador lisossomal LysoTracker, com mais estudos sendo necessários para a compreensão da biologia do processo. A resposta do composto 831 na linhagem MIA PaCa-2 foi distinta, sem formação de vacúolos, com observação de núcleos fragmentados típicos de núcleo em morte tipo apoptose. Outros marcadores utilizados para a linhagem MIA PaCa-2 foram utilizados (laranja de acridina e despolarização de membrana mitocondrial) fazendo parte de estudos fenotípicos. Os resultados observados na linhagem BxPC-3 indicam que os inibidores de dipeptidilnitrilas podem atuar no processo autofágico ou ainda levar a um tipo de morte celular com formaçãode vacúolos e que devem ser investigados em mais detalhe.

Palavras-chave: Câncer de pâncreas. Cisteína catepsina. Composto antineoplásico. Cultura celular. Morte celular.

ABSTRACT

LAROCA, A. B. **Study of the biological activity of antineoplastic cysteine cathepsin inhibitors in pancreatic cancer cell lines (MIA PaCa-2 and BxPC-3)**. 2022. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

Cancer is a group of heterogeneous diseases that can start in any organ or tissue when cells grow uncontrollably, leaving the limits of their natural location (WHO). Pancreatic cancer is the seventh in the rank of deaths globally, with 466,003 deaths and 495,773 new cases in 2020. It has the lowest 5-year survival among all solid cancers. Lysosomes are organelles known primarily as the site of cellular digestion, with about 40 different types of enzymes, and are key for protein degradation, playing an important role in intracellular metabolism and signaling. They are involved in metabolic signaling, gene regulation, immunity, antigen presentation, plasma membrane repair, cell adhesion, migration, apoptosis, tumor invasion, and metastasis. Cysteine cathepsins are concentrated in the endolysosomal system, having important functions such as protein degradation arising from phagocytosis, endocytosis, autophagy and cancer. Changes in its expression/activity and location are associated with several types of cancer. Our research group has studied dipeptidyl nitrile derivatives that act as reversible covalent inhibitors of cysteine proteases with antiparasitic and antineoplastic activity. In this way, 16 compounds were analysed to identify new bioactive substances derived from dipeptidyl nitriles with antineoplastic activity from a cytotoxic profile assay with pancreatic cancer strains (BxPC-3 and MIA PaCa-2). Out of 16 compounds, 4 showed a cytotoxic profile, especially compound 831, which showed an IC₅₀ equal to 14.41 μM in the BxPC-3 cell line and a selectivity index equal to 1.7 in relation to the non-tumour cell line BALB/3T3 clone A31. The study of cell morphology with epifluorescence microscopy of cells administered with compound 831 indicated the presence of important vacuole formation in the BxPC-3 cell line, negative for the lysosomal marker Lysotracker, with further studies being necessary to understand the biology of the process. The response of compound 831 in the MIA PaCa-2 cell line was distinct, without the formation of vacuoles, with the observation of fragmented nuclei typical of apoptosis-like death. Other markers used for the MIA PaCa-2 cell line (acridine orange and mitochondrial membrane potential) were used in phenotypic studies. The results observed in the BxPC-3 lineage may indicate that dipeptidyl nitrile inhibitors can act in the autophagic process or even lead to a type of cell death with vacuole formation, which should be investigated in more detail.

Keywords: Pancreatic cancer. Cysteine cathepsin. Antineoplastic compound. Cell culture.
Cell death

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Exemplo de inibidor de cisteíno protease desenvolvido no NEQUIMED codificado com Neq0409.....	31
Figura 2 Estruturas moleculares dos compostos de referência utilizados no presente estudo: doxorubicina (à esquerda) e gencitabina (à direita).....	33
Figura 3 Análise comparativa da imagem de microscopia de campo claro com objetiva de 10x da linhagem de fibroblasto de camundongo BALB/3T3 clone A31 em cultura no laboratório (A) e do banco de células ATCC (B).....	39
Figura 4 Análise comparativa da imagem de microscopia de campo claro com objetiva de 10x da linhagem MIA PaCa-2 em cultura no laboratório (A) e do banco de células ATCC (B).....	40
Figura 5 Análise comparativa da imagem de microscopia de campo claro com objetiva de 10 x da linhagem BxPC-3 em cultura no laboratório (A) e do banco de células ATCC (B).....	40
Figura 6 Gráfico da Linearidade celular de BALB/3T3 clone A31, BxPC-3 e MIA PaCa-2.....	49
Figura 7 Gráfico de Sensibilidade Celular ao DMSO em BxPC-3 e em MIA PaCa-2.....	51
Figura 8 Curva de crescimento de MIA PaCa-2 e BxPC-3 ao longo de sete dias de incubação	52
Figura 9 Ensaio de curva concentração resposta (CCR) para o composto referência Doxorubicina (controle positivo) nas três linhagens utilizadas no estudo	53
Figura 10 Ensaio de curva concentração-resposta (CCR) para o composto referência gencitabina (controle positivo) nas três linhagens utilizadas no estudo.....	55
Figura 11 Análise da citotoxicidade pelo método de MTT para 16 compostos derivados de dipeptidil nitrilas realizadas em duas concentrações (100 μ M e 10 μ M) após 72 h de incubação na linhagem tumoral BxPC-3bina (controle positivo) nas três linhagens utilizadas no estudo	56
Figura 12 Análise da citotoxicidade pelo método de MTT para 16 compostos derivados de dipeptidil nitrilas realizadas em duas concentrações (100 μ M e 10 μ M) após 72 h de incubação na linhagem tumoral MIA PaCa-2.....	57
Figura 13 Análise da citotoxicidade pelo método de MTT para 16 compostos derivados de dipeptidil nitrilas realizadas em duas concentrações (100 μ M e 10 μ M) após 72 h de incubação na linhagem não tumoral BALB/3T3 clone A31	57

Figura 14 Curva Concentração Resposta dos compostos citotóxicos (831, 832, 850, 851) para as linhagens MIA PaCa-2, BALB/3T3 clone A31 e BxPC-3, e IC50, R² e Sy.x correspondentes. SE = Erro Padrão58

Figura 15 - Microscopia em campo claro e de epifluorescência com a linhagem de câncer de pâncreas BxPC-3. Em A (campo claro), B (núcleos marcados com Hoechst 33342) e C (sobreposição de A e B) temos células BxPC-3 sem nenhum tratamento (controle negativo). Em D (campo claro), E (núcleos marcados com Hoechst 33342) e F (sobreposição de D e E) temos células BxPC-3 com tratamento do composto 831 ([IC₅₀]). As setas vermelhas indicamos vacúolos observados nas células tratadas com o composto 831. As áreas demarcadas em vermelho indicam a localização de núcleos próximos uns aos outros, possivelmente compartilhando os mesmos vacúolos. Aumento de 60X na objetiva.....61

Figura 16 : Microscopia de epifluorescência com diversos marcadores na linhagem de câncer de pâncreas MIA PaCa-2. As imagens mostram os núcleos marcados em azul com Hoechst 33342. (A) células sem tratamento (controle negativo). (B) células tratadas com doxorubicina ([IC₅₀]). (C) células tratadas com gencitabina ([IC₅₀]). (D) células tratadas com o composto 831 ([IC₅₀]). As setas vermelhas indicam núcleos fragmentados característicos de célula em processo de apoptose. Aumento de 100x e 600x64

Figura 17 Análise da acidez das organelas nas células MIA PaCa-2. Em A temos um painel de imagens das células com o controle negativo, células tratadas com doxorubicina ([IC₅₀]), gencitabina ([IC₅₀]) e 831 ([IC₅₀]), utilizando os marcadores Hoechst 33342 para o núcleo e laranja de acridina para o núcleo (verde) e regiões ácidas (vermelho). Em B temos as imagens com sobreposição de marcadores em maior tamanho para melhor visualização. Aumento de 600X.....66

Figura 18 Análise da polarização da membrana da mitocôndria na linhagem MIA PaCa-2. Em A temos um painel com o controle negativo, células tratadas com doxorubicina ([IC₅₀]), gencitabina ([IC₅₀]) e 831 ([IC₅₀]), utilizando os marcadores Hoechst 33342 para o núcleo e potencial de membrana das mitocôndrias despolarizadas (verde) e mitocôndrias funcionais (vermelho). Em B temos as imagens com sobreposição de marcadores em maior tamanho para melhor visualização. Em C temos a razão da quantificação de fluorescência entre as colorações realizada no programa ImageJ. Aumento de 600X.67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Série de 16 compostos derivados de dipeptidil nitrilas utilizadas na triagem do estudo	38
Tabela 2 – Valores de IC50 e R2 e Sy.x para Doxorubicina em BALB/C 3T3 A31, MIA PaCa-2 e BxPC-3. SE = Erro Padrão	53
Tabela 3 – Valores de índice de seletividade (SI) dos compostos citotóxicos presentes no estudo	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INCA - Instituto Nacional de

Câncer EMT - Transição

Epitélio MesenquimalECM -

Matriz Extracelular

CP - Câncer Pancreático

PDAC - Adenocarcinoma Ductal de

PâncreasMT - Microambiente

Tumoral

ROS - Espécies Reativas de

Oxigênio TAMs - Macrófagos

Associados a TumorMCR - Morte

Celular Regulada

MCP - Morte Celular Programada

DAMPs - Padrões Moleculares Associados

ao DanoNT - Transportadores de

Nucleosídeos

DMSO - Dimetilsulfóxido

MTT - brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-

difeniltetrazólioBCRJ - Banco de células do Rio de

Janeiro

SUMÁRIO

1. Introdução	19
1.1 Câncer	19
1.2 Metástase	20
1.3 Câncer de Pâncreas	21
1.4 Estruturas e aspectos celulares de interesse	23
1.4.1 Lisossomos	23
1.4.2 Autofagia	24
1.4.3 Cisteíno Catepsinas	26
1.4.4 Morte celular	28
1.4.5 Mitocôndria	29
1.5 Ensaios fenotípicos	30
1.6 Substâncias Químicas	31
1.6.1 Novas Substâncias em Prospecção	31
1.6.2 Substâncias de referência	32
2. Objetivos	35
2.1 Objetivos gerais	35
2.2 Objetivos específicos	35
3. Materiais e Métodos	37
3.1 Materiais	37
3.2 Substâncias Químicas	38
3.3 Linhagens e Manutenção Celular	38
3.3.1 Linhagens e meios de cultura	39
3.4 Manutenção das células	41
3.5 Substâncias químicas	41
3.6 Ensaios celulares	42
3.6.1 Análise de viabilidade celular	42
3.6.2 Ensaios de curva de crescimento celular	43
3.6.3 Ensaio de sensibilidade celular ao DMSO	44
3.6.4 Padronização de citotoxicidade celular a doxorrubicina	44
3.6.5 Padronização de citotoxicidade celular a gencitabina	44
3.6.6 Triagem de compostos derivados de dipeptidil nitrilas	45
3.6.7 Ensaio de curva concentração resposta	45
3.6.8 Ensaios de microscopia de fluorescência	45
4. Resultados e Discussão	49
4.1 Linearidade celular	49
4.2 Análise da concentração de DMSO tolerável pelas células	50

4.3 Estudo da curva de Crescimento para as linhagens MIA PaCa-2 e BxPC-3	51
4.4 Estudo da citotoxicidade da Doxorrubicina	53
4.5 Estudo da citotoxicidade da gencitabina	54
4.6 Triagem dos compostos derivados de dipeptidil nitrilas	56
4.7 Curva concentração-resposta dos compostos citotóxicos	58
4.8 Estudo da morfologia celular	60
4.8.1 Estudo da morfologia celular – alterações originadas pela ação do composto 831 em BxPC-3	60
4.8.2 Resposta celular da linhagem MIA PaCa-2 para o composto 831	63
4.8.3 Diferenças de resultados entre as linhagens de câncer de pâncreas e o papel dos lisossomos	68
5. Conclusões e perspectivas	71
6. Referências Bibliográficas	73

1. Introdução

1.1 Câncer

Das várias definições dadas ao câncer, uma delas, dada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) diz se tratar de um grupo de doenças heterogêneas que podem começar em qualquer órgão ou tecido quando células crescem descontroladamente, podendo sair dos limites de sua localização natural. No entanto, o câncer não é apenas um conjunto de células anormais com replicação descontrolada, mas sim um conjunto de doenças complexas com mecanismos que envolvem vários processos a níveis celulares e globais no organismo. É importante entender que os mecanismos observados nas células tumorais não são inovadores, mas manipulações de mecanismos já encontrados nas células em homeostase a benesse do desenvolvimento tumoral. O conhecimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento tumoral é de supra importância para determinar possíveis estratégias e desenvolvimento de novas terapias alvo específicas (SENGA; GROSE, 2021).

O conjunto de mecanismos associados à progressão tumoral ficou conhecido como propriedades do câncer e descreve os principais eventos que ocorrem de forma concomitante ao longo do desenvolvimento tumoral, culminando na migração e invasão. As principais propriedades são: autossuficiência em estimuladores de crescimento, insensibilidade para inibidores de crescimento, invasão tecidual e metástase, potencial ilimitado de replicação, estímulo de formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e evasão de apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2000). A reprogramação do metabolismo e a evasão do sistema imune foram as últimas propriedades a serem adicionados (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Assim como os mecanismos explicados acima são complexos, as causas também seguem esse padrão, e são multifatoriais, com fatores genéticos e ambientais de forma conjunta sendo os grandes responsáveis pelo surgimento de células cancerosas. De acordo com o National Institute of Health (NIH), mutações genéticas tem um papel fundamental em 5 a 10% dos casos de câncer, enquanto que os fatores ambientais representam os maiores riscos para o surgimento de câncer, com tabaco, álcool, dieta, poluição, falta de exercício físico, estresse, exposição a carcinógenos (relacionados ao trabalho), pesticidas e toxinas sendo as principais causas (RAHMAN; SURESH; WALY, 2018). De forma preocupante, as estatísticas mostram que os casos de câncer e as mortes pela doença têm aumentado ao longo do tempo, e esses números estão relacionados com o envelhecimento e aumento da população, além de mudanças no estilo de vida que expõem as pessoas cada vez mais a fatores de risco. Esse aumento pode ser visto ao comparar os dados de incidência e morte disponibilizados pela International Agency for

Research on Cancer (IARC). Globalmente, em 2012 foram estimados 14,1 milhões de novos casos (excluindo câncer de pele não melanoma) e 8,2 milhões de mortes (excluindo câncer de pele não melanoma) (IARC). Já em 2020 foram estimados 18,1 milhões de novos casos (excluindo câncer de pele não melanoma) e 9,9 milhões de mortes (excluindo câncer de pele não melanoma) por câncer no mundo (IARC). O cenário brasileiro de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) foi estimado em 626.030 novos casos e 232.030 novas mortes em 2020.

Desse número de mortes, a metástase é responsável por substancial parte. Muitos estudos mostram que até 90% das mortes ocorrem por metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000), enquanto outros estudos atribuem 66% das mortes (DILLEKÅS; ROGERS; STRAUME, 2019). De toda forma, é uma estatística importante e que deve ser levada em consideração para direcionar esforços em pesquisa da biologia do processo metastático e terapias mais efetivas para tumores de estágio mais avançado.

1.2 Metástase

O avanço da doença de tumor primário localizado para novas colônias distantes do tumor primário se chama cascata de invasão metastática, e possui algumas etapas básicas: escape de células do tumor primário, intravasão, sobrevivência, extravasão e colonização (PAUL; MISTRITIS; KONSTANTOPOULOS, 2017) com diversos eventos biológicos observados durante esta progressão metastática (TALMADGE; FIDLER, 2010).

Um deles, a transição epitélio mesenquimal (EMT), é um programa celular reversível que torna células epiteliais em um estado semi-mesenquimal (NIETO, 2009) e ocorre na embriogênese, processo de cicatrização e em migração/invasão em câncer (KALLURI, 2009). No contexto de metástase, as células malignas perdem traços epiteliais e adquirem traços mesenquimais, como motilidade, maior capacidade de invasão e habilidade de degradar componentes da matriz extracelular (ECM), facilitando a migração/invasão (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017). Há também a repressão da expressão de moléculas de adesão, como a E-caderina, importantes para a manutenção das células aderidas umas às outras (TERRY et al., 2017).

Além disso, células em EMT são capazes de regular a atividade antitumoral, sendo mais resistentes à morte por células do sistema imune e dificultam a eficácia de tratamentos quimioterápicos e imunoterapia (TERRY et al., 2017).

Outro fator-chave que promove o desenvolvimento tumoral in situ até tumores mais agressivos e metastáticos é a instabilidade genômica (YAO; DAI, 2014). Ao longo de gerações

de células tumorais em rápida divisão celular, a instabilidade genômica gera inúmeras subpopulações com seus respectivos perfis genéticos e que conferem heterogeneidade tumoral (CARTER, 2006). Esses subclones podem ser vistos de forma evolutiva, com variações genéticas trazendo vantagens sobre outros clones, seja evasão do sistema imune ou resistência a tratamentos quimioterápicos e seriam uma das grandes causas de tratamento malsucedido e resultando em recidivas (NOWELL, 1976).

As interações celulares com a ECM são determinantes para o fenótipo celular (WINKLER, 2020). A migração e invasão celular têm ligação direta com modificações biofísicas e bioquímicas da matriz extracelular (EGEBLAD; RASCH; WEAVER, 2010) promovidas por cerca de 700 proteínas, dentre elas as cisteíno catepsinas, as quais resultam em mudanças na abundância, estrutura e organização dos componentes da ECM, mudando o destino celular (NABA, 2016). São quatro os principais processos na remodelação da ECM: deposição da ECM, mudanças químicas pós-translacionais, degradação proteolítica e remodelação física (WINKLER, 2020). Células tumorais e associadas ao tumor modificam estes quatro mecanismos, estimulando a progressão tumoral (KAI; DRAIN; WEAVER, 2019).

A ECM é clivada por diversas classes de proteases, dentre elas proteases que clivam em resíduos de aminoácidos e que são secretadas em maior parte por células do estroma e por células tumorais (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010). Essas proteases ao degradarem a ECM normal, abrem espaço para a substituição por uma ECM mais favorável à progressão tumoral que facilita a motilidade das células cancerosas e liberam fatores de crescimento previamente ligados a moléculas da ECM original (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010). A ECM remodelada facilita a migração celular e invasão no estroma (KAI; DRAIN; WEAVER, 2019); a degradação dos componentes da ECM é crucial para a movimentação das células através da matriz ao abrir caminhos de migração além de reduzir o estresse mecânico das células em migração (WOLF, 2013).

1.3 Câncer de Pâncreas

O câncer pancreático (CP) é o sétimo em número global de mortes com 496 mil novos casos e 466 mil novos casos em 2020 para ambos os sexos e todas as idades (MATHUR, 2020). No Brasil, segundo o INCA, no ano de 2019, o CP esteve entre os dez tipos de câncer mais incidentes em ambos os sexos, foi o sétimo em número de mortes para homens (5.905) e quinto em mulheres (5.893).

O adenocarcinoma ductal de pâncreas (PDAC), que compreende aproximadamente 90% dos casos de CP (ADAMSKA; DOMENICHINI; FALASCA, 2017), tem a menor sobrevida

após 5 anos de todos os tipos de câncer sólidos. São várias as razões para esse prognóstico, dentre elas a dificuldade de um diagnóstico precoce, uma vez que os sintomas frequentemente aparecem quando o estágio da doença já é avançado, contribuindo para um diagnóstico tardio. Além disso a falta de biomarcadores validados influencia em tratamentos pouco efetivos (MOFFAT; EPSTEIN; O'REILLY, 2019). De forma geral o tratamento para CP é feito por remoção cirúrgica, seguido de terapia adjuvante com gencitabina e capecitabina, variando também de acordo com o estágio do tumor no momento do diagnóstico (ROBATEL; SCHENK, 2022). Além disso, terapias neoadjuvantes são utilizadas para tumores avançados e de remoção cirúrgica impeditiva, sendo que pacientes diagnosticados com tumores em estágio III e IV realizam tratamento paliativo (KAMISAWA, 2016; ROBATEL; SCHENK, 2022). Conseguir realizar um diagnóstico precoce é de extrema valia para melhorar o prognóstico atual e identificar os fatores de risco se torna uma das estratégias principais (KAMISAWA, 2016). Consumo de cigarro (IODICE, 2008), pancreatite crônica (RAIMONDI, 2010) histórico familiar de CP (HRUBAN, 2010) e diabetes mellitus (BOSETTI, 2014) estão entre os principais fatores de risco.

A alta mortalidade do CP se deve também ao seu caráter agressivo e várias características de sua biologia explicam isso, tais como a perda de genes supressores de tumor, resposta imune inefetiva e características de seu microambiente tumoral (MT) (UZUNPARMAK; SAHIN, 2019) como desmoplasia, imunossupressão, baixa infiltração de células imunes e hipóxia, promovendo o crescimento tumoral e diminuição da atividade dos fármacos administrados (SARANTIS, 2020).

O CP possui uma grande variedade de vias de sinalização alteradas e que promovem a progressão tumoral. O fator de crescimento transformante alfa (TGF- α), fator de crescimento insulina símile-1 (IGF1), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e seus respectivos receptores de tirosina quinase ativam vias que por fim promovem migração e invasão (KLEEFF, 2016). Vias anti-apoptóticas e pró-sobrevivência tais como STAT3, NF- κ B e AKT também se encontram ativadas (WADDELL, 2015).

Mutações de muitos genes são encontrados no câncer de pâncreas, porém algumas são mais prevalentes. Mutações em KRAS são encontradas em mais de 90% dos tumores e a inativação dos genes *TP53*, *CDKN2A* e *SMAD4* ocorrem em taxas de mais de 50% (WADDELL, 2015). Somado ao cenário de dificuldades quanto ao diagnóstico, diversidade de vias de sinalização e genes mutados, temos a própria ineficácia dos tratamentos hoje utilizados na oncologia (em geral Gencitabina). A resistência ao tratamento quimioterápico ocorre tanto de forma intrínseca, com resistência desde o início do protocolo, quanto resistência adquirida, ocorrendo ao longo

do tratamento (AMRUTKAR; GLADHAUG, 2017). Uma vez que a fisiologia lisossomal e das cisteíno catepsinas tem um papel importante no processo de resistência quimioterápica (abordado no próximo tópico), o estudo de compostos que atuam regulando/inibindo esse processo se torna uma estratégia para atingir um maior sucesso no tratamento comparado ao que temos atualmente na oncologia (GEISLINGER et al., 2020).

1.4 Estruturas e aspectos celulares de interesse

Dado que o câncer de pâncreas possui, como discutido no item anterior, uma complexidade molecular e tratamentos inefetivos, novas substâncias bioativas devem ser desenvolvidas. O presente estudo tem como foco o desenvolvimento de compostos inibidores de cisteíno catepsinas e, para melhor compreensão, os próximos itens trarão informações de organelas e aspectos celulares importantes para o desenvolvimento do estudo.

1.4.1 Lisossomos

Os lisossomos são organelas conhecidas principalmente como o local de digestão celular. Possuem cerca de 40 diferentes tipos de enzimas (hidrolíticas, proteases, nucleases, glicosidases, lipases, fosfolipases, fosfatases e sulfatases) (BONAM; WANG; MULLER, 2019) e, portanto, são importantes para a degradação de proteínas e desempenham papel importante no metabolismo e sinalização intracelular (SETTEMBRE, 2013). A atividade das enzimas lisossomais é ótima em pH ácido (~ 5) e, para tal, a membrana do lisossomo possui uma bomba H^+ -ATPase, que através de clivagem de ATP transporta íons H^+ para dentro do lúmen lisossomal e mantém o pH ácido (ISHIDA et al., 2013). Cada célula de mamífero possui entre 50 e 1000 lisossomos distribuídos pelo citoplasma e, apesar de seu grande número e importante função primordial, teve por muito tempo o seu estudo negligenciado. Somente nos últimos anos novos avanços foram feitos sobre sua importância e biologia (BALLABIO; BONIFACINO, 2020). Os lisossomos estão envolvidos em sinalização metabólica, regulação gênica, imunidade, apresentação de antígenos, reparo da membrana plasmática, adesão celular, autofagia, migração, apoptose, invasão tumoral e metástase (LAWRENCE; ZONCU, 2019) e mudanças em sua função estão relacionadas com doenças neurodegenerativas metabólicas e câncer (BALLABIO; BONIFACINO, 2020).

Como exemplo da ascensão em importância do lisossomo para a biologia celular e suas variadas funções, a recente descoberta de que os lisossomos atuam como sensores de nutrientes celulares e que mTORC1 se associa ao lisossomo em situações específicas se tornou tema

importante na pesquisa atual (SANCAK, 2008; 2010; SAXTON, 2017).

Outro ponto relevante é a regulação do número, posicionamento e tamanho dos lisossomos, regulados a partir de estímulos intracelulares e extracelulares e que por consequência altera sua atividade (NEEFJES; JONGSMA; BERLIN, 2017; PU et al., 2016;). Mudanças no padrão de localização trazem consequências negativas para várias doenças, incluindo o câncer (DAVIDSON; VANDER HEIDEN, 2017). Subpopulações de localização periférica em células tumorais têm funções na adesão celular (PU et al., 2015; SCHIEFERMEIER et al., 2014), exocitose, invasão (BIAN et al., 2016; BRIX et al., 2014; RAFN et al., 2012), sinalização e morte celular. Um expressivo aumento dessa população lisossomal na periferia celular tem sido relatado em processos de malignidade, migração e invasão que ocorrem na tumorigênese (OLSON; JOYCE, 2015).

A exocitose das enzimas lisossomais acaba por degradar componentes da ECM e estes são internalizados e degradados por lisossomos, facilitando a invasão das células tumorais na ECM. Moléculas de adesão como E-caderina também são alvos que promovem o desenvolvimento tumoral (OLSON; JOYCE, 2015). Além disso, os lisossomos participam da progressão tumoral, através de processos como o aumento da macropinocitose, aumento do fluxo autofágico e regulação da expressão gênica que ativam a autofagia.

Os lisossomos também estão envolvidos em mecanismos de resistência quimioterápica ao sequestrar o fármaco para dentro de seu lúmen, acumulando-o e por consequência afastando-o do seu alvo molecular. Fármacos hidrofóbicos têm particular tendência a se acumular em lisossomos por se locomoverem facilmente nas membranas plasmáticas e lisossomais. Quando esses adentram o lisossomo, em que há um pH ácido, ocorre sua protonação, perdendo a capacidade de passar pela membrana do lisossomo e assim se direcionar ao citoplasma (GOTINK et al., 2011; JANSEN et al., 1999; KAUFMANN; KRISE, 2017). A diminuição da função do lisossomo pode ser benéfica em vários aspectos, pois pode levar a redução de sua atividade e função nos variados processos de progressão tumoral em que participa, além de mitigar a probabilidade da resistência aos fármacos e suas consequências terapêuticas maléficas (GEISLINGER et al., 2020).

1.4.2 Autofagia

Outro processo em que o lisossomo está diretamente envolvido é a autofagia, que é uma via intracelular catabólica estimulada por diversas condições de estresse, caracterizada pela reciclagem de componentes celulares para reutilização celular, degradando proteínas não funcionais ou desnecessárias, além de organelas para a manutenção da homeostase celular. É

um processo fundamental para proteção das células contra proteínas com perda de função, toxinas, manutenção do metabolismo e contribuição para a sobrevivência da célula (MIZUSHIMA, 2005; 2017). O aumento da autofagia é estimulado por vários fatores como a falta de oferta energética, privação de hormônios de crescimento, hipóxia, patógenos, dentre outros (GALLUZZI et al., 2014; KAUR, DEBNATH, 2015). Desta forma, é compreensível que a disfunção da autofagia celular contribua para a perda da homeostase, através de danos ao DNA, estresse metabólico, acúmulo de toxinas e proteínas defeituosas, além da tumorigênese. A perda de função da autofagia está relacionada com doenças como Alzheimer, Parkinson e câncer (NIXON, 2013; WHITE, 2012).

O processo autofágico ocorre a partir do sequestro de material intracelular por vesículas constituídas por duas membranas. É um evento sequencial, iniciado pela formação do fagoforo (membrana de isolamento), evoluindo a autofagossomo e autolisossomo, este último responsável pela degradação e reciclagem final gerada pela autofagia (KLIONSKY et al., 2011). O lisossomo é a organela que armazena as enzimas responsáveis pela degradação do conteúdo autofágico (HUANG et al., 2018).

A autofagia em câncer pode ter um papel de supressor ou promotor da tumoral, dependendo do contexto e momento observados durante a tumorigênese. Os níveis basais de autofagia protegem a célula ao promover a homeostase, reduzindo constituintes celulares danificados, reduzindo os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), promovendo a manutenção do metabolismo celular normal (TANG et al., 2010). A perda de função da autofagia resulta em um aumento do estresse bioquímico, que favorece o aumento de mutações genéticas, proteínas não funcionais e ROS, que favorece a progressão tumoral.

No entanto, em tumores avançados, a autofagia possui um papel promotor e atua na sobrevivência das células tumorais. A hipóxia e a privação de nutrientes, situação encontrada principalmente na região central de tumores, são um dos principais ativadores da autofagia, ajudando as células a superarem o estresse causado pela falta de oxigênio (LIU, RYAN, 2012; RABINOWITZ, WHITE, 2010). A autofagia complementa a alta demanda energética ao degradar componentes extracelulares, fornecendo substratos metabólicos às células do tumor. O elevado metabolismo das células tumorais traz como consequência um grande estresse bioquímico, que a autofagia ajuda a contornar, mantendo as células tumorais funcionais, auxiliando na sua sobrevivência (BOYA, REGGIORI, CODOGNO, 2013; WEI et al., 2011). Alguns tumores, como o câncer de pâncreas podem ter mutações em RAS, com aumentados níveis de autofagia, acelerando o crescimento tumoral, sobrevivência e oncogênese (GUO et al., 2011; KARNOUB, WEINBERG, 2008).

Além disso, a autofagia favorece o processo metastático ao proteger as células tumorais que encontram ambientes não favoráveis à sobrevivência quando deixam o tumor primário. Para migrar do local primário e se estabelecer em um sítio secundário, a célula tumoral deixa de estar envolta em matriz extracelular, o que pode causar um tipo de morte celular chamado de anoikis (GUADAMILLAS; CERESO; DEL POZO, 2011). A adaptação ao sítio secundário metastático também fornece condições não ideais às células tumorais e a autofagia tem papel protetor que favorece a sobrevivência e estabilização para concretização da metástase (AVIVAR-VALDERAS et al., 2013; CAI; YAN; XU, 2015). O aumento do processo autofágico também é observado em tumores apresentando resistência ao tratamento quimioterápico. A autofagia protege a célula dos danos causados pelo quimioterápico, por exemplo, favorecendo a resistência a tratamentos com 5-fluorouracil (PARK et al., 2013) e cisplatina (WANG.; WU, 2014). Desta forma, a autofagia se torna um alvo promissor para aumentar a eficiência dos tratamentos anticâncer com conhecidos reguladores de autofagia como rapamicina, cloroquina e hidroxicloroquina (HUANG et al., 2018).

1.4.3 Cisteíno Catepsinas

Há cerca de 600 proteases em humanos, das quais 11 fazem parte do grupo das cisteíno proteases (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X) (REISER et al., 2010), sendo expressas na forma de zimogênios inativos, fundamentais para a homeostase em condições fisiológicas (SOOND; KOZHEVNIKOVA; ZAMYATNIN, 2019). São em maioria endopeptidases, embora as catepsinas B, C, H e X apresentem atividade exopeptidase (VIZOVIŠEK; FONOVÍČ; TURK, 2019). As catepsinas estão concentradas no sistema endolisossomal, local em que possuem importantes funções como degradação proteica oriunda de fagocitose, endocitose e autofagia (DE DUVE, 2005) e resposta imune relacionada ao MHC-II (TURK et al., 2012). Sua atividade ótima ocorre em pH ácido, correspondendo com sua localização prevalente no sistema endolisossomal. Em pH neutro são inativadas, com exceção da catepsina S, onde a catepsina L é a mais sensível nesse aspecto (TURK et al., 1995). Sua localização no meio extracelular é associada a algumas doenças como as cardiovasculares, ósseas, articulares e diversos tipos de câncer (BRIX et al., 2015; OLSON; JOYCE, 2015; REPNIK et al., 2012). As cisteínocatepsinas também são encontradas no citoplasma, através por exemplo do escape dos lisossomos atuando em processos de inflamação e morte celular (DROGA-MAZOVEC et al., 2008) e no núcleo, atuando no ciclo celular, particularmente algumas isoformas de cisteíno catepsinas. Dentre elas, a isoforma de catepsina L, capaz de se translocar ao núcleo e aumentara proliferação de fibroblastos (GOULET et al., 2004). Outras isoformas também são encontradas para as

catepsinas B e S (SHI et al., 1992; TEDELIND et al., 2010).

No câncer, o pH ácido do microambiente tumoral (GERWECK; SEETHARAMAN, 1996) possibilita a atividade das cisteíno catepsinas no meio extracelular, cooperando para a progressão tumoral pela degradação de componentes da ECM (OLSON; JOYCE, 2015). Os macrófagos associados a tumor (TAMs) são as maiores fontes de cisteíno catepsinas no microambiente tumoral, porém outras células do estroma (incluindo as células tumorais) apresentam altos níveis de expressão e secretam catepsinas no microambiente tumoral (MOHAMED; SLOANE, 2006). As catepsinas trazem um fator complicador em seu estudo global por serem redundantes e terem a capacidade de se regularem entre si, ou seja, a inibição de uma cisteíno catepsina pode ser compensada pela maior expressão e atividade de outra cisteíno catepsina (SEVENICH, 2010), porém algumas atividades específicas foram designadas através de estudos. A catepsina B tem a capacidade de degradar a membrana basal (CHANG et al., 2009), a catepsina L atua estimulando o crescimento tumoral (ABBOUD-JARROUS et al., 2008), enquanto as catepsinas L e S favorecem a angiogênese (VEILLARD et al., 2011). Importantes moléculas de adesão são alvos das cisteíno catepsinas, como caderina-E e JAM-B, essenciais para a coesão celular (SOBOTIČ et al., 2015). As catepsinas B, L e S possuem menor especificidade e ampla atividade em inúmeros componentes da ECM como proteoglicanos, colágeno I, II, IV, IX, X, XI, fibronectina, osteocalcina, osteonectina e elastina são substratos (RUDZIŃSKA et al., 2019), mostrando a extensão com que atuam no contexto tumoral e de sua progressão, cooperando diretamente com o processo metastático.

1.4.3.1 Cisteíno catepsinas em câncer de pâncreas

As cisteíno catepsinas têm expressão aumentada em células tumorais, atuando em diversos mecanismos durante o desenvolvimento tumoral. Embora estejam concentradas na via endolisossomal, atuam em processos de morte celular e inflamação no citoplasma, regulação do ciclo celular no núcleo e sinalização celular em meio extracelular (KRAMER; TURK; TURK, 2017). As cisteíno catepsinas atuam clivando inúmeros componentes da matriz extracelular (colágeno I, II, IV, IX, X, XI, fibronectina, osteocalcina, osteonectina e elastina) e moléculas de adesão (E-Caderina, JAM-B, ALCAM, CD44) e receptores de vias importantes relacionadas a invasão e mobilidade celular como o EGFR (KRAMER; TURK; TURK, 2017; RUDZIŃSKA et al., 2019), demonstrando a extensão de sua atividade pró desenvolvimento tumoral e a sua elegibilidade como alvo para terapias de câncer, sobretudo pelo seu papel extracelular e favorecimento da metástase, causa primordial das mortes por câncer

(DILLEKÅS; ROGERS; STRAUME, 2019; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Para o CP a superexpressão de catepsinas não é diferente, contribuindo para o desenvolvimento tumoral (SULPIZIO et al., 2012). O desenvolvimento do presente estudo tem o enfoque em três catepsinas (B, L e S) e que apresentam atividades importantes em CP. A catepsina B atua na ativação de proenzimas, pró-hormônios e degradação da ECM (CHWIERALSKI; WELTE; BÜHLING, 2006; OHTA et al., 1994). Há um aumento dos níveis de mRNA de catepsina B no citoplasma de células de câncer de pâncreas, macrófagos e fibroblastos de amostras de PDAC e a imunorreatividade (imuno-histoquímica) da catepsina B foi encontrada em 96% das amostras de pacientes com tumor passível de remoção cirúrgica e se mostrou um preditor de recorrência após a remoção cirúrgica, estressando a ação na metástase (NIEDERGETHMANN et al., 2004). Em modelo de rato knockdown para catepsina B, há a diminuição da progressão tumoral, invasão e metástase (GOPINATHAN et al., 2012).

Assim como para a catepsina B, a catepsina L também tem imunorreatividade alta (90%) das amostras de tumores ressecáveis de CP, além de fibroblastos, macrófagos (NIEDERGETHMANN et al., 2004). Um modelo transgênico de camundongo RIPI-Tag2 (desenvolve câncer de pâncreas com 12-14 semanas de idade) ao ter a catepsina L inibida tem apoptose aumentada, além de redução de angiogênese (GOCHEVA et al., 2006; JOYCE et al., 2004). A catepsina S promove angiogênese, crescimento e invasão em CP (GOCHEVA et al., 2006; KWOK et al., 2011; WANG et al., 2006). Por imuno-histoquímica, foram detectados altos níveis de expressão de catepsina em modelos in vivo com lesões PanIn e estágios iniciais de PDAC (WANG., 2006).

1.4.4 Morte celular

A morte celular regulada (MCR) possui processos biológicos e maquinaria celular dedicada a ela, e, portanto, pode ser alvo de regulação farmacológica e genética (GALLUZZI et al., 2015; 2016).

A MCR pode ocorrer para a manutenção da fisiologia e homeostase corporal, chamada então de morte celular programada (MCP), ou pode ocorrer em resposta a um agente externo, seja físico, químico, biológico ou farmacológico. A morte celular ocorre quando a perturbação foi muito intensa a ponto da célula não ter mais mecanismos de retorno à homeostase, entrando então em processo de morte celular, que se torna importante no contexto global por liberar moléculas que alertam o organismo da presença de um agressor, comumente chamados de padrões moleculares associados ao dano ou DAMP (KRYSKO et al., 2012; WEST et al., 2017). Durante o processo de morte celular, ocorrem alterações morfológicas que são facilmente

identificadas, auxiliando na categorização do tipo de morte celular em questão. Três tipos principais foram categorizados seguindo os padrões morfológicos: (1) morte tipo apoptose, com fragmentação nuclear e encolhimento citoplasmático, (2) morte tipo autofagia, com formação extensa de vacúolos citoplasmáticos e (3) morte tipo necrose, com perda da integridade da membrana plasmática e vazamento de conteúdos celulares (GALLUZZI et al., 2007).

Esta classificação é oriunda do acúmulo de estudos de várias décadas, começando nos anos 1960, porém, o avanço tecnológico permite o estudo cada vez mais aprofundado. A morte celular regulada não tem apenas aspectos morfológicos a serem avaliados, mas também diversos aspectos genéticos, bioquímicos, farmacológicos e funcionais que trazem valiosas informações para auxiliar na compreensão dos processos envolvidos na morte celular e que podem ser de grande valia para o desenvolvimento de efetivas alternativas terapêuticas (GALLUZZI et al., 2018). Ainda que aspectos morfológicos sejam importantes e possam trazer informações que direcionem para o conhecimento dos mecanismos bioquímicos, morfologias de morte celular similares podem ter diferenças moleculares significativas (CHERNOBROVKIN; ZUBAREV, 2016). Como resultado, o comitê de nomenclatura de morte celular (GALLUZZI et al., 2018), tem em seus relatórios aportado um crescente número de categorias de morte celular. Enquanto em 2005, foram relatados 4 subtipos, o último relatório (GALLUZZI et al., 2018) descreveu 12 subtipos. A morfologia de uma célula em processo de morte não deixa de ser, porém uma característica importante a ser avaliada e que pode nos dar informações dos processos bioquímicos e alvos moleculares envolvidos (CHERNOBROVKIN; ZUBAREV, 2016), sobretudo em estudos iniciais e que indicam caminhos a serem melhor investigados.

1.4.5 Mitocôndria

As mitocôndrias são organelas celulares fundamentais para a homeostase celular. Células eucarióticas possuem centenas de mitocôndrias, ocupando até 20% do volume citoplasmático. As mitocôndrias foram essenciais para a evolução de animais complexos, pois é o local onde ocorre o metabolismo aeróbico das células. Sem as mitocôndrias, as células teriam adenosina trifosfato (ATP) proveniente apenas da glicólise, processo anaeróbico de baixo rendimento energético. Dessa forma, a homeostase da fisiologia celular e do organismo é dependente do metabolismo mitocondrial (KUMMER; BAN, 2021). Esse é responsável pela energia para o funcionamento celular e saúde do organismo, incluindo geração de energia (por exemplo, contração muscular, divisão celular), biossíntese, envelhecimento e degradação de proteínas, geração e manutenção de potenciais de membrana. Além da respiração celular e geração de ATP, são responsáveis por diversas outras funções como a geração de NADH, GTP, biossíntese

de aminoácidos e grupo heme, sinalização de cálcio, respostas a estresse e são um centro de sinalização celular (CHANDEL, 2014; PELLEGRINO; HAYNES, 2015; RIZZUTO et al., 2012).

Devido a esse amplo papel na fisiologia celular, disfunções mitocondriais são geralmente graves, e sua perda de função está relacionada à morte celular por apoptose e envelhecimento. A mitocôndria possui duas membranas, a externa é porosa e permite a livre passagem de pequenas proteínas e íons, com isso não há formação de potencial de membrana. No entanto, a membrana interna é uma forte barreira de difusão para íons e outras moléculas, com o transporte sendo realizado por proteínas de transporte seletivas, com consequente criação de um potencial de membrana de 180mV. É na membrana interna que ocorre a fosforilação oxidativa, através de complexos proteicos e geração de ATP (KÜHLBRANDT, 2015).

Durante o processo apoptótico a mitocôndria sofre diversas mudanças fisiológicas, dentre elas a perda do gradiente eletroquímico existente na membrana interna, gerando uma perda de eficiência na fosforilação oxidativa. O potencial de membrana então é um indicador de saúde da mitocôndria e, por conseguinte, da célula e que pode ser utilizado para observar a homeostase ou estresse celular (SIVANDZADE; BHALERAO; CUCULLO, 2019).

1.5 Ensaios fenotípicos

Ensaios que acessam respostas fenotípicas celulares a um determinado composto são ferramentas importantes para identificação da atividade biológica de um composto em desenvolvimento (SCHNEIDEWIND et al., 2020). Células eucarióticas possuem uma série de organelas e estruturas celulares e, quanto maior o número de estruturas celulares estudadas, maior será a compreensão da ação de determinado composto na fisiologia celular. Assim, diferentes organelas podem sofrer alterações morfológicas e fisiológicas, ainda que o composto administrado tenha um alvo molecular não diretamente relacionado a elas (REISEN et al., 2015). Diversos fenótipos da morfologia celular, como formato, tamanho, granulosidade, formação de vacúolos, alterações no DNA, alterações em organelas, mudanças de pH dentre outros podem ser estudadas nos ensaios fenotípicos e, assim, fazer inferências sobre o mecanismo de ação (NASSIRI; MCCALL, 2018). Os compostos químicos podem ser desenvolvidos e planejados para um alvo molecular específico. No entanto, em um contexto celular, respostas não antecipadas podem ocorrer e são importantes de serem avaliadas devido à extensa inter-regulação e comunicação das vias de sinalização que altamente complexas (CAICEDO et al., 2017; SUBRAMANIAN et al., 2017).

1.6 Substâncias Químicas

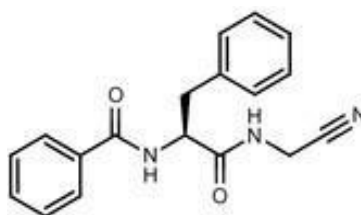
1.6.1 Novas Substâncias em Prospecção

Com o conhecimento da biologia molecular e celular de inúmeras doenças, dentre elas o câncer, é possível desenvolver novas substâncias cujos alvos sejam conhecidos, visando modular vias de sinalização ou regular uma proteína superexpressa (DUGGER; PLATT; GOLDSTEIN, 2018).

Em nosso grupo de trabalho (Química Medicinal e Biológica - NEQUIMED), derivados de dipeptidil nitrilas que atuam como inibidores covalentes reversíveis de cisteíno proteases foram inicialmente estudados com atividade antiparasitária (AVELAR et al., 2015; BURTOLOSO et al., 2017). No entanto, as substâncias também têm apresentado atividade inibitória para a catepsina L, sendo potentes inibidores dessa enzima, o que também abre a possibilidade de uso dessas substâncias como antineoplásicos. Devido à similaridade com a catepsina S, pode-se também estender o mesmo conceito de inibição enzimática (GREENSPAN et al., 2001) associada à atividade antineoplásica (CARTLEDGE et al., 2013).

Inibidores derivados de dipeptidil nitrilas como apresentado na Fig. 1 são descritos como compostos com atividade citostática e inibidora de migração em células de câncer (RAMALHO et al., 2015). No entanto, poucas informações são disponibilizadas na literatura sobre o mecanismo de ação e sua correlação com a resposta farmacológica.

Figura 1. Exemplo de inibidor de cisteíno protease desenvolvido no NEQUIMED codificado com Neq0409.



Fonte: Avelar et al. (2015).

Assim, os inibidores de cisteíno proteases devem ser analisados quanto a sua atividade antineoplásica. Um estudo recentemente publicado em nosso grupo de pesquisa (NEQUIMED-IQSC-USP) demonstrou que essas substâncias atuam como agentes citostáticos com inibição da catepsina L (QUILLES JR. et al., 2019), enquanto outros trabalhos ainda não publicados e recentemente realizados demonstraram compostos com atividade citotóxica. Várias dipeptidil nitrilas têm apresentado atividade na enzima ortóloga em *Trypanosoma cruzi* denominada cruzaina e não são citotóxicos para as células de mamíferos (isto é, são seletivas), conforme

estudos prévios no grupo de pesquisa NEQUIMED (AVELAR et al., 2015; BURTOLOSO et al., 2017), o que as tornam bons pontos de partida para o estudo, pois não são citotóxicos para células não tumorais.

1.6.2 Substâncias de referência

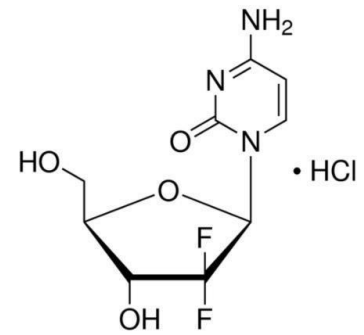
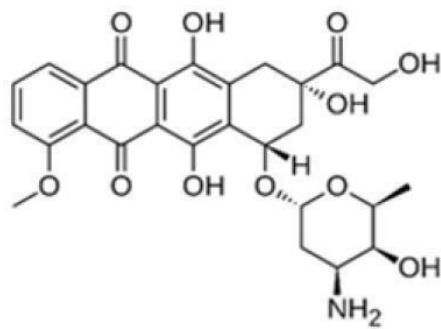
A doxorubicina (Fig. 2) é um antibiótico derivado da bactéria *Streptomyces peucetius*. É utilizada como quimioterápico para diversos tipos de câncer e um dos mais efetivos para câncer de mama, leucemia e linfoma (TRACHTENBERG et al., 2011).

O mecanismo de ação primário é dado pela habilidade da doxorubicina de atuar como intercalante de DNA, promovendo quebras das fitas do DNA e inibindo a síntese de ambos DNA e RNA. Além disso, atua inibindo a enzima topoisomerase II, gerando danos ao DNA e indução de apoptose (JOHNSON-ARBOR; DUBEY, 2020).

No entanto, seu uso tem diversos efeitos colaterais, afetando órgãos como o cérebro, fígado e rins, afetando o tratamento ao ser necessária a redução da dose. O tecido cardíaco é o alvo preferencial da toxicidade da doxorubicina com um risco oito vezes maior de desenvolver toxicidade cardiológica fatal (CUSACK; YOUNG; OLSON, 1995).

A gencitabina (Fig.2), originalmente usada por suas propriedades antivirais (BIANCHI et al.,1994) é atualmente utilizada como quimioterápico para vários tipos de tumores sólidos, linfomas e câncer de pâncreas avançado ou metastático (BURRIS et al., 1997; WONG et al., 2009). Também denominada de dFdC, a gencitabina é um nucleosídeo anticâncer análogo à deoxicidina. Gencitabina difosfato e gencitabina trifosfato inibem a síntese do DNA e sua incorporação na extremidade da fita de DNA impede a continuação da síntese de DNA pelas DNA polimerases. Seu mecanismo de ação possui a característica de permitir a adição de um deoxinucleotídeo, e assim a gencitabina fica ligada ao DNA, uma vez que as enzimas de reparo não conseguem remover o fármaco ligado (PLUNKETT et al., 1995). A gencitabina necessita primeiramente ser transportada para o citoplasma por transportadores de nucleosídeos (NT). Os transportadores conhecidos do fármaco são o hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT2 e, principalmente, por hENT1 (FUKUNAGA et al., 2004; MINI et al., 2006). Pacientes com câncer de pâncreas apresentando menores níveis de expressão de NTs possuem menores níveis de sobrevivência comparado com pacientes com altos níveis de expressão de NTs. Além disso, células deficientes de NTs são resistentes à gencitabina (GIOVANNETTI et al., 2006; MACKEY et al., 1998; MARÉCHAL et al., 2009).

Figura 2. Estruturas moleculares dos compostos de referência utilizados no presente estudo: doxorubicina (à esquerda) e gencitabina (à direita).



Fonte: Selleckchem, Sigma Aldrich (2022)

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho visa identificar novas substâncias bioativas derivadas de dipeptidil nitrilas com atividade antineoplásica a partir de ensaios *in vitro* utilizando linhagens de câncer de pâncreas (BxPC-3 e MIA PaCa-2). A partir da identificação das substâncias bioativas, iniciar a investigação dos mecanismos celulares envolvidos por meio de ensaios de microscopia de epifluorescência.

2.2 Objetivos específicos

- Realização de ensaios de padronização, para (i) determinação da densidade celular de semeadura utilizada nos ensaios, (ii) determinar concentração ideal do solvente (DMSO) utilizado, (iii), determinar o perfil e a concentração utilizada dos controles positivos (Doxorrubicina e Gencitabina) utilizados
- Avaliação da atividade citotóxica através de uma triagem de uma série de 16 compostos derivados de dipeptidil nitrila em duas linhagens de câncer de pâncreas e uma linhagem não tumoral.
- Determinação do IC50 dos compostos testados que se mostraram citotóxicos
- Estudo da morfologia celular após administração de composto citotóxico em investigação para acessar os mecanismos envolvidos.
- Estudo dos mecanismos celulares através de ensaios fenotípicos com marcadores celulares para observação em microscópio de epifluorescência.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

- Linhagem celular BALB/3T3 clone A31 (código: 0047) - fibroblasto de camundongo – Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ);
- Linhagem celular MIA PaCa-2 (código 0174) - câncer de pâncreas humano – Banco decélulas do Rio de Janeiro (BCRJ);
- Linhagem celular BxPC-3 (código: 0056) - câncer de pâncreas humano – Banco decélulas do Rio de Janeiro (BCRJ);
- Meios de cultura celular DMEM (meio Dulbecco MEM) e RPMI1640 em pó - CultiLab;
- Tampão Fosfato Salino Dulbecco Modificado (D-PBS), Soro Fetal Bovino (FBS), Soro Fetal de Cavalo, solução 0,25% de tripsina com EDTA e penicilina/estreptomicina – adquiridos da Vitrocell Embriolife Ltda.
- Glicose, Bicarbonato de Sódio (NaHCO₃), dimetilsulfóxido (DMSO), dodecilsulfato de sódio (SDS), Sal Hepes, ácido acético glacial (99,7%), brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazólio (MTT) – adquiridos da Sigma-Aldrich;
- Substâncias químicas disponibilizadas pelo laboratório (entre 1 e 10 mg, com grau de pureza acima de 95 %).
- Doxorrubicina - Selleckchem;
- Gencitabina - Sigma-Aldrich®;
- Frascos de cultura T25 e T75, placas de 96 poços e CELLview™ Cell Culture Slides - Greiner Bio-One®;
- Tubos de centrifugação tipo Falcon de 15 e 50 mL;
- Microtubos tipo Eppendorf de 0,6 mL, 1,5 mL e 2 mL;
- Ponteiras para 10 µL, 100 µL, 1,0 mL e 5,0 mL;
- Frascos de vidro de 500 e 1000 mL;
- Filtros de seringa PVDF 0,22 µm; seringas de 3, 5 e 10 mL; sistema de filtração a vácuo 500 e 1000 mL e agulha 25G.
- Leitor de microplacas multidetector BioTek™ Synergy HT - BioTek Instruments, Inc.;
- Centrífuga microprocessada - Quimis®;
- Mesa agitadora - Quimis®;

- Micro balança Sartorius CPA26P - Sartorius®;
- Capelas de fluxo laminar vertical classe II - Pachane e Veco;
- Estufa 37 °C a úmido (90%) com atmosfera de CO₂ (5%) - Sanyo;
- Ultrafreezer -75 °C - Sanyo;
- Banho-maria a 37 °C - Solab;
- Centrífuga de bancada - Quimis;
- Estufa a seco - Quimis;
- Autoclave 50 L Phoenix - Lufenco;
- Bomba de vácuo - Symbol;
- Sistema de purificação Merck-Millipore Direct Q3 para água Milliq;
- Microscópio invertido Primovert - Carl Zeiss;
- Microscópio de epifluorescência EVOS® FL Cell Imaging System - Thermo Fisher Scientific;
- Hoechst 33342 (I34202) Thermo Fisher Scientific;
- Laranja de Acridina (235474-5G) - Sigma-Aldrich;
- Guava Mitochondrial Depolarization Kit (4500-0250) - Merck-Millipore;

3.2 Substâncias Químicas

As substâncias de referência utilizadas (doxorubicina e gencitabina) e os compostos desenvolvidos pelo laboratório NEQUIMED (Tabela 1) em teste no presente estudo possuem um grau de pureza superior a 95%. As fórmulas químicas dos compostos não estão aqui apresentadas por motivos de patente.

Tabela 1: Série de 16 compostos derivados de dipeptidil nitrilas utilizadas na triagem do estudo

779	780	781	782	783	784	827	828
830	831	832	837	838	848	850	851

Fonte: A autoria própria

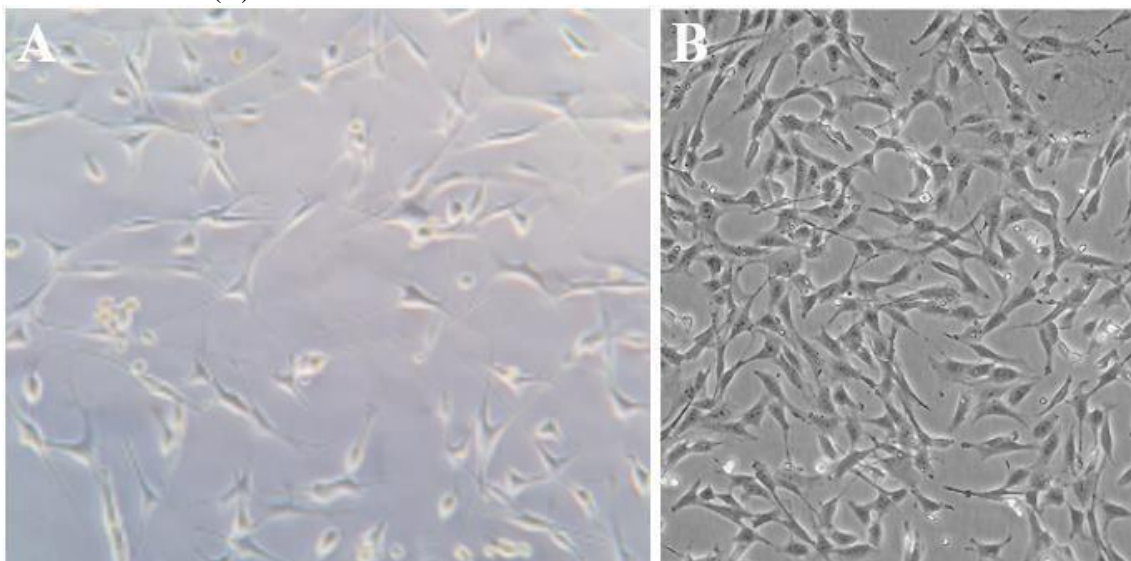
3.3 Linhagens e Manutenção Celular

3.3.1 Linhagens e meios de cultura

3.3.1.1 BALB/3T3 clone A31

As células da linhagem BALB/3T3 clone A31 (fibroblastos de *Mus musculus*) são extremamente sensíveis à inibição de divisão por contato celular, crescem em alta diluição e exibem baixa densidade de saturação (ATCC). Esta linhagem é muito utilizada como controle sendo indicada pela OECD para testes de toxicidade (OECD, 2010). Tem como meio de cultura o DMEM (para volume total de 1 L) suplementado com 3,5 g glicose, 1,5 g NaHCO₃ e 10% de soro fetal bovino (v/v). Ao meio filtrado foram adicionados 1% de solução penicilina/estreptomicina (v/v), sendo mantidos sob refrigeração à temperatura de 8 °C (podendo variar em 2°C para mais ou para menos).

Figura 3: Análise comparativa da imagem de microscopia de campo claro com objetiva de 10x da linhagem de fibroblasto de camundongo BALB/3T3 clone A31 em cultura no laboratório (A) e do banco de células ATCC (B).

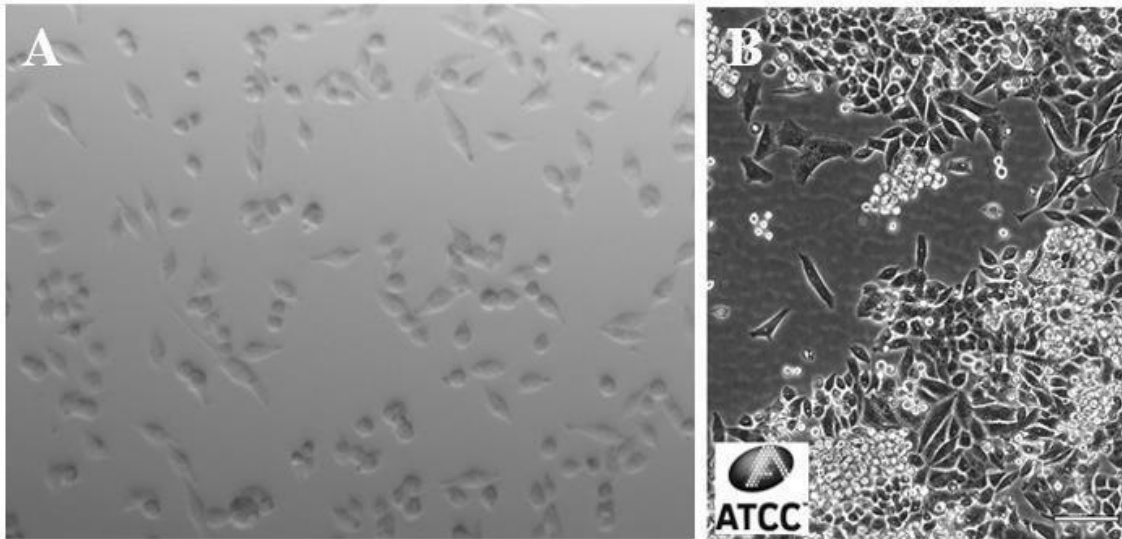


Fonte: (A) Autoria própria; (B) ATCC (2022).

3.3.1.2 MIA PaCa-2

As células da linhagem MIA PaCa-2 (carcinoma de pâncreas) são grandes e de abundante citoplasma, exibindo uma alta taxa de aneuploidia, com a tendência de crescer em cima de outras células, eventualmente ficando livres em suspensão (BCRJ, 2019). Tem como meio de cultura o DMEM (para volume total de 1 L) suplementado com 3,5 g glicose, 1,5 g NaHCO₃, 10% de soro fetal bovino (v/v) e 2,5% de soro fetal de cavalo (v/v). Ao meio filtrado foram adicionados 1% de solução penicilina/estreptomicina (v/v), sendo mantidos sob refrigeração à temperatura de 8 °C (podendo variar em 2 °C para mais ou para menos).

Figura 4: Análise comparativa da imagem de microscopia de campo claro com objetiva de 10x da linhagem MIA PaCa-2 em cultura no laboratório (A) e do banco de células ATCC (B).

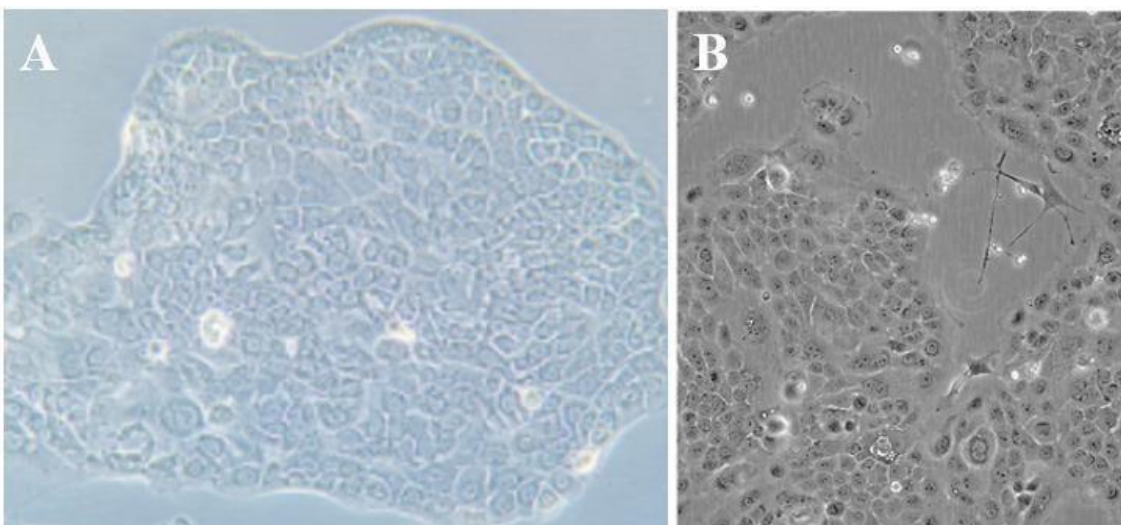


Fonte: (A) Autoria própria; (B) ATCC (2022).

3.3.1.3 BxPC-3

As células da linhagem BxPC-3 (adenocarcinoma de pâncreas) produzem mucina e antígeno CEA17. Tem como meio, RPMI1640 (para volume total de 1 L) suplementado com 6,5 g glicose, 1,5 g NaHCO₃, 2,38 g HEPES e 10% de soro fetal bovino (v/v). Ao meio filtrado foram adicionados 1% de solução penicilina/estreptomicina (v/v), sendo mantidos sob refrigeração à temperatura de 8 °C (podendo variar em 2 °C para mais ou para menos).

Figura 5. Análise comparativa da imagem de microscopia de campo claro com objetiva de 10 x da linhagem BxPC-3 em cultura no laboratório (A) e do banco de células ATCC (B).



Fonte: (A) Autoria própria; (B) ATCC (2022).

3.4 Manutenção das células

A manutenção das células se inicia com o descongelamento de uma das linhagens em uso no trabalho, mantidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em tubos criogênicos de 1 mL em 90% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido (v/v). A primeira etapa do descongelamento deve ser rápida e é feita no banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar exposição prolongada das células ao DMSO, tóxico. O conteúdo é diluído em 10 mL do respectivo meio de cultura indicado para a célula e feita a centrifugação a 1500 rpm (300 g) para separação das células. O sobrenadante é descartado e o precipitado celular formado é ressuspenso e transferido para um frasco contendo 10 mL de meio de cultura. Os frascos de cultura são mantidos em incubadora úmida a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 5% de CO_2 . A troca do meio de cultura foi realizada a cada dois dias, até que atingissem 80% de confluência para a realização de passagem para outros frascos. A passagem celular se inicia pela adição de 5 mL da solução de tripsina/EDTA a 37°C com 5 minutos de incubação para retirar a adesão das células ao substrato com posterior adição do mesmo volume de meio de cultura para inativação da enzima. O conteúdo é transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL e centrifugado nas mesmas configurações do protocolo de descongelamento. O precipitado celular formado é ressuspenso e transferido nas diluições especificadas para cada tipo celular (usualmente 3-6x) em outros frascos de cultura.

3.5 Substâncias químicas

Como mencionado item 1.6.1, os compostos usados neste estudo são derivados de dipeptidil nitrilas que atuam como inibidores reversíveis de cisteíno proteases. Uma série com 16 compostos foi analisada. Todas as substâncias apresentam grau de pureza acima de 95% e são armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em estado sólido. O NEQUIMED dispõe de um banco de dados para gerenciar os compostos por meio da identificação com código e localização. Somente as substâncias completamente caracterizadas de acordo com protocolo interno usado no grupo são adicionadas ao banco de dados. As substâncias de referência usadas nestes estudos compreendem fármacos antineoplásicos descritos no 1.6.2

A solubilização em DMSO deve ser realizada previamente aos ensaios, sendo que a concentração (v/v) de DMSO usada na solução final deve estar em 0,50 %, conforme anteriormente analisado para as linhagens testadas. Essas condições também foram usadas para as substâncias de referência adquiridas.

3.6 Ensaios celulares

3.6.1 Análise de viabilidade celular

A análise de viabilidade celular pode ser feita por diferentes metodologias, trazendo consigo vantagens e desvantagens que devem ser levadas em consideração para a escolha da metodologia que fornece as características necessárias ao estudo em questão (Cell Viability Assays – Sigma-Aldrich).

O ensaio de viabilidade celular brometo de 3,4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT) tem amplo uso em ensaios em larga escala para determinação de citotoxicidade de compostos em prospecção. É baseado na capacidade da enzima oxidoreductase celular dependente (NADPH) em reduzir MTT em formazan, que possui coloração roxa, e assim determinando a atividade mitocondrial. A diminuição ou aumento de células viáveis é analisado pela medição da absorbância em 570 nm (concentração de formazan solubilizado) (VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011).

Diversos experimentos do estudo utilizaram essa metodologia e todos seguem o procedimento padrão de manutenção celular. Os experimentos de viabilidade celular seguem a partir da cultura celular em 80% de confluência. No entanto, ao invés de uma simples passagem para outro frasco, é realizada a contagem de células utilizando Câmara de Neubauer para semeadura na densidade celular desejada, que varia de acordo com o experimento e linhagem celular. Foram utilizadas placas de 96 poços, porém nas bordas apenas meio de cultura foi adicionado para evitar problemas de evaporação que pudessem gerar erros experimentais. A administração de compostos químicos, seja de teste ou de referência, foram realizadas após as 24 horas de incubação para aderência celular. As concentrações dos compostos administrados e os tempos de incubação podem variar de acordo com o experimento e será explicado em detalhes em seu devido momento.

Terminado o tempo de incubação do experimento, foi realizada a remoção do meio de cultura para a administração de 100 µL de MTT diluído em meio de cultura (1,0 mg/mL) por poço, cujo tempo de incubação é de 3-4 horas. Após este período, novamente foi realizada a remoção do conteúdo para a adição de 100 µL de DMSO, que age como solubilizante do formazan. Logo depois, a placa permanece por 10 minutos no agitador de placas e em seguida é feita a análise da viabilidade celular através do leitor de microplacas Biotek Synergy HT, no qual a leitura da absorbância é feita à 570 nM.

Para a análise de dados foi utilizado o software Graphpad. Os parâmetros R^2 e $Sy.x$, foram determinados para mostrar o ajuste (R), ou variância para o coeficiente de determinação (R^2) e

o desvio ($Sy.x$) do modelo e são calculados a partir do melhor modelo em relação aos pontos que se tem no gráfico. Quanto mais próximo a 1 para R^2 e a 0 para $Sy.x$ melhor é a qualidade do modelo em relação aos dados obtidos. Os experimentos utilizando a metodologia de viabilidade celular por MTT apresentados a seguir foram realizados em quintuplicata e em dois ensaios independentes para análises estatísticas mais robustas.

3.6.1.2 Ensaio de linearidade celular

Através desse experimento, busca-se visualizar a fase exponencial de crescimento celular em diferentes concentrações, pois esta é a fase de maior atividade metabólica e ideal para a experimentação.

Esse experimento foi realizado de acordo com o item 3.6.1. para as linhagens BALB/3T3 clone A31, MIA PaCa-2 e BxPC-3. Foram estudadas as concentrações de semeadura de $5,0 \times 10^5$, $4,0 \times 10^5$, $3,0 \times 10^5$, $2,0 \times 10^5$, $1,0 \times 10^5$, $0,80 \times 10^5$, $0,60 \times 10^5$, $0,40 \times 10^5$, $0,20 \times 10^5$, $0,10 \times 10^5$ células/mL e em 3 tempos de incubação (24, 48 e 72 horas). Não foi feita a administração de qualquer composto químico.

3.6.2 Ensaios de curva de crescimento celular

A biologia celular modifica-se em cada fase do crescimento celular, sendo importante o controle do estágio em que as células serão coletadas, quando será realizado a passagem da cultura, ou quando novos nutrientes (compostos) serão adicionados (MOLINARO; ETELCIA MORAES, 2010).

O estudo da curva de crescimento de cada linhagem celular tem como função a determinação da densidade ideal de semeadura de células para trabalhar em fase exponencial de crescimento nos experimentos posteriores, corroborando com o ensaio de linearidade, porém realizado por 7 dias, o que torna o estudo mais completo. Além disso, a partir deste ensaio é possível realizar a comparação da curva de crescimento, porém com a adição de compostos potencialmente citostáticos/citotóxicos e ver diferenças no padrão das fases da curva (fase lag, fase log, paltô e declínio).

Este experimento foi realizado de acordo com o item 3.6.1 para as linhagens MIA PaCa-2 e BxPC-3. As densidades de semeadura foram $4,0 \times 10^5$, $3,0 \times 10^5$, $2,0 \times 10^5$, $1,0 \times 10^5$, $0,80 \times 10^5$, $0,60 \times 10^5$, $0,40 \times 10^5$, $0,20 \times 10^5$, $0,10 \times 10^5$ células/mL em 7 tempos de incubação (1 placa por dia). O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Nenhum composto químico foi adicionado.

3.6.3 Ensaio de sensibilidade celular ao DMSO

Dimetilsulfóxido (DMSO) é uma molécula aprótica orgânica polar de natureza anfipática que é ideal para dissolver moléculas polares pouco solúveis e moléculas apolares. DMSO é amplamente usado como solvente em toxicologia e farmacologia (VERHEIJEN; LIENHARD; SCHROODERS, 2019). Concentrações menores a 10% (v/v) têm sido reportadas como tóxicas a células, tendo estudos que mostram que concentrações entre 2-4% induzem morte celular via ativação da via independente caspase-3 (GALVAO et al., 2014). Ainda que a concentração final de DMSO para a diluição dos compostos seja de 0,50%, é necessário confirmar que as linhagens celulares (MIA PaCa-2, BxPC-3 e BALB 3T3) não apresentam ou desenvolveram sensibilidade ao DMSO, o que levaria a um viés experimental.

O experimento foi realizado de acordo com o item 3.6.1 para as linhagens BALB/3T3 clone A31, MIA PaCa-2 e BxPC-3. A concentração de semeadura a $1,0 \times 10^5$ células/mL. As concentrações de DMSO administradas às células foram de 1,0%, 0,90%, 0,80%, 0,70%, 0,60%, 0,50%, 0,40%, 0,30%, 0,20% (v/v) e tempo de incubação foi de 72 horas após a adição dos compostos.

3.6.4 Padronização de citotoxicidade celular a doxorrubicina

A doxorrubicina (TRACHTENBERG et al., 2011) é um quimioterápico de amplo uso na clínica médica para diversos tipos tumorais, atuando como intercalante de DNA, causando quebras em sua estrutura e inibindo a síntese de DNA e RNA. Além disso, a doxorrubicina inibe a enzima topoisomerase II, causando danos ao DNA e indução a apoptose (JOHNSON-ARBOR; DUBEY, 2020). Por essas características é o composto de referência escolhido como nosso controle positivo para ensaios de triagem de novos compostos bioativos.

O experimento foi realizado de acordo com o item 3.6.1 para as linhagens BALB/3T3 clone A31, MIA PaCa-2 e BxPC-3. A densidade de semeadura escolhida foi de $1,0 \times 10^5$ células/mL. As concentrações de Doxorrubicina adicionadas foram de 100 μ M, 10 μ M, 1,0 μ M, 333 nM, 100 μ M, 33,3 nM, 10 nM, 3,3 nM e 1,0 nM e controle negativo (somente com meio de cultura). O tempo de incubação após a adição dos compostos foi de 72 horas neste estudo.

3.6.5 Padronização de citotoxicidade celular a gencitabina

A gencitabina é um nucleosídeo análogo a citidina que interrompe a síntese de DNA quando incorporada (PLUNKETT et al., 1995). É utilizada no tratamento de câncer de pâncreas e, por isso, será utilizada como controle positivo para ensaios mais específicos com compostos

selecionados de maior atividade citotóxica ou citostática.

O experimento foi realizado de acordo com o item 3.6.1 para as linhagens BALB/3T3 clone A31 e MIA PaCa-2. As concentrações de Gencitabina administradas foram de 1000 nM, 333 nM, 100 nM, 33 nM, 10 nM, 3,3 nM, 1,0 nM, 0,33 nM e 0,10 nM e o controle negativo (somente meio de cultura). O tempo de incubação após a adição dos compostos foi de 72 horas.

3.6.6 Triagem de compostos derivados de dipeptidil nitrilas

Os compostos estudados no projeto são derivados de dipeptidil nitrilas e atuam como inibidoras covalentes reversíveis de cisteíno proteases com atividade antiparasitária e que têm apresentado atividade inibitória para a cathepsina L, abrindo um espaço para o estudo de atividade antineoplásica (CARTLEDGE et al., 2013; GREENSPAN et al., 2001).

O experimento de triagem de compostos foi realizado de acordo com o item 3.6.1 para as linhagens BALB/3T3 clone A31, MIA PaCa-2 e BxPC-3. As concentrações dos compostos foram de 100 μ M e 10 μ M, além da doxorrubicina (10 μ M) e o controle negativo (somente com meio de cultura). O tempo de incubação foi de 72 horas após a adição dos compostos neste experimento.

3.6.7 Ensaio de curva concentração resposta

Compostos que apresentam citotoxicidade em linhagens tumorais merecem um estudo mais aprofundado. Informações como IC₅₀ e índice de seletividade (SI) podem ser assim acessados para melhor caracterização do composto. Desta forma foi realizado este ensaio com a administração do composto nas concentrações de 250 μ M, 150 μ M, 100 μ M, 75 μ M, 66 μ M, 50 μ M, 33 μ M, 18 μ M, 10 μ M, 4,6 μ M, 2,5 μ M e 1,0 μ M, além do controle positivo (doxorrubicina – 10 μ M) e o controle negativo (somente meio de cultura) para as linhagens BALB/3T3 clone A31 e MIA PaCa-2 e BxPC-3. O tempo de incubação após a adição dos compostos foi de 72 horas para o experimento.

3.6.8 Ensaio de microscopia de fluorescência

Os ensaios de microscopia de fluorescência foram realizados utilizando placas CellView™ Cell Culture Slide (Greiner Bio-one®) de 10 poços. Três marcadores foram utilizados: Hoechst 33342, para a marcação nuclear; Mitochondrial Depolarization kit (4500-0250) para avaliação de homeostase mitocondrial; e Laranja de Acridina (235474-5G), que avalia regiões ácidas celulares e é um marcador indireto de autofagia.

Todos os marcadores têm a primeira etapa de protocolo idêntica. Foi feita a semeadura com

100 μL de $1,0 \times 10^5$ células/mL em cada poço. Após a semeadura realizada, há uma incubação de 24 horas para aderência das células à superfície.

Com as células aderidas, os compostos em teste e os compostos referência são adicionados na concentração do IC50 quantificado de acordo com o item anterior neste trabalho, com período de incubação de 72 horas. Após a incubação, são adicionados os marcadores de imunofluorescência, cada qual seguindo seu preparo e tempo de incubação descritos a seguir, para que seja realizada a visualização dos poços em microscópio de epifluorescência.

O preparo dos marcadores é descrito abaixo:

Hoechst 33342

Solução estoque: 1,0 mM.

Solução de trabalho: 2,0 $\mu\text{g/mL}$ em meio de cultura.

Após o preparo do marcador Hoechst 33342 (I34202) na concentração de trabalho indicada, são adicionados 100 μL /poço com incubação de 5 min. em temperatura ambiente. Em seguida é feita a remoção do marcador e lavagem das células com PBS. Por último, o meio de cultura é adicionado para observação no comprimento de onda ($\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 461 \text{ nm}$) usando o cubo DAPI (azul) no microscópio de epifluorescência.

Análise da atividade mitocondrial

O Guava Mitochondrial Depolarization kit (4500-0250) fornece 3 microtubos. Um deles contém o marcador JC-1 que avalia o potencial de membrana mitocondrial liofilizado, o segundo contém 230 μL de DMSO anidro para diluição do JC-1, enquanto o terceiro contém uma solução do composto 7-aminoactinomicina D (7-AAD) com a concentração não especificada pelo fabricante.

Primeiro é realizada a diluição do marcado JC-1 com o volume de 230 μL de DMSO anidro. Posteriormente, é feita uma solução com o marcador JC-1 e 7-AAD na mesma proporção, com volumes variando de acordo com a quantidade necessária para o experimento. Para a marcação das células é feita uma diluição de 4,0 μL desta solução em 96 μL de meio de cultura para atingir 100 μL . Esses marcadores fluorescentes são analisados nos respectivos comprimentos de onda para a JC-1 ($\lambda_{\text{exc}} = 514 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 529 \text{ nm}$) e 7-AAD ($\lambda_{\text{exc}} = 549 \text{ nm}$;

$\lambda_{em} = 644 \text{ nm}$) usando os cubos GFP (verde) e Texas Red (vermelho) no microscópio de epifluorescência.

Laranja de Acridina

O Laranja de Acridina (235474-5G) é um composto que cora o RNA e núcleo celular em fluorescência verde e regiões ácidas da célula em fluorescência vermelha. Dessa forma é utilizado para análise indireta da autofagia, pelo fato de autofagossomos e autofagolisossomos serem ácidos.

Para o preparo é feita uma solução estoque de 1,0 mg/mL e posterior diluição de solução de 1:1000 para o experimento, adicionando 100 μL /poço e período de incubação de 15 minutos. As análises são realizadas usando os cubos de fluorescência GFP (verde) e Texas Red (vermelho).

As imagens obtidas por microscopia de fluorescência foram analisadas utilizando o software IMAGE J (FIJI). Imagens obtidas com fluorescência em azul, vermelho ou verde foram tratadas da mesma forma para padronização e evitar qualquer tipo de viés. Foi feito o “*subtract background*” em 50.0 pixels, o aumento do contraste e brilho ajustado entre 0-78. As imagens em campo claro foram tratadas apenas com o aumento do contraste (0,3%). A quantificação da fluorescência também foi realizada utilizando o software IMAGE J.

4. Resultados e Discussão

4.1 Linearidade celular

Cada linhagem celular possui um período necessário para que sua população dobre de número (doubling time). A célula em cultura é exposta a diversos tipos de estresses, e a sua análise de desenvolvimento em cultura deve ser acessada antes da realização de experimentos mais avançados. Dessa forma, é possível averiguar que a linhagem celular se comporta de acordo com suas características (ASSANGA et al., 2013). Os experimentos posteriores devem levar em conta essa característica, uma vez que células em estágio de adaptação não apresentam divisão celular, assim como células em estágio estacionário (plateau), seja por limitações do ambiente in vitro, por competição dos nutrientes, ou inibição da divisão pela densidade celular alta. Os resultados para as três linhagens podem ser visualizados na Figura 6 abaixo.

Figura 6: Gráfico da Linearidade celular de BALB/3T3 clone A31, BxPC-3 e MIA PaCa-2.

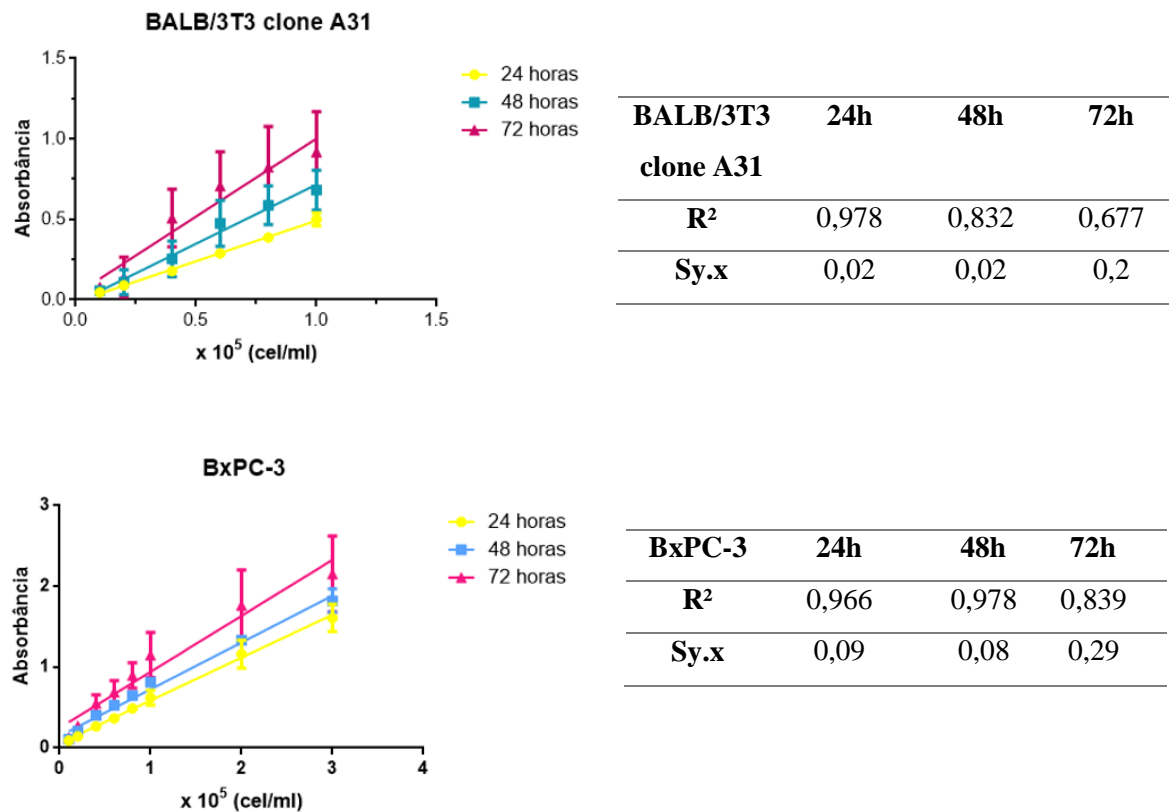
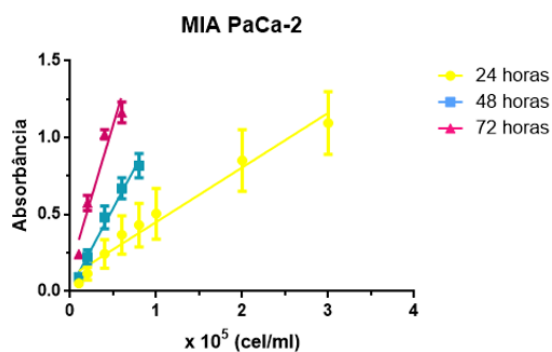


Figura 6: Continuação

MIA	24h	48h	72h
PaCa-2			
R²	0,849	0,954	0,929
Sy.x	0,14	0,06	0,10

Fonte: Autoria própria

Como pode ser visto na Figura 6, a linhagem celular BALB/3T3 clone A31 (doubling time - 18 horas, segundo ATCC) e MIA PaCa-2 (doubling time - 30 horas, segundo DSMZ) apresentam a fase de adaptação mais rápida em relação a linhagem BxPC-3 (doubling time - 48 horas - DSMZ), sendo possível perceber que possuem maior proliferação no intervalo de 24-48 horas, enquanto BxPC-3 tem pouco aumento populacional durante o mesmo intervalo, porém, maior proliferação entre 48-72 horas de experimento. A linhagem BALB/3T3 clone A31 apresentou linearidade celular nos 3 tempos de incubação até a concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL, chegando ao plateau em concentrações maiores. Em MIA PaCa-2, a concentração limite onde a linearidade celular aumentou foi dependente do tempo de incubação, mostrando a alta taxa de proliferação dessa linhagem. No entanto, a fase de plateau foi alcançada mais rapidamente do que o esperado para esta linhagem. Esse comportamento pode ser explicado pela característica da linhagem MIA PaCa-2 em crescer em multicamadas, se adaptando a condições limitantes de crescimento e assim obtendo maior proliferação em cultura (BCRJ).

A linearidade celular de BxPC-3 ocorreu até a concentração de $3,0 \times 10^5$ células/mL nos 3 tempos de incubação, demonstrando que a célula leva mais tempo para que as condições in vitro sejam limitantes para a diminuição de sua proliferação celular.

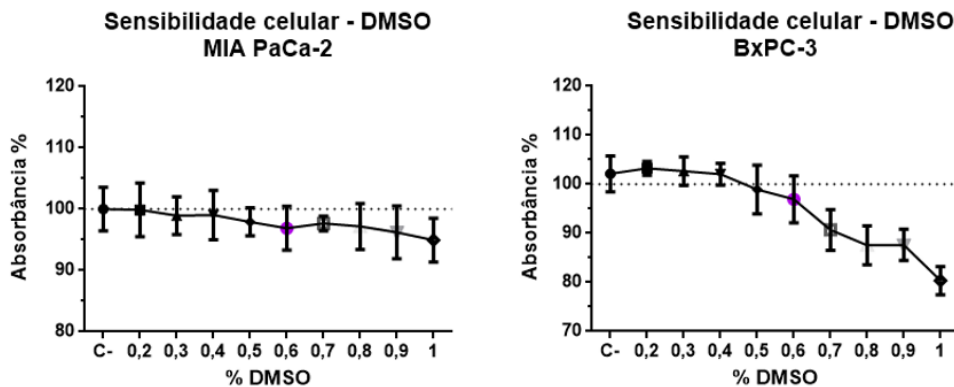
4.2 Análise da concentração de DMSO tolerável pelas células

Uma vez que DMSO é o solubilizante utilizado neste estudo, e que concentrações entre 2-4% induzem morte celular através da ativação da via independente caspase-3 (GALVAO et al., 2014), é importante confirmar que a concentração utilizada (0,50%) não está causando morte celular.

A sensibilidade celular ao DMSO obtidos para linhagens (BxPC-3 e MIA PaCa-2) mostra a concentração de 0,50% (v/v) não ocasionou perda de viabilidade celular (Figura 7). Estes

dados mostram que os compostos testados no presente trabalho, podem ser solubilizados em DMSO nesta porcentagem sem levar a um viés experimental. A linhagem MIA PaCa-2 é mais resistente do que BxPC-3, pois houve redução significativa da viabilidade celular em 1,0% e a partir de 0,6%, respectivamente. A sensibilidade da linhagem BALB/3T3 clone A31 ao DMSO foi previamente realizada por outros membros do grupo e não houve toxicidade em 0,50%.

Figura 7: Gráfico de Sensibilidade Celular ao DMSO em BxPC-3 e em MIA PaCa-2



Fonte: Autoria própria

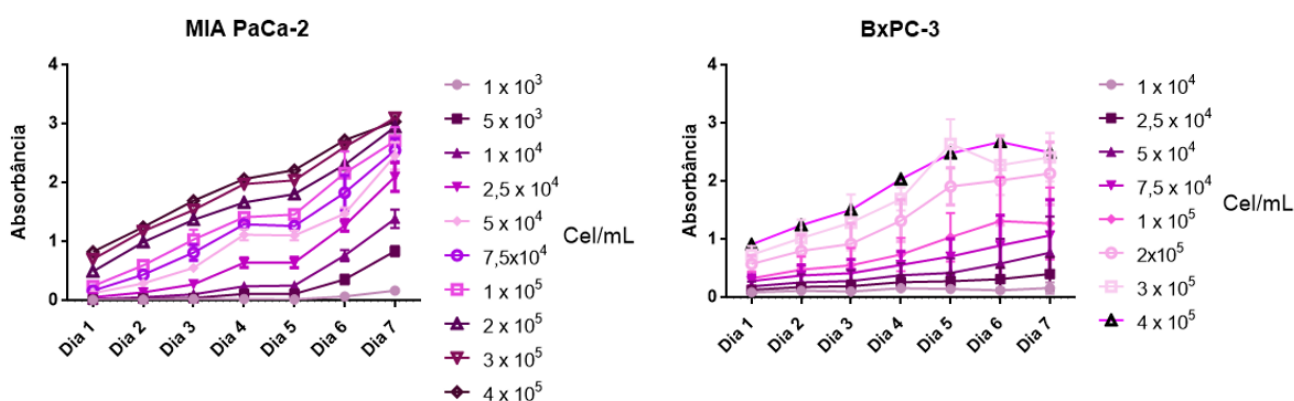
4.3 Estudo da curva de Crescimento para as linhagens MIA PaCa-2 e BxPC-3

Para saber se as células em cultura estão saudáveis e se os níveis de crescimento estão normais é necessário analisar a curva de crescimento. Apesar de diferenças entre linhagens, a curva de crescimento apresenta alguns pontos em comum, tendo 4 fases: (i) a fase estacionária inicial (lag), que é uma fase adaptação, em que as células irão se recuperar de uma subcultura ou descongelamento, e começar a se multiplicar; (ii) em seguida tem-se a fase log, com crescimento exponencial em uma taxa característica da linhagem celular conhecida como doubling time; (iii) as células atingem um grande número e encontram fatores limitantes, alcançando a chamada fase estacionária ou plateau; (iv) se não for realizada uma subcultura, que é indicada a ser feita antes deste momento, atingimos a fase de decaimento da cultura, ou morte, em que é visto a perda de aderência celular ao substrato.

A realização de um experimento de curva de crescimento para as linhagens utilizadas no estudo é essencial por vários motivos. Assim como no ensaio de linearidade, o ensaio de curva de crescimento determina a taxa de desenvolvimento da linhagem por meio da replicação celular ao longo do tempo. A análise da concentração celular a ser usada nos próximos experimentos também pode ser extraída deste estudo. Por fim, este experimento funciona como um controle de padrão de crescimento em ensaios de inibição de replicação celular.

Percebe-se que a curva de crescimento da linhagem MIA PaCa-2 não atingiu a fase estacionária (Figura 8), mantendo-se em fase log ainda no sétimo dia de leitura de viabilidade celular. A maior concentração (4×10^5) parece diminuir a taxa de crescimento, porém seriam necessários mais dias de leitura para confirmação. Todas as concentrações tiveram uma aparente fase estacionária entre o quarto e o quinto dia, porém retornam a se proliferar a partir do quinto dia. Percebe-se a capacidade de proliferação celular da linhagem mesmo nas maiores concentrações de semeadura, mantendo o crescimento durante todo o experimento. Como relatado pelo Banco de Células do Rio de Janeiro, a linhagem MIA PaCa-2 tem a capacidade de se desenvolver em mais de uma subcamada e até mesmo em suspensão, explicando o comportamento da curva de crescimento, sem a fase estacionária final usualmente observada.

Figura 8: Curva de crescimento de MIA PaCa-2 e BxPC-3 ao longo de sete dias de incubação



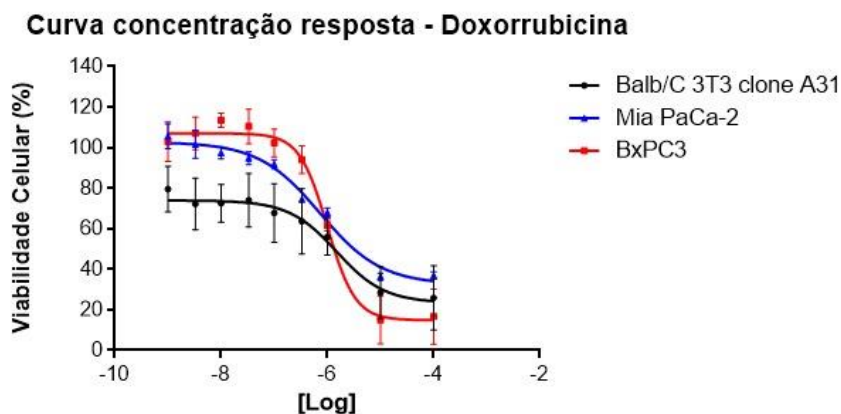
Fonte: Autoria própria

A fase estacionária foi alcançada somente a partir da concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL no sexto dia. A concentração de $2,0 \times 10^5$ células/mL apresentou uma fase log mais pronunciada a partir do terceiro dia, enquanto a única concentração que mostra uma fase de morte foi a de $4,0 \times 10^5$ células/mL. Desta forma, a realização de experimentos com a concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL para BxPC-3 seria pouco indicado, pois o ideal é que sejam utilizadas concentrações em que as células alcancem a fase log e apresentem seu máximo metabolismo. Por este motivo a concentração de $2,0 \times 10^5$ células/mL foi a escolhida para os experimentos posteriores. Deve-se ressaltar que esta foi a concentração também usada para experimentos anteriores no grupo de pesquisa, demonstrando que o resultado alcançado nesta etapa apresentou correspondência ao que foi previamente descrito e que as células mantiveram suas características originalmente delineadas para este tipo de estudo.

4.4 Estudo da citotoxicidade da Doxorrubicina

Este ensaio foi realizado para as 3 linhagens em estudo (BALB/C 3T3 clone A31, MIA PaCa-2 e BxPC-3). Na Figura 9 temos o gráfico da viabilidade celular (%) pela concentração do fármaco e os valores estatísticos na Tabela 2. A análise estatística com o auxílio do GraphPad Prism para determinar o valor de IC₅₀ (concentração em que o fármaco usado diminui a formação de cristais de formazam em 50%), R² e Sy.x.

Figura 9: Ensaio de curva concentração resposta (CCR) para o composto referência Doxorrubicina (controle positivo) nas três linhagens utilizadas no estudo.



Fonte: Autoria própria

Tabela 2: Valores de IC₅₀ e R² e Sy.x para Doxorrubicina em BALB/C 3T3 A31, MIA PaCa-2 e BxPC-3. SE = erro padrão. R² = coeficiente de correlação do modelo. Sy.x = desvio do modelo. SI = índice de seletividade (SI = IC₅₀ linhagem não tumoral/ IC₅₀ na linhagem tumoral).

Célula	IC ₅₀ (SE) μM	R ² / Sy.x	SI
BALB/3T3 clone A31	1,51 (1,05)	0,674 / 12,8	-
MIA PaCa-2	0,73 (0,13)	0,969 / 4,66	2,05
BxPC-3	1,00 (0,090)	0,95 / 9,0	1,49

Fonte: Autoria própria.

Pode-se observar na Tabela 2 que a potência para as três linhagens (IC₅₀) está na faixa de 1 micromolar, sendo menor o valor para as linhagens de câncer de pâncreas em relação a linhagem não tumoral de fibroblasto de camundongo. Desta forma, o índice de seletividade (SI) foi calculado, onde valores maiores do que 1 indicam a seletividade para a linhagem tumoral, enquanto valores menores do que 1 indicam a não seletividade (FIOCRUZ). Conforme observado, o valor foi maior do que 1 para as linhagens de câncer de pâncreas, significando que a doxorrubicina foi seletiva para ambas as linhagens tumorais. Embora a doxorrubicina não seja

o composto utilizado na clínica para câncer de pâncreas, ainda assim é um composto antitumoral com um espectro abrangente, que atua como intercalante de DNA, provocando quebras e inibindo a topoisomerase II (JOHNSON-ARBOR K; DUBEY, 2020).

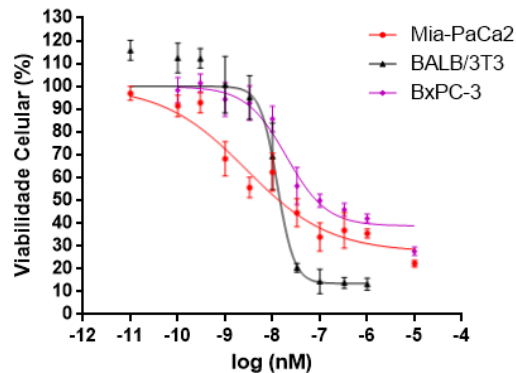
A Figura 9 mostra que a doxorrubicina não deve levar a morte de 100% das células, ao menos quando o metabolismo do MTT é considerado. No entanto, devido a uma série de outros estudos realizados no grupo de pesquisa, foi identificada uma correlação entre o metabolismo do MTT e a morte celular, indicando que algumas células ainda devem estar vivas mesmo nas concentrações mais elevadas. No entanto, para que a doxorrubicina seja usada como um padrão na análise da citotoxicidade, é necessário considerar uma concentração onde haja a maior morte celular, sendo observado nos gráficos da Figura 9 que a 10 μ M há o início do platô inferior para todas as linhagens. Dessa forma, essa foi a concentração escolhida para utilização como controle positivo. Caso as células em cultura para prospecção de novos compostos passem a não mais responder a Doxorrubicina, podemos inferir alterações no comportamento da célula.

4.5 Estudo da citotoxicidade da gencitabina

Esse ensaio foi realizado para as três linhagens: BALB/C 3T3 clone A31, MIA PaCa-2 e BxPC-3. Na Figura 10 temos a viabilidade celular (%) em função da concentração do fármaco. A análise estatística feita com auxílio do programa GraphPad Prism que forneceu o valor de IC50 (concentração em que o fármaco usado diminui a formação de cristais de formazam em 50%), além dos parâmetros R^2 e $Sy.x$ para verificar a qualidade do modelo não linear.

Figura 10: Ensaio de curva concentração-resposta (CCR) para o composto referência gencitabina (controle positivo) nas três linhagens utilizadas no estudo.

Curva Concentração - Resposta Gencitabina



Célula	IC ₅₀ (SE) nM	R ² / Sy.x	SI
BALB/3T3 clone A31	12,7 (0,87)	0,949 / 9,64	-
MIA PaCa-2	2,78 (0,65)	0,887 / 7,98	4,6
BxPC-3	19,6 (0,91)	0,94 / 6,94	0,6

SE = erro padrão. R² = coeficiente de correlação do modelo. Sy.x = desvio do modelo. SI = índice de seletividade (SI = IC₅₀ linhagem não tumoral/ IC₅₀ na linhagem tumoral).

Fonte: Autoria própria.

Os resultados alcançados demonstram uma maior potência da gencitabina para a linhagem MIA PaCa-2 em relação a BxPC-3 (Figura 10). Dependendo do estudo a ser analisado, esse resultado pode ser considerado inesperado para a linhagem MIA PaCa-2, pois é descrito na literatura que ela é resistente a gencitabina, enquanto a BxPC-3 é sensível no experimento usando 3000 células por poço, após a incubação do composto por 72 h e análise usando MTS (ARUMUGAM et al., 2009). No entanto, esses resultados estão dentro da faixa, quando considerado o trabalho de Pandita (2014) para a linhagem MIA PaCa-2 (2,0×10⁵ células/poço) quando foi incubada com a gencitabina por 48 h e a análise foi realizada usando MTT (IC₅₀ = 1,0 μM) e o de Qu (2017) usando a linhagem BxPC-3 (5000 células/poço), após a incubação do composto por 72 h e análise usando o CCK8 (IC₅₀ = 20.2 μM). Isto demonstra que as condições experimentais às quais o composto e a célula estão submetidos e o manuseio destes, levando a uma variação na resposta celular.

A seletividade é bem distinta quando considerada a potência frente a linhagem não tumoral (BALB/3T3 clone A31) demonstrando que a gencitabina é seletiva favoravelmente somente para a linhagem MIA PaCa-2 (Figura 10).

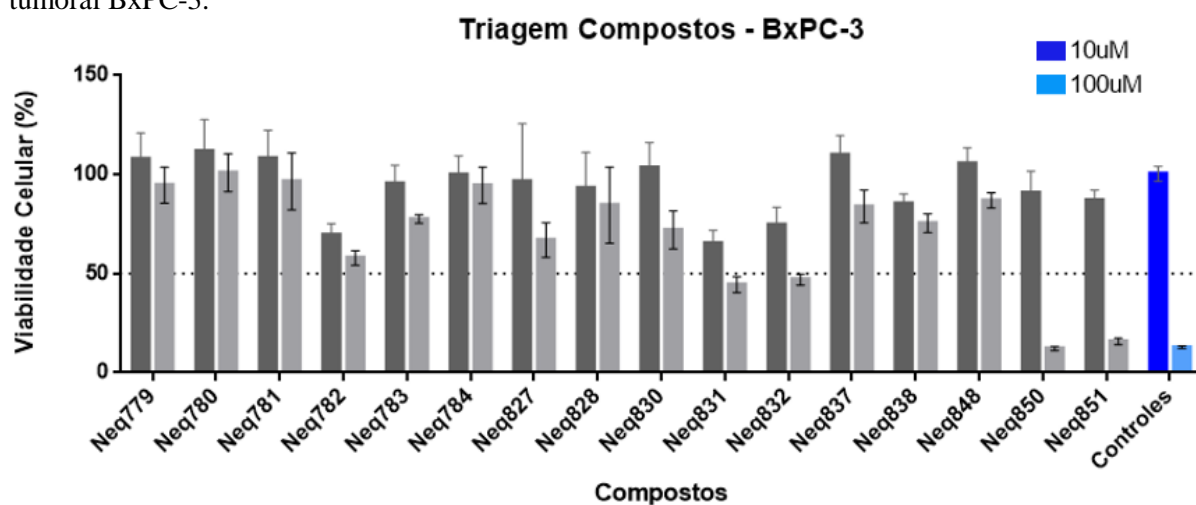
4.6 Triagem dos compostos derivados de dipeptidil nitrilas

Como já relatado, o CP é atualmente a sétima causa de morte por câncer em números globais e nacionais (IARC; INCA) e a menor sobrevida dentre todos os cânceres sólidos (Johns Hopkins Medicine), o que demonstra que as terapias em uso, principalmente a gencitabina (KAMISAWA, 2016), não tem sido eficaz, necessitando de um melhor conhecimento da biologia do CP, além de novos compostos que possam auxiliar no aumento da sobrevida em 5 anos ou mesmo tratamentos definitivos e curativos.

As relações existentes entre o CP e as cisteíno catepsinas B, L e S levantadas no item 1.4.3.1 fornecem um cenário positivo para a busca por inibidores de cisteíno catepsinas e uma possível resposta antitumoral satisfatória. Dessa forma, 16 compostos derivados de dipeptidil nitrilas que podem apresentar atividade inibitória para cisteíno catepsinas foram testados nas linhagens tumorais de pâncreas MIA PaCa-2 e BxPC-3, além da linhagem não tumoral BALB/3T3 clone A31. A doxorrubicina foi usada como referência nos ensaios de triagem, pois apresenta citotoxicidade suficiente para ser utilizada como controle positivo, além de já ser o composto padronizado pelo grupo em ensaios para outras linhagens celulares.

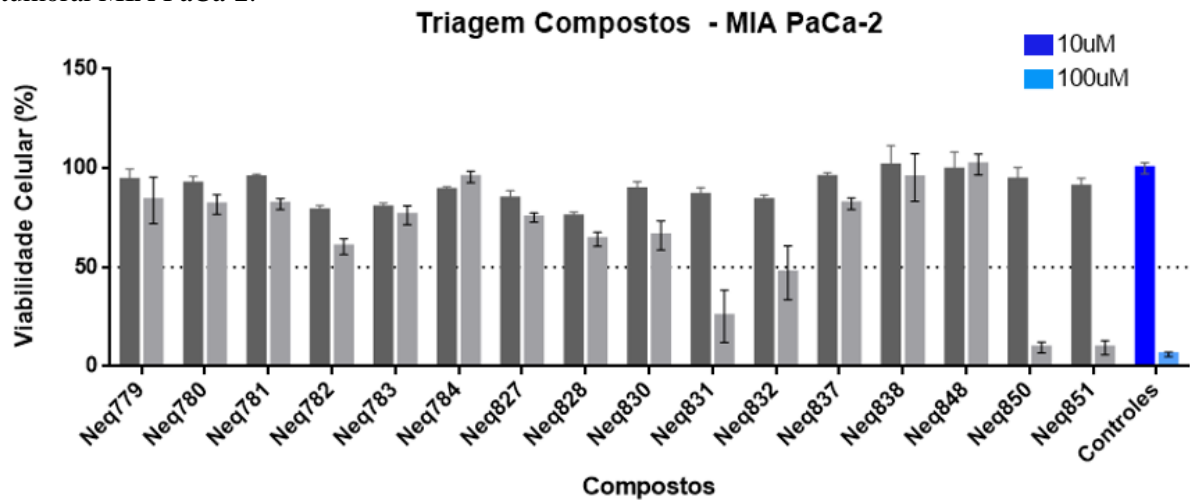
Nas Figuras 11, 12 e 13 temos os resultados do ensaio de triagem, realizado em duas concentrações, 100 μ M e 10 μ M, além dos controles positivo (Doxorrubicina) e negativo. A linhas tracejadas nos gráficos indicam os 50% de viabilidade celular e que serve como um corte para determinar se o composto teve atividade citotóxica ou não.

Figura 11: Análise da citotoxicidade pelo método de MTT para 16 compostos derivados de dipeptidil nitrilas realizadas em duas concentrações (100 μ M e 10 μ M) após 72 h de incubação na linhagem tumoral BxPC-3.



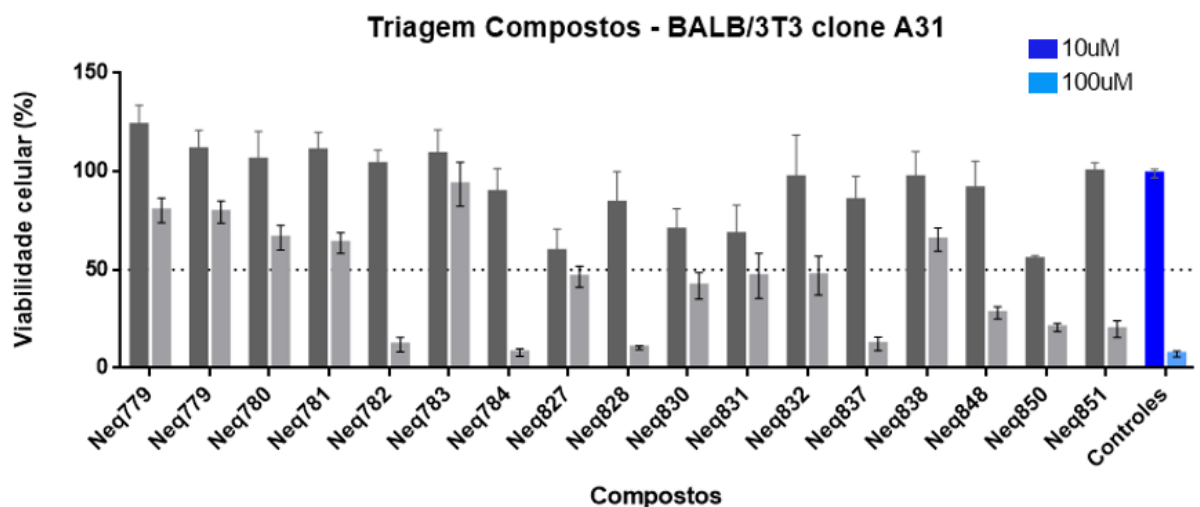
Fonte: Autoria própria.

Figura 12: Análise da citotoxicidade pelo método de MTT para 16 compostos derivados de dipeptidil nitrilas realizadas em duas concentrações (100 μ M e 10 μ M) após 72 h de incubação na linhagem tumoral MIA PaCa-2.



Fonte: Autoria própria

Figura 13: Análise da citotoxicidade pelo método de MTT para 16 compostos derivados de dipeptidil nitrilas realizadas em duas concentrações (100 μ M e 10 μ M) após 72 h de incubação na linhagem não tumoral BALB/3T3 clone A31.



Fonte: Autoria própria.

Como pode ser visto nas Figuras 11 e 12, os compostos 831, 832, 850 e 851 em 100 μ M foram citotóxicos para as duas linhagens tumorais, além da linhagem não tumoral (Figura 13) e foram escolhidos para os ensaios seguintes que buscam acessar informações mais detalhadas. Percebe-se que a linhagem controle BALB/3T3 clone A31 (Figura 13) apresentou citotoxicidade aos compostos (782, 784, 827, 828, 830, 831, 832, 837, 848) em 100 μ M, que não foram citotóxicos nas linhagens tumorais, o que pode ser explicado por diferenças biológicas entre as

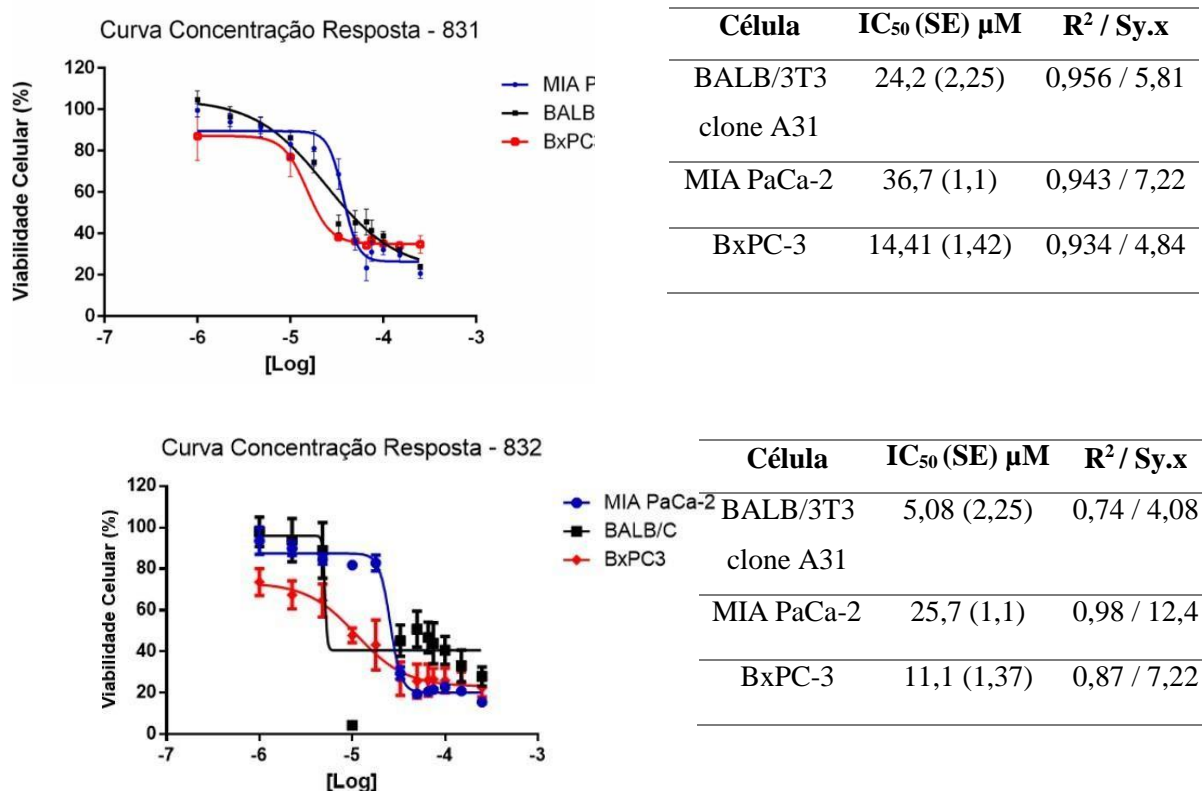
linhagens celulares, em que compostos químicos podem resultar em respostas diferentes (MANNERSTRÖM et al., 2017).

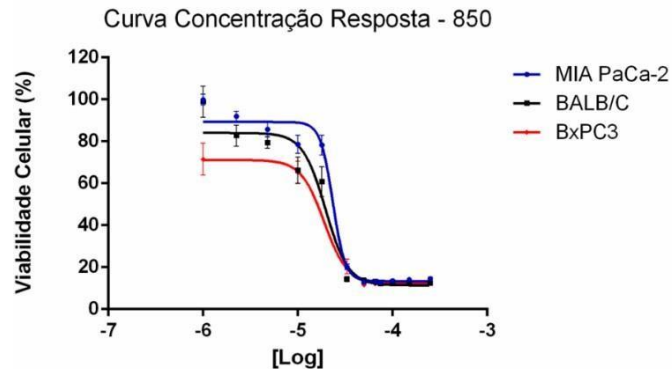
4.7 Curva concentração-resposta dos compostos citotóxicos

De acordo com os resultados apresentados no item anterior, quatro compostos (831, 832, 850 e 851) apresentaram citotoxicidade nas linhagens tumorais MIA PaCa-2 e BxPC-3. Esses compostos então, necessitaram de melhor caracterização para acessarmos o IC₅₀ e uma possível seletividade para a linhagem tumoral, como já explicado. Foram utilizadas 12 concentrações para a realização das curvas concentração-respostas das três linhagens em estudo (BALB/3T3 clone A31, MIA PaCa-2, 12 e BxPC-3).

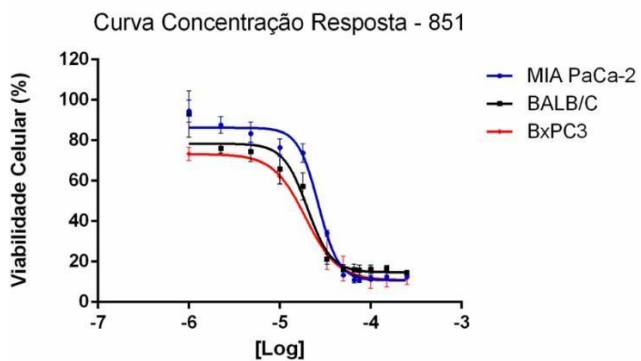
É interessante notar que, embora os compostos tenham apresentado a mesma faixa de IC₅₀, a linhagem BxPC-3 se mostrou mais sensível aos compostos em comparação com a outra linhagem tumoral (MIA PaCa-2) observando os valores de IC₅₀ apresentados na Figura 14. O composto com maior potência dentre os estudados neste ensaio foi o 832 na linhagem BxPC-3, com um valor de IC₅₀ igual a 11,1 µM. É a primeira vez que realizamos testes com a linhagem BxPC-3 no nosso grupo de pesquisa. Portanto, pode ser uma característica da linhagem em ser mais sensível aos compostos por nós desenvolvidos, em relação a linhagem MIA PaCa-2.

Figura 14: Curva Concentração Resposta dos compostos citotóxicos (831, 832, 850, 851) para as linhagens MIA PaCa-2, BALB/3T3 clone A31 e BxPC-3, e IC₅₀, R² e Sy.x correspondentes. SE = Erro Padrão.





Célula	IC ₅₀ (SE) μ M	R ² / Sy.x
BALB/3T3 clone A31	21,0 (0,73)	0,952 / 7,17
MIA PaCa-2	23,2 (0,63)	0,975 / 5,79
BxPC-3	19,1 (1,13)	0,971 / 4,01



Célula	IC ₅₀ (SE) μ M	R ² / Sy.x
BALB/3T3 clone A31	20,1 (0,86)	0,952 / 6,12
MIA PaCa-2	26,5 (0,64)	0,98 / 4,99
BxPC-3	19,2 (1,34)	0,947 / 4,55

Fonte: Autoria própria.

A linhagem BxPC-3 também apresentou valores de IC₅₀ menores aos encontrados para a linhagem controle BALB/3T3 clone A31, com exceção do composto 832. Dessa forma, os compostos 850 e 851 foram equipotentes entre a linhagem BxPC-3 e a não tumoral, enquanto o composto 831 foi seletivo para a linhagem BxPC-3, como mostrado na Tabela 3. A faixa de valores de IC₅₀ observada para os novos compostos testados foi similar aos fármacos de referência doxorubicina e gencitabina, o que é um bom indicativo da potência destas novas substâncias citotóxicas. Apesar do composto 832 ter apresentado valor de IC₅₀ menor em comparação com o composto 831, o composto 831 foi escolhido para aprofundar os estudos da atividade biológica, por ter tido seletividade para a linhagem BxPC-3.

Tabela 3: Valores de índice de seletividade (SI) dos compostos citotóxicos presentes no estudo

Compostos	(SI) MIA PaCa-2	(SI) BxPC-3
831	0,66	1,67
832	0,20	0,46
850	0,84	1,03
851	0,76	1,05

Fonte: Autoria própria.

4.8 Estudo da morfologia celular

Os ensaios com microscopia de fluorescência fazem parte de um segundo estágio do trabalho, em que não apenas é estudado se o composto é citotóxico, mas como o composto atua na célula e quais modificações fenotípicas ocorrem. Assim, torna-se possível inferir mecanismos de ação que devem ser corroborados por outros métodos. Nestes ensaios foram utilizados marcadores para estruturas celulares como lisossomos, mitocôndrias, regiões ácidas do citoplasma e núcleo.

4.8.1 Estudo da morfologia celular – alterações originadas pela ação do composto 831 em BxPC-3

O composto 831 foi o composto escolhido para dar andamento nos experimentos de microscopia. Embora o composto 832 seja o de maior potência, ele não foi seletivo para a linhagem tumoral.

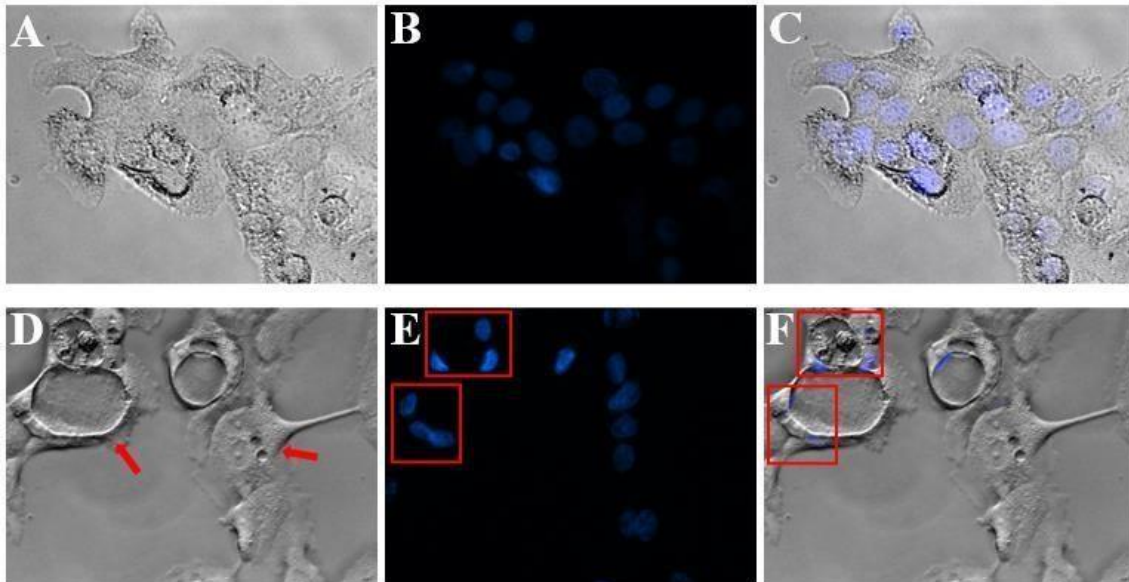
Na Figura 15 abaixo vemos as morfologias dos controles negativos em comparação com as alterações morfológicas resultantes da administração do composto 831, chamando a atenção a formação de grandes vacúolos. Na Fig. 15D, com tratamento com o composto 831, vemos tanto vacúolos (indicado pelas setas vermelhas) de grande tamanho, correspondendo a praticamente todo o citoplasma, como vacúolos menores, que acreditamos que passam por um processo de coalescência, crescendo em tamanho. Também na Fig. 15D e Fig. 15E e Fig. 15F, vemos como os núcleos estão localizados margeando o vacúolo de grande tamanho sem uma boa definição sobre a qual célula pertence o vacúolo. São necessários mais estudos, para averiguar como estes vacúolos evoluem ao longo do tempo, tanto para visualizar a coalescência, quanto para averiguar a dinâmica relacionada aos núcleos e vacúolos.

Atualmente há muitos tipos de mortes celulares descritos (GALLUZZI, 2018), com características moleculares e morfológicas associadas específicas, nos permitindo direcionar maiores investigações de processos celulares e tipos de morte celular em que há formação de

vacúolo, tal qual observado em nossos estudos.

A morfologia típica de morte celular tipo apoptose é caracterizada pelo encolhimento da célula, formação de expansões como bolhas (blebs) da membrana plasmática, perda do posicionamento normal das organelas e condensação e fragmentação do DNA (YAN; ELBADAWI; EFFERTH, 2020), o que não corresponde com a morfologia observada nas células tratadas com 831 (Figura 15).

Figura 15: Microscopia em campo claro e de epifluorescência com a linhagem de câncer de pâncreas BxPC-3. Em A (campo claro), B (núcleos marcados com Hoechst 33342) e C (sobreposição de A e B) temos células BxPC-3 sem nenhum tratamento (controle negativo). Em D (campo claro), E (núcleos marcados com Hoechst 33342) e F (sobreposição de D e E) temos células BxPC-3 com tratamento do composto 831 ($[IC_{50}]$). As setas vermelhas indicamos vacúolos observados nas células tratadas com o composto 831. As áreas demarcadas em vermelho indicam a localização de núcleos próximos uns aos outros, possivelmente compartilhando os mesmos vacúolos. Aumento de 60X na objetiva.



Fonte: Autoria própria

Há diversos tipos de mortes celulares e alterações fisiológicas relacionadas com a formação de vacúolos (SHUBIN et al., 2016), porém não é uma das características observadas na apoptose (GALLUZZI, 2018). Os tipos de morte celular com formação de vacúolos são morte tipo autofágica, morte tipo entose, morte tipo metuose e morte tipo paraptose (YAN; ELBADAWI; EFFERTH, 2020).

Embora tenhamos visto células com núcleos aparentemente partilhando um único vacúolo (regiões delimitadas em vermelho), como nas imagens da Fig. 15D, Fig. 15E e Fig. 15F, os núcleos estão dispostos lado a lado, enquanto em entose, outro tipo de morte celular, uma célula é internalizada por outra, com o núcleo da célula internalizada sendo visualizado dentro do vacúolo (OVERHOLTZER et al., 2007). É necessário investigar em mais detalhes se

de fato o que é observado nas Figuras 15D, 15E e 15F se trata de células partilhando o mesmo vacúolo e quais mecanismos poderiam estar envolvidos. Temos também a formação de diversos vacúolos em algumas células (Fig. 15), o que não seria observado em entose.

No caso da metuose, há a formação, acúmulo e coalescência de vacúolos e estes possuem marcadores endossomais tardios, como a proteína-1 de membrana associada ao lisossomo (LAMP1) e Rab7. Interessante que no caso da metuose, os vacúolos não são reciclados ou fundidos com lisossomos, levando à morte celular (YAN; ELBADAWI; EFFERTH, 2020). Essas características também foram observadas nas células tratadas com composto 831, em que os vacúolos têm tamanho menor, porém em maior quantidade (Fig. 15D), provavelmente no começo do processo, e podem acabar por se fundir (coalescência), gerando os vacúolos de grande tamanho (Fig. 15D).

Com relação a paraptose, temos a formação de múltiplos vacúolos de membrana única, visualizados por microscopia eletrônica. Os vacúolos formados por este tipo de morte celular são derivados da dilatação do retículo endoplasmático ou mitocôndria (SPERANDIO; BELLE; BREDESEN, 2000), e seriam necessários estudos mais específicos para determinar se os vacúolos por nós encontrados teriam alguma relação a este tipo de morte celular.

A autofagia, processo que envolve lisossomos na formação de autolisossomos e que tem elevados níveis em câncer de pâncreas (PIFFOUX; ERIAU; CASSIER, 2021) sempre foi um processo que dedicamos atenção, sobretudo por conta de a inibição de autofagia em CP resultar em aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos ao DNA, podendo levar à morte celular (HASHIMOTO et al., 2014). De forma importante, a regulação do processo autofágico é em grande parte regulado pelas peptidases lisossomais, com as cisteíno catepsinas B, L, C e S tendo propriedades pró-sobrevivência. A inibição de sua atividade tem como efeito um distúrbio na ciclagem proteica, e com isso há um acúmulo de autofagossomos e aumento de ROS (JAKOŠ, 2019). Ao observar a formação dos vacúolos pela ação do composto 831 (Fig. 15), nossa atenção novamente se voltou a autofagia pelos vacúolos poderem refletir este fenômeno de acúmulo de autofagossomos, e por ser uma das características principais da morte tipo autofágica (SHUBIN et al., 2016), se torna uma hipótese a ser investigada futuramente.

A partir dos inúmeros processos biológicos em que há a ocorrência de formação de vacúolos, percebe-se que sua formação não significa uma informação conclusiva da ação dos compostos, mas nos impulsiona para estudar as possibilidades que podem explicar quais mecanismos estão por trás de sua ocorrência.

Com relação a autofagia, alguns marcadores podem ser utilizados para confirmar se os vacúolos formados têm origem neste processo. As membranas de isolamento podem ser

visualizadas com alguns marcadores, como o ULK1 e LC3, que também é marcador do autofagossomo. Os autofagossomos acabam por se fundir aos lisossomos, e podem ser visualizados pelos marcadores LC3 (autofagossomo), LysoTracker e LAMP1/2 (lisossomos), o que deverá ser feito para investigação da relação entre os fenótipos observados e a autofagia.

Para investigar os fenótipos observados, foram utilizados marcadores de despolarização da mitocôndria, e laranja de acridina. A ideia de utilizar um marcador para a despolarização da mitocôndria era de nos informar a localização desta organela em relação aos vacúolos e a atividade das mitocôndrias (vermelho, ativo; verde, inativo), uma vez que mitocôndrias são substrato de processos autofágicos (MOREAU; LUO; RUBINSZTEIN, 2010). Isto nos dá maior entendimento da natureza do vacúolo e sua relação com a fisiologia celular global. Além disso, o composto laranja de acridina, que é um marcador indireto de autofagia (MURUGAN; AMARAVADI, 2016) usado para acessar regiões ácidas da célula. Dessa forma, poderíamos averiguar esta informação quanto ao posicionamento dos vacúolos na célula. No entanto, por dificuldades na manutenção da linhagem celular BxPC-3, estes ensaios não foram realizados para esta linhagem, precisando ainda ser feito em momento futuro.

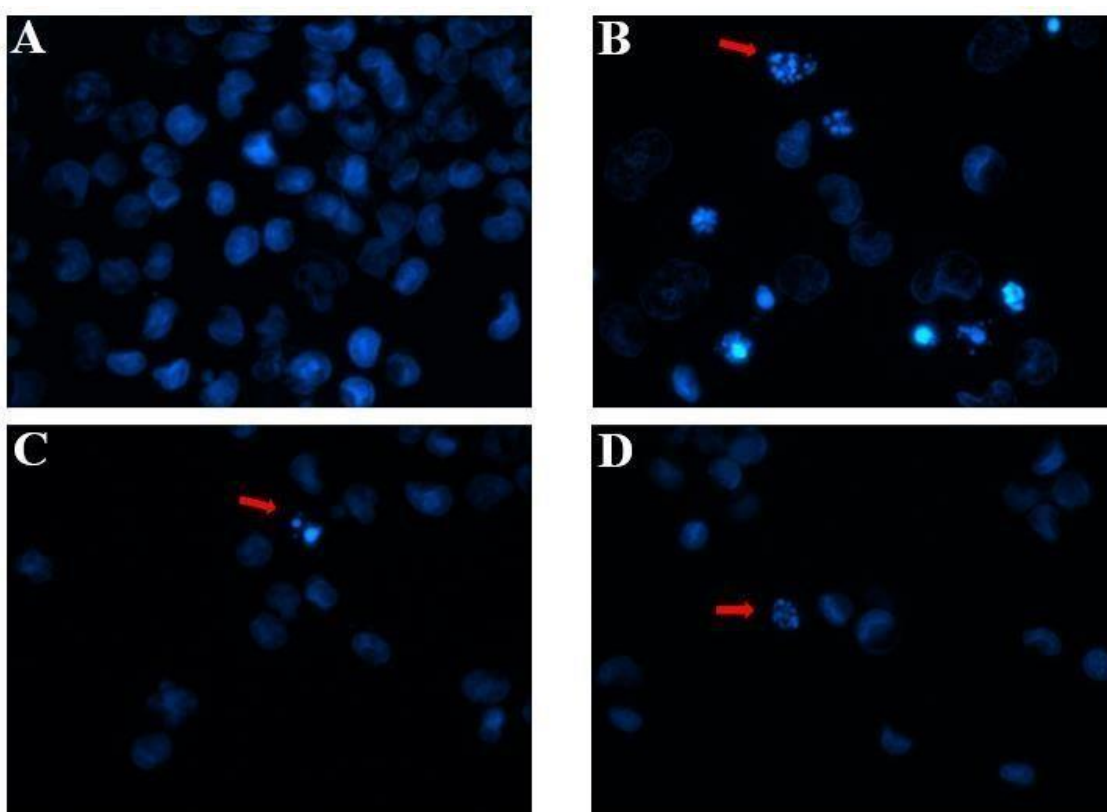
4.8.2 Resposta celular da linhagem MIA PaCa-2 para o composto 831

Da mesma forma como feito para a linhagem BxPC-3, o ensaio de microscopia com o composto 831 foi realizado para avaliação da morfologia celular na linhagem de câncer de pâncreas MIA PaCa-2. A linhagem MIA PaCa-2 não apresentou formação de vacúolos, ao contrário do que ocorreu com a linhagem BxPC-3. Esta resposta distinta é muito importante para demonstrar que linhagens celulares de um mesmo tipo de câncer podem ter respostas diferentes a um mesmo composto. Isto ocorre pela grande variabilidade genética existente entre as linhagens e, mesmo em um mesmo tumor de um paciente, a variabilidade tem importante significado (MROZ; ROCCO, 2017). As diferenças entre BxPC-3 e MIA PaCa-2 serão levantadas em um tópico posterior.

Na Figura 16 temos a visualização de núcleos celulares com marcador Hoechst 33342. Em Fig. 16E, 16F, 16G e 16H temos as morfologias nucleares de uma célula normal, célula apoptótica, célula necrótica e célula em divisão respectivamente. Nas Fig. 16I e Fig 16J temos os núcleos apoptóticos após administração da doxorubicina (LI et al., 2019) e gencitabina (MIZUKAMI et al., 2005). Nas Fig. 16B e 16C temos as marcações dos núcleos apoptóticos realizado em experimento do presente estudo nas células tratadas com doxorubicina e gencitabina, o que era esperado por ambos compostos induzirem apoptose (LI et al., 2019; MIZUKAMI et al., 2005). No caso das células MIA PaCa-2 na presença de 831 (Fig. 16D),

vemos também a presença de núcleo com morfologia apoptótica (algo não presente nos ensaios com as células BxPC-3) em menor quantidade quando comparadas a células tratadas com doxorubicina (Fig. 16B).

Figura 16: Microscopia de epifluorescência com diversos marcadores na linhagem de câncer de pâncreas MIA PaCa-2. As imagens mostram os núcleos marcados em azul com Hoechst 33342. (A) células sem tratamento (controle negativo). (B) células tratadas com doxorubicina ($[IC_{50}]$). (C) células tratadas com gencitabina ($[IC_{50}]$). (D) células tratadas com o composto 831 ($[IC_{50}]$). As setas vermelhas indicam núcleos fragmentados característicos de célula em processo de apoptose. Aumento de 100x e 600x.



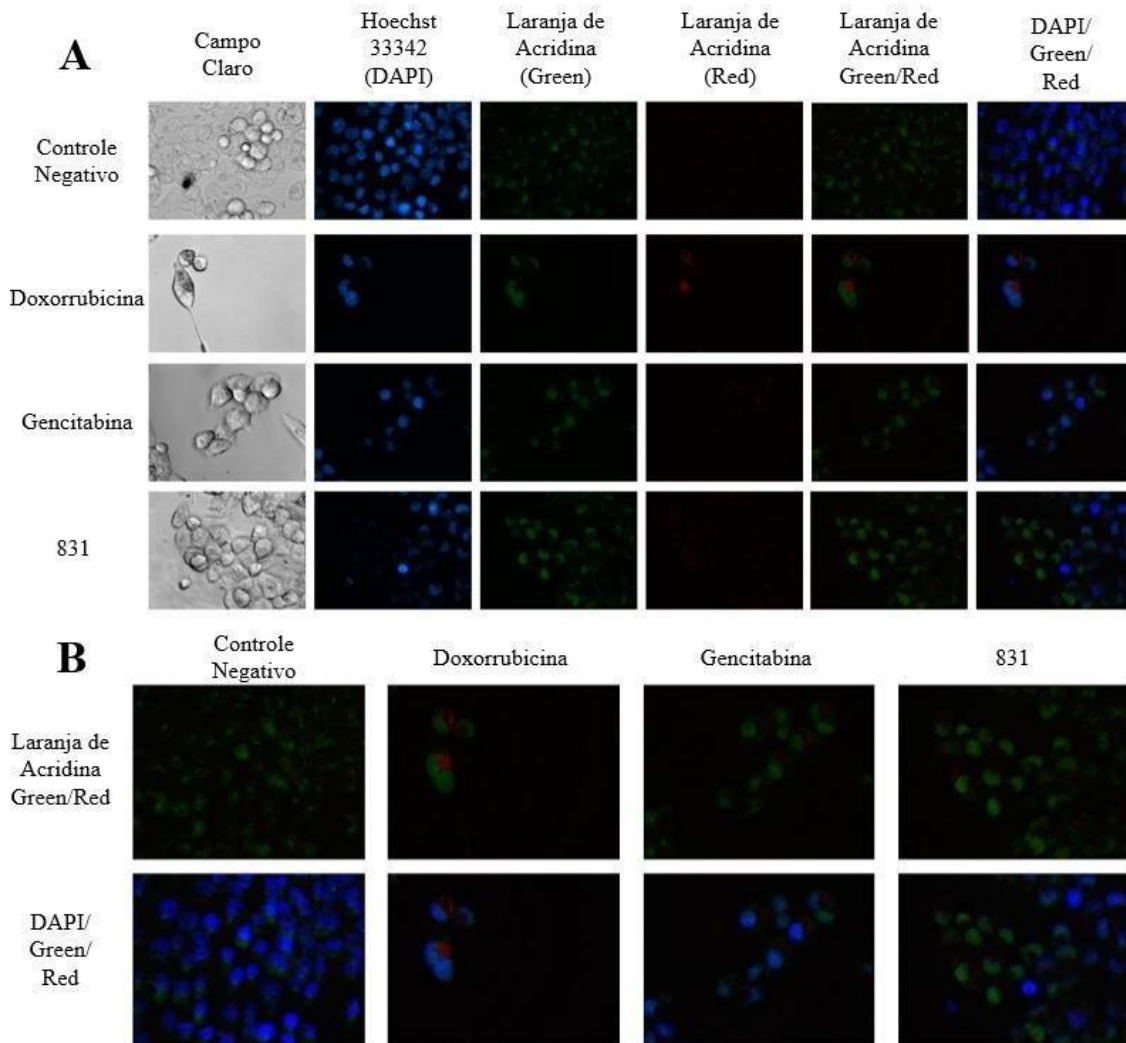
Fonte: (A, B, C e D) autoria própria.

Como descrito anteriormente, os resultados obtidos com a linhagem BxPC-3 trouxeram a necessidade de maiores investigações, no caso com os marcadores de despolarização de membrana da mitocôndria e do laranja de acridina, para compreender melhor a biologia dos vacúolos observados, e como também explicado no item anterior, estes ensaios ainda não foram realizados. De toda forma, realizamos os ensaios fenotípicos com estes marcadores para a linhagem MIA PaCa-2.

Na Fig. 17 temos as células (MIA PaCa-2) com administração do IC_{50} dos compostos doxorubicina, gencitabina e 831, além do controle negativo. O marcador utilizado, laranja de acridina, é protonado e preso em vesículas ácidas, tendo neste caso a fluorescência vermelha,

sendo assim utilizado para avaliar processos como a autofagia. Além disso, ele se liga ao dsDNA emitindo fluorescência verde e vermelha, quando ligado ao ssDNA ou RNA. Podemos visualizar que as células não tratadas (controle negativo) apresentam marcação em verde, com marcação imperceptível em vermelho, quando comparada às células tratadas com doxorrubicina, gencitabina e 831. É sabido que o citoplasma de células em apoptose possui uma acidificação (LAGADIC-GOSSMANN; HUC; LECUREUR, 2004), no entanto, a fluorescência em vermelho do laranja de acridina ocorre quando este está localizado em vesículas com pH ácido, ou ligado ao ssDNA e RNA. Desta forma, as áreas em vermelho visualizadas podem corresponder a estas três estruturas. Não é possível realizar conclusões definitivas somente com este ensaio, porém deve ser realizá-lo para termos um comparativo em um momento futuro quando o mesmo ensaio for feito para a linhagem BxPC-3, que apresenta vacúolos quando administrada com o composto 831.

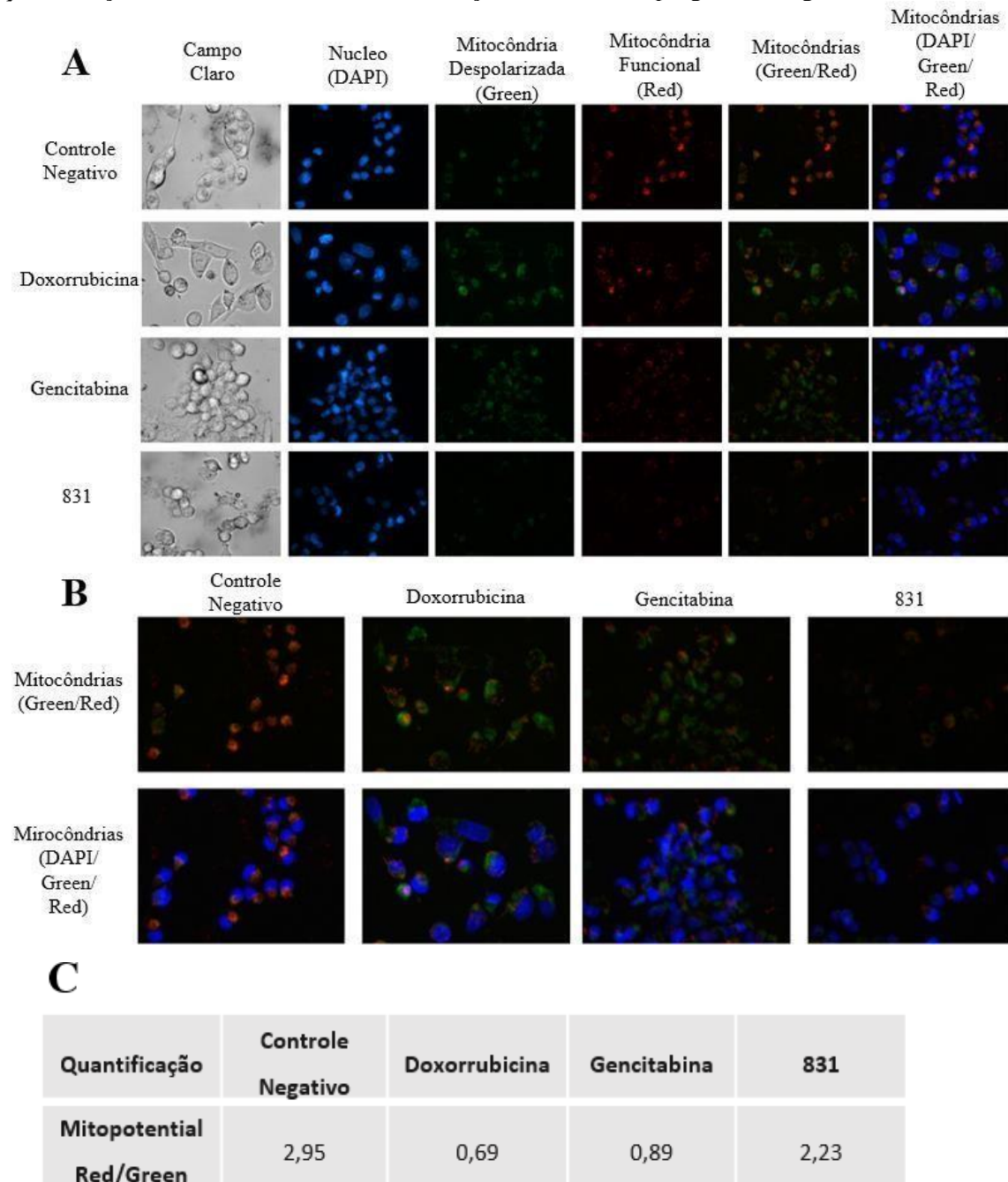
Figura 17: Análise da acidez das organelas nas células MIA PaCa-2. Em A temos um painel de imagens das células com o controle negativo, células tratadas com doxorubicina (IC_{50}), gencitabina (IC_{50}) e 831 (IC_{50}), utilizando os marcadores Hoechst 33342 para o núcleo e laranja de acridina para o núcleo (verde) e regiões ácidas (vermelho). Em B temos as imagens com sobreposição de marcadores em maior tamanho para melhor visualização. Aumento de 600X.



Fonte: Autoria própria

O marcador do potencial mitocondrial também foi feito e nos deu informações interessantes (Fig. 18). Novamente, temos duas situações em termos de fluorescência. Em verde estão marcadas as mitocôndrias com perda do potencial de membrana, enquanto as funcionais estão mostradas em vermelho, exercendo com seu importante papel para a homeostase celular.

Figura 18: Análise da polarização da membrana da mitocôndria na linhagem MIA PaCa-2. Em A temos um painel com o controle negativo, células tratadas com doxorubicina ($[IC_{50}]$), gencitabina ($[IC_{50}]$) e 831 ($[IC_{50}]$), utilizando os marcadores Hoechst 33342 para o núcleo e potencial de membrana das mitocôndrias despolarizadas (verde) e mitocôndrias funcionais (vermelho). Em B temos as imagens com sobreposição de marcadores em maior tamanho para melhor visualização. Em C temos a razão da quantificação de fluorescência entre as colorações realizada no programa ImageJ. Aumento de 600X.



Fonte: Autoria própria.

No controle negativo é possível constatar que há uma nítida diferença na marcação em vermelho das mitocôndrias (razão vermelho/verde = 2,95) que estão polarizadas e funcionais. De forma similar, mas com menor intensidade, as células tratadas com o composto 831 (razão vermelho/verde = 2,233) apresentam muitas mitocôndrias funcionais. Como esperado, as

células tratadas com doxorubicina (razão vermelho/verde = 0,692) e gencitabina (razão vermelho/verde = 0,899) demonstram estar morrendo com a despolarização da membrana mitocondrial (Fig. 24). Isso demonstra que as células tratadas com os compostos de referência tiveram a homeostase mitocondrial mais afetada do que células tratadas em relação ao composto 831, cujos resultados estiveram mais próximos do controle negativo do que com os compostos referência. É importante dizer, que a mitocôndria é apenas um dos vários indicadores da fisiologia celular, e mais estudos são necessários para entender melhor quais efeitos são ocasionados pela administração do composto 831. Tal qual para o laranja de acridina, este ensaio será de grande valia para discutirmos mais adiantes quando realizado com a linhagem BxPC-3.

4.8.3 Diferenças de resultados entre as linhagens de câncer de pâncreas e o papel dos lisossomos

É nítida as diferenças em resposta ao composto 831 entre as linhagens BxPC-3 e MIA PaCa-2, demonstrando a importância da realização da caracterização da resposta de um composto em estudo em um painel de linhagens celulares dentro de um mesmo tipo tumoral, e para diferentes tipos tumorais. Atualmente há um grande problema com a enorme quantidade de fármacos que falham nos ensaios clínicos por apresentarem respostas apenas em uma limitada quantidade de linhagens celulares. Caso tal fato não seja levado em consideração, trará consequências quando o composto é utilizado em um ensaio com grande complexidade genética e fenotípica. Mesmo a utilização de seis linhagens de um mesmo tumor pode se mostrar insuficiente para demonstrar diferenças estatísticas importantes para detectar correlações e diferenças consideradas essenciais ao desenvolvimento tumoral. Para afirmar qualquer relação entre as diferenças encontradas na resposta ao composto 831 entre as linhagens MIA PaCa-2 e BxPC-3 relacionadas a qualquer diferença genética, seriam necessários estudos para traçar perfis genéticos que carregam um significado biológico importante. Além disso, a morte celular induzida é fármaco- dependente ou dependente do tipo celular, podendo um mesmo composto levar a diferentes tipos de morte celular de acordo com a célula em questão (MCCONKEY et al., 2010). Uma característica importante que difere entre as duas linhagens e que poderia explicar a presença de vacúolos em BxPC-3 e a ausência de vacuolos em MIA PaCa-2, seria a produção de mucina pela linhagem BxPC-3, como relatados nos bancos de célula ATCC e Banco de Células do Rio de Janeiro. A mucina é uma glicoproteína com diversas funções no organismo, como a manutenção de sua integridade, lubrificação e proteger as superfícies epiteliais dentro do corpo. Em câncer de pâncreas, há o aumento da expressão de mucinas,

participando ativamente da progressão do adenocarcinoma pancreático e desenvolvimento de metástases (MONIAUX; BRAND; BATRA, 2004). A mucina presente nas células tumorais forma uma camada protetora, facilitando o escape imunológico e a sinalização celular, além de diminuir a absorção de quimioterápicos (WANG et al., 2020). Desta forma, caso o nosso composto esteja de fato impedindo a via de secreção das mucinas produzidas pela célula BxPC-3, nós podemos estar sensibilizando as células tumorais a algum quimioterápico utilizado em combinação, como a gencitabina (BAFNA et al., 2009; MIMEAULT et al., 2010; NATH et al., 2013). No entanto, o próprio fenótipo observado, em que temos o acúmulo destas vesículas de secreção, modifica a dinâmica celular, com o citoplasma diminuído pela presença dos vacúolos de diferentes tamanhos, o que por si só pode levar a célula a morte.

Com relação aos lisossomos, temos na literatura que há mudanças na morfologia, número, pH do lúmen, conteúdo de suas enzimas, distribuição e localização intracelular, com notável aumento da população periférica e diminuição da população perinuclear (KALLUNKI; OLSEN; JÄÄTTELÄ et al., 2013; KROEMER; JÄÄTTELÄ, 2005; NISHIMURA, 2002). Percebemos então que a biologia dos lisossomos é alterada de múltiplas formas em células tumorais, e tem importante significado biológico, principalmente por estarem envolvidos em mecanismos de resistência a terapias antitumorais e na progressão tumoral e metástase. Ao haver um aumento da população periférica com posterior exocitose, dois eventos estão ocorrendo de forma simultânea, um deles é a liberação de quimioterápicos acumulados no lúmen lisossomal no meio extracelular, resultando na diminuição da eficácia do tratamento ao haver um distanciamento do fármaco administrado de seu alvo molecular, muitas vezes intracelular ou nuclear. O outro evento que ocorre com esta exocitose é a liberação das enzimas lisossomais, que acaba por degradar componentes da ECM, promovendo o desenvolvimento de metástase. É possível então traçar uma relação entre o aumento da população periférica de lisossomos e um pior prognóstico (resistência a tratamentos e metástase) (BIAN et al., 2016; BRIX et al., 2014; OLSON; JOYCE, 2015; PU et al., 2015; RAFN et al., 2012; SCHIEFERMEIER et al., 2014). Desta forma, diminuir a população periférica, aumentando a população perinuclear, que é o encontrado em situações de homeostase, por meio de compostos que atuem nesta fisiologia alterada, pode ser uma alternativa para obter tratamentos quimioterápicos mais efetivos e diminuir a progressão tumoral.

As duas populações de lisossomos se comunicam por uma via de microtúbulos ou por difusão de baixa velocidade. Os mecanismos pelos quais as células tumorais utilizam para alterar a localização dos lisossomos ainda não é muito bem estabelecido. (HÄMÄLISTÖ; JÄÄTTELÄ, 2016). Uma das possíveis explicações é a acidificação do microambiente tumoral

que influencia na localização periférica de lisossomos e exocitose (KALLUNKI; OLSEN; JÄÄTTELÄ, 2013). Um outro estudo sugere que o aumento da atividade das proteases lisossomais do interior do lúmen, em especial as catepsinas B e L, promovem a localização periférica dos lisossomos (BIAN et al., 2016; BRIX et al., 2014) e ainda, a expressão aumentada de catepsinas em resposta a super expressão de TFEB tem um efeito similar nas populações lisossomais (MEDINA et al., 2011). Desta forma, inibir a atividade de cisteíno catepsinas, e ao que indicam os estudos acima relatados, inibir as catepsinas B e L, podem resultar na diminuição da população lisossomal periférica com diminuição da atividade lisossomal e de suas proteases na progressão tumoral.

5. Conclusões e perspectivas

O estudo levou a identificação de quatro novos compostos citotóxicos derivados de dipeptidil nitrilas a partir do estudo inicial com 16 compostos em 3 linhagens celulares, sendo uma delas controle (Balb/3T3 clone A31) e duas linhagens de câncer de pâncreas (MIA PaCa-2 e BxPC-3). Dos 16 compostos testados, quatro deles demonstram ter perfil citotóxico, com os compostos 831, 850 e 851 sendo discretamente seletivos para a linhagem BxPC-3. Além disso a linhagem BxPC-3 se mostrou mais sensível aos compostos testados em comparação à linhagem MIA PaCa-2.

Dos quatro compostos citotóxicos, o composto 831 foi escolhido para ser estudado em maior detalhe. Ao longo dos experimentos de microscopia de epifluorescência, foi observada a formação vacúolos em diversos tamanhos e número nas células da linhagem BxPC-3.

O marcador relacionado à função da membrana da mitocôndria nos mostrou que há um pequeno aumento de mitocôndrias despolarizadas em células MIA PaCa-2 administradas com o composto 831 quando comparado ao apresentado pelo controle negativo, porém bem inferior aos compostos de referência doxorubicina e gencitabina. Estes experimentos foram importantes para averiguar qual o efeito do composto 831 na quantidade de vesículas ácidas, que podem estar associadas à autofagia e como este composto afeta a homeostase mitocondrial, além de podermos comparar futuramente com os dados da linhagem BxPC-3 com os mesmos marcadores. Além destes experimentos, em BxPC-3, o composto 831, poderia ser administrado em outras linhagens celulares para avaliação morfológica e se haverá formação de vacúolos, podendo então, fazer uma comparação com os perfis moleculares de genes-chaves das linhagens que tiveram formação de vacúolos, e das que não tiveram, podendo também ser um fenômeno encontrado apenas para a linhagem BxPC-3.

Como perspectiva de estudos temos uma série de experimentos que poderão ser realizados para avaliação de aspectos importantes dos lisossomos e cisteíno catepsinas na fisiologia celular e progressão tumoral, características estas amplamente discutidas na literatura.

Referências

- ABBOUD-JARROUS, G. et al. Cathepsin L is responsible for processing and activation of proheparanase through multiple cleavages of a linker segment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 26, p. 18167-18176, 2008.
- ADAMSKA, A.; DOMENICHINI, A.; FALASCA, M. Pancreatic ductal adenocarcinoma: current and evolving therapies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1338-1381, 2017.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 13, p. 722-723.
- AMENDOEIRA, M. R. R.; CAPUTO, L. F. G.; MOLINARO, E. M. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio; Instituto Oswaldo Cruz, 2010. v. 2.
- AMRUTKAR, M.; GLADHAUG, I. P. Pancreatic cancer chemoresistance to gemcitabine. **Cancers**, v. 9, n. 11, p. 157-180, 2017.
- ARUMUGAM, T. et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. **Cancer Research**, v. 69, n. 14, p. 5820-5828, 2009.
- ASSANGA, I. et al. Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities. **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research**, v. 4, n. 4, p. 60-70, 2013.
- ASSOCIAÇÃO TÉCNICO CIENTÍFICA PAUL EHRLICH. **MIA PaCa-2**. Disponível em: <http://bcrcj.org.br/celula/Mia-Paca-2-Human-Pancreatic-Carcinoma>. Acesso em: 23 jan. 2019.
- ATCC. MIA PaCa-2 (ATCC® CRL-1420™). Disponível em: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-1420.aspx>. Acesso em: 12 abr. 2021.
- ATCC.BALB/3T3 clone A31 (ATCC® CCL-163™). Disponível em: https://www.atcc.org/en/Products/Quality_Control_Strains/By_Organization_Company/CCL-163.aspx. Acesso em: 23 jan. 2019.
- ATCC.BxPC3 (ATCC® CRL-1687™). Disponível em: <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1687.aspx>. Acesso em: 23 jan. 2019.
- AVELAR, L. A. A. et al. Molecular design, synthesis and trypanocidal activity of dipeptidyl nitriles as cruzain inhibitors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003916>.
- AVIVAR-VALDERAS, A. et al. Regulation of autophagy during ECM detachment is linked to a selective inhibition of mTORC1 by PERK. **Oncogene**, v. 32, n. 41, p. 4932-4940, 2013.
- BAFNA, S. et al. Pancreatic cancer cells resistance to gemcitabine: the role of MUC4 mucin. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 7, p. 1155-1161, 2009.

- BALLABIO, A.; BONIFACINO, J. S. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 2, p. 101-118, 2020.
- BAO, L. et al. Induction of autophagy contributes to cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 1, p. 91-98, 2015.
- BIAN, B. et al. Cathepsin B promotes colorectal tumorigenesis, cell invasion, and metastasis. **Molecular Carcinogenesis**, v. 55, n. 5, p. 671-687, 2016.
- BIANCHI, V. et al. Inhibition of ribonucleotide reductase by 2'-substituted deoxycytidine analogs: possible application in AIDS treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 18, p. 8403-8407, 1994.
- BONAM, S. R.; WANG, F.; MULLER, S. Lysosomes as a therapeutic target. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 12, p. 923-948, 2019.
- BOSETTI, C. et al. Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the international pancreatic cancer case-control consortium. **Annals of Oncology**, v. 25, n. 10, p. 2065-2072, 2014.
- BOYA, P.; REGGIORI, F.; CODOGNO, P. Emerging regulation and functions of autophagy. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 7, p. 713-720, 2013.
- BRIX, D. M. et al. Screening and identification of small molecule inhibitors of ErbB2-induced invasion. **Molecular Oncology**, v. 8, n. 8, p. 1703-1718, 2014.
- BRIX, Klaudia et al. Proteolysis mediated by cysteine cathepsins and legumain—recent advances and cell biological challenges. **Protoplasma**, v. 252, n. 3, p. 755-774, 2015.
- BURRIS, H. A. 3rd et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 15, n. 6, p. 2403-2413, 1997.
- BURTOLOSO, A. C. B. et al. Anti-trypanosomal activity of non-peptidic nitrile-based cysteine protease inhibitors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005343>.
- CAI, Q.; YAN, L.; XU, Y. Anoikis resistance is a critical feature of highly aggressive ovarian cancer cells. **Oncogene**, v. 34, n. 25, p. 3315-3324, 2015.
- CAICEDO, J. C. et al. Data-analysis strategies for image-based cell profiling. **Nature Methods**, v. 14, n. 9, p. 849-863, 2017.
- CARTER, S. L. et al. A Signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. **Nature Genetics**, v. 38, n. 9, p. 1043-1048, 2006.
- CARTLEDGE, D. M. et al. Inhibitors of cathepsins B and L induce autophagy and cell death in neuroblastoma cells. **Investigational New Drugs**, v. 31, n. 1, p. 20-29, 2013.
- CELL culture fundamentals: cell types & culture characteristics. Sigma Aldrich. Disponível

em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/cell-types-culture.html>. Acesso em: 6 abr. 2021.

CELL viability and proliferation assays sigma aldrich. Disponível em:

<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/cell-viability-and-proliferation.html>. Acesso em: 3 abr. 2021.

CHANDEL, N. S. Mitochondria as signaling organelles. **BMC Biology**, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2014.

CHANG, S.-H. et al. VEGF-A induces angiogenesis by perturbing the cathepsin- cysteine protease inhibitor balance in venules, causing basement membrane degradation and mother vessel formation. **Cancer Research**, v. 69, n. 10, p. 4537-4544, 2009.

CHERNOBROVKIN, A. L.; ZUBAREV, R. A. How well can morphology assess cell death modality? A Proteomics study. *Cell Death Discovery*, v. 2, n. 1, p. 1- 6, 2016.

CHWIERALSKI, C. E.; WELTE, T.; BÜHLING, F. Cathepsin-regulated apoptosis. **Apoptosis**, v. 11, n. 2, p. 143-149, 2006.

COLLISSON, E. A. et al. Molecular subtypes of pancreatic cancer. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 4, p. 207-220, 2019.

CUSACK, B. J.; YOUNG, S. P.; OLSON, R. D. Daunorubicin and daunorubicinol pharmacokinetics in plasma and tissues in the rat. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 213-218, 1995.

DAVIDSON, S. M.; VANDER HEIDEN, M. G. Critical functions of the lysosome in cancer biology. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 57, p. 481-507, 2017.

DE DUVE, C. The Lysosome turns fifty. **Nature Cell Biology**, v. 7, n. 9, p. 847-849, 2005.

DILLEKÅS, H.; ROGERS, M. S.; STRAUME, O. Are 90% of deaths from cancer caused by metastases?. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 12, p. 5574-5576, 2019.

DOXORUBICIN (Adriamycin). Selleckchem. Disponível em:

<https://www.selleckchem.com/products/Adriamycin.html>. Acesso em: 26 jan. 2022.

DROGA-MAZOVEC, G. et al. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 27, p. 19140-19150, 2008.

DSMZ BXPC3. Disponível em:

<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-760>. Acesso em: 23 jan. 2019.

DSMZ. MIA-PACA-2. Disponível em:

<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-733>. Acesso em: 23 jan. 2019.

DUGGER, S. A.; PLATT, A.; GOLDSTEIN, D. B. Drug development in the era of precision medicine. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 3, p. 183-196, 2018.

- EGEBLAD, M.; RASCH, M. G.; WEAVER, V. M. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 5, p. 697-706, 2010.
- ESTATÍSTICAS de câncer. INCA. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 30 mar. 2021.
- EVERYDAY culture practice eppendorf. Disponível em: <https://handling-solutions.eppendorf.com/cell-handling/reproducibility/scientific-background/everyday-culture-practice/>. Acesso em: 12 abr. 2021.
- FARES, J. et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2020.
- FUKUNAGA, A. K. et al. Identification and analysis of single-nucleotide polymorphisms in the gemcitabine pharmacologic pathway. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 4, n. 5, p. 307-314, 2004.
- GALLUZZI, L. et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 7, p. 1237, 2007.
- GALLUZZI, L. et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, n. 1, p. 58-73, 2015.
- GALLUZZI, L. et al. Metabolic control of autophagy. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1263-1276, 2014.
- GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486-541, 2018.
- GALLUZZI, L. et al. Regulated cell death and adaptive stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 11, p. 2405-2410, 2016.
- GALLUZZI, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. Mitochondria: master regulators of danger signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 12, p. 780-788, 2012.
- GALVAO, J. et al. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **The FASEB Journal**, v. 28 n. 3, p. 1317-1330, 2014.
- GEISSLINGER, Fr. et al. Targeting lysosomes in cancer as promising strategy to overcome chemoresistance—a mini review. **Frontiers in Oncology**, v. 10, July, 2020. DOI: 10.3389/fonc.2020.01156.
- GEMCITABINE. Merck. Sigma Aldrich. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/g6423>. Acesso em: 26 jan. 2022.
- GERWECK, L. E.; SEETHARAMAN, K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. **Cancer Research**, v. 56, n. 6, p. 1194-1198, 1996.
- GIOVANNETTI, E. et al. Transcription analysis of human equilibrative nucleoside transporter-1 predicts survival in pancreas cancer patients treated with gemcitabine.

- Cancer Research**, v. 66, n. 7, p. 3928-3935, 2006.
- GOICHEVA, V. et al. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. **Genes & Development**, v. 20, n. 5, p. 543-556, 2006.
- GOEL, S.; HUANG, J.; KLAMPFER, L. K-Ras, intestinal homeostasis and colon cancer. **Current Clinical Pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 73-81, 2015.
- GOPINATHAN, A. et al. Cathepsin B promotes the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. **Gut**, v. 61, n. 6, p. 877-884, 2012.
- GOTINK, K. J. et al. Lysosomal sequestration of sunitinib: a novel mechanism of drug resistance. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 23, p. 7337-7346, 2011.
- GOULET, B. et al. A Cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. **Molecular Cell**, v. 14, n. 2, p. 207-219, 2004.
- GREENSPAN, P. D. et al. Identification of dipeptidyl nitriles as potent and selective inhibitors of cathepsin B through structure-based drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 26, p. 4524-4534, 2001.
- GUADAMILLAS, M. C.; CEREZO, A.; DEL POZO, M. A. Overcoming anoikis— pathways to anchorage-independent growth in cancer. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 19, p. 3189-3197, 2011.
- GUAVA mitochondrial depolarization kit. Merck Millipore. Disponível em: https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Guava-Mitochondrial-Depolarization-Kit-for-Flow-Cytometry,MM_NF-4500-0250. Acesso em: 26 jan. 2022.
- GUO, J. Y. et al. Activated ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. **Genes & Development**, v. 25, n. 5, p. 460-470, 2011.
- GUPTA, G. P.; MASSAGUÉ, J. Cancer metastasis: building a framework. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 679-695, 2006.
- HÄMÄLISTÖ, S.; JÄÄTTELÄ, M. Lysosomes in cancer—living on the edge (of the cell). **Current Opinion in Cell Biology**, v. 39, p. 69-76, 2016.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.
- HASHIMOTO, D. et al. Autophagy is needed for the growth of pancreatic adenocarcinoma and has a cytoprotective effect against anticancer drugs. **European Journal of Cancer**, v. 50, n. 7, p. 1382-1390, 2014.
- HRUBAN, R. H. et al. Update on familial pancreatic cancer. **Advances in Surgery**, v. 44, p. 293, 2010.

- HUANG, T. et al. Autophagy and hallmarks of cancer. **Critical Reviews™ in Oncogenesis**, v. 23, n. 5-6, p. 247-267, 2018.
- IODICE, S. et al. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 393, n. 4, p. 535-545, 2008.
- ISHIDA, Y. et al. A model of lysosomal pH regulation. **Journal of General Physiology**, v. 141, n. 6, p. 705-720, 2013.
- JAKOŠ, T. et al. Cysteine cathepsins in tumor-associated immune cells. **Frontiers in Immunology**, v. 10, Aug. 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02037.
- JANSEN, G. et al. Multiple mechanisms of resistance to polyglutamatable and lipophilic antifolates in mammalian cells: role of increased folylpolyglutamylation, expanded folate pools, and intralysosomal drug sequestration. **Molecular Pharmacology**, v. 55, n. 4, p. 761-769, 1999.
- JOHNSON-ARBOR, K.; DUBEY, R. Doxorubicin. In: STATPEARLS [Internet]. Treasure Island: StatPearls, 2020.
- JOYCE, J. A. et al. Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 5, n. 5, p. 443-453, 2004.
- KAI, F.; DRAIN, A. P.; WEAVER, V. M. The Extracellular matrix modulates the metastatic journey. **Developmental Cell**, v. 49, n. 3, p. 332-346, 2019.
- KALLUNKI, T.; OLSEN, O. D.; JÄÄTTELÄ, M. Cancer-associated lysosomal changes: friends or foes? **Oncogene**, v. 32, n. 16, p. 1995-2004, 2013.
- KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The Basics of epithelial-mesenchymal transition. **The 75 Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420-1428, 2009.
- KAMISAWA, T. et al. Pancreatic cancer. **The Lancet**, v. 388, n. 10039, p. 73-85, 2016.
- KARNOUB, A. E.; WEINBERG, R. A. Ras oncogenes: split personalities. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 7, p. 517-531, 2008.
- KAUFMANN, A. M.; KRISE, J. P. Lysosomal sequestration of amine- containing drugs: analysis and therapeutic implications. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n.4, p. 729-746, 2007.
- KAUR, J.; DEBNATH, J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 8, p. 461-472, 2015.
- KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52-67, 2010.
- KLEEFF, J. et al. Pancreatic cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 1, p. 1- 22, 2016.
- KLIONSKY, D. J. et al. A Comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes. **Autophagy**, v. 7, n. 11, p. 1273-1294, 2011.

- KOIZUMI, Y. et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is necessary for gemcitabine-induced cytotoxicity in human pancreatic cancer cells. **Anticancer Research**, v. 25, n. 5, p. 3347-3353, 2005.
- KRAMER, L.; TURK, D.; TURK, B. The Future of cysteine cathepsins in disease management. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 10, p. 873-898, 2017.
- KROEMER, G.; JÄÄTTELÄ, M. Lysosomes and autophagy in cell death control. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 11, p. 886-897, 2005.
- KRYSKO, D. V. et al. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 12, p. 860-875, 2012.
- KÜHLBRANDT, W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. **BMC Biology**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2015.
- KUMMER, E.; BAN, N. Mechanisms and regulation of protein synthesis in mitochondria. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 22, n. 5, p. 307-325, 2021.
- KWOK, H. F. et al. Antibody targeting of cathepsin S induces antibody-dependent cellular cytotoxicity. **Molecular Cancer**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2011.
- LAGADIC-GOSSMANN, D.; HUC, L.; LECUREUR, V. Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. **Cell Death & Differentiation**, v. 11, n. 9, p. 953-961, 2004.
- LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging biological principles of metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670-691, 2017.
- LAWRENCE, R. E.; ZONCU, R. The Lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control. **Nature Cell Biology**, v. 21, n. 2, p. 133-142, 2019.
- LI, Y. et al. Nuclear accumulation of UBC9 contributes to SUMOylation of lamin A/C and nucleophagy in response to DNA damage. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, p. 1-14, 2019.
- LIANG, X. et al. Suppression of autophagy by chloroquine sensitizes 5-fluorouracil-mediated cell death in gallbladder carcinoma cells. **Cell & Bioscience**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2014.
- LIU, E. Y.; RYAN, K. M. Autophagy and cancer—issues we need to digest. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 10, p. 2349-2358, 2012.
- MACKEY, J. R. et al. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. **Cancer Research**, v. 58, n. 19, p. 4349-4357, 1998.
- MALTESE, W. A.; OVERMEYER, J. H. Methuosis: nonapoptotic cell death associated with vacuolization of macropinosome and endosome compartments. **The American Journal of Pathology**, v. 184, n. 6, p. 1630-1642, 2014.
- MANNERSTRÖM, M. et al. Human BJ fibroblasts is an alternative to mouse BALB/c 3T3

- cells in in vitro neutral red uptake assay. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 121, p. 109-115, 2017.
- MARÉCHAL, R. et al. Human equilibrative nucleoside transporter 1 and human concentrative nucleoside transporter 3 predict survival after adjuvant gemcitabine therapy in resected pancreatic adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 8, p. 2913-2919, 2009.
- MASLIAH-PLANCHON, J.; GARINET, S.; PASMANT, E. RAS-MAPK pathway epigenetic activation in cancer: miRNAs in action. **Oncotarget**, v. 7, n. 25, p.38892-38907, 2016.
- MATHUR, P. et al. Cancer statistics, 2020: report from national cancer registryprogramme, India. **JCO Global Oncology**, v. 6, p. 1063-1075, 2020.
- MCCONKEY, D. J. et al. Molecular characterization of pancreatic cancer cell lines. *In*: NEOPTOLEMOS, J. P. **Pancreatic cancer**. Berlin: Springer, 2010. p. 457-469.
- MCDONALD, B. et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 362-366, 2010.
- MEDINA, D. L. et al. Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. **Developmental Cell**, v. 21, n. 3, p. 421-430, 2011.
- MIKHAYLOVA, O. et al. VHL-regulated MiR-204 suppresses tumor growth through inhibition of LC3B-mediated autophagy in renal clear cell carcinoma. **Cancer Cell**, v. 21, n. 4, p. 532-546, 2012.
- MIMEAULT, M. et al. MUC4 down-regulation reverses chemoresistance of pancreatic cancer stem/progenitor cells and their progenies. **Cancer Letters**, v. 295, n. 1, p. 69-84, 2010.
- MINI, E. et al. Cellular pharmacology of gemcitabine. **Annals of Oncology**, v. 17, p. v7-v12, 2006.
- MIZUSHIMA, N. Autophagy: process and function. **Genes & Development**, v. 21, n. 22, p. 2861-2873, 2007.
- MIZUSHIMA, N. The Pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. **Cell Death & Differentiation**, v. 12, n. 2, p. 1535-1541, 2005.
- MOFFAT, G. T.; EPSTEIN, A. S.; O'REILLY, E. M. Pancreatic cancer— a disease in need: optimizing and integrating supportive care. **Cancer**, v. 125, n. 22, p. 3927-3935, 2019.
- MOHAMED, M. M.; SLOANE, B. F. Multifunctional enzymes in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 10, p. 764-775, 2006.
- MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis. Microscopia de luz. *In*: **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. 2010. p. 125-153.
- MONIAUX, N. et al. Multiple roles of mucins in pancreatic cancer, a lethal and challenging

- malignancy. **British journal of cancer**, v. 91, n. 9, p. 1633-1638, 2004.
- MOREAU, K.; LUO, S.; RUBINSZTEIN, D. C. Cytoprotective roles for autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 2, p. 206-211, 2010.
- MROZ, E. A.; ROCCO, J. W. The Challenges of tumor genetic diversity. **Cancer**, v. 123, n. 6, p. 917-927, 2017.
- MURUGAN, S.; AMARAVADI, R. K. Methods for studying autophagy within the tumor microenvironment. *In*: KOUMENIS, C. et al. (Ed.). **Tumor microenvironment**. Berlin: Springer, 2016. p. 145-166. (Advances in Experimental Medicine and Biology, 899).
- NABA, A. et al. The Extracellular matrix: tools and insights for the “omics” era. **Matrix Biology**, v. 39, p. 10-24, 2016.
- NASSIRI, I.; MCCALL, M. N. Systematic exploration of cell morphological phenotypes associated with a transcriptomic query. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 19, p. e116-e116, 2018.
- NATH, S. et al. MUC1 induces drug resistance in pancreatic cancer cells via upregulation of multidrug resistance genes. **Oncogenesis**, v. 2, n. 6, p. e51-e51, 2013.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. **The Genetics of cancer**. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics#:~:text=Inherited%20genetic%20mutations%20play%20a,individuals%20to%20developing%20certain%20cancers>. Acesso em: 30 mar. 2021.
- NEEFJES, J.; JONGSMA, M. M. L.; BERLIN, I. Stop or go? Endosome positioning in the establishment of compartment architecture, dynamics, and function. **Trends In Cell Biology**, v. 27, n. 8, p. 580-594, 2017.
- NIEDERGETHMANN, M. et al. Prognostic impact of cysteine proteases cathepsin B and cathepsin L in pancreatic adenocarcinoma. **Pancreas**, v. 29, n. 3, p. 204-211, 2004.
- NIETO, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease: old views and new perspectives. **International Journal of Developmental Biology**, v. 53, n. 8-10, p. 1541-1547, 2009.
- NISHIMURA, Y. et al. A Role for small GTPase RhoA in regulating intracellular membrane traffic of lysosomes in invasive rat hepatoma cells. **The Histochemical Journal**, v. 34, n. 5, p. 189-213, 2002.
- NIXON, R. A. The Role of autophagy in neurodegenerative disease. **Nature Medicine**, v. 19, n. 8, p. 983-997, 2013.
- NOWELL, P. C. The Clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, v. 194, n. 4260, p. 23-28, 1976.
- OECD toxicity guide TG-129: guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. New Jersey: Chemyunion, 2010. (OECD Series on Testing and Assessment, v. 20).

- OHTA, T. et al. Pancreatic trypsinogen and cathepsin B in human pancreatic carcinomas and associated metastatic lesions. **British Journal of Cancer**, v. 69, n. 1, p. 152-156, 1994.
- OLSON, O. C.; JOYCE, J. A. Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 12, p. 712-729, 2015.
- OVERHOLTZER, M. et al. A Nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 966-979, 2007.
- PANCREATIC cancer types. Disponível em:
<https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/pancreatic-cancer/pancreatic-cancer-types>. Acesso em: 30 mar. 2021.
- PANDITA, A. et al. Synergistic combination of gemcitabine and dietary molecule induces apoptosis in pancreatic cancer cells and down regulates PKM2 expression. **PLoS One**, v. 9, n. 9, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0107154.
- PARK, J. M. et al. Prognostic impact of Beclin 1, p62/sequestosome 1 and LC3 protein expression in colon carcinomas from patients receiving 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy. **Cancer Biology & Therapy**, v. 14, n. 2, p. 100-107, 2013.
- PAUL, C. D.; MISTRITIS, P.; KONSTANTOPOULOS, K. Cancer cell motility: lessons from migration in confined spaces. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 2, p. 131-140, 2017.
- PELLEGRINO, M. W.; HAYNES, C. M. Mitophagy and the mitochondrial unfolded protein response in neurodegeneration and bacterial infection. **BMC Biology**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2015.
- PIFFOUX, M.; ERIAU, E.; CASSIER, P. A. Autophagy as a therapeutic target in pancreatic cancer. **British Journal of Cancer**, v. 124, n. 2, p. 333-344, 2021.
- PLUNKETT, W. et al. Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potentiation. **Seminars in Oncology**, v. 22, n. 4 (Suppl 11), p. 3-10, 1995.
- PU, J. et al. BORC, a multisubunit complex that regulates lysosome positioning. **Developmental Cell**, v. 33, n. 2, p. 176-188, 2015.
- PU, J. et al. Mechanisms and functions of lysosome positioning. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 23, p. 4329-4339, 2016.
- QU, M. et al. Design, synthesis and biological evaluation of sulfonamide-substituted diphenylpyrimidine derivatives (Sul-DPPYs) as potent focal adhesion kinase (FAK) inhibitors with antitumor activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 15, p. 3989-3996, 2017.
- QUILLES JR., J. C. et al. Biological activity and physicochemical properties of dipeptidyl nitrile derivatives against pancreatic ductal adenocarcinoma cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 112-120, 2019.
- RABINOWITZ, J. D.; WHITE, E. Autophagy and metabolism. **Science**, v. 330, n. 6009, p. 1344-1348, 2010.

- RAFN, B. et al. ErbB2-driven breast cancer cell invasion depends on a complex signaling network activating myeloid zinc finger-1-dependent cathepsin B expression. **Molecular cell**, v. 45, n. 6, p. 764-776, 2012.
- RAHMAN, M. S.; SURESH, S.; WALY, M. I. Risk factors for cancer: genetic and environment. *In*: WALY, M. I.; RAHMAN, M. S. (Ed.). **Bioactive components, diet and medical treatment in cancer prevention**. Cham: Springer International, 2018. p. 1-23.
- RAIMONDI, S. et al. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 24, n. 3, p. 349-358, 2010.
- RAMALHO, S. D. et al. Imaging sites of inhibition of proteolysis in pathomimetic human breast cancer cultures by light-activated ruthenium compound. **PLoS One**, v. 10, n.11, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142527>.
- REISEN, F. et al. Linking phenotypes and modes of action through high-content screen fingerprints. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 13, n. 7, p. 415-427, 2015.
- REISER, J. et al. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 10, p. 3421-3431, 2010.
- REPNIK, U. et al. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - proteins and proteomics**, v. 1824, n. 1, p. 22-33, 2012.
- RIZZUTO, R. et al. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 9, p. 566-578, 2012.
- ROBATEL, Steve; SCHENK, Mirjam. Current Limitations and Novel Perspectives in Pancreatic Cancer Treatment. **Cancers**, v. 14, n. 4, p. 985, 2022.
- RUDZIŃSKA, M. et al. The Role of cysteine cathepsins in cancer progression and drug resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, 2019. DOI: 10.3390/ijms20143602.
- SANCAK, Y. et al. Ragulator-rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. **Cell**, v. 141, n. 2, p. 290-303, 2010.
- SANCAK, Y. et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. **Science**, v. 320, n. 5882, p. 1496-1501, 2008.
- SARANTIS, P. et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: treatment hurdles, tumor microenvironment and immunotherapy. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 12, n. 2, p. 173-181, 2020.
- SAXTON, R. A.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. **Cell**, v. 168, n. 6, p. 960-976, 2017.
- SCHIEFERMEIER, N. et al. The Late endosomal p14-MP1 (LAMTOR2/3) complex regulates focal adhesion dynamics during cell migration. **Journal of Cell Biology**, v. 205, n.4, p. 525-540, 2014.

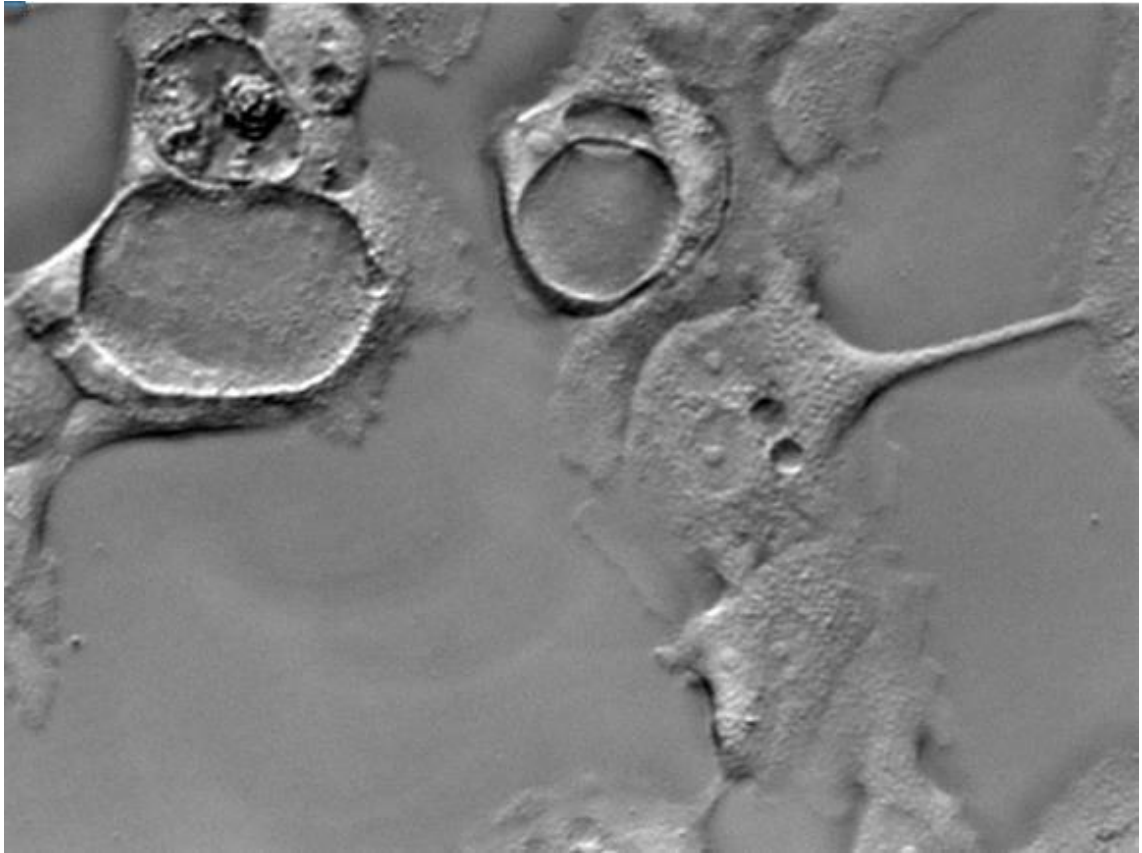
- SCHMUKLER, E.; KLOOG, Y.; PINKAS-KRAMARSKI, R. Ras and autophagy in cancer development and therapy. **Oncotarget**, v. 5, n. 3, p. 577-586, 2014.
- SCHNEIDEWIND, T. et al. Morphological profiling identifies a common mode of action for small molecules with different targets. **ChemBioChem**, v. 21, n. 22, p. 3197-3207, 2020.
- SCHWEICHEL, J.-U.; MERKER, H.-J. The Morphology of various types of cell death in prenatal tissues. **Teratology**, v. 7, n. 3, p. 253-266, 1973.
- SENGA, S. S.; GROSE, R. P. Hallmarks of cancer—the new testament. **OpenBiology**, v. 11, n. 1, 2021. DOI: 10.1098/rsob.200358.
- SETTEMBRE, C. et al. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 5, p. 283-296, 2013.
- SEVENICH, L. et al. Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 6, p. 2497-2502, 2010.
- SHI, G.-P. et al. Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 11, p. 7258-7262, 1992.
- SHUBIN, A. V. et al. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, p. 55863-55889, 2016.
- SIVANDZADE, F.; BHALERAO, A.; CUCULLO, L. Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe. **Bio-Protocol**, v. 9, n. 1, 2019. DOI: 10.21769/BioProtoc.3128.
- SOBOTIČ, B. et al. Proteomic identification of cysteine cathepsin substrates shed from the surface of cancer cells. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 14, n. 8, p. 2213-2228, 2015.
- SOOND, S. M.; KOZHEVNIKOVA, M. V.; ZAMYATNIN JR., A. A. 'Patchiness' and basic cancer research: unravelling the proteases. **Cell Cycle**, v. 18, n. 15, p. 1687-1701, 2019.
- SPERANDIO, S.; DE BELLE, I.; BREDESEN, D. E. An Alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 26, p. 14376-14381, 2000.
- SUBRAMANIAN, A. et al. A Next generation connectivity map: L1000 platform and the first 1,000,000 profiles. **Cell**, v. 171, n. 6, p. 1437-1452, 2017.
- SULPIZIO, S. et al. Cathepsins and pancreatic cancer: the 2012 update. **Pancreatology**, v. 12, n. 5, p. 395-401, 2012.
- TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. **Cancer Research**, v. 70, n. 14, p. 5649-5669, 2010.
- TANG, D. et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. **Journal of Cell Biology**, v. 190,

- n. 5, p. 881-892, 2010.
- TEDELIND, S. et al. Nuclear cysteine cathepsin variants in thyroid carcinoma cells. **Biological Chemistry**, v. 391, n. 8, p. 923-935, Aug. 2010.
- TERRY, S. et al. New insights into the role of EMT in tumor immune escape. **Molecular Oncology**, v. 11, n. 7, p. 824-846, 2017.
- TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.
- TRACHTENBERG, B. H. et al. Anthracycline-associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. **Pediatric Cardiology**, v. 32, n. 3, p. 342-353, 2011.
- TURK, B. et al. Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH- induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 376, n. 4, p. 225-230, 1995.
- TURK, V. et al. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - proteins and proteomics**, v. 1824, n. 1, p. 68-8, 2012.
- UZUNPARMAK, B.; SAHIN, I. H. Pancreatic cancer microenvironment: a current dilemma. **Clinical and Translational Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2019.
- VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *In*: CREE, I. (Ed.). **Cancer cell culture**. Totowa: Humana Press, 2011. p. 237-245. (Methods in Molecular Biology, v.731).
- VEILLARD, F. et al. Cysteine cathepsins S and L modulate anti-angiogenic activities of human endostatin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 43, p. 37158-37167, 2011.
- VERHEIJEN, M.; LIENHARD, M.; SCHROODERS, Y. et al. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. **Scientific Report**, v.9, n. 1, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40660-0>.
- VIZOVIŠEK, M.; FONOVIĆ, M.; TURK, B. Cysteine cathepsins in extracellular matrix remodeling: extracellular matrix degradation and beyond. **Matrix Biology**, v. 75, p.141-159, 2019.
- WADDELL, N. et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. **Nature**, v. 518, n. 7540, p. 495-501, 2015.
- WANG, B. et al. Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix- derived angiogenic factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 9, p. 6020- 6029, 2006.
- WANG, J.; WU, G. S. Role of autophagy in cisplatin resistance in ovarian cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 24, p. 17163-17173, 2014.
- WANG, Shunda et al. Mucins in pancreatic cancer: A well-established but promising family for diagnosis, prognosis and therapy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 18, p. 10279-10289, 2020.

- WEI, H. et al. Suppression of autophagy by FIP200 deletion inhibits mammary tumorigenesis. **Genes & Development**, v. 25, n. 14, p. 1510-1527, 2011.
- WEST, A. P.; SHADEL, G. S. Mitochondrial DNA in innate immune responses and inflammatory pathology. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 6, p. 363-375, 2017.
- WHITE, E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 6, p. 401-410, 2012.
- WILDING, J. L.; BODMER, W. F. Cancer cell lines for drug discovery and development. **Cancer Research**, v. 74, n. 9, p. 2377-2384, 2014.
- WINKLER, J. et al. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1-19, 2020.
- WOLF, K. et al. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. **Journal of Cell Biology**, v. 201, n. 7, p. 1069-1084, 2013.
- WONG, A. et al. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine. **Drug Metabolism Reviews**, v. 41, n. 2, p. 77-88, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acesso em: 30 mar. 2021.
- YAN, G.; ELBADAWI, M.; EFFERTH, T. Multiple cell death modalities and their key features. **World Academy of Sciences Journal**, v. 2, n. 2, p. 39-48, 2020.
- YAO, Y.; DAI, W. Genomic instability and cancer. **Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis**, v. 5, n. 2, 2014. DOI: 10.4172/2157-2518.1000165.
- YOSHII, S. R.; MIZUSHIMA, N. Monitoring and measuring autophagy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18091865>.
- YUN, C. W.; LEE, S. H. The Roles of autophagy in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, 2018. DOI: 10.3390/ijms19113466.

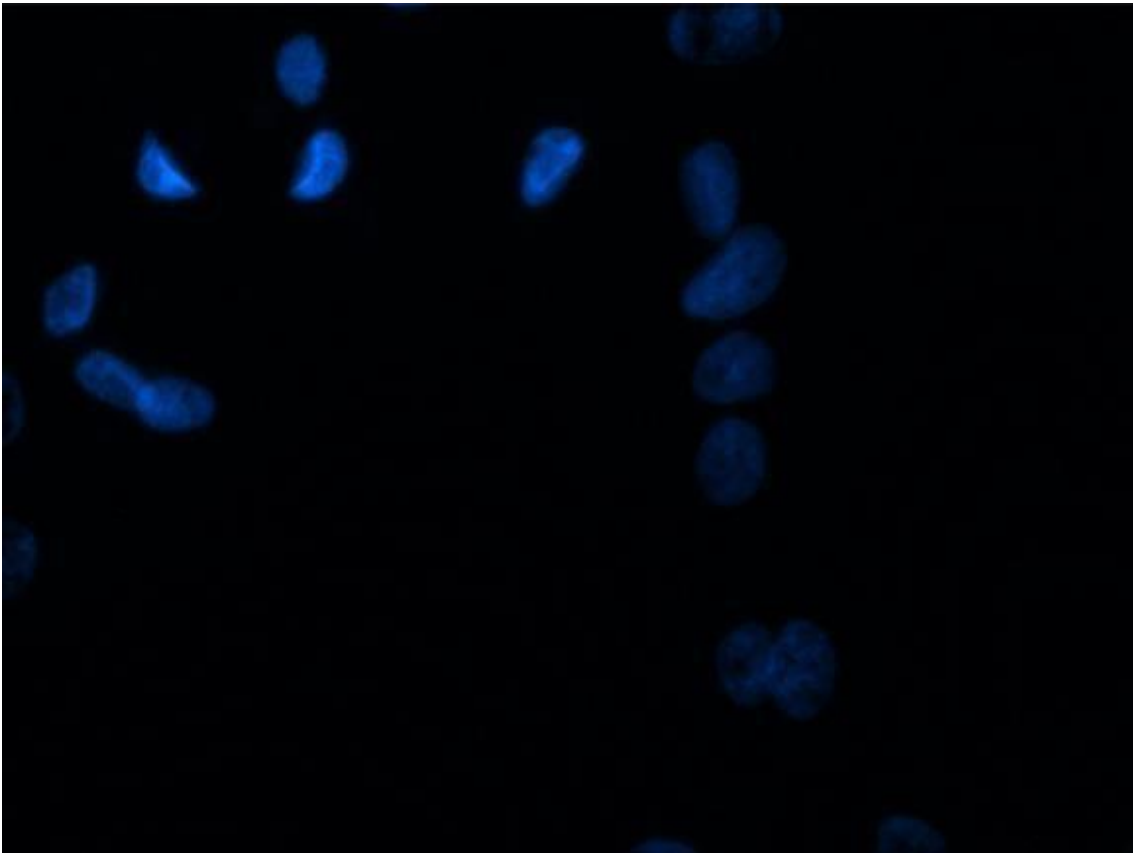
Apêndice

BxPC-3 – Tratamento com 831 ([IC50]) – Campo claro – campo 1. Aumento de 60X.



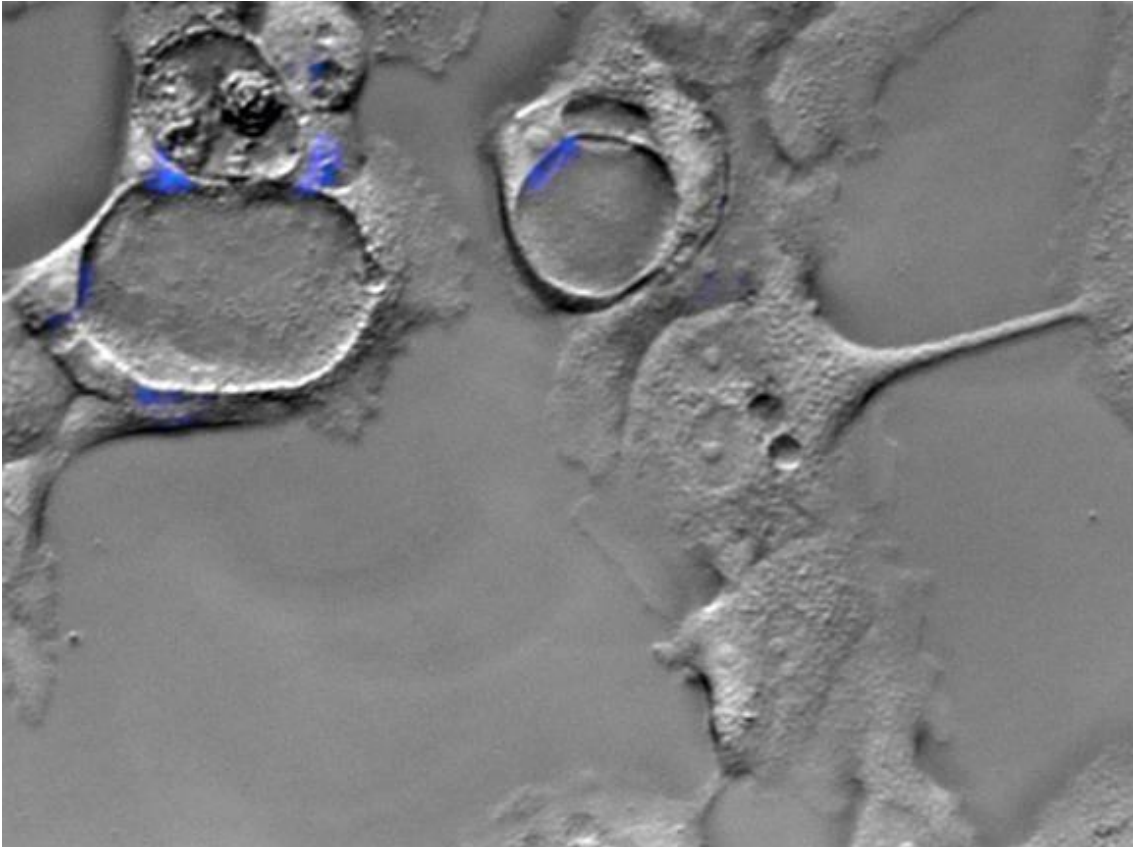
Fonte: Autoria própria

BxPC-3 – Tratamento com 831 ([IC₅₀]) – Hoechst 33342 (Dapi) – campo 1. Aumento de60X.



Fonte: Autoria própria

BxPC-3 – Tratamento com 831 ([IC₅₀]) – Sobreposição campo claro/dapi – campo 1.
Aumento de 60X.



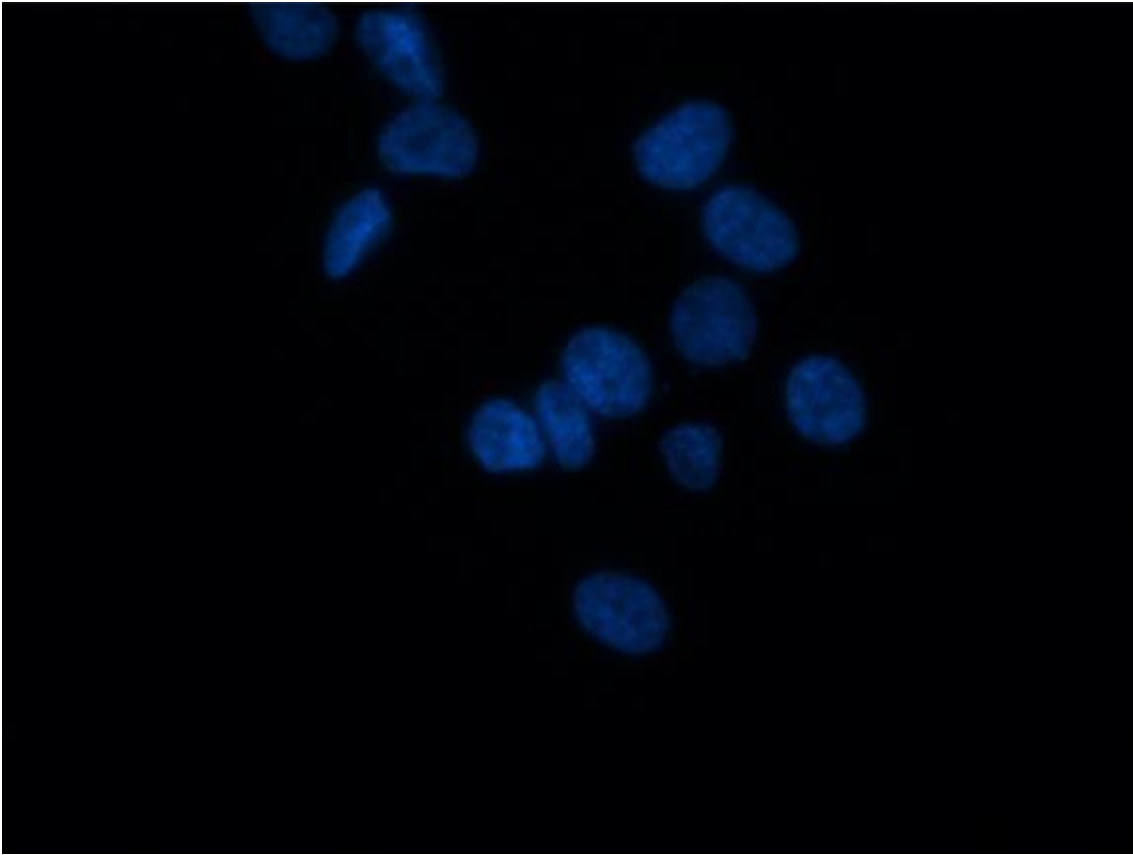
Fonte: Autoria própria

BxPC-3 – Tratamento com 1013 (IC_{50}) – Campo claro – campo 1. Aumento de 60X.



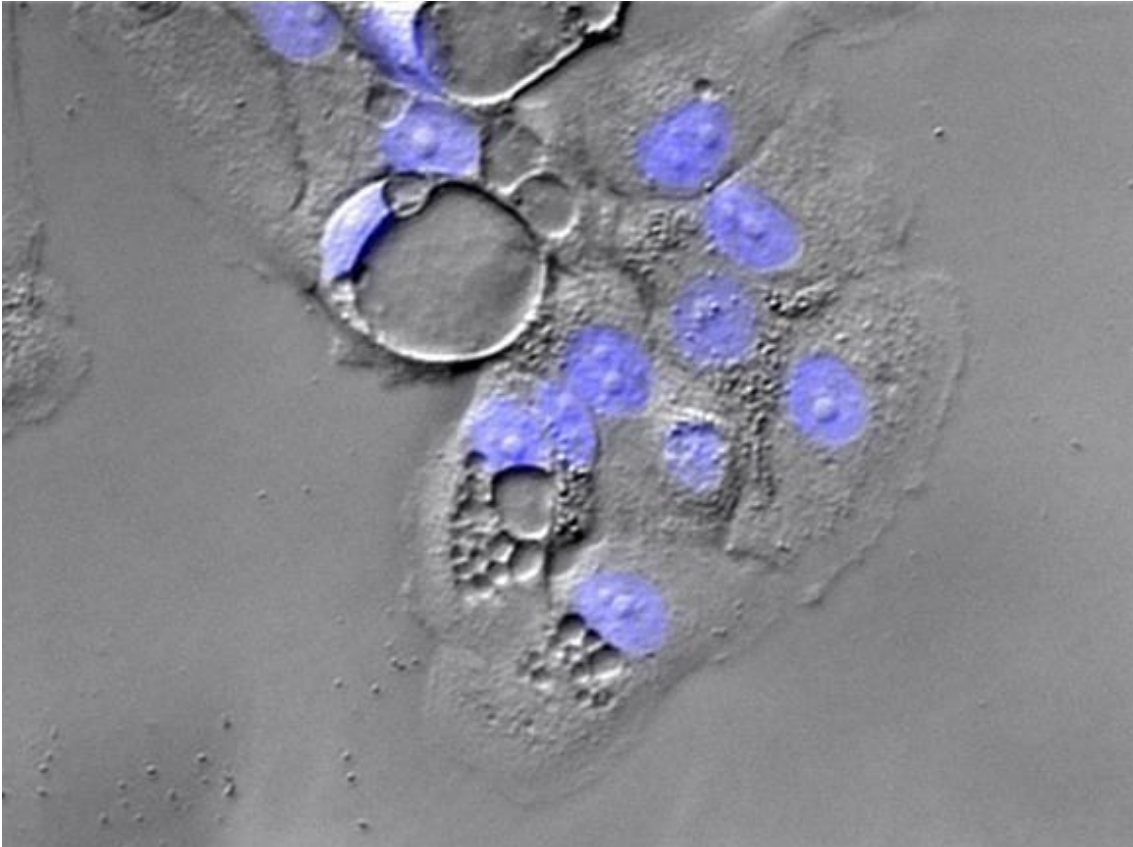
Fonte: Marília Riul Ferreira

BxPC-3 – Tratamento com 1013 ($[IC_{50}]$) – Hoechst 33342 (Dapi) – campo 1. Aumento de 60X.



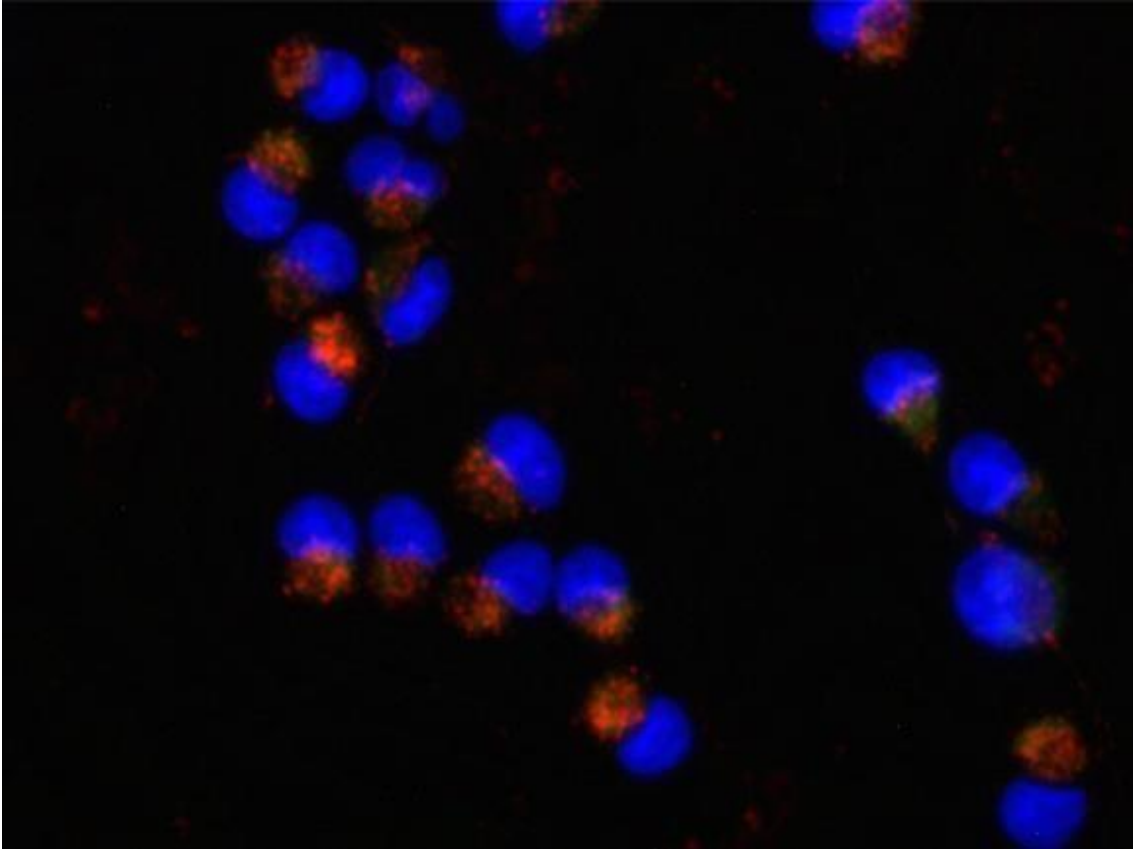
Fonte: Marília Riul Ferreira

BxPC-3 – Tratamento com 1013 ($[IC_{50}]$) – Sobreposição campo claro/dapi – campo 1.
Aumento de 60X.



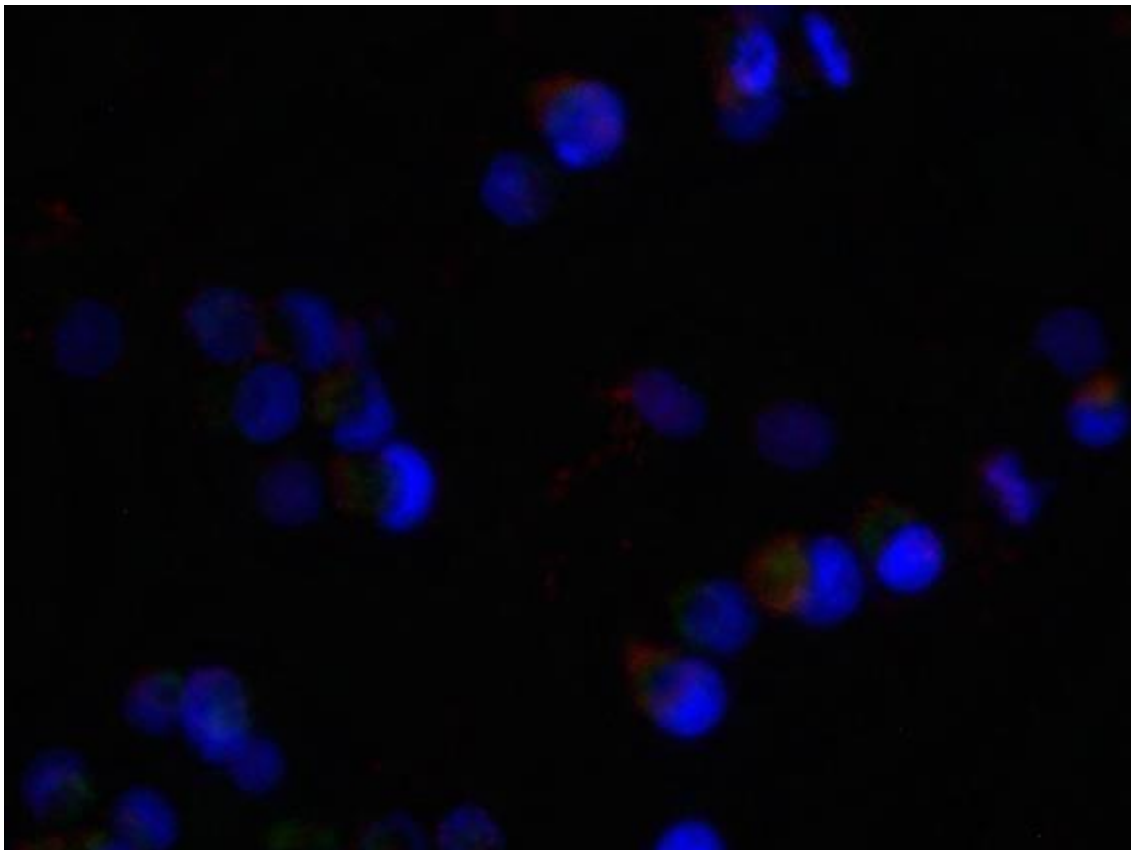
Fonte: Marília Riul Ferreira

MIA PaCa-2 – Controle Negativo – Mitopotential – Red (mitocôndria funcional); Green (mitocôndria despolarizada); Dapi (núcleo). Aumento de 60X.



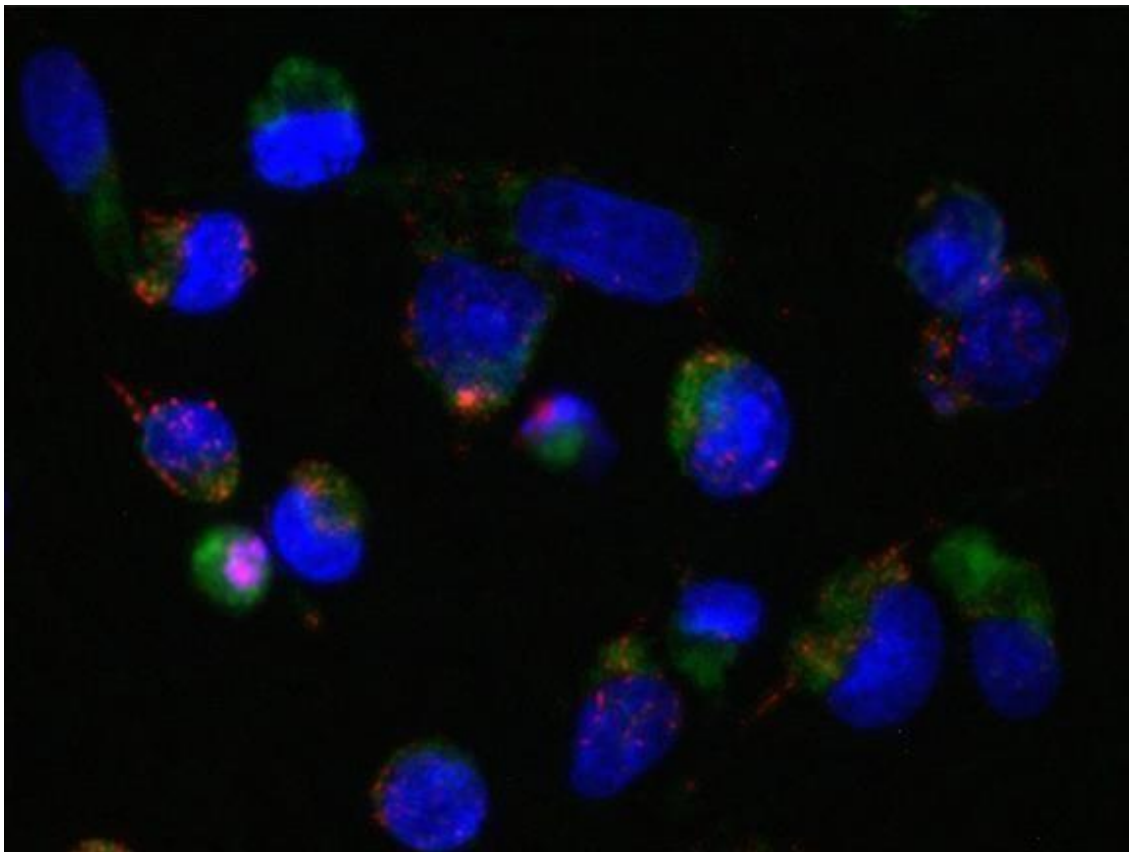
Fonte: Autoria própria

MIA PaCa-2 – Tratamento com 831 ($[IC_{50}]$) – Mitopotential – Red (mitocôndria funcional); Green (mitocôndria despolarizada); Dapi (núcleo). Aumento de 60X.



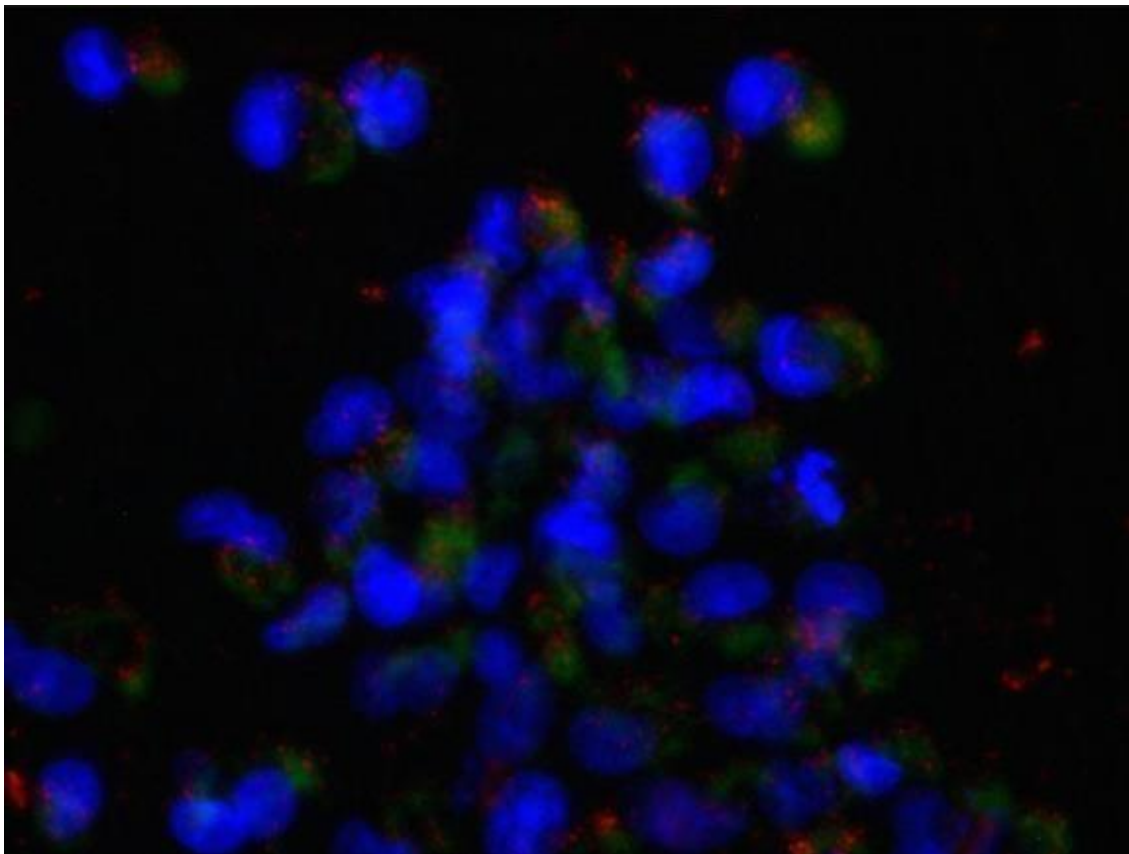
Fonte: Autoria própria

MIA PaCa-2 – Tratamento com Doxorrubicina ($[IC_{50}]$) – Mitopotential – Red
(mitocôndria funcional); Green (mitocôndria despolarizada); Dapi (núcleo). Aumento de 60X.



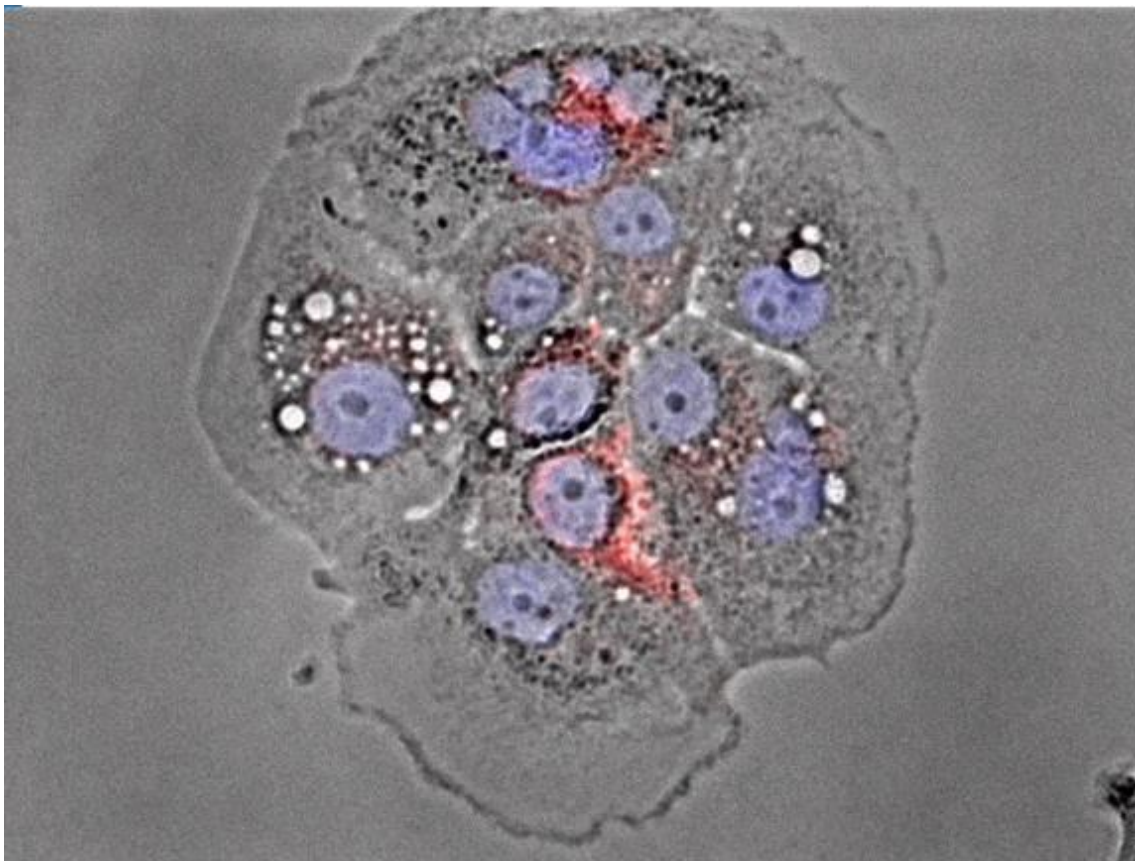
Fonte: Autoria própria

MIA PaCa-2 – Tratamento com Gencitabina ($[IC_{50}]$) – Mitopotential – Red (mitocôndria funcional); Green (mitocôndria despolarizada); Dapi (núcleo). Aumento de 60X.



Fonte: Autoria própria

BxPC-3 – Tratamento com 1013 (IC_{50}) – Sobreposição Campo claro/ Red (Lysotracker-Lisossomos)/Dapi (núcleos). Aumento de 60X.



Autoria: Marília Riul Ferreira