

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

ISABELA MARQUES

ANÁLISE IN VITRO DO EFEITO DA TERAPIA COMBINADA COM
DOXORRUBICINA E INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASE CONTRA O
CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO MDA-MB-231

São Carlos

2023

ISABELA MARQUES

ANÁLISE IN VITRO DO EFEITO DA TERAPIA COMBINADA COM
DOXORRUBICINA E INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASE CONTRA O
CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO MDA-MB-231

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 obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Andrei Leitão

São Carlos

2023

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).

M298a MARQUES, ISABELA
ANÁLISE IN VITRO DO EFEITO DA TERAPIA COMBINADA COM DOXORRUBICINA E INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASE CONTRA O CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO MDA-MB-231 / ISABELA MARQUES; orientador Andrei Leitão. São Carlos, 2023.

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, 2023.

1. Ensaios celulares. 2. Câncer de mama. 3. Resposta fenotípica. 4. Inibidores enzimáticos. 5. Combinação terapêutica. 6. Ensaio de migração celular..
I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907



FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Isabela Marques

Título: "Análise in vitro do efeito da terapia combinada com doxorrubicina e inibidores de cisteíno proteases contra câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231"

Data da defesa: 10/11/2023

Comissão Julgadora	Resultado
Prof(a). Dr(a). Andrei Leitão UFSCar - Orientador	<u>Não Votante</u>
Prof(a). Dr(a). Felipe Roberti Teixeira Universidade Federal de São Carlos - UFSCar	<u>APROVADA</u>
Prof(a). Dr(a). Marcia Regina Cominetti Universidade Federal de São Carlos - UFSCar	<u>APROVADA</u>
Prof(a). Dr(a). Patrícia Pintor dos Reis Universidade Estadual Paulista - UNESP	<u>APROVADA</u>

Orientador: Prof. Dr. Andrei Leitão

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

*Agradeço à minha família pelo
amor, carinho e apoio durante toda
a minha trajetória.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Andrei Leitão, pela oportunidade dada a mim de participar deste grupo, NEQUIMED. Professor, agradeço por todo apoio, zelo, cuidado e atenção que dispôs não somente a mim, mas a todos do grupo. Seguir na área acadêmica não é fácil, bem sabemos, mas o senhor torna tudo mais sereno e tranquilo. Obrigada por todo o ensinamento que me proporcionou nestes anos. Saio do nosso laboratório com sentimento de gratidão e alegria.

Agradeço com a mesma intensidade a Dra. Talita Alvarenga Valdes que sempre se fez presente em minha vida como pesquisadora e nunca mediu esforços para me ajudar. Tali, você ainda vai conquistar o mundo, não somente pela sua inteligência e conhecimento, mas principalmente pelo seu coração. Obrigada!

Ao grupo NEQUIMED, em especial ao pessoal que está e passou pelo LabECel. Vocês fizeram deste laboratório uma segunda casa. Obrigada não somente pelos ensinamentos teóricos mas principalmente pelos aprendizados de vida.

Às agências de fomento, em especial à CAPES, CNPq e FAPESP, por tornarem meu trabalho possível.

Ao programa, Interunidade em bioengenharia, e a todos que estão inseridos nele, por auxiliarem minha pesquisa, mesmo que de maneira externa. Obrigada aos porteiros, faxineiras, administradores, coordenadores, professores, secretárias, a todos que auxiliaram a mim e a minha pesquisa.

À minha família: pai, mãe, Mari, João, Cê, Isa e Dani. Vocês são meu porto seguro, meu conforto e onde meu coração se acalma. Muito obrigada por todo o suporte e confiança que depositaram em mim. Tudo o que sou devo a vocês.

Ao meu companheiro, Lucas! Você é meu amor, agradeço pela nossa casa, nossos filhotes, nossa vida, nossa rotina, nós. Você é minha parte favorita do dia e da vida. Eu te amo.

Aos meus filhos de quatro patas, Julieta, Bartolomeu, Amendoim, Tarsila e Afonso por serem a minha paz e o meu descanso. Receber o amor de vocês e me permitirem amar-vos de volta faz com que minha vida seja mais leve e feliz. Sem vocês nada sou.

Obrigada!

EPÍGRAFE

“Educação não transforma o mundo.
Educação transforma pessoas. Pessoas
transformam o mundo.”

- Paulo Freire.

RESUMO

MARQUES, I. **Análise in vitro do efeito da terapia combinada com doxorubicina e inibidores de cisteína protease contra o câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231.** 2023. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

O câncer é uma das doenças mais agressivas e mortais da atualidade. Em 2020 o câncer de mama matou cerca de 684 mil mulheres no mundo e em 2020 no Brasil, ocorreram 66 mil novos casos. Ensaios celulares apresentam grande relevância para a identificação de substância com novos mecanismos de ação ou na confirmação de um mecanismo. Neste estudo, novas substâncias bioativas com atividade antineoplásica foram testadas em modelos celulares, inclusive com análise de terapia combinada, uma vez que estudos prévios demonstraram uma combinação (Neq 0780 e doxorubicina) com elevada sinergia. As substâncias analisadas são inibidoras de cisteína proteases, e se mostraram não citotóxicas para as linhagens de câncer responsivas ao hormônio feminino (estradiol – MCF-7) e independente (MDA-MB-231), além da linhagem não tumoral BALB/3T3 clone A31. O ensaio de fechamento da risca não mostrou atividade antimigratória significativa para a linhagem testada (MDA-MB-231) quando comparado às células sem tratamento, no entanto, no ensaio de terapia combinada foi possível identificar sinergia em todas as amostras testadas nessa linhagem, com resultados promissores para o Neq1008, que potencializou quinze vezes mais o agente citotóxico. A terapia combinada aplicada ao fibroblasto de camundongo (controle) revelou antagonismo em treze das quinze amostras testadas e destacou seletividade quando comparado a linhagem tumoral MDA-MB-231, sugerindo menores efeitos colaterais com a combinação doxorubicina e derivado de dipeptidil nitrila. Com o ensaio de Espécie Reativa de Oxigênio, foi possível avaliar maior expressividade de ROS enquanto terapia combinada entre os compostos NEQUIMED e doxorubicina se comparada à doxorubicina isolada. Por fim, com o ensaio de Western Blot foi possível avaliar a inibição das catepsinas B, L e S quando usados os novos compostos estudados se relacionado ao controle. Esses resultados incentivam análises mais detalhadas que possam explicar por quais mecanismos as combinações podem estar levando a morte celular.

Palavras-chave: ensaios celulares, câncer de mama, resposta fenotípica, inibidores enzimáticos, combinação terapêutica, ensaio de migração celular.

ABSTRACT

MARQUES, I. **In vitro analysis of the effect of combination therapy with doxorubicin and cysteine protease inhibitors against MDA-MB-231 triple-negative breast cancer.** 2023. Dissertação (Mestrado) – São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, 2023.

Cancer is one of the most aggressive and deadly diseases of our time. In 2020, breast cancer claimed the lives of approximately 684,000 women worldwide, with 66,000 new cases occurring in Brazil. Cellular assays hold significant relevance for identifying substances with novel mechanisms of action or confirming existing ones. In this study, new bioactive substances with antineoplastic activity were tested using cellular models, including combined therapy analysis. Previous studies demonstrated high synergy with a combination (Neq0780 and doxorubicin), motivating the investigation. The analyzed substances are inhibitors of cysteine proteases and demonstrated non-cytotoxic effects on hormone-responsive (estradiol – MCF-7) and hormone-independent (MDA-MB-231) breast cancer cell lines, as well as the non-tumoral BALB/3T3 clone A31. The scratch closure assay indicated no significant antimetastatic activity in the MDA-MB-231 cell line compared to untreated cells. However, the combined therapy assay identified synergy in all samples tested for this cell line, with promising results for Neq1008, which enhanced cytotoxicity by fifteenfold. Combined therapy on mouse fibroblasts (control) showed antagonism in thirteen out of fifteen tested samples, highlighting selectivity when compared to the MDA-MB-231 tumor line. This suggests reduced side effects with the combination of doxorubicin and dipeptidyl nitrile derivatives. Reactive Oxygen Species (ROS) assay revealed increased ROS expression in the combined therapy of NEQUIMED compounds and doxorubicin compared to doxorubicin alone. Finally, Western Blot analysis indicated the inhibition of cathepsins B, L, and S when using the new compounds, in relation to the control. These findings encourage more detailed analyses to elucidate the mechanisms underlying the cell death induced by these combinations.

Keywords: cell assays, breast cancer, phenotypic response, enzyme inhibitors, combination therapy, cell migration assay.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Exemplificação simples do processo de carcinogênese.....	20
Figura 2 – Exemplos de dipeptidil nitrilas que atuam como inibidores da catepsina L e cruzaina com potência na ordem de nanomolar de acordo com ensaios enzimáticos.....	35
Figura 3 – Neq0780 sintetizado e testado previamente pelo grupo NEQUIMED e utilizado como modelo para o desenvolvimento do novo painel de quinze amostras.....	36
Figura 4 – Imagens das linhagens celulares trabalhadas, sendo, respectivamente, MDA-MB-231, MCF7 e BALB 3T3 clone A31.....	43
Figura 5 – Risca traçada no poço com células de câncer de mama MDA-MB-231 nos tempos de 0, 24 e 48 horas	46
Figura 6 – Mapeamento de uma placa de 96 poços após a adição de MTT mostrando intensidade crescente de cor correspondendo às células vivas, de acordo com a combinação de doxorrubicina e do derivado de dipeptidil nitrila	47
Figura 7 - Representação da disposição da placa de 96 poços preta no ensaio de ROS.....	49
Figura 8 - Representação da disposição da placa de 96 poços para o ensaio de Western Blot.....	51
Figura 9 – Triagem dos compostos derivados do composto Neq0780 para as linhagens de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e linhagem não tumoral (BALB 3T3 clone A31)	56
Figura 10 – Análise do ensaio de fechamento da risca para as quinze substâncias químicas a 10µM e o controle negativo na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 nos tempos de 24 e 48 horas	58
Figura 11 – Análise do ensaio de fechamento da risca para o Neq0780.1 e Neq1008 a 10µM e o controle negativo na linhagem de câncer de mama hormônio dependente MCF7 nos tempos de 24 e 48 horas.....	60

Figura 12 – Curvas concentração-resposta da combinação da doxorubicina com os novos compostos em concentração fixa (10 μ M) para a linhagem MDA-MB-231.....	62
Figura 13 – Curvas concentração-resposta da combinação da doxorubicina com os novos compostos em concentração fixa (10 μ M) para a linhagem controle BALB/3T3 clone A31.....	67
Figura 14 – Curvas concentração-resposta da combinação da doxorubicina com os compostos Neq0780.1 e Neq1008 em concentração fixa (10 μ M) para a linhagem tumoral hormônio dependente MCF7.....	71
Figura 15 – Gráficos de comparação entre os tempos de 24h (verde), 48h (vermelho) e 72h (azul) para os diferentes tratamentos propostos.....	76
Figura 16 - Esquematização da maturação dos sítios catalíticos de cisteíno catepsinas de acordo com a variação do pH.....	80
Figura 17 - Resultado da expressão das catepsinas B, L e S, respectivamente, no tempo de 48h com os tratamentos do Neq0780, Neq1002, Neq1008 e controle negativo para a linhagem tumoral de mama triplo-negativa, MDA-MB-231.....	80
Figura 18 - Resultado da expressão das catepsinas B, L e S, respectivamente, no tempo de 72h com os tratamentos do Neq0780, Neq1002, Neq1008 e controle negativo para a linhagem tumoral de mama triplo-negativa, MDA-MB-231.....	81
Figura 19 - Resultado da expressão das catepsinas B, L e S nos tempos de 48h e 72h com os tratamentos do Neq0780, Neq1002, Neq1008 e controle negativo para a linhagem tumoral de mama triplo-negativa, MDA-MB-231.....	81
Figura 20 - Análise do ensaio de Western Blot para os três compostos de interesse, Neq0780, Neq1002 e Neq1008 para expressão das catepsinas B, L e S no tempo de 48h de tratamento na linhagem tumoral de mama triplo-negativa, MDA-MB-231.....	82
Figura 21. Análise do ensaio de Western Blot para os três compostos de interesse, Neq0780, Neq1002 e Neq1008 para expressão das catepsinas B, L e S no tempo de 72h de tratamento na linhagem tumoral de mama triplo-negativa, MDA-MB-231.....	83

Figura 22. Linhagem tumoral MDA-MB-231 apenas com meio de cultura nos tempos de 48h e 72h, respectivamente, registrando o crescimento celular ao longo do tempo, de modo que sobrecarregue o ambiente conforme o tempo for prolongado.....86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Painel com os quinze derivados do composto Neq0780 investigados em todas as fases em ensaios com linhagens de câncer de mama e não tumoral	42
Tabela 2. Concentrações necessárias para a diluição do H ₂ O ₂ , utilizado como controle positivo para o ensaio em questão.....	50
Tabela 3 – Porcentagem de fechamento da risca dos compostos em comparação com o valor do controle negativo para a linhagem MDA-MB-231.....	59
Tabela 4 – Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com o valor de IC ₅₀ , seu erro padrão, o ajuste do modelo (R ² /Sy.x) e a sinergia (Variação) para as substâncias de referência (doxorubicina) em monoterapia ou combinada com os compostos a 10 µM na linhagem MDA-MB-231.....	64
Tabela 5 – Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com o valor de IC ₅₀ , seu erro padrão, o ajuste do modelo (R ² /Sy.x) e a sinergia (Variação) para as substâncias de referência (doxorubicina) em monoterapia ou combinada com os compostos a 10 µM na linhagem controle (BALB/3T3 clone A31)	69
Tabela 6 – Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com o valor de IC ₅₀ , seu erro padrão, o ajuste do modelo (R ² /Sy.x) e a sinergia (Variação) para as substâncias de referência (doxorubicina) em monoterapia ou combinada com ambos os compostos a 10µM na linhagem tumoral hormônio dependente (MCF7)	71
Tabela 7 - Valores obtidos nos diferentes tratamentos nos tempos de 24h, 48h e 72h em porcentagem.....	75
Tabela 8 – Representação dos valores do pKi entre os Neq0780, Neq1002 e Neq1008 em relação às catepsinas de interesse, CatB, CatL e CatS.....	82
Tabela 9 - Porcentagem da expressão das catpsinas B, L e S nos diferentes tratamentos e nos tempos de 48h e 72h após relacionado a razão do controle GAPDH.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	–	Graus Celsius
μM	–	Micromolar
μL	–	Microlitro
BCRJ	–	Banco de Células do Rio de Janeiro
CO ₂	–	Dióxido de carbono
DMEM	–	Meio de cultura Delbecco Eagle modificado
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
Doxo	–	Doxorrubicina
FBS	–	Soro Fetal Bovino
g	–	Gramas
g/mL	–	Gramas por mililitro
IC ₅₀	–	Valor referência a 50% de inibição de um composto
INCA	–	Instituto Nacional do Câncer
Log	–	Logaritmo (base 10)
mL	–	Mililitro
MTT	–	Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazólio
NaHCO ₃	–	Bicarbonato de sódio
Neq	–	Sigla das Substâncias bioativas desenvolvidas pelo grupo NEQUIMED
nM	–	Nanomolar
PBS	–	Tampão fosfato-salino
RPMI	–	Meio de cultura RPMI-1640
GAPDH	–	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Câncer.....	20
1.2 Câncer de mama.....	25
1.3 Tratamentos para o câncer de mama	26
1.4 Quimioterapia.....	28
1.5 Doxorrubicina.....	29
1.6 Novos alvos terapêuticos e linhagens celulares.....	30
1.7 Cisteíno proteases e catepsinas.....	33
1.8 Novas substâncias bioativas - Neq.....	35
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo geral.....	38
2.2 Objetivos específicos.....	38
3 MATERIAL E MÉTODO.....	39
3.1 Materiais	39
3.1.1 Meio de cultura.....	41
3.1.2 Substâncias bioativas.....	41
3.1.3 Cultura de células.....	42
3.2 Método.....	43
3.2.1 Manutenção das células.....	43
3.2.2 Citotoxicidade das substâncias químicas.....	44
3.2.3 Ensaio de fechamento da risca (<i>Wound Healing</i>)	45
3.2.4 Terapia combinada.....	46
3.2.5 Detecção de Espécie Reativa de Oxigênio (ROS).....	47
3.2.6 Western Blot.....	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1 Análise da citotoxicidade das substâncias químicas.....	55
4.2 Análise da atividade antimigratória (<i>Wound Healing</i> – Fechamento da risca)	57
4.3 Análise do ensaio de terapia combinada	60
4.4 Análise do ensaio de Espécie Reativa de Oxigênio (ROS).....	72
4.5 Análise do ensaio de Western Blot.....	77

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVA	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

ANÁLISE IN VITRO DO EFEITO DA TERAPIA COMBINADA COM DOXORRUBICINA E INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASE CONTRA O CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO MDA-MB-231

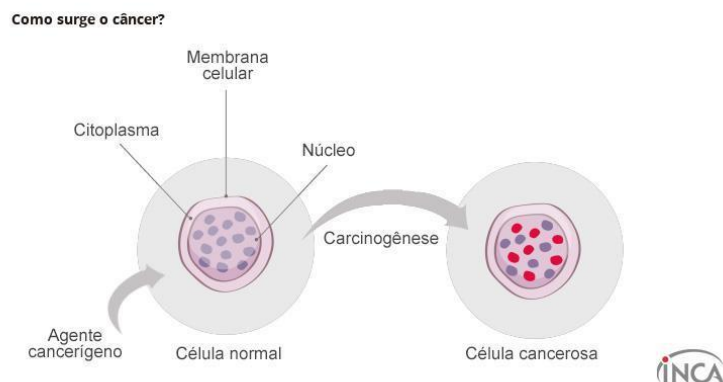
1. INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças decorrentes do crescimento celular descontrolado, rápido e capazes de invadir tecidos e órgãos (ALBERTS et al., 2011). É conhecido pela sua agressividade e alta taxa de incidência e mortalidade (INCA,2023f) sendo uma das principais causas letais do mundo. Deste modo, novas medidas terapêuticas são necessárias e urgentes, a fim da descoberta de novos tratamentos e possíveis curas para a doença.

1.1 Câncer

A palavra “câncer” tem origem latina (*cancer*) com o significado de “caranguejo”, devido à similaridade do crescimento de seus prolongamentos para com as pernas do artrópode. O desenvolvimento do câncer (carcinogênese) ocorre por alterações no DNA que podem ser herdadas ou adquiridas, transformando células saudáveis em células malignas e cancerosas (Figura 1), fazendo com que a célula passe a receber instruções modificadas para suas atividades (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Figura 1. Exemplificação simples do processo de carcinogênese, englobando mutações sofridas durante o processo de replicação celular.



Fonte: Instituto Nacional do Câncer, 2022.

Esta doença pode ser ocasionada devido a fatores de riscos capazes de diferenciar a célula não tumoral em uma célula cancerosa. Estes fatores podem ser encontrados tanto no meio ambiente, por fatores ambientais externos, como por fatores hereditários. A grande maioria desses casos, aproximadamente 80%, está relacionada ou meio ambiente, como por exemplo ambiente ocupacional (quando nocivo à saúde), ambiente cultural e social (hábitos de vida) e ambientes de consumo tanto alimentar como medicamentoso (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Seu crescimento desenfreado e agressivo é capaz de formar tumores por todo o corpo. Os tipos de câncer estão diretamente relacionados com as diferentes células em que ele se originou, sendo esta uma classificação primária (Instituto Nacional do Câncer – INCA2023a).

As células cancerosas, portanto, podem ser definidas por duas propriedades em conjunto: reprodução desenfreada, desrespeitando os limites impostos pela divisão de uma célula normal e invasão e colonização de regiões normalmente destinadas a outras células. Este conjunto de fatores acarretará na formação de um tumor ou neoplasia. Há dois tipos de tumores, diferenciados entre benignos e malignos (ALBERTS *et al.*, 2011).

Segundo Hanahan e Weinberg (2000), as linhagens cancerosas possuem mutação durante seus processos de regulação e proliferação da homeostase celular. A exposição do ser aos agentes carcinogênicos podem ocasionar danos no DNA, resultando em mutações em genes que promovem a regulação de vias essenciais à célula. Esta modificação celular promove mudanças morfológicas e metabólicas, resultando na invasão, migração e metástase.

As células de câncer compartilham características comuns denominadas por Hanahan e Weinberg (2000; 2011; 2022) de *Hallmarks*. Essas características favorecem o desenvolvimento de um microambiente tumoral que é indispensável no desenvolvimento do câncer (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

A mutação genética ocasionada pela doença faz com que atividades celulares antes reguladas e controladas, sejam alteradas, resultando em uma adaptação para a sobrevivência da célula mutada. Segundo os autores (HANAHAN e WEINBERG, 2022) são quatorze as diferenciações encontradas em uma célula cancerosa, possibilitando assim a configuração de um tumor complexo e estruturado, capaz de se desenvolver e impedir mecanismos de ação para a imunidade do corpo contra esta mutação, sendo elas:

Autonomia em sinais de crescimento: Células consideradas normais possuem múltiplos sinais para impedir seu crescimento, mantendo a homeostase celular. Linhagens cancerosas inibem as ações desses fatores inibidores de crescimento, permitindo a proliferação e desenvolvimento celular.

Insensibilidade aos supressores de crescimento: As células não tumorais apresentam mecanismos de homeostase dos mais diferentes aspectos. Dentre eles, há os genes supressores de tumor, responsáveis por codificar proteínas que atuam selecionando somente as células viáveis para a divisão celular, impedindo assim a proliferação e persistência de células não viáveis, independente do motivo que apresentar. As células tumorais apresentam um mecanismo para evitar este tipo de seleção. Suas proteínas supressoras de tumor apresentam diferentes alterações para não às selecionar, permitindo a conclusão de seu ciclo celular e, portanto, a proliferação celular.

Desvio do sistema imune: Nesta característica, assim como o título sugere, células cancerosas possuem a capacidade de desviar do sistema imune. Isso é possível devido a inativação de células de defesa do corpo provocadas pelas células mutadas.

Potencial replicativo ilimitado: Devido ao encurtamento dos telômeros durante cada divisão celular, células não tumorais possuem limitado potencial replicativo. Após este encurtamento causar significativamente malefícios à célula, ocorrem processos como a apoptose ou senescência para a seleção desta célula não mais viável. Células cancerosas apresentam mecanismos de defesa para a reparação deste encurtamento. Com a expressão da atividade enzimática para aumentar o comprimento dos telômeros e, ainda, a desativação de proteínas supressoras de tumor, o potencial replicativo das células cancerosas se torna ilimitado, tornando possível que elas continuem se duplicando e repetindo o ciclo celular.

Processo inflamatório: A inflamação é um processo importante para a permanência do microambiente tumoral por auxiliar no processo de angiogênese e, portanto, na nutrição do tumor. A inflamação, ainda, pode contribuir com fatores de crescimento que sustentam a sinalização de proliferação, fatores de sobrevivência para impedir a morte celular, enzimas modificadoras de matriz que auxiliam na metástase.

Invasão tecidual e metástase: Células cancerosas possuem, como já citado, a capacidade de formação de massas tumorais devido ao seu rápido crescimento e divisão celular. Essas células presentes no tumor são denominadas de primárias. Tais células podem ter a capacidade de deslocamento até novos tecidos adjacentes, levados pelos vasos sanguíneos, permitindo assim a formação de novos tumores ao longo do corpo. A capacidade de deslocamento da massa primária e invasão para novos tecidos tem como denominação metástase, sendo responsável por 90% das vítimas por câncer no mundo.

Indução angiogênica: Como mecanismo de defesa do corpo, lesões provocadas por células mutadas tendem a reduzir pela falta de manutenção deste ambiente, tais como nutrição e oxigenação. Entretanto, células cancerosas possuem mecanismos de defesa para sua permanência, como a indução angiogênica. A formação de vasos sanguíneos dentro do ambiente tumoral é indispensável para seu mantimento. A célula tumoral possui diversos e distintos mecanismos para a indução angiogênica ou a inibição de inibidores angiogênicos. Diferentes tipos de células tumorais utilizam diferentes estratégias de produção destes vasos.

Instabilidade genômica e mutação: Normalmente, células não tumorais ao apresentarem mutações no DNA são impedidas de persistir. No entanto, o genoma das células tumorais apresenta mutabilidade para que o processo de progressão tumoral seja concluído. Isso acontece devido à inativação da proteína supressora de tumor p53, sendo esta a responsável pelo reparo de danos ao DNA e, se irreversível, levar a apoptose daquela célula mutada. Outros genes envolvidos na detecção e reparação de danos no DNA são perdidos em células cancerosas, permitindo assim a permanência dessas células mutantes.

Resistência à morte celular: Células normais possuem mecanismos de defesa e homeostase ao longo de sua vivência. Uma célula pode se dividir por mitose e originar assim uma célula filha. Este processo ocorre por algumas dezenas de vezes até atingir seu limite. Neste caso, a apoptose ou senescência celular são mecanismos de controle para esta célula não mais viável. É por meio destes mesmos mecanismos que células não saudáveis, danificadas e prejudiciais são selecionadas e interrompidas. A célula cancerosa, por sua vez, possui mecanismos de defesa para a resistência à morte celular, mesmo com suas mutações. Elas são capazes de alterar os mecanismos detectores de anormalidades, tais como interferência nas proteínas responsáveis pela apoptose, e persistirem por períodos maiores.

Desregulação metabólica: Para acompanhar o crescimento desenfreado e o aumento significativo de células em um tumor é necessário a mutação também do metabolismo destas células, visto a necessidade de alimentar o crescimento e divisão delas. Células cancerosas são capazes de um metabolismo energético via glicólise aeróbica.

Promover a Plasticidade Fenotípica: Durante o desenvolvimento dos corpo como um todo, as células passam por diferenciações, limitando assim a proliferação e atuando como barreira ao câncer. Desbloquear a plasticidade genotípica, revertendo para estados menos diferenciados

é, portanto, essencial ao câncer. Células cancerosas podem manter-se parcialmente diferenciadas aos progenitores, evitando efeitos antiproliferativos.

Reprogramação Epigenética não mutacional: É referente a uma característica habilitadora genuína no desenvolvimento do câncer, sendo distinta da instabilidade e mutação do DNA genômico. Está relacionado com a reprogramação desempenhar um papel significativo na aquisição de capacidades distintas, como a capacidade provisória de plasticidade fenotípica nas células tumorais.

Microbioma Polimórfico: Os autores sugerem que a composição do microbioma em áreas associadas ao câncer podem variar entre indivíduos e entre diferentes tipos de câncer. Além disso, a diversidade microbiana pode desempenhar um papel na regulação do microambiente tumoral e na resposta do sistema imunológico.

Células Senescentes: A senescência celular é uma forma irreversível de parada proliferativa, evoluída para manter, principalmente, a homeostase tecidual, por meio de inativações e remoções de células doentes através da morte celular programada.

O entendimento e conhecimento destes marcadores de células cancerosas mostraram importante avanço em estudos e pesquisas para o tratamento e cura da doença. Diferentes alvos terapêuticos são estudados, assim como diferentes marcações são visadas.

O registro de câncer no Brasil tem mostrado que os tipos mais comuns para a população masculina são: próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral. Na população feminina o predominante é o câncer de mama, seguido de cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide. (Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2023b).

O aumento no número de casos da doença tem sido reportado e, atualmente, tem sido um dos problemas mais importantes para a saúde mundial e uma das maiores causadoras de mortes em países de todo mundo, inclusive no Brasil (GUERRA *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2005).

1.2 Câncer de mama

O câncer de mama é causado pela multiplicação descontrolada e desordenada das células na mama, podendo ser agressivo e altamente metastático, podendo ocorrer por fatores ambientais ou genéticos. Essa desordem confere anomalias nas células e no seu crescimento, formando um tumor. Por se tratar de uma doença com diferentes formas evolutivas, existem vários tipos de câncer de mama, podendo se desenvolver mais rápido ou lentamente, predominando as características de cada tumor (Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2023d).

Esse pode ser classificado de acordo com as características de suas células encontradas no tecido mamário, considerando suas distinções anatomopatológicas e modelos de carcinogênese distintos, além de tendências epidemiológicas específicas. Deste modo, para malignidades mamárias com origem epitelial – carcinomas, representando mais de 95% dos casos de cânceres de mama – é possível destacar subclassificações do câncer, tais como Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS), Carcinoma Ductal Invasivo (CDI) representando os casos mais recorrente, Carcinoma Lobular *in situ* (CLIS) e Carcinoma Lobular Invasivo (CLI) (ROCHA, 2019).

Além disso, o surgimento e desenvolvimento do câncer de mama pode ou não estar relacionado a fatores endócrinos por hormônios estrogênicos, seja endógeno ou exógeno. Estes dizem respeito a carcinomas invasores da mama com perfil imunofenotípico (ROCHA, 2019). O hormônio estrogênio (RE) está diretamente relacionado ao crescimento das células de mama, podendo resultar no potencial aumento das modificações genéticas. Sendo assim, qualquer fator que aumente os níveis deste hormônio pode influenciar, conseqüentemente, no aumento do risco de desenvolvimento de câncer (OLIVEIRA *et al*, 2020). Além desse, há também os que são imuno-histoquímico para receptor de progesterona (RP) e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), sendo eles marcadores indispensáveis para prognósticos e preditivos, definindo inclusive o manejo clínico, condutas terapêuticas, prognósticos e tratamento necessário para aquele paciente (ROCHA, 2019).

Sendo assim, entende-se que o câncer de mama não tem um causador específico e sim um conjunto de fatores e vivências que o acarretam. Acontecimentos como menarca precoce, menopausa tardia, primeira gravidez após os 30 anos, nuliparidade, uso de contraceptivos orais e terapias de reposição hormonal, podem ser responsáveis pelo desenvolvimento da doença (Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2023d).

1.3 Tratamentos para o Câncer de Mama

O desenvolvimento do câncer de mama no paciente, segundo Souza e colaboradores (2008), varia de acordo com o curso clínico da doença e a sobrevida do paciente. Ainda, esta variação é determinada por uma série de fatores, tais como a diferença na velocidade de duplicação tumoral, o potencial de metástase do tumor, condições imunológicas, hormonais e nutricionais do paciente, dentre outras tantas variáveis. É compreendido que as divergências socioeconômicas e fatores geográficos podem alterar o acesso e o tempo para o diagnóstico do tratamento, acarretando no decréscimo da sobrevida entre indivíduos com baixa renda (TRUFELLI et al., 2008). Ainda, de acordo com De Paiva e Cesse (2015), a alta mortalidade por câncer de mama no Brasil está intimamente relacionada ao atraso na investigação e na instituição oportuna da terapêutica.

Há diferentes métodos para o tratamento dessa doença, sendo dependente do tipo, tais como histologia e biomarcadores, e do estágio do câncer de mama tratado. O primeiro estágio, como já citado, é o Carcinoma Ductal *in situ* que, apesar de não ser invasivo, pode se desenvolver em um câncer invasivo em até 40% dos pacientes. O CDIS é tratado com mastectomia, ou seja, retirada cirúrgica de toda a mama. Caso este for positivo para receptor de estrogênio, os pacientes podem ser submetidos ao tratamento com terapia endócrina. Para os estágios invasivos iniciais e os estágios avançados sem metástase, há três fases de tratamento. A primeira é a fase pré-operatória, que consiste em tratamentos com terapias endócrinas ou imunoterapias para tumores que expressam receptores de estrogênio, progesterona ou HER2. Além deste, é utilizado como tratamento a quimioterapia pré-operatória, sendo esta a única opção para tumores triplo-negativos, ou seja, que não possuem os receptores para os hormônios citados. Há ainda tratamentos que utilizam a radioterapia no tumor. Portanto, a fase pré-operatório inclui como tratamentos a radioterapia, imunoterapia, quimioterapia e terapia endócrina ou hormonioterapia. Para o câncer de mama em estágio já metastático, ou seja, o estágio IV, há tratamentos para a melhora na expectativa de vida da paciente, mas há uma baixa expectativa de cura (TRAYES e COKENAKES, 2021).

Para os autores Maughan e Lutterbie (2010), o prognóstico para decidir qual o tratamento mais indicado para o câncer de mama específico do paciente é baseado na relação tumor-linfonodo-metástase. Dentre alguns fatores de importante relevância para esta definição está o grau histológico, receptores hormonais e do HER2, comorbidades, menopausa, idade, dentre outros. Ainda, como já descrito, o câncer pode avançar de acordo com estágios estabelecidos. O primeiro estágio, conhecido como Estágio 0 ou *in situ* diz respeito de um

crescimento celular anormal nos lóbulos mamários, não havendo progressão, porém podendo se diferenciar futuramente em um câncer e, por este motivo, os pacientes que o apresentarem devem ser submetidos a acompanhamentos contínuos para avaliar a progressão deste carcinoma lobular. Porém, se tratado de um carcinoma ductal *in situ*, pelo seu alto potencial de diferenciação em um câncer de mama invasivo, é recomendado uma cirurgia conservadora da mama seguido da radioterapia. Não é necessário o uso de quimioterápicos, principalmente se considerado seus significativos efeitos colaterais.

Seguinte do Estágio 0, tem-se os Estágios I e II, representando os cânceres inicialmente invasivos. Para tais estágios, é recomendado a retirada da mama por completo, a mastectomia, ou a parte já comprometida do órgão. Após, é necessário uma avaliação dos linfonodos regionais, sendo este estudo o determinante para a próxima etapa, podendo variar entre a radioterapia e a terapia sistêmica coadjuvante. O procedimento de radioterapia, ou seja, a radiação emitida na mama, é normalmente realizada após a mastectomia, e auxiliam significativamente a sobrevida do paciente além do sucesso em seu tratamento. Além da radioterapia, há também uma terapia sistêmica, ou seja, terapias com químicos, hormônios ou direcionadas especificamente ao tecido podem ser utilizadas para amenizar o crescimento daquele câncer. A quimioterapia é comumente utilizada para tumores maiores de 1 cm e linfonodos positivos. Pode ser utilizado um conjunto de químicos necessários para combater o determinado câncer, variando de acordo com as condições específicas do paciente. Já as terapias endócrinas são aquelas que utilizam de meios hormonais, como o bloqueio do desenvolvimento de estrogênio, para o controle do desenvolvimento do câncer. Este caso não é eficaz para cânceres que não possuem receptores de hormônio, como é o caso do triplo-negativo.

O Estágio III, ou seja, o Estágio localmente avançado, é relacionado com tumores maiores do que 5 cm com grande envolvimento de linfonodos regionais, tumores estes considerados não mais operáveis por já estarem em ligação direta com a parede torácica ou com a pele subjacente, porém não apresentam a metástase como característica. É considerado como tratamento padrão para os cânceres de mama neste estágio a quimioterapia de indução, seguida de terapia local, podendo variar entre cirurgia, radioterapia ou, em alguns casos, ambas. A quimioterapia pré-operatória é responsável pela diminuição do tamanho do tumor local, o efeito da terapia local sugerida.

Por fim, há o último estágio caracterizado para definir os diferentes níveis alcançados para o câncer de mama, o Estágio IV, ou Estágio Metastático. Para os pacientes que apresentarem a metástase, a chance de sobrevida cai consideravelmente. Segundo os autores, apenas 23,3% das mulheres conseguem um tratamento eficaz contra este câncer. Ainda, é

importante ressaltar que, apesar da queda na expectativa de vida, os tratamentos contra os cânceres metastáticos são importantes para garantir a estes pacientes conforto, alívio de dor, além de prevenir o desenvolvimento da doença. Neste caso, é necessário considerar a especificidade de cada paciente, abrangendo uma grande variedade de tratamentos, desde quimioterápicos, radioterápicos dentre outros tipos de terapias.

1.4 Quimioterapia

Como exemplificado anteriormente, dentre os diferentes tratamentos disponíveis para o câncer de mama, tem-se a quimioterapia, ou seja, terapia com químicos. Este tipo de tratamento é destinado para praticamente todos os casos da doença, podendo ser utilizado em diferentes momentos do tratamento, seja após a mastectomia como terapia adjuvante ou até mesmo antes da cirurgia para controlar o crescimento do tumor. A quimioterapia tem como principal função a de selecionar células cancerosas, impedindo assim o seu crescimento e proliferação. A quimioterapia é, portanto, o uso de químicos ou combinação destes com a finalidade de atingir linhagens celulares específicas e em diferentes fases do ciclo celular e de diferentes condições, podendo ser inseridos por meio intravenoso, oral ou até mesmo topicamente (FERREIRA e DE REZENDE FRANCO, 2017).

As características que definirão quais as terapias necessárias para o tratamento específico do paciente são variadas. Fatores de prognósticos podem incluir o tamanho do tumor, o seu estágio, quantidade de linfonodos e se há metástase ou não. Além disso, é importante definir previamente se o câncer tratado apresenta expressão de receptores de tumores como o estrogênio e a progesterona, além da superexpressão da proteína do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano, o HER2 (ANAMPA *et al*, 2015).

Os quimioterápicos hoje utilizados para o tratamento de câncer de mama estão subdivididos em categorias, sendo eles selecionados seguindo as condições exemplificadas anteriormente. Os grupos quimioterápicos mais frequentemente utilizados para o tratamento de câncer de mama, segundo Testa e Mano (2010) são:

Antraciclinas: São compostos comumente utilizados para o tratamento do câncer de mama. Atuam na interrupção da síntese de DNA das células cancerosas com a inibição da atuação da topoisomerase II durante a replicação do DNA destas células, acarretando em sua morte. Porém, este grupo de medicamentos podem acarretar em efeitos colaterais significativos na vida do paciente, dentre eles a insuficiência cardíaca e a leucemia. Dentre os medicamentos deste grupo mais utilizados para o tratamento está a Doxorrubicina e a Epirrubicina.

Taxanos: O grupo de medicamentos conhecidos como taxanos são aqueles que interferem no processo da divisão celular com a estabilização dos microtúbulos, impedindo assim sua quebra durante a mitose, acarretando, conseqüentemente, na morte celular. São usualmente utilizados em combinação com as antraciclinas por proporcionar redução do risco da recidiva, ou seja, do retorno da doença após o tratamento. Os taxanos mais utilizados são o Paclitaxel e o Docetaxel.

Além disso, há, por vezes, medicamentos diretamente direcionados para o tratamento antineoplásico, tais como o Trastuzumabe e o Pertuzumabe, agindo contra linhagens tumorais que apresentam o receptor HER2.

A quimioterapia sistêmica e adjuvante tem se fortalecido como significativa terapia curativa para os pacientes com câncer de mama. É entendido, cada vez com mais convicção, que a combinação destes medicamentos se faz relevante, fortalecendo a importância de regimes de poliquimioterapia. As melhorias dos estudos destes adjuvantes citotóxicos contribuíram e contribuem para a queda nos níveis de mortalidade pela doença (ANAMPA *et al*, 2015). Apesar da sua importância para a saúde e cura dos pacientes de câncer, a quimioterapia também é responsável por indesejáveis e graves efeitos colaterais além de acarretar em uma resistência dos pacientes para com os medicamentos, dificultando sua cura ao longo do tempo. Sendo assim, é indispensável a busca por novos alvos terapêuticos cada vez mais eficazes e menos tóxicos (CHOWDHURY, 2020).

1.5 Doxorrubicina

A doxorrubicina é uma droga anticancerígena por seu alto potencial citotóxico, pertencente ao grupo das antraciclinas. Foi isolada primeiramente da bactéria *Streptomyces peucetius*. Sua ação antitumoral se deve, principalmente, devido à diversos mecanismos que interferem no ciclo celular e danificam o DNA da célula de câncer. A droga atua contra a célula de câncer de distintas formas, como na inibição da topoisomerase II, enzima responsável por soltar as fitas do DNA durante o processo de replicação e transcrição celular, impossibilitando assim que o DNA se reestruture e se replique, ocasionando a quebra do DNA e, por sua vez, danos irreversíveis à célula, inibindo a proliferação da célula cancerígena (CHOWDHURY, 2020).

Além disso, a droga possui alto potencial antineoplásico pela intercalação no DNA, ou seja, sua fixação entre as bases nitrogenadas que formam a dupla hélice do DNA, causando

distorção na estrutura do DNA e, conseqüentemente, interfere na replicação e transcrição do material genético, impedindo a finalização da divisão celular (FRANCO *et al*, 2018).

Por fim, a doxorrubicina possui potencial efeito antineoplásico por acarretar a formação de Radicais Livres de Oxigênio (ROS). A formação de ROS é um processo comum e importante para o bom funcionamento celular, resultado, por exemplo, da ação da cadeia de transporte de elétrons para dentro da mitocôndria celular. O desequilíbrio de ROS, ou seja, a geração e degradação de ROS por mecanismos antioxidantes celulares pode provocar o chamado estresse oxidativo do meio. Altos níveis de ROS participam da instabilidade genômica e levam à agressividade e progressão da carcinogênese. Para que seja possível, este processo é acompanhado da ativação de genes específicos (PILCO-FERRETO e CALAF, 2016).

Este quimioterápico é responsável por causar danos irreversíveis nas células tumorais, tais como a inibição da cadeia respiratória nas mitocôndrias, oxidação dos lipídios da membrana, interferência com o desenrolamento de DNA e atividade de helicase e, por fim, indução de apoptose em resposta a inibição da topoisomerase II. A apoptose é um importante processo de morte celular para a regulação do crescimento normal e homeostase. Entretanto, sua alteração pode acarretar no crescimento de células anormais, aumentando também os níveis de células mutadas naquele microambiente (FRANCO *et al*, 2018), (NICOLETTO e OFNER, 2022).

Como apresentado anteriormente, a doxorrubicina apresenta graves efeitos colaterais ao paciente que dela necessita, tais como a cardiotoxicidade e leucemia. Portanto, apesar de seu importante papel para o tratamento de câncer de mama, novas medidas terapêuticas são alvos de estudos para que, deste modo, seus efeitos colaterais possam ser reduzidos e, por vezes, potencializados.

1.6 Novos Alvos Terapêuticos e Linhagens Celulares

Assim como apresentado anteriormente, o câncer de mama possui uma vasta variedade de subtipos e, com isso, há diferenças em seus tratamentos, sendo relativos de acordo com suas características moleculares, histológicas, seu microambiente tumoral, o estágio de desenvolvimento e também sobre a ativação e inativação de genes associados ao desenvolvimento da doença, os chamados oncogenes e genes supressores tumorais, respectivamente (BRAGA, 2021). Deste modo, compreender as particularidades de cada uma dessas variações e como utilizá-las para o combate contra a doença é indispensável o desenvolvimento de novas pesquisas e novos alvos terapêuticos.

As pesquisas desenvolvidas para a cura e o entendimento da doença passaram não apenas da compreensão de sub classificações histológicas e moleculares, como também de vias de transdução de sinal intracelular, refinamento de biomarcadores e desenvolvimento de fármacos com alvos celulares específicos, tornando cada vez mais abrangente as possibilidades de customizações de tratamentos para cânceres específicos de cada paciente, resultando assim não somente no aumento de sua sobrevivência como as melhorias na sua qualidade de vida (LEITÃO, 2018).

A progressão do câncer de mama ocorre por meio de etapas sucessivas, iniciando predominantemente com a hiperproliferação das células ductais, progredindo então para carcinoma in situ, carcinoma invasivo e, por fim, metástase. Por essa alta variabilidade, a identificação de marcadores específicos de cada tipo deste câncer é indispensável para um tratamento eficaz em pacientes doentes, auxiliando, segundo Leitão (2018), principalmente em procedimentos diagnósticos, estadiamento, avaliação de resposta terapêutica, detecção de recorrência e metástase à distância e prognóstico, auxiliando assim em novos alvos terapêuticos.

Deste modo, é necessária uma complexa associação entre novas pesquisas para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos com o conhecimento prévio já entendido e sua relação com a particularidade de cada paciente. Dentre a vasta variedade de novas metodologias utilizadas para a busca da cura da doença, a terapia combinada tem mostrado sua eficiência e significância. A terapia combinada é uma modalidade de tratamento que combina dois ou mais agentes terapêuticos. A utilização de mais de uma droga anticancerígena aumenta a eficácia do tratamento em comparação com a monoterapia, isso por ter potencial efeito sinérgico entre os químicos utilizados. Esta metodologia utilizada mostrou-se capaz de diminuir a resistência ao medicamento ao mesmo tempo que oferece outras vantagens terapêuticas ao combate da doença como a diminuição do crescimento dos tumores, capacidade antimetastática, inibição do ciclo celular, desencadeamento de apoptose, entre outros, variando efeitos entre tumores alvos e químicos utilizados (MOKHTARI, 2017).

A parâmetro laboratorial, é necessária a clareza de qual é o tipo de câncer de mama tratado, sendo diferenciado de acordo com as linhagens celulares trabalhadas, dependendo de qual será a metodologia utilizada e os objetivos da pesquisa. As linhagens celulares são células previamente tratadas e estabelecidas por algum banco de células, sendo que, no Brasil, é tido como a mais notável o Banco de Células do Rio de Janeiro. Estas células tumorais foram primeiramente estabelecidas a partir de amostras de tumores de pacientes com a doença específica. São monitoradas continuamente obedecendo condições ambientais representativas das origens daquela linhagem. As células de origem podem ser constituídas não apenas por

pacientes humanos, mas também de diversos animais, como suínos, caprinos, bovinos, insetos, peixes, primatas, mustelídeos e aves (BCRJ, 2023).

Dentre as linhagens celulares tumorais, a MDA-MB-231 e a MCF7 são exemplos comumente utilizadas nas pesquisas relacionadas ao câncer de mama. Ambas as linhagens apresentam ampla utilização como modelos *in vitro* para pesquisas laboratoriais, isso devido à vantagens como a auto-replicação de amostras, fácil manuseio e alto grau de homogeneidade. Ambas são utilizadas em laboratórios de pesquisas em condições específicas de seu ambiente de origem. A utilização dessas para estudos relacionados são usualmente encontrados, devido a alta variação que elas representam (FLODROVA *et al*, 2016).

A linhagem tumoral MDA-MB-231 teve origem a partir de uma efusão pleural de carcinoma mamário metastático, estabelecida em 1974. É utilizada como modelo para o câncer de mama triplo negativo, ou seja, não apresenta receptores três biomarcadores, o receptor de crescimento epidérmico humano 2, conhecido como HER2, o receptor de estrogênio (ER) e o receptor de progesterona (PR), hormônios femininos. Essa linhagem é conhecida por ser altamente agressiva e invasiva. Portanto, é usualmente utilizada para estudos de metástase e invasão celular (FLODROVA *et al*, 2016). Os tumores que apresentam esta como linhagem tumoral são biologicamente mais agressivos e estão associados a maior taxa de recorrência devido sua alta taxa de proliferação e sua capacidade de movimentação e migração, possuindo assim pior prognóstico. Eles representam cerca de 10 a 20% das neoplasias mamárias (LUZETE, 2015).

A linhagem tumoral MCF7 foi originalmente isolada de uma efusão pleural de um carcinoma mamário metastático e foram estabelecidas como uma linhagem celular de uso contínuo laboratorial. Estas células têm como principal particularidade a expressão e sensibilidade de hormônios femininos, tais como o estrogênio e a progesterona, além de expressarem também o fator de crescimento epidérmico (HER2) para se proliferar (COMSA *et al*, 2015). A expressão hormonal é importante para esta linhagem tumoral visto que permite por meio de várias vias de sinalização o crescimento do tumor. Além disso, o metabolismo celular com receptores hormonais permite efeitos celulares distintos relevantes para o processo de carcinogênese. É uma linhagem tumoral menos agressiva e com menor incidência metastática do que a apresentada anteriormente, MDA-MB-231 (TELANG, 2022).

Como visto anteriormente, o câncer possui características que favorecem o desenvolvimento de um microambiente tumoral, sendo indispensável no desenvolvimento da doença. Dentre estas características, há a superexpressão de catepsinas de acordo com funções específicas para cada uma delas e da particularidade do câncer tratado (SUN *et al*, 2016). As

catepsinas são enzimas proteolíticas, tipicamente localizadas no lisossomo, onde desempenham o papel de degradação de diferentes proteínas intracelulares e na remodelação do ambiente extracelular, sendo por meio de autofagia ou por resposta imune. Além disso, a expressão alterada de catepsinas está relacionada à angiogênese tumoral e, por sua ação direta na degradação de proteínas, é responsável pela invasão e metástase. As que são mais facilmente encontradas em grande expressão para as linhagens tumorais de mama são as catepsinas B, L e S (POREBA *et al*, 2018; SUN *et al*, 2016).

1.5 Cisteíno proteases e catepsinas

Proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas entre os resíduos de aminoácidos das proteínas, ou seja, enzimas que degradam proteínas. Estão presentes em diferentes seres vivos, desde vírus à animais e desenvolvem distintas atividades no corpo do hospedeiro, como por exemplo ser uma enzima-chave para ativar ou desativar processos biológicos de diferentes atuações. Além disso, em caso de disfunção desta enzima, pode acarretar o desenvolvimento de várias doenças tais como inflamações, parasitoses infecciosas e a metástase.

Para que ocorra o câncer metastático é necessário um conjunto de especificidades àquele microambiente tumoral e às células tumorais. Dentre elas, sabe-se que as proteases são necessárias para causar a proteólise e degradar os componentes da matriz extracelular além de estruturas entre uma célula e outra, favorecendo não somente a migração como a ativação de fatores de crescimento e angiogênese (SWISHER *et al*, 2015).

São cinco os principais grupos de classificação das proteases segundo seu sítio ativo e a relação estrutural evolutiva, sendo eles: serino, aspartil, metalo, treonina e cisteíno (SANTOS, 2007; QUILLES JUNIOR, 2019). Segundo Santos (2007) as cisteíno proteases são enzimas que dependem da formação de uma dupla no sítio catalítico de cisteína e histidina presentes na grande maioria das células. São enzimas indispensáveis para o desenvolvimento e proliferação de diversas doenças, inclusive o câncer (QUILLES JUNIOR, 2019).

Cisteíno proteases lisossomais são enzimas que degradam as ligações peptídicas entre os aminoácidos formadores de proteínas. Quando relacionado ao câncer, dentro deste grupo, estão as catepsinas B, L e S são essenciais à progressão tumoral, metástase, apoptose em células tumorais e morte programada, além do controle da proliferação e diferenciação de células (TURK *et al.*, 1996). Essa atividade enzimática configura às células diversidade funcional,

como adaptação a diferentes substratos e ter estabilidade à diferentes ambientes (SANTOS, 2007) permitindo assim um desvio do sistema de controle presente no corpo. Portanto, para cada catepsina, é sabido que:

A catepsina B é uma cisteíno protease lisossômica associada a renovação e degradação de proteínas nos lisossomos. Ela apresenta papéis importantes em distintos eventos biológicos para, não somente o câncer de mama, como outros cânceres ao longo do corpo. Tais funções variam entre iniciação, crescimento e angiogênese, além de ser responsável pela degradação de componentes presentes na matriz extracelular e, portanto, está diretamente relacionada com a migração celular, invasão e metástase (NI *et al*, 2019).

A catepsina L, no câncer de mama, participa nos mecanismos subjacentes da quimiorresistência, servindo como promotores tumorais ou supressores. Essa catepsina secretada participa da degradação de proteínas extracelulares, como o receptor de insulina, fibronectina da matriz, elastina e colágeno além de outras moléculas de adesão celular fixas na membrana e receptores, favorecendo assim o processo de tumorigênese (POREBA *et al*, 2018).

A catepsina S demonstrou ser um mediador importante para o microambiente tumoral devido sua ação inflamatória, possibilitando assim às células tumorais seu crescimento, invasão e disseminação. Ainda, auxilia na formação de novos vasos sanguíneos e a supressão da resposta imunológica, contribuindo para a progressão da doença. Além disso, já foi avaliado que a superexpressão desta catepsina proporciona às células de câncer de mama a metástase para o cérebro (MCDOWELL *et al*, 2020).

Pelas atividades realizadas por este grupo enzimático e sua nocividade aos diferentes organismos, como o câncer de mama, pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos de inibidores destas proteases tem se mostrado necessárias (RODRIGUES, 2018). A determinação destes biomarcadores tem se mostrado necessária não somente para o nível acadêmico e laboratorial, como para prescrição de diagnóstico de pacientes que enfrentam a doença (SWISHER *et al*, 2015). Estes inibidores das cisteíno proteases têm a capacidade de seletivamente reprimir a ação da catepsina de interesse, resultando na contenção do desenvolvimento do tumor. Diferentes estudos mostram sua eficiência, tais como o de Rudzinska e colaboradores (2020), onde demonstraram eficácia na terapia contra a agressividade do câncer renal inibindo a ação das catepsinas B e L.

Dentre as diferentes metodologias utilizadas para estudos relacionados à expressividade de catepsinas no câncer e sua inibição, a mais comumente utilizada é o Western Blot. Essa técnica consiste em detectar, quantificar e identificar proteínas específicas de uma determinada amostra a partir de seu peso, através de eletroforese em gel transferida para uma membrana

tratada com anticorpos específicos da catepsina de interesse. Shockey e colaboradores (2019), apresentaram em sua pesquisa a importância da inibição de proteases para o câncer de mama com modelos computacionais e, dentre os métodos utilizados, o Western Blot foi necessário para identificação das catepsinas trabalhadas. Ainda, no trabalho de Zhao e colaboradores (2021) foi possível a observação da inibição de catepsinas necessárias para a metástase da MDA-MB-231 com a utilização de medicamentos aprovados pela FDA (Food and Drugs Administration), como, por exemplo o esomeprazol e, dentro do grupo de métodos utilizados, o Western Blot também foi necessário para identificação das catepsinas expressadas e, pós tratamento, inibidas.

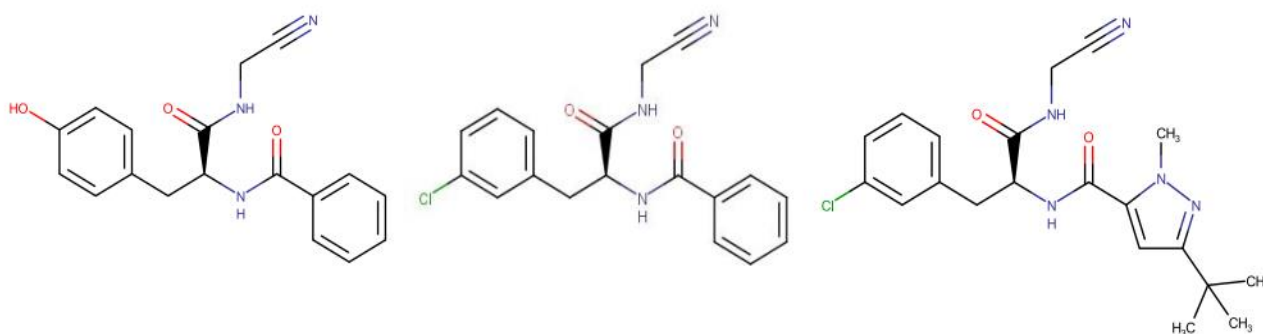
Por isso, o grupo de pesquisa NEQUIMED busca, de maneira *in vitro*, alternativas para a produção de substâncias bioativas para o controle de doenças como o câncer e doenças tropicais negligenciadas a partir da inibição de cisteíno proteases.

1.6 Novas substâncias bioativas – derivados de dipeptidil nitrila (NEQUIMED)

O grupo de química medicinal (NEQUIMED) que possui vínculo com o Instituto de Química de São Carlos, na Universidade de São Paulo (IQSC – USP) tem como objetivo sintetizar e avaliar novas substâncias bioativas, derivadas de dipeptidil nitrilas, que possuem efeito antineoplásico e antiparasitário (AVELAR et al., 2015). Nomeamos tais substâncias de Neq, pelo prefixo de NEQUIMED, com o número da substância de estudo. Por exemplo, Neq1008.

As dipeptidil nitrilas desenvolvidas pelo grupo apresentam potência nanomolar em ensaios bioquímicos para cruzafina e catepsina L (Figura 2).

Figura 2. Exemplos de dipeptidil nitrilas que atuam como inibidores da catepsina L e cruzafina com potência na ordem de nanomolar de acordo com ensaios enzimáticos.

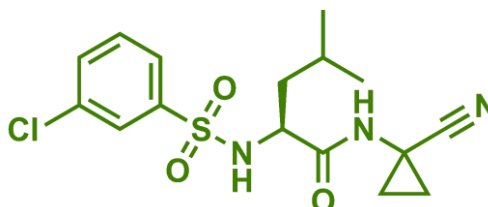


Fonte: AVELAR et al., 2015.

Anteriormente foi observada atividade sinérgica do Neq0780 (Figura 4) combinado com Doxorubicina na linhagem MDA-MB-231 de adenocarcinoma mamário e atividade antimetastática do mesmo (dados não publicados). No estudo foi mostrado que Neq0780 não apresentou citotoxicidade na concentração de 100 μM (viabilidade celular acima de 70%) e, na concentração de 10 μM foi capaz de impedir o fechamento da risca em 30% quando comparado ao controle no ensaio de *Wound Healing*, mostrando inibição na migração celular. Na análise de Terapia Combinada foi reportado aumento na potência da doxorubicina em 33 vezes (dados não publicados). A substância mencionada foi previamente sintetizada pelo Dr. Lorenzo Cianni e testado pela Dra. Talita Alvarenga Valdes.

Desta forma, a Dra. Deborah Araújo, pertencente ao grupo NEQUIMED, sintetizou um painel com 15 derivados do composto Neq0780, bem como o próprio Neq0780 que nesse trabalho será chamado de Neq0780.1 para não ser confundido com a substância que havia sido posteriormente sintetizada por outro membro do grupo. A série de compostos foi testada nas mesmas condições realizadas anteriormente.

Figura 3. Neq0780 sintetizado e testado previamente pelo grupo NEQUIMED e utilizado como modelo para o desenvolvimento do novo painel de quinze amostras.



Fonte: Disponibilizado pelo grupo NEQUIMED.

A descoberta de fármacos envolve várias etapas para a caracterização da atividade biológica de novas substâncias bioativas. Dentre essas, os ensaios celulares são de grande importância tanto para organismos unicelulares, quanto para organismos multicelulares (Leitão *et al.*, 2011) e são as primeiras triagens na descoberta e desenvolvimento de fármacos. Com isso, este projeto consiste no estudo de novas entidades químicas inibidoras de cisteína proteases que têm apresentado atividade antineoplásica e sua aplicação em ensaios celulares *in vitro*. A principal hipótese é que os derivados de dipeptidil nitrilas, inibidores de cisteína proteases, exigem atividade biológica significativa em linhagens de câncer de mama triplo-negativa (MDA-MB-231) e hormônio dependente (MCF7) quando avaliados por meio de ensaios celulares. Acredita-se que os inibidores possam apresentar potencial terapêutico, tanto isoladamente quanto em combinação com o fármaco de referência, doxorubicina. E, além

disso, há a hipótese de que essa combinação poderá resultar em efeitos citotóxicos mais expressivos para o câncer se comparado ao controle.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a atividade biológica de derivados de dipeptidil nitrilas inibidores de cisteíno proteases a partir de ensaios celulares usando substâncias isoladas e em estudo de terapia combinada em linhagens de câncer de mama hormônio-dependente (MCF7) e independente (MDA-MB-231). E, avaliar o porquê da combinação de inibidores de cisteíno proteases com a doxorrubicina promover sinergismo contra a linhagem tumoral MDA-MB-231.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a triagem para observar a atividade das novas substâncias bioativas nas linhagens de câncer de mama para determinar a possível atividade citotóxica;
- Realizar o ensaio de *wound healing* para avaliar o efeito anti-migratório dos compostos nas linhagens tumorais de mama triplo-negativa e hormônio dependente a fim de determinar o efeito da inibição de cisteíno proteases nesta ação;
- Para as substâncias mais promissoras, realizar o estudo de terapia combinada com o fármaco doxorrubicina;
- Realizar ensaios para avaliar possíveis causas da sinergia dos novos compostos em combinação com o fármaco de referência de acordo com ações já avaliadas em pesquisas previamente sucedidas;
- Analisar a formação de Espécie Reativa de Oxigênio após os tratamentos com a combinação;
- Analisar a inibição da expressão de cisteíno proteases após tratamento com os novos compostos.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Materiais

- Água deionizada;
- Meio de cultura celular DMEM (meio Dulbecco MEM em pó);
- Meio de cultura RPMI-1640 (em pó);
- Tampão Fosfato Salino (PBS);
- Antibiótico Penicilina/Estreptomicina;
- Soro Fetal Bovino (FBS),
- Solução de 0,25% de tripsina com EDTA;
- D-Glicose;
- Bicarbonato de sódio (NaHCO₃);
- Sistema de filtração a vácuo de 1L com membrana de Pes 0,22um;
- Câmara de Neubauer;
- Ponteiras e pipetas;
- Seringas, agulhas e filtros para seringas Pes 0,22um;
- Placa para cultura de célula de 96 poços transparente;
- Placa para cultura de célula de 96 poços preta com fundo transparente;
- Placa para cultura de célula de 24 poços;
- Dimetilsulfóxido (DMSO);
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) – adquiridos da Sigma Aldrich®;
- Marcador DCFH-DA (diacetato de 2,7-diclorofluoresceína);
- Peróxido de hidrogênio (H₂O₂);
- Balança analítica;
- Capela de fluxo laminar vertical classe II - Pachane PCR Pachane®;
- Centrífuga microprocessada (Quimis®);
- Mesa agitadora (Quimis®);
- Leitor de microplacas Biotek Synergy HT (BioTek Instruments, Inc.®);
- Linhagens celulares: MDA-MB-231, MCF7, BALB/ 3T3 clone A31, cultivadas no laboratório, mantidas em uma incubadora úmida a 37°C e 5% de CO₂, todas adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ);

- Fármaco de referência Doxorubicina MedKoo;
- Substâncias bioativas sintetizadas no grupo de pesquisa (Neq);
- Tampão de extração de proteína;
- Tampão de Laemmli;
- Gel de SDS-PAGE para eletroforese;
- Tampão de corrida;
- Tampão de transferência;
- Solução TBS-T;
- Tampão para gel de resolução;
- Tampão par gel de iniciação;
- Tampão estoque de Acrilamida 40%;
- Trizma Base 1M;
- EDTA 200mM;
- SDS 10%;
- NaCl 5M;
- Câmara de eletroforese;
- Buffers de corrida;
- Sistema de transferência;
- Membrana de nitrocelulose;
- Leite em pó;
- Anticorpo primário específico das proteínas de interesse (B, L e S);
- Anticorpo secundário;
- Bio-Rad Universal Hood III ChemiDoc MP Gel Imaging System w/ Camera

3.1.1 Meio de cultura

O meio de cultura DMEM (meio MEM modificado por Dulbecco), foi comprado em pó e preparado segundo os interesses da célula utilizada. No caso, segundo o BCRJ, as linhagens aqui trabalhadas que utilizam este meio são a MDA-MB-231 e BALB/3T3 clone A31. O tratamento do meio foi realizado para 1 L total, sendo ele: 1,5 g de bicarbonato de sódio; 3,5 g de D-glicose; 100 mL de soro de feto bovino; 10 mL de antibiótico penicilina/estreptomicina; 1 sachê de meio DMEM em pó. Eles foram solubilizados em 890 mL de água deionizada. Após, foi necessário a regulação do pH entre 7,2 e 7,4. Por fim, filtrou-se o meio em através de um sistema de filtração a vácuo com membrana de Pes 0,22um para evitar qualquer tipo de contaminação por microrganismos. O meio já finalizado é armazenado em 8°C. Os protocolos de cultivo já estão estabelecidos no laboratório.

Para o meio de cultura RPMI (RPMI-1640) há algumas diferenças. É o meio que a linhagem celular MCF7 utiliza, segundo o BCRJ. Este meio também foi comprado em pó e sua preparação final é totalizada em 1 litro, sendo ela: 1,5 g de bicarbonato de sódio; 4,5 g de D-glicose; 100 mL de soro de feto bovino; 10 mL de antibiótico penicilina/estreptomicina; 890 mL de água deionizada para completar 1 L. Tudo foi misturado e solubilizado até ficar homogêneo. Após, a calibração foi realizada para o pH entre 7,2 e 7,4, a filtragem pelo mesmo filtro é armazenada em 8 °C. Os protocolos de cultivo já estão estabelecidos no laboratório.

3.1.2 Substâncias bioativas

As novas substâncias testadas neste trabalho (Tabela 1) foram previamente sintetizadas pelo grupo de pesquisa NEQUIMED, com grau de pureza acima de 95%, diluídas em DMSO para formar a solução estoque a 50 mM e armazenadas a -20 °C.

Tabela 1 – Painel com os quinze derivados do composto Neq0780 investigados em todas as fases em ensaios com linhagens de câncer de mama e não tumoral.

Derivados de dipeptidil nitrilas		
Neq0780	Neq1006	Neq1017
Neq1002	Neq1007	Neq1020
Neq1003	Neq1008	Neq1021
Neq1004	Neq1015	Neq1022
Neq1005	Neq1016	Neq1023

Fonte: Autoria própria.

3.1.3 Cultura de células

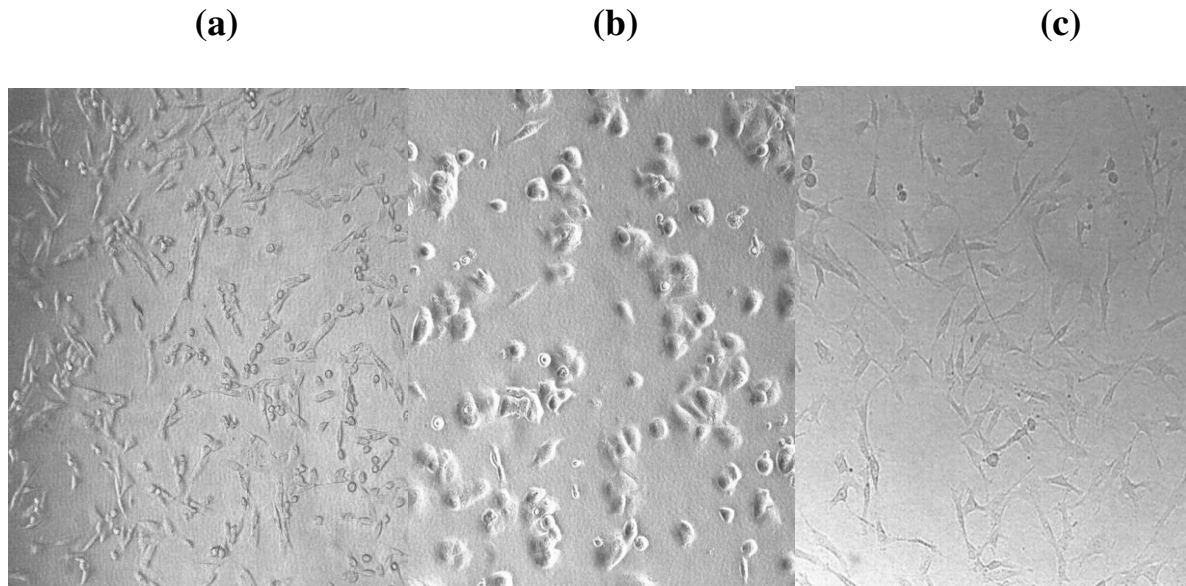
Os ensaios usando células de mamíferos foram efetuados nas linhagens MCF7, MDA-MB-231, além de BALB/3T3 clone A31 (fibroblasto de camundongo), todas adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células de estudo são, portanto:

- MDA-MB-231 - Código BCRJ 0164 (linhagem humana derivada de metástase pleural de um adenocarcinoma mamário). São células altamente metastáticas, consideradas como triplo negativas, não expressando receptores de hormônios. Sendo assim, é uma célula hormônio independente com um crescimento rápido e é resistente às terapias convencionais (HOLLIDAY E SPEIRS, 2011).
- MCF7 - Código BCRJ 0162 (Michigan Cancer Foundation-7) são células de câncer de mama estrogênio dependente. Diferentemente da MDA-MD-231, a linhagem tumoral MCF-7 tem seu crescimento e desenvolvimento dependente de estrogênio, como já registrado, devido sua capacidade de processar o estradiol via receptores citoplasmáticos de estrogênio (CRUZ, 2015).
- BALB/3T3 clone A31 - Código BCRJ 0047 (fibroblasto de camundongo – *Mus musculus*) é a célula utilizada como controle não tumoral para este projeto. A escolha dessa célula como controle foi determinada após testes e estudos de toxicidade *in vitro* confirmarem sua eficácia desta para diferentes amostragens. (INTER-

ORGANIZATIONAL PROGRAMME FOR THE SOUND MANAGEMENT OF CHEMICALS, 2010).

As imagens representativas para as 3 linhagens trabalhadas são mostradas na Figura 4.

Figura 4. Imagens das linhagens celulares trabalhadas: (a) MDA-MB-231, (b) MCF7 e (c) BALB 3T3 clone A31.



Fonte: Autoria própria.

3.2 Método

3.2.1 Manutenção das células

As linhagens celulares utilizadas nesse projeto possuem manutenção e cuidados específicos antes de dar início aos diferentes tipos de ensaios celulares. Primeiramente, a linhagem escolhida para o ensaio foi descongelada, onde estava armazenada à -80°C em tubos criogênicos de 1 mL, composto de 90% de FBS e 10% de DMSO em uma concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL. O descongelamento foi feito em banho maria à 37°C . Em uma capela de fluxo laminar, essas células são solubilizadas em 5 mL de meio de cultura e transferidas a um tubo de 15 mL para serem centrifugadas durante 5 minutos a 1200 rpm e, assim, separar células viáveis de demais substâncias e restos celulares. O precipitado celular surgido após a centrifugação foi ressuspenso com 1 mL de meio de cultura. Por fim, as células foram passadas para um frasco contendo, aproximadamente, 12 mL de meio de cultura. Esse frasco, agora com

as células em cultura, foi mantido em uma incubadora a 37° C e 5% de CO₂ para seu crescimento e desenvolvimento. Foi necessária a troca do meio a cada 2 dias até atingirem 80% de confluência para fazer uma passagem, ou então para serem utilizadas no ensaio. Na passagem, foi utilizado aproximadamente 5mL da solução de tripsina/EDTA para a soltura celular, agindo por aproximadamente 2 minutos. Após esse período, o efeito da tripsina é cortado com a adição de meio de cultura, sendo de aproximadamente 7mL. Por fim, essa solução é passada para um tubo de 15mL, levado à centrífuga e, por fim, ter-se o precipitado para ser utilizado de acordo com o ensaio em andamento. Para o nosso grupo de pesquisa, a célula é considerada viável até chegar à passagem de número 20.

3.2.2 Citotoxicidade das substâncias químicas

A análise de citotoxicidade foi realizada na etapa de triagem celular em três concentrações e na etapa de terapia combinada em nove concentrações, que será detalhado posteriormente. Em todo trabalho a citotoxicidade foi medida por meio do ensaio de viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT. Esse método foi aplicado para as três linhagens celulares trabalhadas.

Com a confluência celular próxima a 80%, foi possível iniciar os ensaios de citotoxicidade. A soltura dessas células do frasco foi feita por meio de tripsina, como descrito anteriormente. Depois, esta foi centrifugada a 1200 rpm por 5 minutos, com remoção do sobrenadante para que apenas o precipitado celular formado fosse ressuspenso em meio de cultura. A contagem das células presentes para o ensaio foi feita na câmara de Neubauer em um microscópio invertido. Foram transferidos 100 µL de $1,0 \times 10^5$ células/mL para cada poço em placas de 96 poços, com incubação de 24 h em estufa úmida com atmosfera a 5 % CO₂ para adesão celular.

Com as células já aderidas na placa, o meio de cultura foi retirado. No lugar, foram colocados os compostos em diferentes concentrações (1 µM, 10 µM e 100 µM), com incubação de 72 horas.

A viabilidade celular foi mensurada pelo método colorimétrico por MTT. O MTT é um sal de tetrazólio amarelo e solúvel em meio aquoso. Quando em contato com células vivas ele reage com enzimas redutases formando o formazan, sendo esse um sólido roxo e insolúvel em meio aquoso (LIU et al., 2002). Após 72 horas de incubação das amostras, o meio contendo composto foi retirado e adicionou-se 100 µL de uma solução de MTT (1 mg/mL) em cada poço que foi incubada por 3 horas. Um dos poços em cada condição na placa foi usado como branco,

sendo colocado apenas meio de cultura, para que fosse descontada qualquer interferência durante a leitura. Após o período de incubação, o MTT foi retirado e foi colocado 100 μ L de DMSO em cada poço para a diluição dos cristais de formazan. A absorbância foi medida a 570 nm, sendo analisados com o uso do Excel[®] e GraphPad Prism 5.0.

Os valores obtidos e utilizados foram calculados com a porcentagem média de cada concentração, com o valor do controle negativo fixado em 100% e o desvio padrão. Todos os ensaios foram realizados em quintuplicata em dois ensaios independentes (N=2) de modo a diminuir eventuais erros amostrais.

Como controle negativo foi utilizada a penúltima coluna da placa contendo apenas meio de cultura com 0,5% (v/v) de DMSO. A utilização de 0,5% de DMSO no controle negativo é importante para demonstrar que o DMSO utilizado na diluição das substâncias químicas não tenha relação com a morte celular.

Como controle positivo, foi utilizada a doxorrubicina a 10 μ M que leva à morte celular, atestado com ensaios previamente realizados por outros membros do grupo.

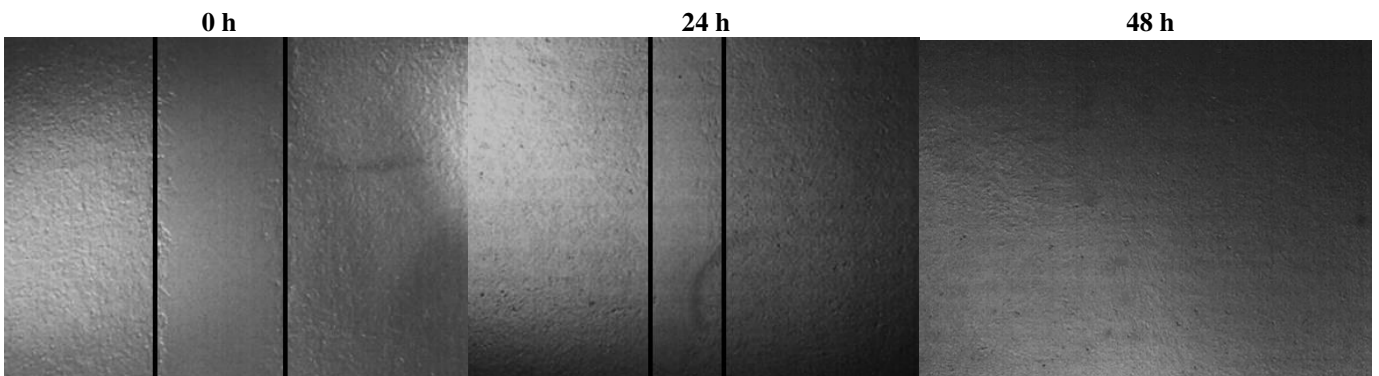
3.2.3 Ensaio de fechamento da risca (*Wound Healing*)

Com a finalidade de avaliar a atividade antimigratória dos novos compostos, visto que são potenciais químicos inibidores de cisteíno proteases, foi realizado o ensaio de fechamento da risca (*Wound Healing*) que é comumente aplicado em estudos antimetastáticos. Este ensaio é utilizado para avaliar a capacidade de cicatrização de tecidos e migração celular. (ELLIS e FIDLER, 1996). O ensaio foi realizado com todas as substâncias mencionadas na Tabela 1 para a linhagem de câncer de mama (MDA-MB-231) e com dois compostos para a linhagem de câncer de mama hormônio dependente MCF7, sendo eles o Neq0780 e o Neq1008.

As células em cultura foram depositadas em placas de 24 poços na concentração de $4,0 \times 10^5$ células/mL, com volume de 1 mL por poço, e mantida em incubadora úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas de adesão celular, foi realizada uma risca vertical no poço com o auxílio de uma ponteira de 200 μ L, seguida da lavagem com PBS (para retirada das células que possam ter se desprendido) e adição do composto. As amostras foram preparadas na concentração de 10 μ M e adicionadas em duplicatas de 1 mL por poço para cada uma das quinze amostras.

O teste foi realizado em duplicata em dois ensaios independentes (N=2). O monitoramento da risca foi realizado no tempo 0, 24 h e 48 h da realização da risca (Figura 5).

Figura 5. Risca traçada no poço com células de câncer de mama MDA-MB-231 nos tempos de 0, 24 e 48 horas, respectivamente.



Fonte: Autoria própria.

Software *ImageJ* foi realizada a partir do cálculo da área com a equação abaixo (Equação 1):

$$\% \text{ de fechamento da risca} = \frac{(At=0h - At=\Delta h)}{(At=0h)} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

3.2.4 Terapia combinada

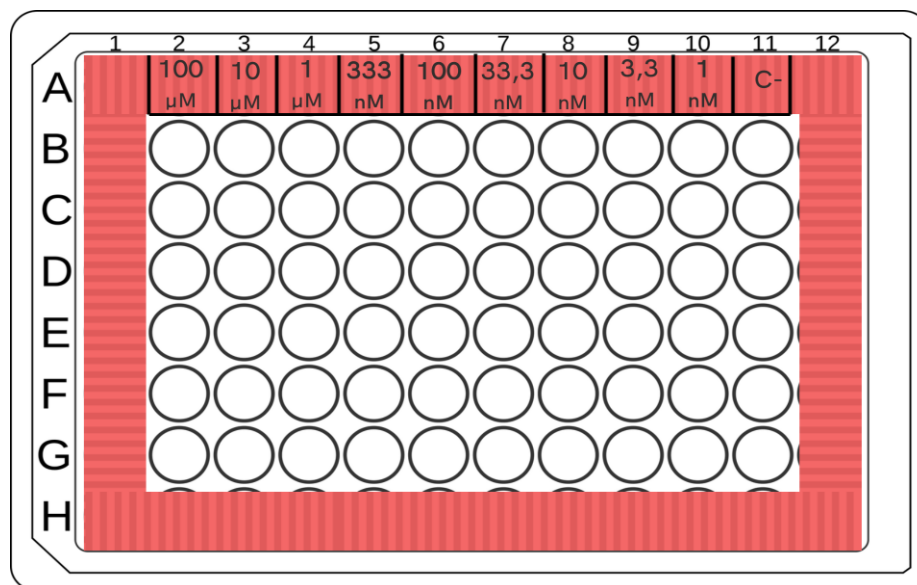
Este ensaio foi realizado com o auxílio e orientação da Dra. Talita Alvarenga Valdes. O intuito da terapia combinada é observar se a combinação de uma substância com outra resulta em sinergia, aditividade ou antagonismo. Para determinar qual o efeito da combinação, foi avaliada a variação de IC₅₀ do fármaco doxorrubicina isolado e em combinação com a nova substância química.

A doxorrubicina foi utilizada como referencial nesse estudo por apresentar um perfil citotóxico e ter seu mecanismo de ação conhecido. Além disso, a doxorrubicina já é utilizada como fármaco contra o câncer de mama (SAAD *et al*, 2007).

O estudo da terapia combinada foi realizado na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231, na linhagem não tumoral BALB/3T3 clone A31, além de ter sido realizado para dois compostos na linhagem tumoral MCF7, sendo eles o Neq0780 e o Neq1008. A viabilidade celular foi medida pelo método colorimétrico MTT, como descrito anteriormente. O plaqueamento foi realizado previamente nos 60 poços centrais de uma placa de 96, sendo 10 colunas e 6 linhas. Os compostos foram preparados e adicionados por coluna, totalizando 6 replicatas contendo, cada uma, 100 µL da concentração fixa de 10 µM do novos compostos em conjunto com distintas concentrações da Doxorrubicina (100 µM, 10 µM, 1,0 µM, 333 nM, 100 nM, 33,3 nM, 10 nM, 3,3 nM e 1,0 nM em cada coluna). Assim, cada placa foi reservada para

apenas uma combinação contendo o novo composto em concentração fixa, com diferentes concentrações de doxorrubicina (Figura 6). Na última coluna foi depositado o controle negativo contendo células sem tratamento. As placas foram incubadas por 72 horas, com leitura realizada como descrito anteriormente.

Figura 6. Mapeamento de uma placa de 96 poços após a adição de MTT mostrando intensidade crescente de cor correspondendo às células vivas, de acordo com a combinação de doxorrubicina e do derivado de dipeptidil nitrila.



A concentração de doxorrubicina é reduzida da esquerda para a direita na placa. A concentração do composto Neq0780.1 foi mantida a 10 μM. A última coluna representa o controle negativo (contendo apenas meio e 0,5% de DMSO), e a última linha compõe o branco (sem adição de MTT). Fonte: Autoria própria.

3.2.5 Detecção de Espécie Reativa de Oxigênio (ROS)

O ensaio de ROS é utilizado para medir se há a presença e, se sim, qual a expressividade de espécies reativas de oxigênio dentro da célula, sendo este um subproduto resultado do metabolismo celular. Os radicais possuem papel importante para a viabilidade celular, tanto para processos de sinalização celular quanto para o controle de processos fisiológicos, porém em altas concentrações ou em condições de desequilíbrio redox, podem causar danos celulares irreversíveis e estimular o estresse oxidativo. Para o câncer de mama, este subproduto pode afetar o desenvolvimento e a progressão da doença (HAYES, DINKOVA-KOSTOVA, 2020).

A doxorubicina é um composto utilizado na quimioterapia para alguns cânceres, incluindo o de mama. Seu efeito antitumoral é resultado de múltiplas ações no corpo do paciente, dentre eles a formação de ROS para estimular o estresse oxidativo e, portanto, tornar o microambiente tumoral tóxico para a célula, resultando em sua morte. Portanto, este ensaio foi realizado para avaliar se houve ou não o estímulo na produção de ROS após a combinação do fármaco de referência doxorubicina com as novas substâncias químicas sintetizadas pelo grupo de pesquisa.

O ensaio para a detecção de ROS foi realizado na linhagem tumoral de mama triplo-negativa MDA-MB-231, nas seguintes condições: combinação Neq0780+Doxorubicina; combinação Neq1002+Doxorubicina; combinação Neq1008+Doxorubicina; Doxorubicina isolada; Controle negativo (apenas meio de cultura); e Controle positivo, com a adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O valor da concentração da Doxorubicina isolada foi definido de acordo com os resultados obtidos no ensaio de terapia combinada, sendo referente ao IC_{50} da viabilidade da linhagem tumoral. Para o tratamento contendo a combinação do fármaco com os novos compostos foi utilizada a mesma concentração de doxorubicina (Dox) com a adição do fármaco à concentração de $10\mu M$.

Após a realização da manutenção celular e esta atingir a confluência de 80%, foi realizado o plaqueamento celular em placas de 96 poços preta na concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL, com volume de 100 μL por poço. As bordas desta placa também foram desconsideradas e, por isso, 60 poços foram utilizados para o ensaio. Após o período de 24hrs e com as células já aderidas, foi retirado o sobrenadante e adicionado os compostos em seus respectivos tratamentos. Foi utilizado duas colunas por placa por tratamento e uma coluna para cada controle, como representado na Figura 7.

Figura 7. Representação da disposição da placa de 96 poços preta no ensaio de ROS.



Exemplificação da disposição da placa durante o ensaio. Em azul escuro foi acrescentado o tratamento de Neq0780+Dox; em amarelo, Neq1002+Dox; em verde, Neq1008+Dox; em roxo, Dox isolada; em azul claro, Controle Negativo; e em laranja, Controle Positivo. Fonte: Autoria própria.

Após o período de 72hrs para a ação dos compostos na célula trabalhada, foi finalizado o ensaio. Primeiramente, retira-se o sobrenadante para adicionar o marcador de espécies reativas de oxigênio utilizado, o DCFH-DA, em uma diluição de 2,45mg do marcador (em pó) em 10mL do tampão PBS, ou seja, na concentração de 500 μ M. Adicionar este preparado no volume de 100 μ L por poço, com exceção da última linha, utilizada como branco para este ensaio, e incubar por 30 minutos a 37°C na incubadora de CO₂. Após este período, retirou-se todo o sobrenadante cuidadosamente, adicionou-se 100 μ L por placa de PBS para retirar qualquer possível resquício do marcador, retirar novamente este sobrenadante e, por fim, acrescentar 100 μ L de PBS nos poços, com exceção do controle positivo e dos poços da última linha da placa, para a leitura no leitor de microplacas. Este ensaio foi realizado em triplicata (N=3) e, em cada tratamento, foram estabelecidos 10 poços (desconsiderando dois poços destinados ao branco), sendo assim um total de 30 poços por tratamento.

Foi utilizado como controle positivo para este ensaio o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), visto que esta substância tem alta capacidade de formar espécies reativas de oxigênio nas células, devido à sua natureza oxidante. Para determinar as concentrações necessárias de H₂O₂ para a linhagem celular em questão, MDA-MB-231, foi realizado um ensaio de curva concentração resposta com a substância, assim como previamente protocolado pela Mestre Camila Melo, em concentrações descritas na tabela a seguir:

Tabela 2. Concentrações necessárias para a diluição do H₂O₂, utilizado como controle positivo para o ensaio em questão.

Preparo controle positivo H ₂ O ₂ – Ensaio ROS			
Concentração (μM)	Volume H ₂ O ₂ (μM)	Volume PBS (mL)	Volume final (mL)
2.000	1.800	8,2	10
1.000	900	9,1	10
500	450	9,55	10
250	225	9,77	10
125	112	9,88	10

Fonte: Desenvolvida e fornecida pela Dra. Talita Alvarenga.

Por fim, ao adicionar o preparado do controle positivo em seus respectivos poços e o PBS nos demais poços da placa, realizar imediatamente a leitura da fluorescência no leitor de microplacas, sendo os comprimentos de onda $\lambda_{exc} = 485/20/40$ e $\lambda_{emis} = 532/40$, como descrito o protocolo previamente mencionado.

Para a análise dos resultados, foi analisada a porcentagem do controle negativo (célula sem tratamento), onde a média dos poços referentes ao controle positivo é 100%. Além disso, foi subtraído o valor da média dos branco dos valores dos demais poços em tratamento.

3.2.6 Western Blot

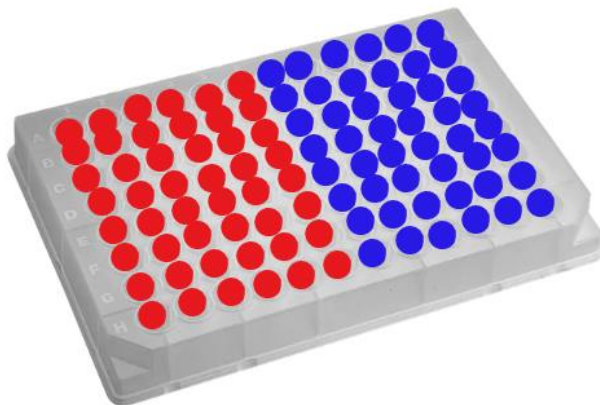
O ensaio de Western Blot é um método analítico para a detecção de proteínas específicas de uma determinada amostra, sendo possível estimar sua presença, quantidade, peso molecular ou possíveis modificações e degradações após determinado tratamento utilizado. Para isto, é necessário a separação das proteínas por eletroforese em gel e, posteriormente, a transferência desta informação para uma membrana, onde será tratada com anticorpos específicos de interesse e, por fim, a marcação das proteínas reagentes a este anticorpo (MORITZ, 2020).

Este ensaio foi realizado com o auxílio da, então, Doutoranda Sabrina Botelho, e guiado pelo protocolo oferecido pelo grupo do Laboratório de Biologia do Câncer e Antineoplásicos do Departamento de Farmacologia no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – *campus* São Paulo, orientado pelo Prof. Dr. João Agostinho Machado Neto. Para a revelação, nos foi cedido o espaço e equipamentos do Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Moleculares (LEMiMo), coordenado pela Profa. Dra. Ilana L. B. C. Camargo no

Instituto de Física de São Carlos na Universidade de São Paulo – *campus* São Carlos, com orientação da Dra. Fernanda Zani Manieri.

O estudo de expressão de proteínas foi realizado na linhagem celular MDA-MB-231 nos seguintes tratamentos: Célula isolada, ou seja, célula sem tratamento, utilizada como controle negativo; Neq0780 na concentração de 10 μM ; Neq1002 na concentração de 10 μM ; Neq1008 na concentração de 10 μM e; doxorubicina na concentração de 1,1 μM , sendo este o valor referente ao IC_{50} da linhagem celular utilizada. Após toda a etapa de preparação celular, as células foram distribuídas na concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL em placas de 96 poços com o volume de 100 μL por poço. Após o tempo de 24hrs para a aderência celular, todo o meio foi retirado e, no lugar, colocado o tratamento específico. Neste ensaio, foi utilizado metade da placa para cada tratamento, incluindo as bordas, para uma maior amostragem de precipitado, sendo exemplificado na imagem abaixo. O ensaio foi realizado em duplicata ($N=2$) e nos tempos de 48h e 72 h para ação dos compostos nas células.

Figura 8. Representação da disposição da placa de 96 poços para o ensaio de Western Blot.



Exemplificação da disposição da placa durante o ensaio. Cada cor representa um tratamento diferente, totalizando então 48 poços para cada um. Fonte: Autoria própria.

Após o tempo de ação dos compostos (48h ou 72h) foi necessário preparar o precipitado celular. Para tal, adicionou-se 100 μL de tripsina em cada poço, com tempo de ação de aproximadamente 1 minuto. Após esse período, foi adicionado 150 μL de meio de cultura para a inativação da tripsina. Com as células soltas, todo o volume de cada tratamento foi adicionado em um tubo de centrifuga de 15mL, visto que o volume final foi os 48 poços x 250 μL de cada poço, totalizando aproximadamente 12 mL. Esta solução foi centrifugada a 1200 rpm por 5

minutos. Após esta ação, todo o sobrenadante foi retirado e o precipitado formado foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura e passado para um Eppendorf de 1,5 mL. Esse foi levado para uma centrífuga de Eppendorf refrigerada pelo tempo de 10min a 12000 rpm. Depois, é retirado qualquer resquício de líquido acima do precipitado e o tubo colocado novamente à centrífuga, para evitar qualquer formação de cristais da solução restante. Por fim, após a preparação do precipitado celular, este foi mantido em -20°C até o início da primeira etapa do ensaio, após tratamento das células, a extração de proteínas.

As etapas deste ensaio incluem: 1 – Extração de proteínas; 2 – Separação das proteínas por peso molecular através de um gel de poli(acrilamida) contendo SDS; 3 – Transferência para uma membrana de nitrocelulose ou PVDF; 4 – Incubação com anticorpos específicos e; 5 – revelação. Elas estão detalhadas a seguir:

1 - Extração de proteínas: Primeiramente, foi adicionado ao precipitado celular de 50 a 100 µL de tampão de extração para cada $1,0 \times 10^6$ células/mL, sendo este preparado com EDTA, solução Tris, pirofosfato de sódio, fluoreto de sódio, ortovanadato de sódio, Triton PMSF e água deionizada, homogeneizar e incubar no gelo por 40 a 120m. Após, centrifugar esse lisado proteico à 4°C e 12000rpm por 20 minutos na centrífuga de Eppendorf. Coletar o sobrenadante e quantificar pelo método de Bradford. Desnaturar as proteínas de incubação à 94°C por 5 min. Por fim, adicionar o Tampão de Laemmli, sendo este preparado com azul de bromofenol, glicerol, SDS, NaH₂PO₄ e água deionizada.

2 - Separação das proteínas por peso molecular através de um gel de poli(acrilamida) contendo SDS: Para início desta etapa, foi necessário fazer o gel *resolving* (10%) da concentração de interesse, de acordo com o peso molecular da proteína de interesse. Adicionar 50 µL de isopropanol absoluto para a remoção das bolhas que formam no gel e esperar polimerizar. Retirar cuidadosamente o isopropanol com água corrente e retirar esta água logo em seguida. Adicionar o gel *stacking* e colocar o pente e, depois, esperar polimerizar. Por fim, montar o sistema de eletroforese e adicionar o tampão de corrida, retirar o pente e aplicar o volume de proteína. Correr por 30 min a 60V para o empilhamento das proteínas e aumentar para 100V e correr o restante do tempo até a linha de frente atingir o final do gel. O tampão de corrida foi feito com Trizma base, glicina, SDS, EDTA e água deionizada.

3 - Transferência para uma membrana de nitrocelulose: A etapa de transferência ou blotting é iniciada com a montagem do sistema de transferência com a espuma, papel filtro, gel, membrana de nitrocelulose, papel filtro e espuma. O sistema foi montado submerso ao tampão

de transferência. Após, montar a cuba de transferência, colocar a estrutura com o gel e adicionar gelo na parte externa da cuba para evitar superaquecimento. Por fim, correr a transferência a 120V por 2 hrs. O tampão de transferência utilizado continha Trizma base, glicina, SDS e água deionizada.

4 – Incubação com anticorpos específicos: Com a finalização da corrida na etapa anterior, foi retirada a membrana e, com o marcador presente, bloquear a membrana com TBS-T contendo 5% de leite em pó por 15 a 60 minutos (verificar a especificidade do anticorpo). Depois, remover a solução de bloqueio e adicionar a solução TBS-T contendo 3% do leite em pó e o anticorpo primário de interesse. Incubar *overnight*. Por fim, remover a solução contendo o anticorpo primário e lavar a membrana 3X por 5 min com TBS-T. Os anticorpos utilizados são da marca

5 - Revelação: Para finalizar a metodologia deste ensaio, foi necessário a revelação da membrana. Para isto, começou-se com a adição de TBS-T contendo 3% de leite em pó e o anticorpo secundário, este que reconhece a espécie na qual o anticorpo primário foi produzido, sendo eles específicos um ao outro. Com a ligação de ambos os anticorpos, há uma amplificação do sinal. Incubar por 60 a 120 min e depois lavar 3X por 5 min com TBS-T.

O resultado deste ensaio é uma imagem contendo bandas correspondentes às proteínas detectadas, sendo assim possível analisar e quantificar a presença destas proteínas específicas na amostra testada. Para a quantificação, foi necessário a utilização do Software ImageJ, sendo ele capaz de determinar a área representante das bandas formadas por cada tratamento. A partir disto, foi realizada a razão entre o valor da área dos tratamentos pelo valor da área do controle, sendo ele definido pelo tratamento com a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A GAPDH é uma enzima com carga de aproximadamente 37 kDa e, portanto, é utilizada como método comparativo a partir dos resultados obtidos no tratamento. O valor obtido desta razão é transformado em porcentagem e, por fim, com auxílio do software GraphPad Prism v. 5, é desenvolvido o gráfico representando os valores em porcentagem de cada tratamento realizado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados foram obtidos a partir de análises de citotoxicidade para as linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF7, além do controle BALB/3T3 clone A31, referentes às novas entidades químicas derivadas do composto Neq0780, produzido pelo grupo de pesquisa NEQUIMED. Também será mostrado os dados referentes ao potencial antimigratório de todas as amostras na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 e do Neq0780 e Neq1008 na linhagem de câncer de mama hormônio dependente MCF7, obtidos a partir do método de *Wound Healing*. Posteriormente, serão apresentados os resultados da terapia combinada entre a doxorrubicina e todas as novas substâncias bioativas para a linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 e na linhagem controle BALB/3T3 clone A31 e, para a linhagem tumoral MCF7, os resultados obtidos a partir dos efeitos dos compostos Neq0780 e Neq1008, além da doxorrubicina (Dox). Além disso, os resultados obtidos no ensaio de ROS (Espécie Reativa de Oxigênio) serão apresentados para tratamentos comparativos entre Neq780+Dox, Neq1002+Dox, Neq1008+Dox, Dox isolada e controles negativo e positivo na linhagem tumoral de mama triplo-negativa MDA-MB-231, a fim de investigar com mais profundidade resultados obtidos no ensaio de terapia combinada. Por fim, a presente dissertação encerrará com análise do ensaio de Western Blot para a mesma linhagem com tratamentos do Neq780, Neq1002 e Neq1008 comparativamente ao controle negativo, célula sem tratamento, com a finalidade de avaliar a expressão das catepsinas após a ação dos químicos com potencial efeito de inibição das proteínas.

A linhagem celular BALB/3T3 clone A31 é um controle importante em pesquisas sobre câncer de mama devido a suas características conhecidas, utilizada como modelo experimental em diversas pesquisas previamente publicadas. Além disso, é uma linhagem com rápida proliferação, garantindo praticidade para estudos que precisem relacionar esta às demais linhagens, inclusive cancerígenas. Essa escolha permite comparar resultados entre experimentos, minimizar variáveis e estudar especificamente os efeitos das catepsinas nas células cancerígenas, enquanto se mantém uma relação de remodelação da matriz semelhante. Isso contribui para validação de hipóteses e compreensão mais precisa do papel das catepsinas na progressão do câncer de mama.

4.1. Análise da citotoxicidade das substâncias químicas

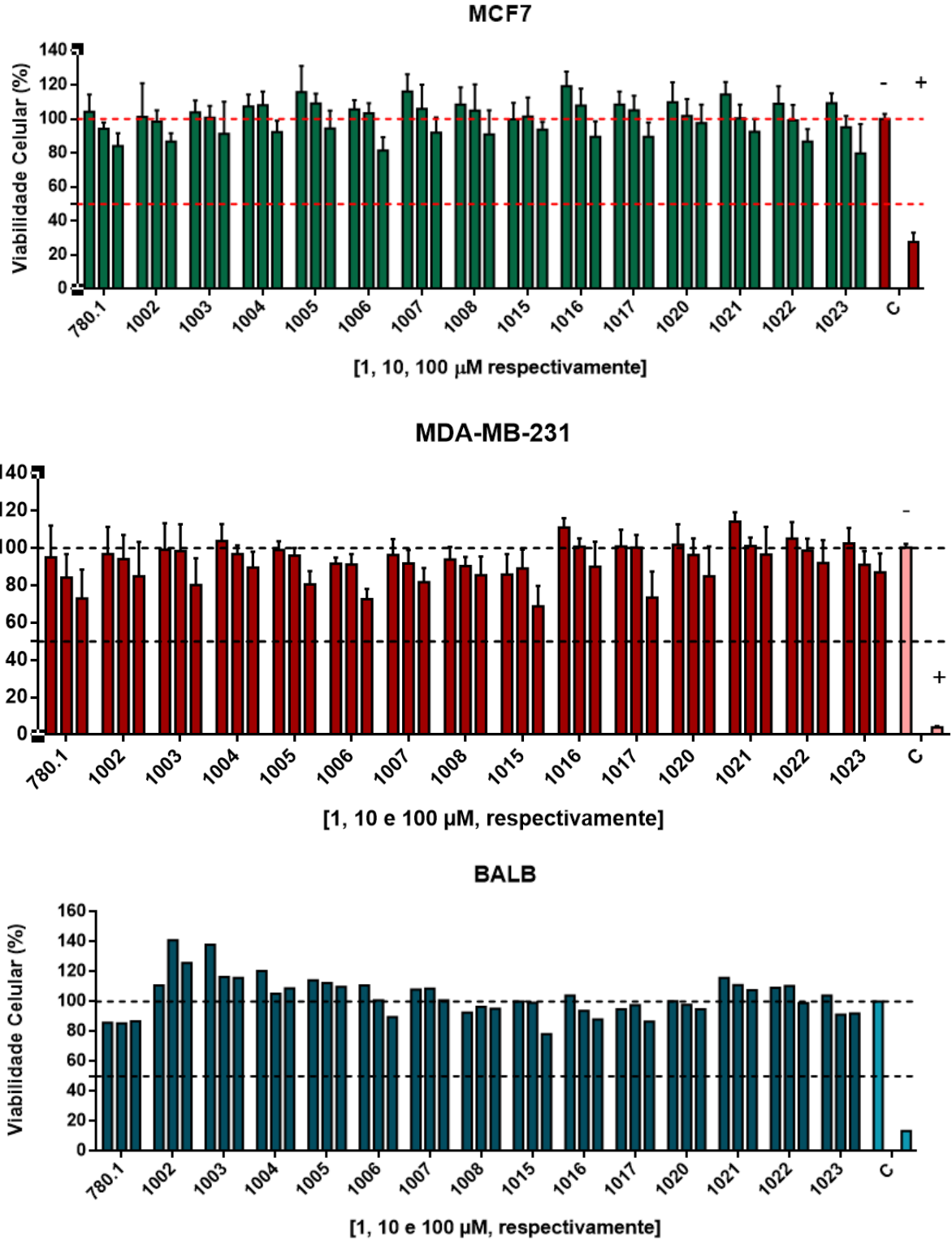
Ensaio que visam a análise de citotoxicidade de novas substâncias químicas são cruciais para estudos a níveis celulares e moleculares. Para estudos com câncer, este ensaio está diretamente relacionado à síntese e avaliação destes novos compostos, analisando sua capacidade de inibir o crescimento celular tumoral, induzir sua morte ou sua interferência na viabilidade da linhagem. Estudos antineoplásicos buscam, como método ideal, tratamentos que selecionem e eliminem as células tumorais ao mesmo tempo que preserve as células saudáveis do paciente, sem efeitos colaterais. Por isso, ensaios de citotoxicidade se mostram consolidados como um dos alicerces para pesquisas de novos químicos com potencial efeito contra o câncer (EASTMAN, 2017).

Deste modo, o presente ensaio foi realizado para avaliar o potencial efeito citotóxico de grupo de novos compostos derivados do Neq0780, previamente testado em trabalhos do grupo não publicados pela Dra. Talita Alvarenga Valdes.

Na Figura 9 é observado que nenhum dos compostos testados, independente da concentração, levou à morte celular de mais de 50% das células (dado como viabilidade celular abaixo 50%), o que já era esperado, visto que os derivados de dipeptidil nitrilas não costumam apresentar citotoxicidade nessas concentrações (QUILLES, 2019). Para todas as amostras em todas as linhagens a viabilidade celular se manteve acima de 70%.

Anteriormente, o composto Neq0780 havia sido testado nas linhagens de fibroblasto de camundongo e na linhagem independente de hormônio (MDA-MB-231) e não foi relatada a citotoxicidade nessas concentrações, como mencionado anteriormente. Conforme esperado, os derivados do composto Neq0780 também não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas (Figura 9). Todos os resultados para a linhagem de câncer de mama hormônio dependente (MCF-7) são inéditos. A viabilidade celular nesta linhagem se manteve alta, com valores acima de 75%, como nas outras duas linhagens celulares.

Figura 9. Triagem dos compostos derivados do composto Neq0780 para as linhagens de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e linhagem não tumoral (BALB 3T3 clone A31).



Fonte: autoria própria.

Compostos inibidores de cisteíno proteases não são, necessariamente, citotóxicos. Sua ação depende especificamente da modulação destas enzimas, ou seja, tais inibidores precisam ser projetados para enzimas-alvo, impedindo assim sua atividade tanto reversível quanto irreversivelmente, interferindo diretamente nas vias proteolíticas. Além de sua especificidade, muitas das ações e ligações enzimáticas são reversíveis de acordo com o tempo, significando assim que a ação do inibidor pode ser interrompida, permitindo que as enzimas tenham capacidade de manifestar suas devidas funções e ligações novamente (EATEMADI *et al*, 2017; SIKLOS *et al*, 2015). Sendo assim, inibidores de cisteíno protease são utilizados como alvos terapêuticos por ter ação de modulação da atividade enzimática e, portanto, podem regular vias específicas, direcionando alvos moleculares sem necessariamente causar danos às células, mas auxiliando em novas pesquisas, tais como ensaios de terapia combinada com químicos já utilizados e conhecidos.

4.2. Análise da atividade antimigratória (*Wound Healing* – fechamento da risca)

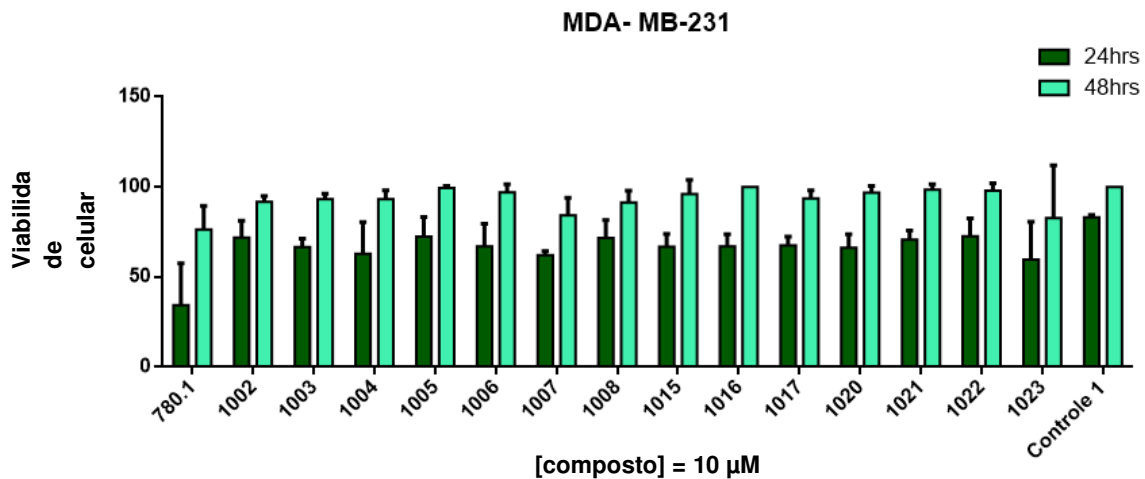
O ensaio de *Wound Healing*, também conhecido como fechamento da risca ou cicatrização de feridas, é realizado para avaliar o potencial efeito de uma determinada linhagem ou tecido se reparar e regenerar de danos. Para que isto seja possível, o processo envolve uma série de etapas, incluindo a migração e proliferação celular. As catepsinas possuem importantes efeitos para a progressão do câncer de mama. Elas são responsáveis por promover a invasão de células tumorais, formação de metástase e, conseqüentemente, resistência a tratamentos, promovendo para o microambiente tumoral a progressão, proliferação e invasão deste câncer (OLSON e JOYCE, 2015). Sendo assim, este ensaio foi utilizado para avaliar a ação antimigratória dos compostos inibidores de cisteíno protease nos cânceres de mama triplo-negativo, MDA-MB-231, e hormônio dependente, MCF7.

As quinze novas substâncias bioativas com perfil não citotóxico foram testadas na linhagem MDA-MB-231 a fim de observar o comportamento do ensaio. Com base nos resultados obtidos, a linhagem tumoral MCF7 recebeu o tratamento para dois dos compostos mais promissores no tratamento de terapia combinada para a linhagem MDA-MB-231, sendo eles, como será mostrado a seguir, o Neq0780 e o Neq1008.

Para a determinação da porcentagem de fechamento da risca, comparou-se cada composto com o controle negativo (células sem tratamento) nos tempos de 24 h e 48 h. Primeiramente, para a linhagem MDA-MB-231 e no tempo de 24h, o controle apresentou fechamento da risca próximo a 80% (Figura 10). Os valores de fechamento da risca descritos

na Tabela 3 foram obtidos fixando o valor do controle como 100%. Os compostos com melhor atividade antimigratória foram Neq0780 e Neq1007, com porcentagem média de 65% e 74%, respectivamente. Anteriormente, Neq0780 havia sido testado nas mesmas condições e foi relatado o fechamento da risca em 66% quando comparado ao controle negativo (dados não publicados) demonstrando uma boa correspondência entre os ensaios *in vitro*.

Figura 10. Análise do ensaio de fechamento da risca para as quinze substâncias químicas a 10 μ M e o controle negativo na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 nos tempos de 24 e 48 horas.



Controle 1 = controle negativo (célula sem tratamento). Fonte: Autoria própria.

Já no tempo de 48 horas de monitoramento para a mesma linhagem, o controle negativo já havia fechado completamente à risca (Figura 11 e Tabela 3). Novamente os compostos mais promissores foram Neq0780.1 e Neq1007, com valores de 76% e 84% para o fechamento da risca, respectivamente. Todas as outras amostras apresentaram valores muito próximos a 100%, demonstrando que a inibição antimigratória vai sendo perdida ao longo do tempo nessa concentração testada.

Tabela 3. Porcentagem de fechamento da risca dos compostos em comparação com o valor do controle negativo para a linhagem MDA-MB-231.

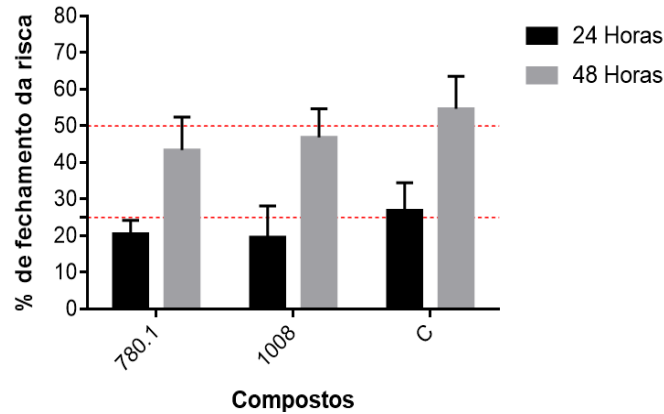
Amostra	% fechamento da risca		Amostra	% fechamento da risca	
	24 horas	48 horas		24 horas	48 horas
780.1	65	76	1015	79	96
1002	86	91	1016	79	100
1003	79	93	1017	81	93
1004	75	93	1020	79	96
1005	87	99	1021	84	98
1006	81	96	1022	87	97
1007	74	84	1023	84	97
1008	85	91			

Valores relativos ao fechamento de risca do controle negativo dado como 100% para 24 e 48 h. Fonte: Autoria própria.

Para a linhagem tumoral MCF7, assim como mostrada na Figura 11, foram testados os compostos Neq0780 e o Neq1008, além de obtidos valores da média da porcentagem de fechamento da risca para os poços sem tratamento. Para o tempo de 24 h, o valor obtido para o Neq0780 foi de 20,5% e de 19,6% para o Neq1008. Enquanto isso, para a média nos poços controle, o valor foi de 26,9%, sendo relativamente menos seletivos do que os poços tratados.

Enquanto isso, os valores obtidos foram de 43,4% para o Neq0780, 46,8% para o Neq1008 e 54,6% para o controle negativo após 48h.

Figura 11. Análise do ensaio de fechamento da risca para o Neq0780 e Neq1008 a 10 μ M e o controle negativo na linhagem de câncer de mama hormônio dependente MCF7 nos tempos de 24 e 48 horas.



Fonte: Autoria própria.

De modo geral os compostos apresentaram efeito antimigratório, mesmo que com baixa expressão. Os inibidores de cisteíno protease estão se tornando com cada vez mais frequência alvos de terapias que buscam inibir as metástases de diferentes grupos neoplásicos. O descolamento celular ocorre quando células se desprendem principalmente a matriz extracelular e invadem vasos circulatórios para se deslocar até outro local pré-disposto. Este é o primeiro passo necessário na cascata metastática. Para tal, o deslocamento celular envolve forças mecânicas e clivagens mediadas por proteases (GUAN, 2015). Assim, a potencial ação dos inibidores dessas proteases podem ter apresentado ação em etapas-chave no processo migratório das linhagens tumorais, dificultando a invasão destas.

Por apresentarem este potencial efeito, mesmo que ínfimo, e, ainda, não apresentarem efeito citotóxico, todos os novos compostos testados foram selecionados para o ensaio de terapia combinada, cujos resultados serão apresentados a seguir.

4.3. Análise do ensaio de terapia combinada

Vários estudos descrevem o uso de combinações de substâncias químicas e seus efeitos significativos no tratamento de várias doenças, inclusive para o câncer de mama. Os compostos isolados, muitas vezes, são ineficientes em baixas concentrações e em altas podem ser tóxicos, ocasionando efeitos colaterais agressivos e prejudiciais ao tratamento do câncer (LI et al., 2019). Portanto, foi realizada a terapia combinada entre os novos compostos sintetizados pelo

grupo de pesquisa, este por sua vez que já apresentaram resultados não citotóxico e com baixo potencial antimigratório, juntamente com a doxorubicina, fármaco hoje utilizado como principal quimioterápico para tratamento de câncer de mama, principalmente para o câncer triplo-negativo, sendo este o mais agressivo e metastático, como já descrito na introdução.

A terapia combinada foi realizada com os quinze novos inibidores e a doxorubicina para a linhagem de câncer de mama MDA-MB- 231 e para a linhagem não tumoral BALB/3T3 clone A31 e foram apresentados separadamente. Além disso, como descrito, foi realizada a análise para MCF7 em dois compostos, o Neq0780.1 e o Neq1008. Posteriormente será aplicado esse tratamento para os demais compostos na linhagem MCF-7.

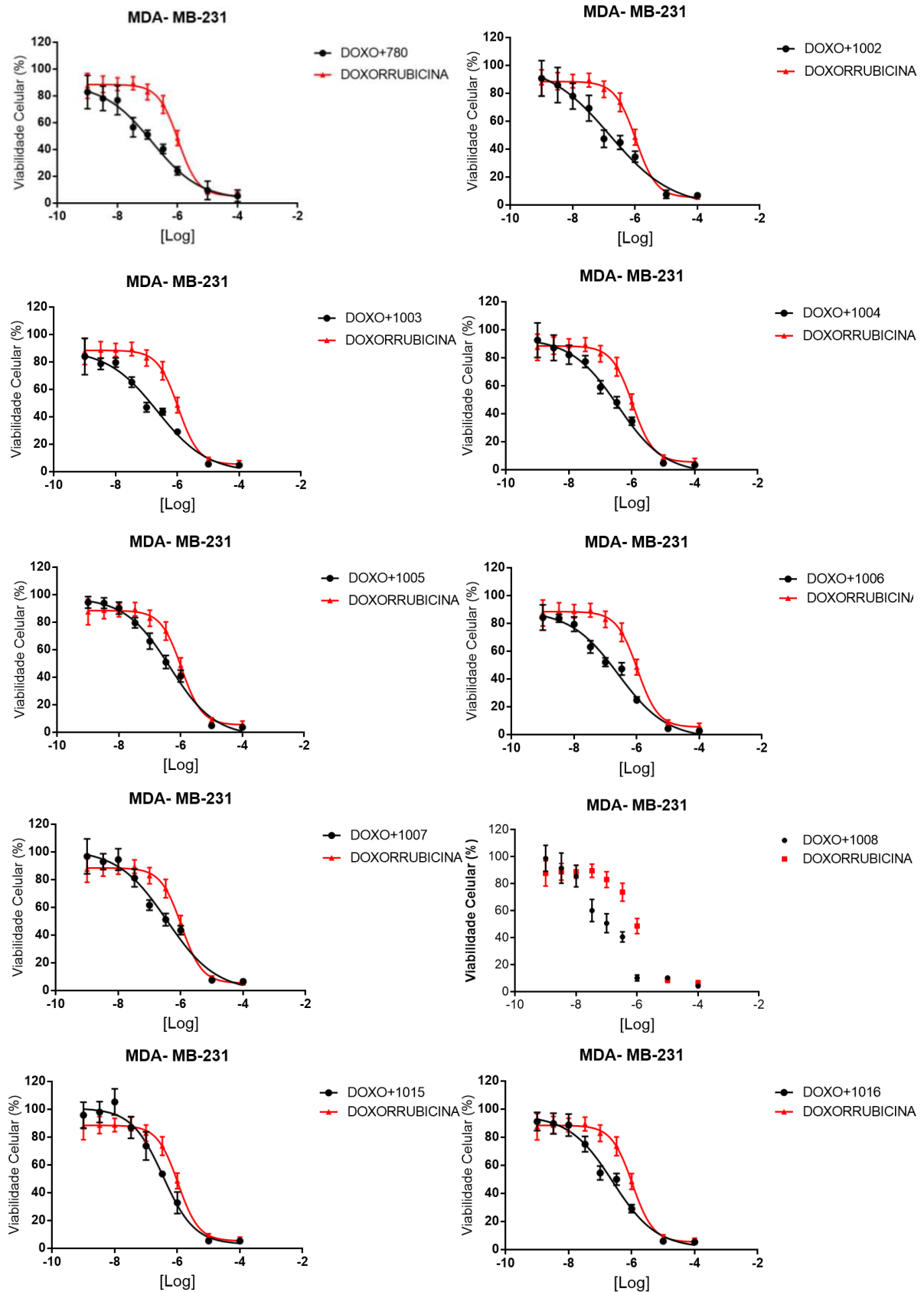
Os valores de IC_{50} do agente citotóxico administrado isoladamente (doxorubicina) foi comparado com o valor de IC_{50} da combinação da doxorubicina com a substância antimigratória (doxorubicina + novo composto), com a finalidade de verificar se a combinação potencializou a substância de referência, tanto para a linhagem de câncer de mama quanto para a linhagem controle.

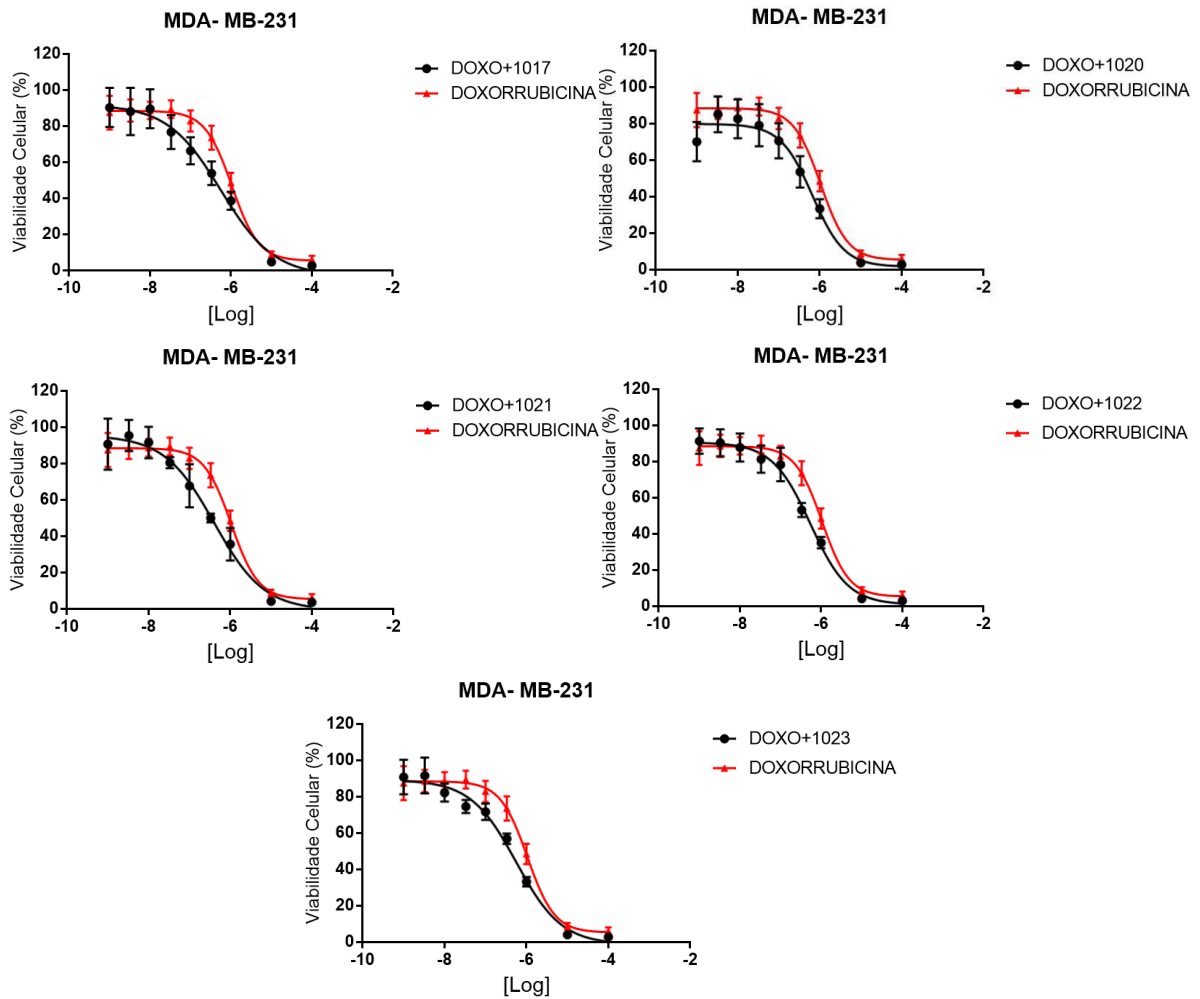
A razão entre os valores de IC_{50} foram interpretadas da seguinte forma: variação acima de 1 apresenta o efeito sinérgico (agente antimigração sensibiliza a célula para aumentar a potência do agente citotóxico), é observada a diminuição do IC_{50} da substância combinada e a curva de combinação se desloca para a esquerda da curva com a substância isolada; variação abaixo de 1, o efeito é antagonista; e quanto menor for a variação do valor de IC_{50} , mais próximo de 1 é a razão entre os valores, destacando a não sensibilização da linhagem celular pelo agente citostático. Deve-se lembrar que os derivados de dipeptidil nitrila não apresentaram atividade citotóxica relevante na concentração de 10 μ M escolhida para teste, mas eles podem sensibilizar a célula para aumentar a atividade citotóxica do fármaco doxorubicina.

- **Adenocarcinoma da mama (MDA-MB-231)**

A Figura 12 apresenta as curvas concentração-resposta para a linhagem de câncer de mama hormônio independente. Em vermelho está destacada a curva da doxorubicina isolada e em preto a combinação doxorubicina e derivado de dipeptidil nitrila.

Figura 12. Curvas concentração-resposta da combinação da doxorrubicina com os novos compostos em concentração fixa (10 μ M) para a linhagem MDA-MB-231.





Fonte: Autoria própria.

De uma forma geral, a Figura 12 demonstra que há uma sensibilização das células para a doxorubicina quando as dipeptidil nitrilas e derivados são usados. Estes dados são explorados de forma quantitativa na Tabela 4, que descreve a variação do valor de IC₅₀ e os parâmetros estatísticos.

Tabela 4. Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com o valor de IC₅₀, seu erro padrão, o ajuste do modelo (R²/Sy.x) e a sinergia (Variação) para as substâncias de referência (doxorubicina) em monoterapia ou combinada com os compostos a 10 µM na linhagem MDA-MB-231.

Ensaio	IC ₅₀ ± SE (µM)	R ² /Sy.x	Variação do IC ₅₀
Doxorrubicina	1,11 ± 0,08	0,95/7,11	-
Doxo + Neq0780.1	0,142 ± 0,03	0,92/8,07	7,8
Doxo + Neq1002	0,152 ± 0,05	0,92/8,58	7,3
Doxo + Neq1003	0,221 ± 0,04	0,95/6,24	5,0
Doxo + Neq1004	0,359 ± 0,06	0,96/6,66	3,1
Doxo + Neq1005	0,448 ± 0,05	0,98/4,93	2,5
Doxo + Neq1006	0,261 ± 0,05	0,96/5,58	4,3
Doxo + Neq1007	0,361 ± 0,07	0,95/7,40	3,1
Doxo + Neq1008	0,0726 ± 0,01	0,94/8,38	15
Doxo + Neq1015	0,350 ± 0,04	0,95/7,91	3,2
Doxo + Neq1016	0,250 ± 0,03	0,96/6,26	4,4
Doxo + Neq1017	0,566 ± 0,10	0,93/8,53	2,0
Doxo + Neq1020	0,663 ± 0,09	0,91/9,25	1,7
Doxo + Neq1021	0,404 ± 0,07	0,94/8,41	2,7
Doxo + Neq1022	0,542 ± 0,05	0,96/6,27	2,0
Doxo + Neq1023	0,564 ± 0,06	0,96/6,12	2,0

Doxo: doxorubicina. SE: erro padrão. Variação do IC₅₀: Razão entre os valores de IC₅₀ Doxorubicina/IC₅₀ Doxorubicina+Neq (acima de 1 = efeito sinérgico; abaixo de 1 = efeito antagonista). Fonte: Autoria própria.

Anteriormente, o composto Neq0780 havia sido avaliado na combinação com doxorubicina nas mesmas condições descritas neste estudo. O IC₅₀ da doxorubicina isolada foi de 1,97 ± 0,48 µM e, após a combinação, o valor caiu para 0,06 ± 0,01 µM, ou seja, para se obter o mesmo efeito, a quantidade de composto necessária do agente citotóxico para levar a morte de 50% das células, foi reduzido 33 vezes. Nesse estudo, a doxorubicina isolada apresentou IC₅₀ = 1,11 ± 0,08 µM e em combinação com Neq0780 foi de 0,142 ± 0,03 µM, com redução de 7,8 vezes e a curva da combinação se deslocando à esquerda da curva do composto isolado, representando significativo efeito sinérgico de acordo com o método de Bliss.

Além da substância da série, todas as demais amostras apresentaram sinergia em combinação com o agente citotóxico. As substâncias mais promissoras foram Neq1008, Neq1002 e Neq1003 (Tabela 4). As estruturas destes compostos não são mostradas devido à questão da propriedade intelectual.

Estudos complementares que possibilitem identificar de que forma a combinação está sensibilizando e matando as células são de suma importância, como análise das catepsinas que estão sendo inibidas pelo agente não citotóxico derivado de dipeptidil nitrila, uso de marcadores de catepsina para observamos a localização das moléculas na célula, bem como testes para compreendermos os mecanismos de morte celular e análises de ciclo celular para ser possível traçar o melhor o perfil da terapia combinada

Estudos da literatura corroboram a combinação de doxorrubicina com outros agentes que atuam por meio de outros mecanismos de ação, como abordado neste presente trabalho. Apesar da doxorrubicina ter sua toxidez atribuída a sua inibição da topoisomerase II, esse agente também pode estar comprometido com outras vias de sinalização quando combinada, como descrito por (ZHONG et al., 2017), no qual a terapia combinada com o furonodieno foi capaz de bloquear a invasão e migração de células de câncer de mama MDA-MB-231 *in vitro*, regulando negativamente a expressão da integrina αV e β -catenina e inibindo a fosforilação da paxilina, Src, quinase de adesão focal (FAK), p85 e AKT. Além disso, os tratamentos combinados também resultaram em uma diminuição na metaloproteinase-9 da matriz (MMP 9). Estudos complementares que possam avaliar a migração celular com a combinação de doxorrubicina e derivado de dipeptidil nitrila podem ser explorada de forma análoga.

No trabalho de (LI et al., 2019), a doxorrubicina foi combinada com tansiona na linhagem hormônio dependente MCF-7, e a tansiona pode aumentar a sensibilidade das células de câncer de mama à doxorrubicina, por meio da inibição da via PTEN/AKT e regulação negativa da expressão de transportadores ABC de efluxo, incluindo P-gp, BCRP e MRP1. Além disso, os estudos *in vivo* mostraram que a tansiona aumentou o efeito quimioterápico da doxorrubicina contra o câncer de mama, reduzindo seus efeitos colaterais tóxicos, incluindo perda de peso, mielossupressão, cardiotoxicidade e nefrotoxicidade. Isto é alentador, especialmente pelo fato de também ser uma linha importante de trabalho na quimioterapia, que envolve a redução dos efeitos colaterais visando uma maior qualidade de vida do(a) paciente.

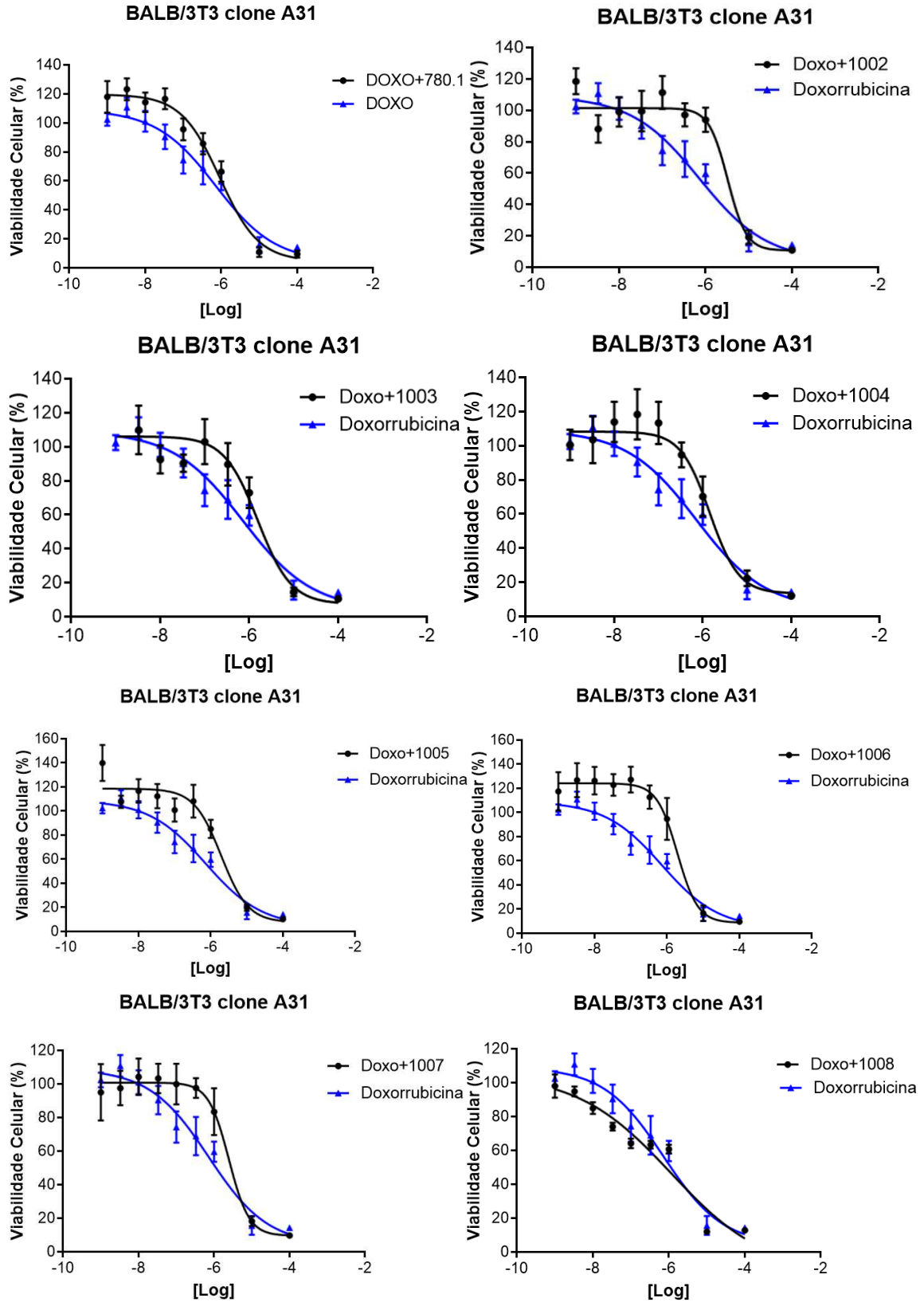
Estudos como de Zhong e Li, os quais exploraram análises de invasão, migração e testes *in vivo* para a doxorrubicina em combinação, justificam o aprofundamento das análises com esse agente para compreensão dos efeitos destes tipos de terapias combinadas, desde inibição de determinadas vias até a morte celular.

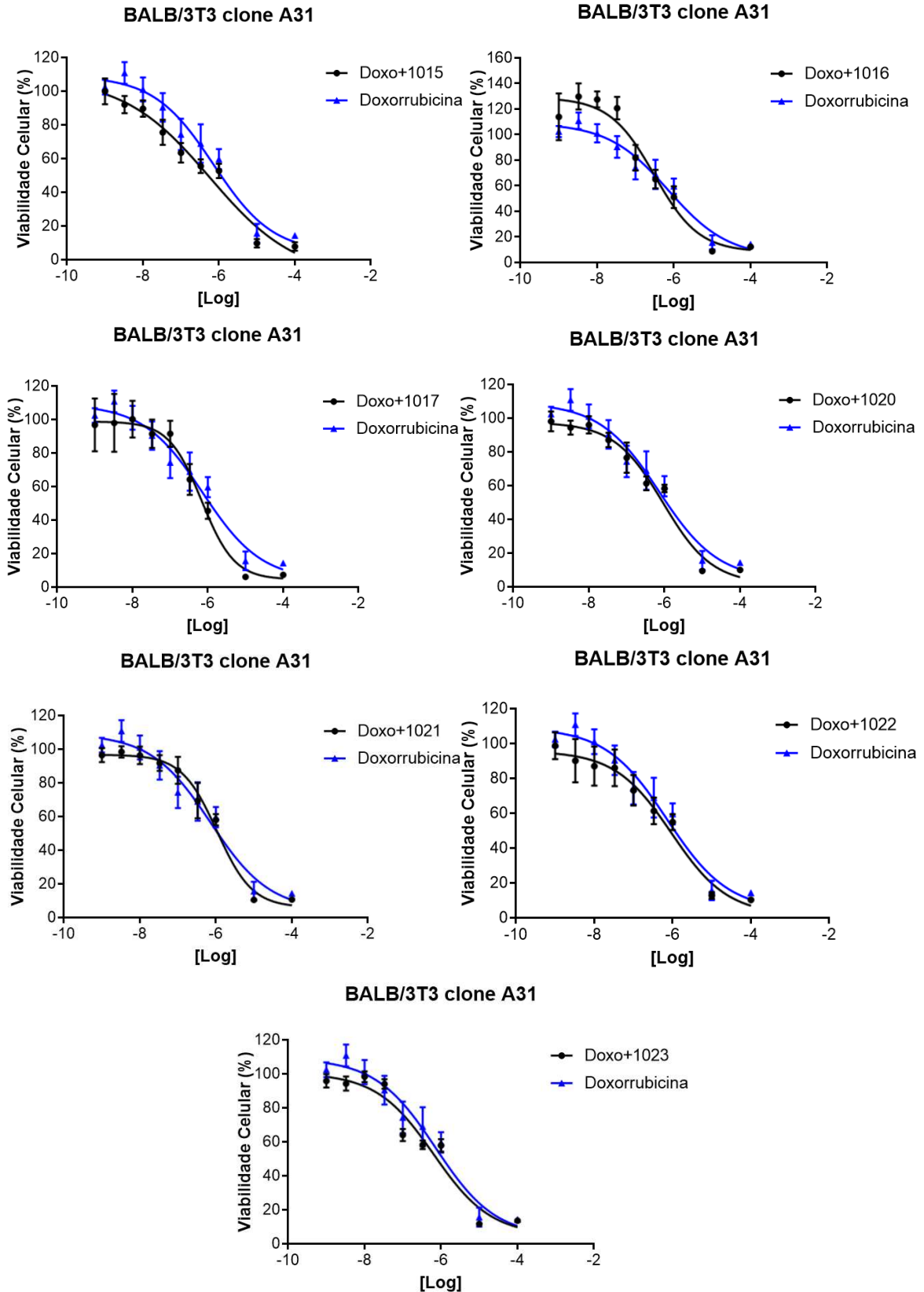
- **Fibroblasto de camundongo (BALB/3T3 clone A31)**

Um estudo comparativo com uma linhagem controle não tumoral de fibroblasto de camundongo foi realizado *in vitro* neste trabalho, que visou analisar se as combinações terapêuticas poderiam levar a uma redução na atividade citotóxica da doxorubicina. Isto pode demonstrar algo que foi discutido na seção anterior quanto a seletividade entre células tumorais e não tumorais.

A Figura 13 apresenta as curvas concentração-resposta para a linhagem controle BALB/3T3 clone A31 (fibroblasto de camundongo). Em azul está destacada a curva da doxorubicina isolada e em preto a combinação com os derivados de dipeptidil nitrilas. De uma forma geral, observa-se que há um deslocamento para a direita das curvas com as combinações em relação ao fármaco isolado, demonstrando que há uma redução do efeito citotóxico na linhagem não tumoral.

Figura 13. Curvas concentração-resposta da combinação da doxorrubicina com os novos compostos em concentração fixa (10 μ M) para a linhagem controle BALB/3T3 clone A31.





Fonte: Autoria própria.

Os dados quantitativos são mostrados na Tabela 5, que descreve a variação do valor de IC₅₀, os parâmetros estatísticos e a variação na potência entre o fármaco isolado e combinado

com os novos compostos.

Tabela 5. Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com o valor de IC₅₀, seu erro padrão, o ajuste do modelo (R²/Sy.x) e a sinergia (Variação) para as substâncias de referência (doxorubicina) em monoterapia ou combinada com os compostos a 10 µM na linhagem controle (BALB/3T3 clone A31)

Ensaio	IC ₅₀ ± SE (µM)	R ² /Sy.x	Variação do IC ₅₀
Doxorrubicina	0,720 ± 0,19	0,93/8,95	-
Doxo + Neq780.1	0,923 ± 0,03	0,97/8,01	0,78
Doxo + Neq1002	3,23 ± 0,66	0,95/8,96	0,22
Doxo + Neq1003	1,55 ± 0,45	0,90/14,3	0,46
Doxo + Neq1004	1,43 ± 0,26	0,93/11,2	0,50
Doxo + Neq1005	1,94 ± 0,39	0,92/12,8	0,37
Doxo + Neq1006	1,93 ± 0,33	0,95/11,1	0,37
Doxo + Neq1007	2,46 ± 0,52	0,93/9,85	0,29
Doxo + Neq1008	1,15 ± 0,83	0,93/7,96	0,63
Doxo + Neq1015	1,94 ± 0,39	0,92/12,8	0,37
Doxo + Neq1016	0,308 ± 0,06	0,92/12,1	2,3
Doxo + Neq1017	0,682 ± 0,11	0,91/10,1	1,1
Doxo + Neq1020	0,929 ± 0,16	0,95/6,94	0,78
Doxo + Neq1021	1,069 ± 0,12	0,96/6,15	0,67
Doxo + Neq1022	0,934 ± 0,26	0,92/8,92	0,77
Doxo + Neq1023	0,642 ± 0,16	0,93/8,22	1,1

Doxo: doxorubicina. SE: erro padrão. Variação do IC₅₀: Razão entre os valores de IC₅₀ Doxorubicina/ IC₅₀ Doxorubicina+Neq (acima de 1 = efeito sinérgico; abaixo de 1 = efeito antagonista). Fonte: Autoria própria.

Na linhagem controle, o perfil de resposta celular foi oposto ao da linhagem de câncer de mama, pois doze das quinze amostras testadas apresentaram resultados antagonistas, ou seja, a combinação de compostos diminuiu a potência da doxorubicina (Tabela 5). Este resultado é muito satisfatório, uma vez que o intuito central da descoberta de fármacos é o desenvolvimento de uma substância que seja seletiva, capaz de tratar a doença, minimizando os danos às células saudáveis.

A melhor resposta da terapia na linhagem controle foi para os compostos Neq1002 e

Neq1007 (Figura 13 e Tabela 5). Somente uma combinação com Neq1016 houve aumento da citotoxicidade, enquanto ela foi inalterada para as combinações com os compostos Neq1017 e Neq1023.

Relacionando esses resultados com a linhagem de câncer de mama, percebe-se que houve seletividade para todos os modelos terapêuticos. Assim, a combinação para a linhagem tumoral foi mais potente do que para a linhagem controle, sugerindo menores danos às células saudáveis e maior eficiência na morte das células cancerosas nessas condições.

Esses resultados podem ser explicados devido à alta produção de cisteína proteases pelas células de câncer, uma vez que essas enzimas são essenciais para o seu desenvolvimento (CIANNI et al., 2019). Os novos inibidores, que atuam interagindo com as catepsinas pertencentes ao grupo das cisteína proteases podem estar sensibilizando a célula cancerosa de alguma forma, favorecendo a atividade da doxorubicina que atua na formação de corpos cetônicos, espécies reativas de oxigênio e na inibição da topoisomerase II. Como as células saudáveis apresentam produção em níveis usuais das catepsinas e sua ativação é controlada adequadamente, a importância deste alvo pode ser menor para a atividade celular. Com isto, há resistência a células não tumorais, mantendo a taxa de viabilidade celular próxima à da doxorubicina isolada, ou até mesmo gerando um efeito antagonista à morte celular, como observado na maior parte da série testada (Tabela 5).

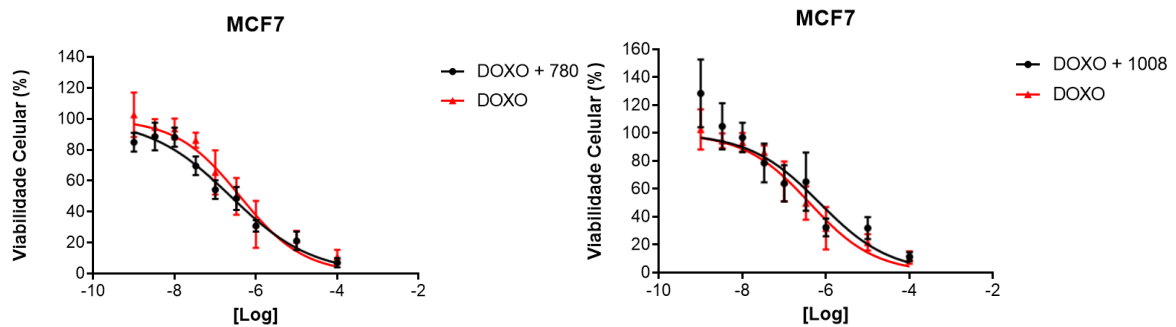
De modo geral, a combinação da doxorubicina com derivados de dipeptidil nitrilas mostrou resultados promissores para a linhagem de câncer de mama em comparação com a linhagem não tumoral. Esse cenário justifica a aplicação da doxorubicina em combinação, uma vez que o composto sozinho apresenta alta citotoxicidade e a literatura descreve efeitos colaterais graves da administração deste agente. A terapia combinada demonstrou aumento no índice de seletividade entre as células analisadas neste projeto, o que demonstra um grande potencial para esta estratégia a ser explorada nos trabalhos subsequentes.

- **Michigan Cancer Foundation-7 (MCF7)**

Além das duas linhagens estudadas, também foi introduzido a atuação destes novos compostos na linhagem de câncer de mama hormônio dependente, MCF7. Para a introdução desta pesquisa nesta linhagem, foram testadas dois dos compostos com maior seletividade para MDA-MB-231 e BALB 3T3 clone A31. Posteriormente, será testado os demais compostos para a MCF7.

A Figura 14 retrata as curvas concentração-resposta para a linhagem tumoral MCF7. Em vermelho, está destacada a curva concentração-resposta da doxorrubicina isolada e em preto a combinação com os derivados de dipeptidil nitrilas. De modo geral, ambas as curvas são bastantes similares, demonstrando que não há uma redução significativa no efeito citotóxico da combinação entre o fármaco de referência com os novos compostos testados para esta linhagem.

Figura 14. Curvas concentração-resposta da combinação da doxorrubicina com os compostos Neq0780.1 e Neq1008 em concentração fixa (10 μ M) para a linhagem tumoral hormônio dependente MCF7.



Fonte: Autoria própria.

Os dados quantitativos para esta linhagem são mostrados na Tabela 6, descrevendo também a variação do valor de IC_{50} , os parâmetros estatísticos e a variação na potência entre o fármaco sozinho e sua combinação com os novos compostos.

Tabela 6. Sumário dos dados das curvas concentração-resposta com o valor de IC_{50} , seu erro padrão, o ajuste do modelo ($R^2/Sy.x$) e a sinergia (Variação) para as substâncias de referência (doxorrubicina) em monoterapia ou combinada com ambos os compostos a 10 μ M na linhagem tumoral hormônio dependente (MCF7).

Linhagem celular	$IC_{50} \pm SE \mu M$	$R^2/Sy.x$	Variação do IC_{50}
Doxorrubicina	$0,187 \pm 0,04 \mu M$	0,91/10,3	-
Doxo+780.1	$0,239 \pm 0,02 \mu M$	0,93/7,37	0,78
Doxo+1008	$0,70 \pm 0,14 \mu M$	0,77/18.14	0,26

Doxo: doxorrubicina. SE: erro padrão. Variação do IC_{50} : Razão entre os valores de IC_{50} Doxorrubicina/ IC_{50} Doxorrubicina+Neq (acima de 1 = efeito sinérgico; abaixo de 1 = efeito antagonista). Fonte: Autoria própria.

Na linhagem tumoral hormônio dependente MCF7, o perfil da resposta celular para ambos compostos, Neq0780.1 e Neq1008, em combinação com a doxorrubicina mostrou baixa seletividade, não potencializando o efeito do fármaco de referência de maneira satisfatória, ao contrário do efeito na linhagem tumoral hormônio não dependente, MDA-MB-231.

Como registrado para as linhagens anteriores, o efeito da combinação dos compostos com o fármaco é sinérgico se a razão entre os valores do IC_{50} da doxorrubicina para com o IC_{50} da combinação estiver acima de 1. Neste caso, não somente ficou abaixo de 1, como mostrado na tabela 5, como para o Neq1008 ficou significativamente abaixo. Não se sabe o mecanismo da resistência para esta linhagem, mas sabemos que tem mais resistência se relacionada à MDA-MB-231, do mesmo modo apontado no trabalho de Carvalho (CARVALHO, 2016).

Relacionando ambas as linhagens tumorais, não houve similaridade de resultados. Entretanto, será avaliado os demais efeitos em combinação para os compostos faltantes para ampliar os resultados e, desta maneira, tornar possível maiores explicações acerca desta relação visto que os resultados obtidos ainda são insuficientes para concluir quaisquer conclusões acerca do trabalho, bem como se a diferença entre os resultados das linhagens tumorais ter relação ou não com hormônios ou catepsinas específicas.

Como mencionado anteriormente, análises que possam identificar as catepsinas envolvidas no processo, bem como o mecanismo de morte celular, devem ser aplicadas neste estudo para a compreensão de todas as etapas envolvidas nesse processo. Se possível, estudos com modelos tridimensionais e *in vivo* também são importantes para evoluir esse estudo.

Portanto, os resultados dos ensaios de análise de Espécie Reativa de Oxigênio e de Western Blot serão apresentados a seguir, sendo estes necessários para o entendimento da relação dos inibidores de cisteína protease com o quimioterápico citotóxico, doxorrubicina. É importante lembrar que dentre as ações da doxorrubicina, há a superexpressão de ROS para estimular o estresse oxidativo e, portanto, tornar o microambiente tumoral tóxico para a célula, resultando em sua morte. Além disso, o ensaio de Western Blot poderá trazer clareza acerca da inibição de catepsinas importantes para a proliferação do câncer de mama e, deste modo, se a combinação desta terapia estimulou a inibição das sínteses destas.

4.4. Análise do ensaio de Espécie Reativa de Oxigênio (ROS).

Espécie Reativa de Oxigênio (ROS) são moléculas quimicamente reativas contendo um átomo de oxigênio. Essas são produzidas naturalmente a partir de processos biológicos das

células, como durante a respiração celular a metabolização de nutrientes. Na respiração aeróbica, por exemplo, é gerado nas mitocôndrias das células eucarióticas energia a partir de um metabolismo oxidativo, resultando em vários compostos produzidos. Essas substâncias geralmente em baixas concentrações, originárias do metabolismo oxidativo, são essenciais para diversos processos subcelulares, tais como transdução de sinais, catalisação enzimática, regulação da expressão gênica, criação de ligações dissulfeto durante a conformação de proteínas no retículo endoplasmático e modulação da atividade da caspase, que é acionada durante o processo apoptótico. Apesar de seu resultado ser em grande parte benéfico ao funcionamento e à metabolização celular, menos de 5% deles podem ser tóxicos para a célula caso haja aumento em sua concentração (SOSA, 2013).

Os ROS podem ser formados a partir de uma redução incompleta do oxigênio. Dentro do grupo destas espécies químicas há, principalmente, ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e radical hidroxila ($\bullet OH$). Estas espécies químicas participam de regulações e funções fisiológicas dos organismos vivos nos mais variáveis metabolismos. Entretanto, sua superprodução leva ao estresse oxidativo, implicando em diversas doenças como o câncer, doenças neurodegenerativas, inflamação, doenças cardiovasculares, entre outros (YANG *et al*, 2019; HAYES *et al*, 2020).

Por isso, um equilíbrio nessas associações deve ser alcançado entre o ROS e os antioxidantes formados. As células apresentam diferentes mecanismos tanto bioquímicos quanto genéticos para manter a homeostase de seu meio. Essa desregulação, como já dito, pode acarretar em fisiopatologias agressivas ao corpo, inclusive o câncer de mama. A rápida multiplicação de células cancerígenas é seguida por uma elevada produção de ROS, porém são ajustadas para prosperar sob estas circunstâncias já que o estresse oxidativo empurra o balanço redox para longe de um estado reduzido. Estas células malignas conseguem isso ampliando sua capacidade antioxidante para maximizar o crescimento celular, ao mesmo tempo que evitam os níveis de ROS que desencadeariam o envelhecimento celular, a morte programada ou a morte induzida por ferro (HAYES *et al*, 2020).

Desta forma, estudos que acarretam no metabolismo e homeostase celular, com alteração na biologia e função mitocondrial das células, como é o caso do ROS, têm se mostrado uma crescente, principalmente se relacionadas à progressão de doenças como o câncer. É sabido da importância do ROS na progressão do tumor, entretanto a tentativa de manipular a diminuição de seu nível com antioxidantes ainda é pouco conhecida (SARMIENTO-SALINAS, 2019).

Neste contexto, foi feito o ensaio para análise de formação de ROS na linhagem tumoral de mama triplo-negativa MDA-MB-231, nas seguintes condições: combinação Neq0780+Doxorrubicina; combinação Neq1002+Doxorrubicina; combinação Neq1008+Doxorrubicina; Doxorrubicina isolada; Controle negativo (apenas meio de cultura e DMSO); e Controle positivo, com a adição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Este ensaio foi sugerido e executado devido à combinação sinérgica ocasionada com o fármaco de referência, Doxorrubicina, com os três Neqs citados.

Como mostrado anteriormente, a doxorrubicina é um fármaco do grupo das antraciclinas antitumoral de amplo uso para tratamento de diferentes cânceres, inclusive diferentes cânceres de mama. Dentre os diferentes efeitos da ação da doxorrubicina está o estresse oxidativo causado pelo desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e os antioxidantes (SONGBO *et al*, 2019). Desta forma, este ensaio foi realizado para avaliar se houve ou não o aumento da produção de ROS na combinação entre os químicos e, podendo assim, estar ou não relacionado com a seletividade da linhagem tumoral triplo-negativa. Para isso, as análises foram realizadas nos tempos de 24h, 48h e 72h e, como parâmetro, foi utilizado a porcentagem do controle negativo (tratamento apenas com meio de cultura e DMSO), e como controle positivo, foi utilizado o peróxido de hidrogênio na concentração de 500 µM.

É importante ressaltar que a Doxorrubicina está a uma concentração isolada que seleciona 50% das células, ou seja, a concentração de IC₅₀ da MDA-MB-231, sendo este equivalente a 1,1 µM, segundo o dado obtido no ensaio de Terapia Combinada apresentado anteriormente e, para os Neqs, a concentração utilizada foi de 10 µM, assim como também estabelecido de acordo com os ensaios anteriores.

Todos os tratamentos, desconsiderando os controles, tiveram como concentração valores que atingissem o IC₅₀ da MDA-MB-231. Isso significa que a viabilidade celular foi reduzida à metade se comparado aos controles. Ainda, no gráfico apresentado a seguir, a linha tracejada em vermelho está remetendo ao 100% de viabilidade do controle negativo. Todos os valores foram demonstrados na tabela 7.

Tabela 7. Valores obtidos nos diferentes tratamentos nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h em porcentagem.

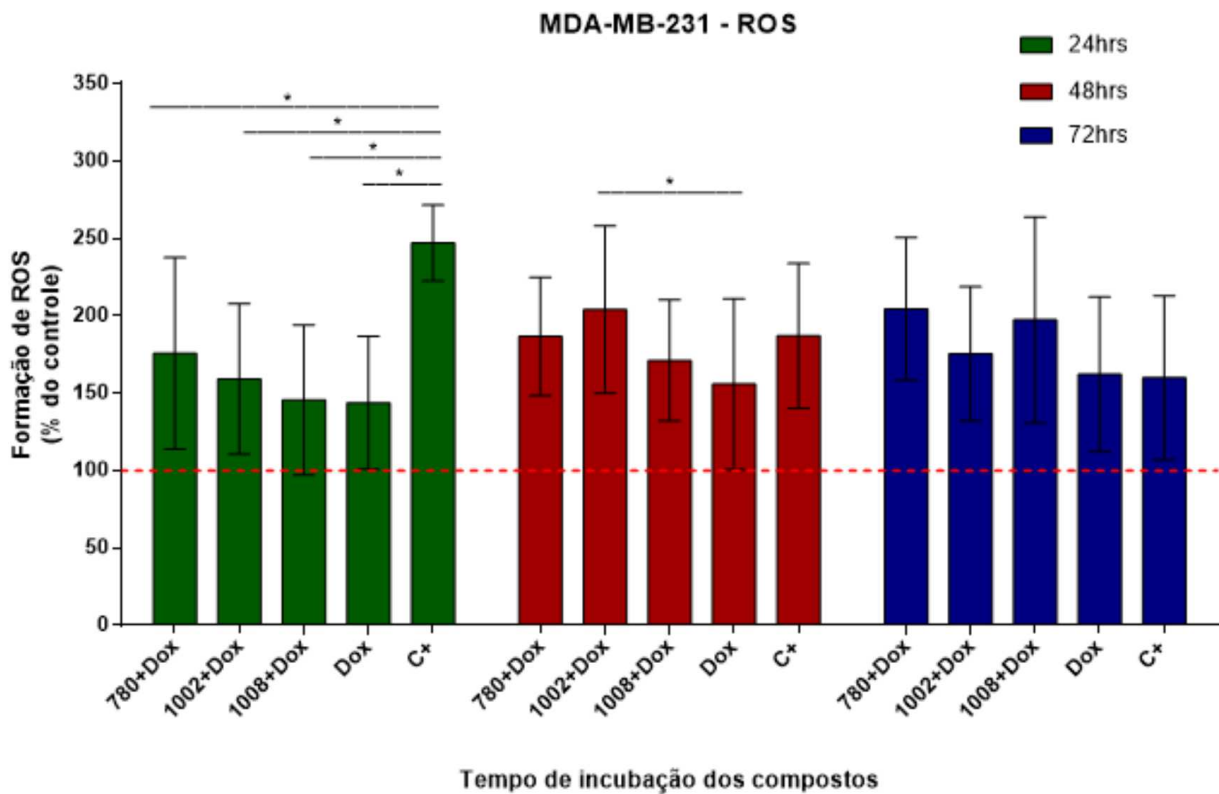
%	Neq780+Dox	Neq1002+Dox	Neq1008+Dox	DOX	C+
24h	175,87	159,35	145,77	143,94	247,21
48h	186,83	204,16	171,30	155,98	187,19
72h	204,68	175,67	197,2	162,40	160,15

Fonte: Autoria própria.

No primeiro tempo de 24h, exemplificado na Figura 15 em verde, foi possível observar a produção de ROS nos quatro tratamentos utilizados, abaixo da porcentagem do controle positivo, como já era esperado. O Neq780 foi o que obteve maior produção de ROS, chegando à porcentagem de 175,8%, seguido do Neq1002, Neq1008 e Doxo, respectivamente. Para este primeiro tratamento, é importante observar que o controle positivo foi o que mais manifestou a presença de ROS, isso por conta do tempo de ação dos compostos à célula, se comparado aos demais tempos explicados a seguir.

Para o tempo de 48h foi possível observar uma variação significativa entre os tratamentos em comparação ao primeiro tempo. Agora, não mais o controle positivo foi o principal formador de ROS e sim o Neq1002, com a porcentagem de 204% relacionado ao controle negativo. Isso se deve ao fato do tempo de exposição mais prolongada do composto resultar em um acúmulo de ROS maior nas células. Ou seja, o acúmulo do estresse oxidativo sobre esta linhagem para um mesmo tratamento determinou uma resposta celular diferente devido ao aumento de sua exposição. Esta variação pode ser uma resposta adaptativa da célula ao estresse sofrido pelo composto, permitindo à célula um tempo de resposta ao composto maior e, conseqüentemente, permitindo a ela tempo para desenvolver e revelar mecanismos de defesa ou adaptação, podendo influenciar diretamente os níveis de ROS ao longo do tempo (WANG *et al*, 2015). Isso ainda é reforçado no próximo tempo, de 72h. Ainda mais ROS foram sintetizados, principalmente se relacionado ao controle positivo.

Figura 15. Gráficos de comparação entre os tempos de 24h (verde), 48h (vermelho) e 72h (azul) para os diferentes tratamentos propostos com exemplificação das análises estatísticas realizadas.



Fonte: Autoria própria.

Além disso, trabalhos como o de Wang e colaboradores (2015) reforçam a ação da doxorrubicina na síntese de ROS e, principalmente, com maiores tempos de exposição. Ainda, diferentes trabalhos mostram que uma das principais vias apoptóticas da doxorrubicina está relacionada diretamente à geração excessiva de ROS intracelular (CHEUNG *et al*, 2015; MIN *et al*, 2015; SHOKOOHINIA *et al*, 2014; ZHAO *et al*, 2010). Em condições normais, o ROS é sintetizado pela mitocôndria durante o processo de respiração mitocondrial quando elétrons desemparelhados escapam da cadeia de transporte de elétrons e reagem ao oxigênio molecular. Se não diminuído com ação de antioxidantes, há o estresse oxidativo do meio. Portanto, o maior tempo de exposição da célula ao químico de referência, doxorrubicina, neste ensaio, resultou em uma maior produção de ROS, consequentemente.

A terapia combinada entre os Neqs com a doxorrubicina apresentou maior formação de ROS em comparação à doxorrubicina isolada, reforçando a sinergia da combinação. Este resultado pode nos exemplificar alguns fatores. Primeiramente, ao estresse oxidativo sinérgico, visto que tanto inibidores de cisteíno proteases quanto a própria doxorrubicina participam na

sintetização de ROS. As cisteíno proteases são enzimas com importante ação de equilíbrio redox, ou seja, equilíbrio entre a quantidade de ROS e antioxidantes do meio. Deste modo, ao relacionar a doxorrubicina com inibidores destas proteases, há um aumento no estresse oxidativo pela sinergia entre ambos (CIRCU e AW, 2010). Ainda, a inibição de cisteíno proteases pode acarretar em danos nas mitocôndrias, visto que aquelas auxiliam na manutenção e funcionalidade destas (YUSTE *et al*, 2005). Tanto a ação da doxorrubicina quanto de inibidores das proteases podem acarretar em danos nas mitocôndrias das células cancerígenas e, por se tratar de uma organela com responsabilidade na formação de ROS devido às enzimas presentes na cadeia de transporte de elétrons, o resultado final do tratamento com ambos os químicos acarreta em maior produção de ROS do que se comparado ao tratamento exclusivamente com doxorrubicina (HERNANSANZ-AGUSTÍN e ENRÍQUEZ, 2021).

Por fim, alguns trabalhos ainda relacionam diretamente a produção excessiva de ROS à morte celular induzida, ou seja, a apoptose. Níveis excessivos de ROS causam danos em proteínas, ácidos nucleicos, lipídios, membranas e organelas, podendo levar a ativação de processos de morte celular, como por exemplo a apoptose (REDZA-DUTORDOIR e AVERILL-BATES, 2016). Deste modo, a sinergia obtida pelos tratamentos propostos pode estar relacionada ao tipo de morte celular e este por sua vez diretamente relacionado aos níveis de ROS aumentado com a combinação dos químicos.

Foi possível observar uma alta variação entre os tratamentos e os tempos de cada um em relação à formação de ROS. É entendido que o dano celular causado pela doxorrubicina foi progressivo e necessitou de mais tempo para sua manifestação em estresse oxidativo e, além disso, a combinação da doxorrubicina com os Neqs foram mais expressivos na produção de ROS se comparado ao tratamento do fármaco isolado.

4.5 Análise do ensaio de Western Blot.

O método de Western Blot consiste em uma técnica utilizada frequentemente para estudos relacionados à biologia molecular e celular para a identificação e quantificação de proteínas específicas em amostras previamente estabelecidas. Este tipo de metodologia permite, portanto, a compreensão da ação de um determinado tratamento em uma linhagem celular de interesse. No caso, foi utilizado para avaliar o efeito do potencial da ação dos compostos inibidores de cisteíno protease, os Neqs, desenvolvidos e sintetizados pelo grupo de pesquisa NEQUIMED, na linhagem tumoral de mama triplo-negativa, MDA-MB-231.

Como exemplificado anteriormente, o Western Blot é realizado em diversas etapas fundamentais. Após a semeadura da linhagem em placas de 96 poços, foi realizado o tratamento em dois tempos distintos, 48h de ação dos compostos na célula e 72h desta mesma ação. Os tratamentos foram realizados para os compostos Neq0780, Neq1002 e Neq1008, além de utilizar o controle negativo, ou seja, células sem adição de compostos durante seu crescimento nas placas, utilizando apenas meio de cultura. Após a retirada destas células nos tempos e tratamentos de interesse da placa, foi realizado sucessivas centrifugações para retirar todo o sobrenadante e, permitir assim, o manuseio apenas do precipitado celular formado. A partir deste precipitado, houve a separação das proteínas das células presentes nas amostras. Estas proteínas foram separadas posteriormente por eletroforese em gel, permitindo assim a formação de bandas específicas e distintas entre si, sendo diferenciadas com base no tamanho e na carga das proteínas presentes. Após, estas proteínas são transferidas do gel utilizado previamente para uma membrana de PVDF e, por fim, é feita a leitura.

Todo este processo só é possível graças a anticorpos específicos que se ligam às proteínas alvos, ou seja, anticorpos direcionados à catepsinas que, por meio de incubação de um determinado período, identificam as proteínas de interesse tornando assim praticável a identificação da catepsina estudada. Estes anticorpos são identificados através de reações químicas que geram sinais fluorescentes, formando bandas na membrana, indicando a presença de proteínas nas amostras.

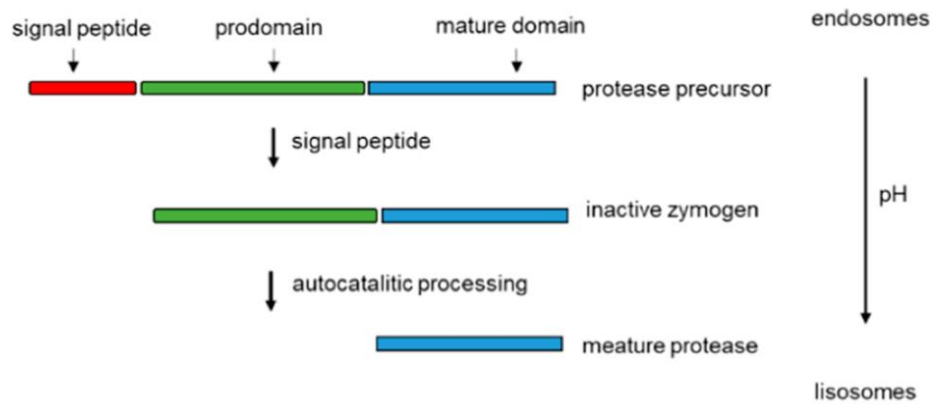
Desta forma, o Western Blot se faz importante para estudos com relação ao câncer devido sua especificidade na: Detecção de proteínas, incluindo as catepsinas indispensáveis para o desenvolvimento e proliferação do câncer de mama, como enfatizado na introdução, tais como catepsinas B, L e S; Quantificação das mesmas, necessário para entender se há ou não alguma resposta fisiológica do câncer ao tratamento de acordo com a quantidade de proteínas expressas antes e depois da utilização dos químicos; Atestar a eficiência de resultados obtidos por outras metodologias, visto que o Western Blot é um método confiável e amplamente utilizado; Entender quais alvos terapêuticos podem ser utilizados nos mais diversos tratamentos, contribuindo para tratamentos mais específicos e eficazes para os mais variados cânceres, inclusive o de mama.

Como entendido, o presente estudo averigua a ação de compostos sintetizados pelo grupo de pesquisa NEQUIMED com potencial efeito de inibição da expressão de catepsinas em diferentes linhagens tumorais. Dentre esses, os Neq780, Neq1002 e Neq1008 apresentaram alto teor sinérgico quando combinado com o fármaco de referência amplamente utilizado para tratamento de câncer de mama, Doxorubicina. Para entender, por fim, quais mecanismos

levaram esta sinergia nas diferentes combinações, algumas metodologias foram experimentadas até agora. Os inibidores de cisteíno protease são compostos químicos que possuem potencial eficiência no bloqueio e redução da atividade destas enzimas, sendo elas necessárias para diferentes mecanismos no microambiente tumoral como a metástase. Desta forma, a utilização do ensaio de Western Blot foi estrategicamente aplicada para entender se a sinergia proposta na combinação dos químicos Doxorubicina+Neqs se deu por ação direta na interferência da síntese destas catepsinas na linhagem trabalhada, MDA-MB-231.

Além disso, é importante ressaltar sobre como a catepsina está expressa, visto que para ensaios como o de Western Blot há diferentes bandas formadas, de acordo com seu peso molecular. A presença de múltiplas bandas de uma mesma catepsina representados no western blot se dá por meio de diferentes tamanhos, ou seja, pesos moleculares. Uma mesma proteína pode ser expressa em diferentes pesos moleculares. Isso ocorre devido à diferentes fatores como por exemplo modificações pós traducionais, ou seja, adição ou remoção de grupos químicos à proteína, alterando sua carga; degradação da proteína em partes, sendo esse referente à fragmentos proteolíticos de tamanhos distintos, resultando em bandas com pesagens diferentes; o processamento da proteína, ou seja, uma mesma proteína pode ser processadas de maneira a atingir formatos funcionais menores e; variações estruturais, ou seja, mudança na forma da proteína devido a interações moleculares ou mudanças no ambiente em que essa se encontra. Cada um destes casos pode resultar na diferença de tamanho de uma mesma proteína, ocasionando em múltiplas bandas observadas no gel de eletroforese no ensaio de western blot. Esta variação entre pesos moleculares e bandas é explicada no trabalho de Rudzinska e colaboradores (2019) e exemplificada na imagem a seguir. Assim, segundo os autores, entender a expressão e a ativação das catepsinas se faz indispensável em estudos que utilizem a compreensão delas. Inicialmente, as catepsinas são sintetizadas como proteínas precursoras contendo um sinal peptídico em sua estrutura. Este sinal é responsável em direcionar as proteínas para diferentes partes da célula, inclusive o lisossomo, onde há a degradação destas proteínas por conta da acidez presente no ambiente. Além disso, tais proteínas como as catepsinas podem conter o pró-domínios com importante função de regulação e proteção durante sua síntese. Ao interagir com o ambiente ácido do lisossomo, a catepsina perde seu prodomínio, convertendo-a assim em sua forma madura e funcional.

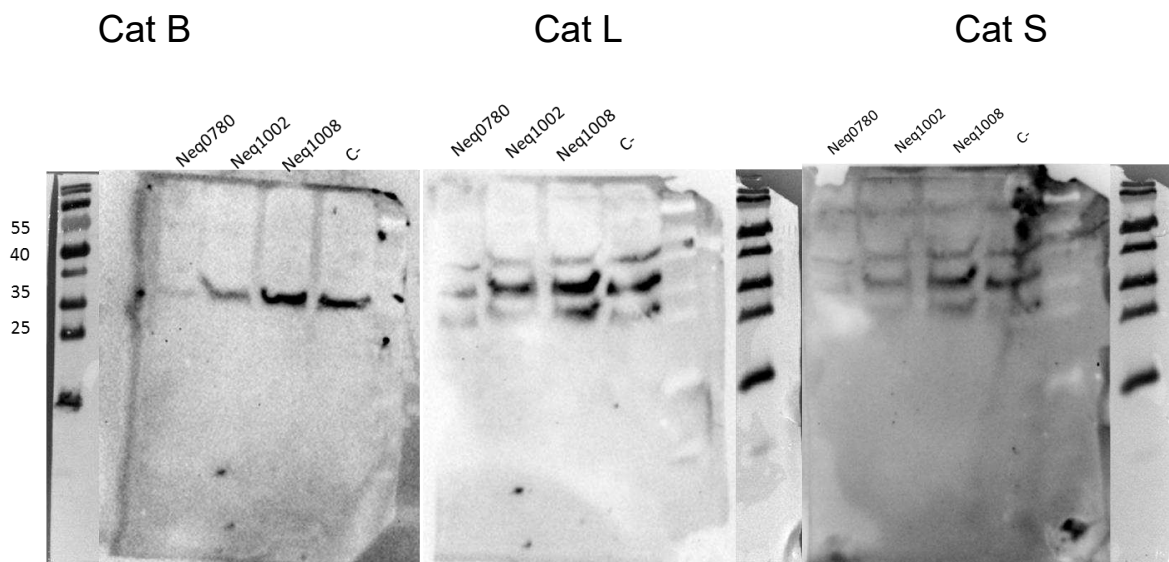
Figura 16. Esquematização da maturação dos sítios catalíticos de cisteína cathepsinas de acordo com a variação do pH.



Fonte: Adaptado de Rudzinska e colaboradores (2019).

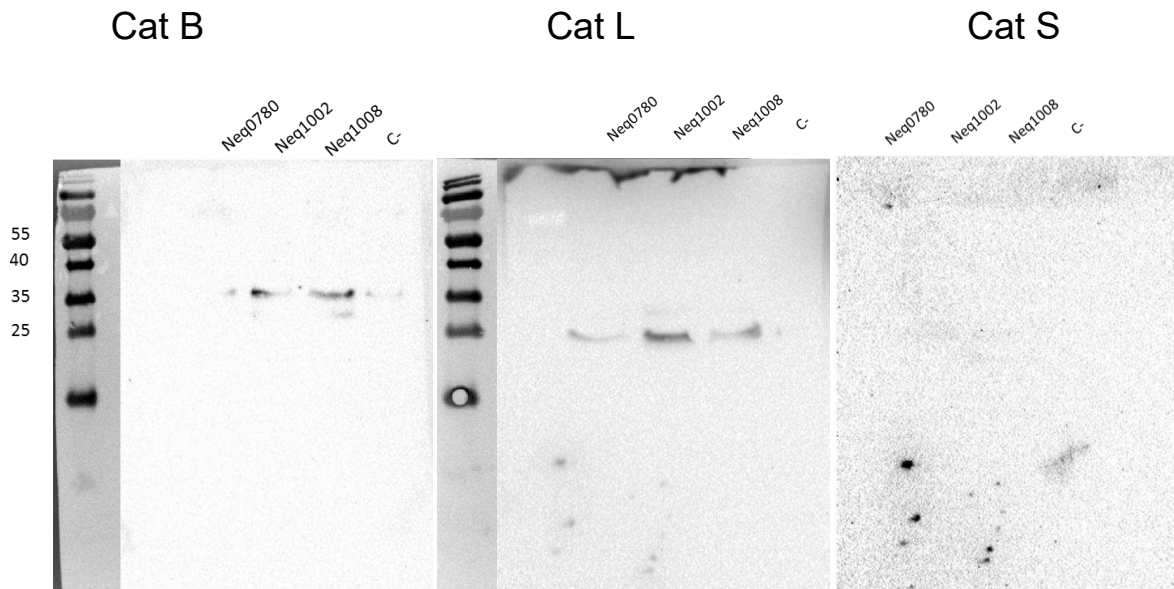
Os resultados obtidos nas leituras das membranas serão mostrados nas Figuras 17, 18 e 19 a seguir.

Figura 17. Resultado da expressão das cathepsinas B, L e S, respectivamente, no tempo de 48h com os tratamentos do Neq0780, Neq1002, Neq1008 e controle negativo para a linhagem tumoral de mama triplo-negativa, MDA-MB-231.



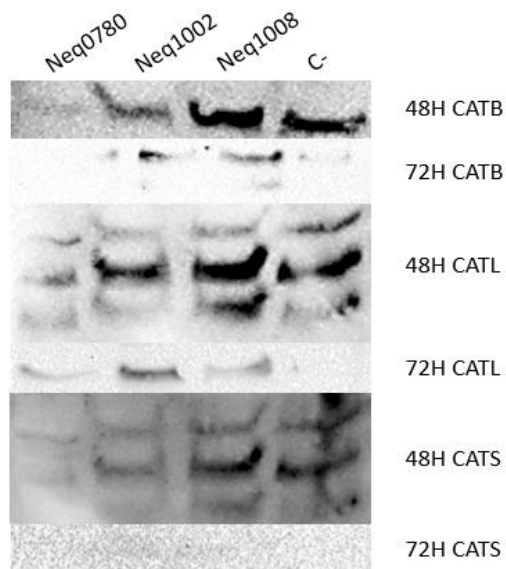
Fonte: Autoria própria.

Figura 18. Resultado da expressão das catepsinas B, L e S, respectivamente, no tempo de 72h com os tratamentos do Neq0780, Neq1002, Neq1008 e controle negativo para a linhagem tumoral de mama triplo-negativa, MDA-MB-231.



Fonte: Autoria própria.

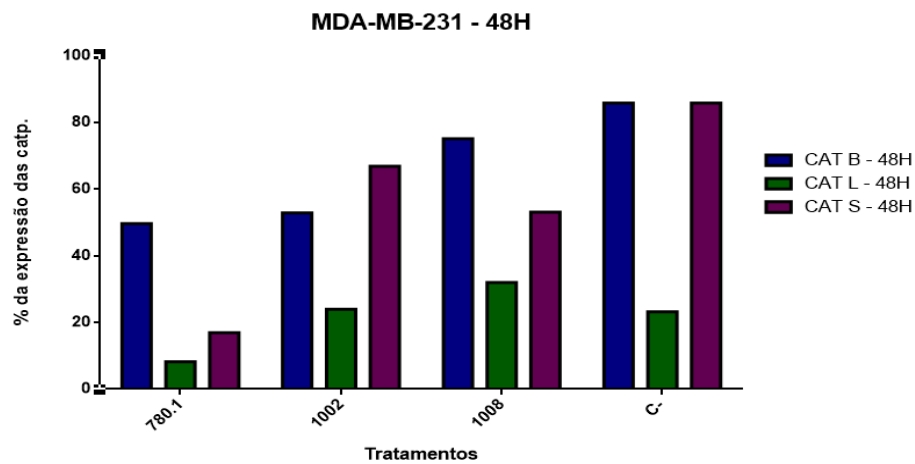
Figura 19. Resultado da expressão das catepsinas B, L e S nos tempos de 48h e 72h com os tratamentos do Neq0780, Neq1002, Neq1008 e controle negativo para a linhagem tumoral de mama triplo-negativa, MDA-MB-231.



Fonte: Autoria própria.

A partir destas leituras, foi possível analisar os resultados da expressão das catepsinas em cada tratamento de acordo com a intensidade da banda de interesse. Esta análise da área de cada banda foi realizada com o auxílio do Software ImageJ e, posterior a isso, tratado e comparado ao controle GAPDH, em planilhas elaboradas no Software Excel. Por fim, para a análise dos gráficos, foi utilizado o Software GraphPad, exemplificado na Figura 20.

Figura 20. Análise do ensaio de Western Blot para os três compostos de interesse, Neq0780, Neq1002 e Neq1008 para expressão das catepsinas B, L e S no tempo de 48h de tratamento na linhagem tumoral de mama triplo-negativa, MDA-MB-231.



Fonte: Autoria própria.

A Tabela 8, representada abaixo, mostra o valor do pKi de cada catepsina em tratamento com cada novo composto testado. O pKi é uma medida de afinidade entre o inibidor por uma enzima, como é o caso das catepsinas estudadas. Quanto maior o valor do pKi, maior é a afinidade do composto do NEQNUIMED estudado pela enzima.

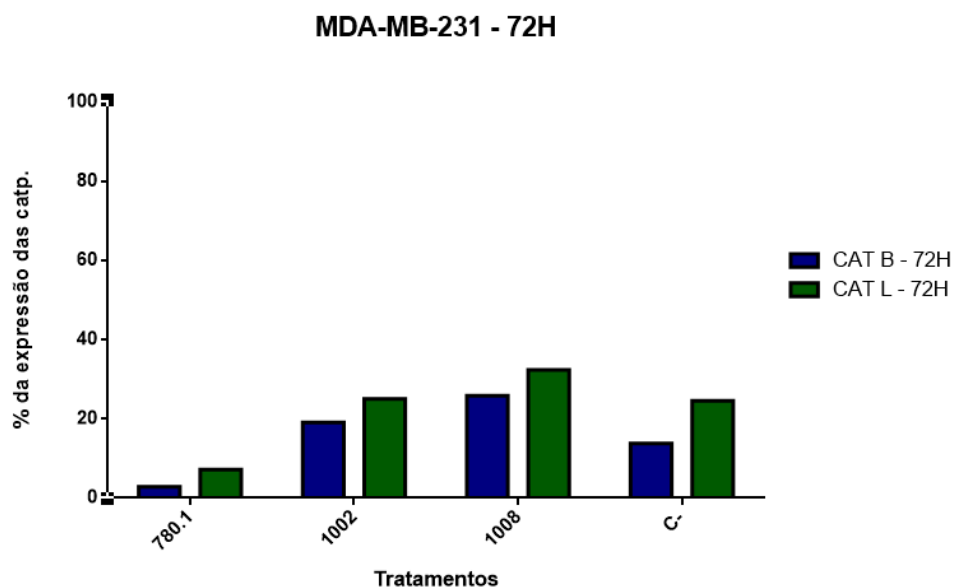
Tabela 8. Representação dos valores do pKi entre os Neq0780, Neq1002 e Neq1008 em relação às catepsinas de interesse, CatB, CatL e CatS.

pKi	NEQ0780	NEQ1002	NEQ1008
CAT B	Não determinado	< 4	< 4
CAT L	6,5	6,3	6,2
CAT S	7,2	5,4	6,2

Fonte: Autoria própria.

O estudo para a catepsina S no tempo de 72h (Figura 21) foi desconsiderado visto que a formação de uma banda significativa, inclusive para o controle negativo, não foi efetivada. Desta forma, a discussão será realizada a partir da ação das catepsinas B, L e S para o tempo de 48h e catepsinas B e L no tempo de 72h, além da ação do controle negativo para ambos os tempos.

Figura 21. Análise do ensaio de Western Blot para os três compostos de interesse, Neq0780, Neq1002 e Neq1008 para expressão das catepsinas B, L e S no tempo de 72h de tratamento na linhagem tumoral de mama triplo-negativa, MDA-MB-231.



Fonte: Autoria própria.

No tratamento de 48h, foi possível avaliar que o Neq780 foi o que teve maior potencial inibitório da expressão das catepsinas. O parâmetro comparativo utilizado neste tratamento foi a linhagem celular sem tratamento, ou seja, com o seu crescimento sendo apenas influenciado pelo meio de cultura específico da linhagem e 0,5% de DMSO, assim como utilizado nos demais ensaios apresentados. É possível observar que, para a catepsina B, a porcentagem da expressão se comparado à porcentagem do GAPDH, é de 49,6%.

Para o tratamento com o Neq1002, com o mesmo tempo de 48h, foi possível observar uma variação de metade da expressão destas em relação ao controle negativo. Sendo assim, também houve inibição da expressão da catepsina B com a utilização do Neq1002. E, por fim,

para o Neq1008, a inibição foi de baixa proporção se relacionado aos demais compostos, variando pouco se comparado à porcentagem do controle.

A interferência obtida em relação ao controle negativo foi observada nos três tratamentos para quase todas as catepsinas. A expressão das proteínas celulares é um processo bastante complexo e que depende de regulações específicas para o bom funcionamento das atividades celulares tanto normais quanto para células patológicas, inclusive tumorais. Os compostos inibidores de cisteíno protease atuam bloqueando a expressão destas proteínas por se ligarem aos seus sítios catalíticos e, assim, impossibilita a célula de sintetizar tais catepsinas. Abaixo, está registrado na Tabela 9 as porcentagens obtidas em cada tratamento em relação ao do controle.

Tabela 9. Porcentagem da expressão das catepsinas B, L e S nos diferentes tratamentos e nos tempos de 48h e 72h após relacionado a razão do controle GAPDH.

%	780 - 48H	1002 - 48H	1008 - 48H	C - 48H	780 - 72H	1002 - 72H	1008 - 72H	C - 72H
CatB	49,60%	52,87 %	75,17%	85,81%	2,89%	19,03%	25,78%	13,76%
CatL	8,2%	24%	32%	23,2%	7,18%	25,03%	32,32%	24,57%
CatS	16,9%	66,9%	53,1%	85,8%	-	-	-	-

Fonte: Autoria própria.

A catepsina B, é uma enzima pertencente da família das cisteíno proteases lisossômicas e é indispensável para a proteólise intracelular, inclusive de componentes da matriz extracelular. Ela é entendida como essencial ao tumor para a ativação da cascata proteolítica na quebra da matriz (CIANNI *et al*, 2019). Desta forma, ao utilizar inibidores para tal catepsina, a ação da célula tumoral é atingida. Para o mesmo tempo de 48h, no controle negativo houve uma expressão desta mesma catepsina de mais de três vezes, se comparado ao tratamento com o Neq0780, reforçando que, de algum modo, houve a inibição da expressão desta proteína. Para o câncer de mama, a inibição da catepsina B pode resultar em processos como a supressão da invasão e metástase, principalmente se evidenciado que a linhagem tumoral utilizada, MDA-MB-231, é altamente metastática e invasiva, retardando assim a progressão tumoral. Ainda, por estar diretamente relacionada à degradação da matriz extracelular, favorecendo assim o microambiente para o tumor, com a inibição da expressão da catepsina B há também a inibição desta degradação, afetando toda a arquitetura tumoral, dificultando ainda mais a progressão do

tumor. Por fim, sem a expressão destas catepsinas, as células tumorais podem ser influenciadas pelo processo de apoptose, já que esta também está relacionada à via de morte celular (RUAN *et al*, 2015). Assim, a catepsina B pode ser entendida como um importante marcador e alvo terapêutico para pesquisas em tratamentos de doenças como o câncer de mama, principalmente se relacionar potenciais inibidores destas proteínas a demais tratamentos já estabelecidos, como em casos de terapias combinadas.

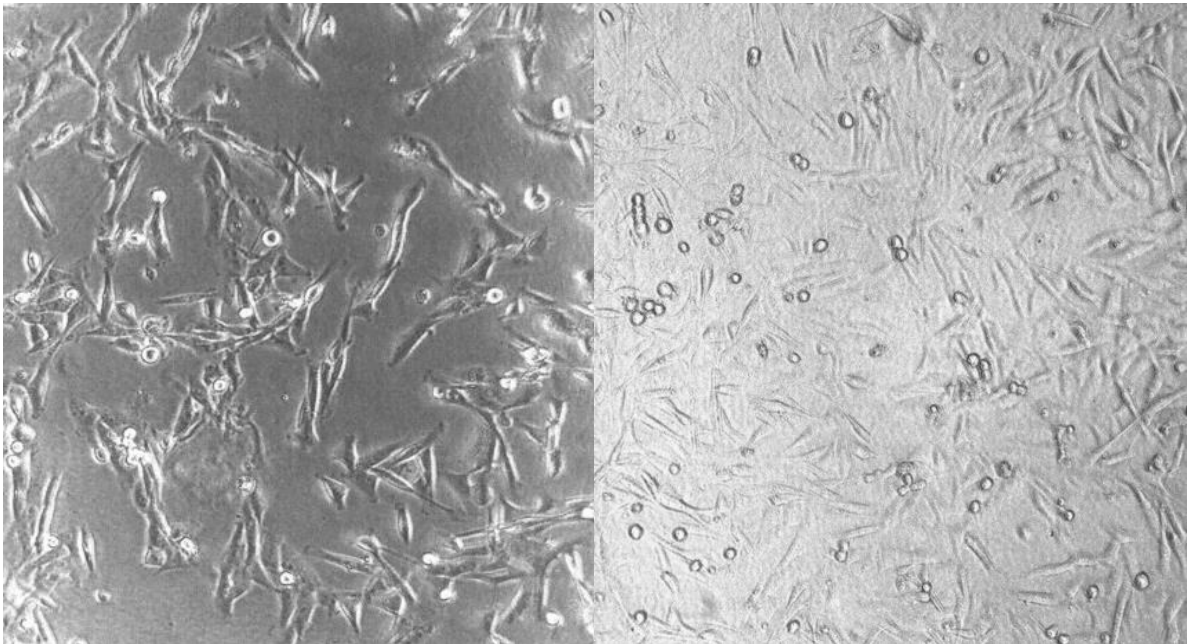
Para além, no tempo de 72 h de ação deste mesmo composto (Neq0780) houve ainda mais interferência na expressão da catepsina B, reforçando a importância de explorar diferentes tempos de exposição aos agentes de interesse para pesquisas relacionadas a quimioterapias. Entretanto, para os Neq1002 e Neq1008, a expressão desta catepsina aumentou ao mesmo tempo em que o controle negativo quase não expressou ação da catepsina B. A variação pode ter ocorrido devido a alguns fatores, inclusive por erro no manuseio durante a execução do ensaio. Foram células tratadas em placas diferentes e em tempos diferentes, aumentando a chance de variações experimentais ao longo dos passos necessários para completar o ensaio. É possível observar na Figura 18 a retenção de algumas proteínas no começo do gel, indicando provavelmente algum erro na transferência entre géis durante o tempo de corrida de eletroforese. Erro durante a execução do ensaio pode ser considerado também devido ao declínio significativo da expressão das catepsinas nos controles. Porém, ainda, é importante ressaltar que o tempo de 72h faz com que as células sem tratamento cresçam mais do que o ambiente comporta, potencializando efeitos de estresse a elas. Sua lotação pode ser vista na imagem comparativa abaixo.

Entretanto, devido à sua alta complexidade, as catepsinas possuem mecanismos de compensação caso alguma dentre o microambiente tumoral sofra alguma inibição ou inativação. Estudos como o de Olson e Joyce (2015) registraram, em modelos de camundongos como MMTV-PyMT e RIP1-Tag2, exemplos de compensação funcional entre catepsinas. A remoção da catepsina B em camundongos MMTV-PyMT levou a um aumento da expressão da catepsina Z nas células cancerígenas, possivelmente para mascarar deficiências da catepsina B. E, além disso, a junção de ambas catepsinas resultou em reduções significativas no crescimento tumoral primário e metástases pulmonares. Assim, a compensação de catepsinas pela perda ou inibição de outras pode ser considerada, como forma de busca do equilíbrio proteolítico e homeostase celular.

Portanto, entre tratamentos de 48 h, o Neq0780 foi o principal composto inibidor para todas as catepsinas, enquanto o Neq1002 e o Neq1008, mesmo registrando percentual abaixo do controle negativo, mostraram efeito inibitório inferior ao Neq0780. Para o tempo de 72h foi

possível observar um efeito inverso, estimulando a síntese das catepsinas B e L para os tratamentos com Neq1002 e Neq1008 acima do controle, enquanto a catepsina S foi pouco expressa em todos os tratamentos, sendo desconsiderada para discussão, podendo indicar potencial efeito inibitório ou erro amostral se considerado sua baixa expressão também para o controle negativo. Assim, entende-se que as cisteíno proteases são indispensáveis para a homeostase do microambiente tumoral da linhagem MDA-MB-231, envolvidas em muitos processos de progressão do câncer, principalmente devido seus potenciais efeitos metastáticos e de degradação da matriz extracelular. A atividade destas proteases é regulada por interações e comunicações, inclusive entre as próprias catepsinas. Assim, estudos do papel destas proteases e de seus inibidores na progressão do câncer de mama são importantes alvos terapêuticos para a busca de novos tratamentos eficazes contra o câncer e sua proliferação (EATEMADI *et al*, 2017).

Figura 22. Linhagem tumoral MDA-MB-231 apenas com meio de cultura nos tempos de 48h (esquerda) e 72h (direita) registrando o crescimento celular ao longo do tempo, de modo que sobrecarregue o ambiente da cultura devido ao tempo de incubação prolongado.



Ambas as imagens foram registradas do mesmo poço de uma placa de 96 poços transparente, contendo a linhagem celular MDA-MB-231 submersa apenas com meio de cultura e 0,5% de DMSO. Fonte: Autoria própria.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

Neste trabalho, foi realizada a triagem das quinze novas substâncias derivadas do composto Neq0780 em três linhagens celulares, sendo duas de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e uma linhagem não tumoral (BALB/3T3 clone A31), sendo inédita a identificação do perfil citotóxico do Neq0780 na linhagem MCF-7. Os resultados corroboraram a não toxicidade dos inibidores de cisteína protease, os quais já vêm sendo explorados pelo grupo de pesquisa em outros trabalhos.

O ensaio de fechamento da risca (*Wound Healing*) pôde ser realizado para a linhagem de adenocarcinoma da mama (MDA-MB-231), mostrando atividade antimigratória dos novos inibidores. Aplicação da terapia combinada foi uma abordagem bem-sucedida, e revelou sinergismo para todas as amostras testadas para a linhagem celular MDA-MB-231, com destaque para o composto Neq1008, com deslocamento acentuado da curva para a esquerda indicando elevada sinergia, com redução do IC₅₀ em 15 vezes, além de reforçar o potencial sinergismo com o Neq0780, previamente testado pela Dra. Talita Alvarenga Valdes, e também pelo Neq1002. Para a linhagem controle, os resultados também foram satisfatórios, uma vez que treze das quinze amostras foram antagonistas na combinação com o agente citotóxico, destacando possíveis reduções de efeitos colaterais nessas condições. Além disso, é importante destacar que todas as combinações foram seletivas, com valores de IC₅₀ mais baixos para o controle do que para a linhagem tumoral, representando maior potência nas células cancerosas. Além disso, os resultados obtidos para a linhagem tumoral MCF7, mostraram pouca sinergia entre os fármacos, resultando em baixa seletividade para ambos os compostos.

No ensaio de ROS (Espécie Reativa de Oxigênio), realizado na linhagem tumoral triplo-negativa MDA-MB-231, foi possível avaliar que, com tratamento da combinação dos Neq0780+Dox, Neq1002+Dox e Neq1008+Dox, a produção de ROS foi mais potencializada se comparada ao tratamento de Dox isolada, podendo este ser responsável pela sinergia encontrada na terapia combinada.

Por fim, no ensaio de Western Blot, foi possível observar a inibição da expressão das catepsinas B, L e S nos tratamentos com o Neq0780, Neq1002 e Neq1008 se comparado à porcentagem do controle negativo (somente meio de cultura e 0,5% de DMSO) para a linhagem tumoral MDA-MB-231, reforçando a ação inibitória da expressão das catepsinas pelos novos compostos sintetizados pelo grupo de pesquisa NEQUIMED, assim como registrado anteriormente por outros membros do grupo.

Como perspectiva, deverá ser realizado o ensaio de fechamento da risca e terapia combinada com todos os novos compostos para a linhagem hormônio dependente MCF-7, além de analisar o tipo de morte celular e a atividade autofágica dos compostos mais promissores. Ainda, a duplicata do ensaio de Western Blot deverá ser realizada para a confirmação dos resultados obtidos, a fim de avaliar se houve ou não erro no manuseio laboratorial, além de novas perspectivas a partir deste ensaio, como avaliar o potencial efeito de inibição da expressão das catepsinas em terapia combinada. Avaliar também o efeito dos compostos sobre as metaloproteases de matriz, já que estas possuem similaridade com o grupo das cisteíno proteases. Por fim, ensaios como PCR para avaliar a expressão gênica, experimentos de zimografia ou uso de kits que avaliam por fluorescência ou absorbância a degradação de substratos específicos pelas metalo ou cisteíno proteases podem ser aplicados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALMEIDA, V. L. D., Leitão, A., Reina, L. D. C. B. Montanari, C. A., Donnici, C. L., & Lopes, M. T. P. 2005. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química nova*, 28(1): 118-129.

ANAMPA, Jesus; MAKOWER, Della; SPARANO, Joseph A. Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview. **BMC medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2015.

AVELAR, L. A., Camilo, C. D., de Albuquerque, S., Fernandes, W. B., Gonzalez, C., Kenny, P. W., et al. 2015. Molecular design, synthesis and trypanocidal activity of dipeptidyl nitriles as cruzain inhibitors. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(7).

BCRJ. Banco de Células do Rio de Janeiro. Quem somos - 2023. Disponível em: <<https://bcrj.org.br/intitucional/quem-somos/bcrj/>>. Acesso em 10/08/2023.

BRAGA, Fabio Henrique Guimarães et al. Estudo comparativo do perfil proteômico de linhagens celulares em diferentes estágios do processo de tumorigênese do câncer de mama. 2021.

CARVALHO, Fernanda Paula de. *Avaliação da expressão gênica de vias pró-apoptóticas em células-tronco tumorais de linhagem de câncer de mama triplo-negativo tratadas com o fitoestrógeno genisteína, doxorubicina e radiação ionizante*. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CHEUNG, K.G.; Cole, L.K.; Xiang, B.; Chen, K.; Ma, X.; Myal, Y.; Hatch, G.M.; Tong, Q.; Dolinsky, V.W. SIRT3 attenuates DOX-induced oxidative stress and improves mitochondrial respiration in H9c2 cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 2015, in press.

CIRCU, Magdalena L.; AW, Tak Yee. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free radical biology and medicine**, v. 48, n. 6, p. 749-762, 2010.

CHOWDHURY, Nusrat et al. Targeted delivery of doxorubicin liposomes for Her-2+ breast cancer treatment. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, p. 1-12, 2020.

CIANNI, L. et al. Can Cysteine Protease Cross-Class Inhibitors Achieve Selectivity? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 23, p. 10497–10525, 12 dez. 2019.

CRUZ, E. C. S. 2015. *Estudo de novas moléculas antitumorais em linhagens de células de câncer de próstata e mama hormônio-dependentes*. Dissertação de doutorado, Universidade de São Paulo.

COMȘA, Șerban; CIMPEAN, Anca Maria; RAICA, Marius. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. **Anticancer research**, v. 35, n. 6, p. 3147-3154, 2015.

DE PAIVA, Christiano José Kühl; CESSÉ, Eduarda Ângela Pessoa. Aspectos relacionados ao atraso no diagnóstico e tratamento do câncer de mama em uma Unidade Hospitalar de Pernambuco. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 61, n. 1, p. 23-30, 2015.

DOS SANTOS, Antônio Celso Siqueira et al. Cardioncologia: anormalidades eletrocardiográficas em pacientes com cardiomiopatia pós-uso de doxorubicina. *Ver SOCERJ*, v. 22, n. 5, p. 281-288, 2009.

EASTMAN, Alan. Improving anticancer drug development begins with cell culture: misinformation perpetrated by the misuse of cytotoxicity assays. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 8854, 2017.

EATEMADI, Ali et al. Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 221-231, 2017.

ELLIS, Lee M.; Fidler, Isaiah J. Angiogenesis and metastasis. *European journal of cancer*, v. 32, n. 14, p. 2451-2460, 1996.

FERREIRA, Rebeca Garcia; DE REZENDE FRANCO, Laura Ferreira. Efeitos colaterais decorrentes do tratamento quimioterápico no câncer de mama: revisão bibliográfica. **Revista da universidade vale do rio verde**, v. 15, n. 2, p. 633-638, 2017.

FLODROVA, Dana et al. A comparative study of protein patterns of human estrogen receptor positive (MCF-7) and negative (MDA-MB-231) breast cancer cell lines. **Gen Physiol Biophys**, v. 35, n. 3, p. 387-92, 2016.

FRANCO, Yesenia L.; VAIDYA, Tanaya R.; AIT-LOUDHIA, Sihem. Anticancer and cardio-protective effects of liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, p. 131-141, 2018.

GUAN, Xiangming. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta pharmaceutica sinica B**, v. 5, n. 5, p. 402-418, 2015.

GUERRA, M. R., Gallo, C. D. M., Mendonça, G. A., & Silva, G. A. 2005. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 51(3): 227-34.

HANAHAN, Douglas; Weinberg, Robert A. The hallmarks of cancer. *cell*, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, Douglas; Weinberg, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HAYES, John D.; DINKOVA-KOSTOVA, Albena T.; TEW, Kenneth D. Oxidative stress in cancer. **Cancer cell**, v. 38, n. 2, p. 167-197, 2020.

HERNANSANZ-AGUSTÍN, Pablo; ENRÍQUEZ, José Antonio. Generation of reactive oxygen species by mitochondria. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 415, 2021.

Holliday, D. L. & Speirs, V. 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast cancer research*, 13(4): 215-221.

INCA. Ministério da Saúde. Estatísticas do câncer. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA, 2022a. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 08/08/2023.

INCA. Ministério da Saúde. Estatísticas do câncer. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA, 2022b. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 08/08/2023.

INCA. Ministério da Saúde. Estimativa 2020 – Câncer de mama. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA, 2022d. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>>. Acesso em: 08/08/2023.

INCA. Ministério da Saúde. Fatores de risco. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA, 2020f. Disponível em:

<<https://www.inca.gov.br/oqueuecancer#:~:text=C%C3%A2ncer%20%C3%A9%20o%20no me%20dado,para%20outras%20regi%C3%B5es%20do%20corpo.>>. Acesso em: 08/08/2023.

INTER-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals, & World Health Organization. 2010. WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009. World Health Organization.

LEITÃO, A.; Montanari, M.L.C.; Montanari, C.A. Desenvolvimento de fármacos. In: Carlos A. Montanari. (Org.). *Química Medicinal: Métodos e fundamentos em planejamento de fármacos*. 1 ed. São Paulo: EDUSP, 2011, p. 94-127.

LEITÃO, Glauber Moreira. Câncer de mama e novos alvos terapêuticos: potenciais biomarcadores. 2018.

LI, K. et al. Combination of tanshinone IIA and doxorubicin possesses synergism and attenuation effects on doxorubicin in the treatment of breast cancer. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 6, p. 1658–1669, jun. 2019.

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

LUZETE, Beatriz Christina. Efeitos do ácido docosaheptaenoico (DHA) e do ácido araquidônico (AA) sobre a morte celular da linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231. 2015.

MAUGHAN, Karen L.; LUTTERBIE, Mark A.; HAM, Peter S. Treatment of breast cancer. **American family physician**, v. 81, n. 11, p. 1339-1346, 2010.

MCDOWELL, Sara H. et al. Leading the invasion: The role of Cathepsin S in the tumour microenvironment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1867, n. 10, p. 118781, 2020.

MIN, K.; Kwon, O.S.; Smuder, A.J.; Wiggs, M.P.; Sollanek, K.J.; Christou, D.D.; Yoo, J.K.; Hwang, M.H.; Szeto, H.H.; Kavazis, A.N.; et al. Increased mitochondrial emission of reactive oxygen species and calpain activation are required for DOX-induced cardiac and skeletal muscle myopathy. *J. Physiol.* 2015, in press.

MOKHTARI, Reza Bayat et al. Combination therapy in combating cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 23, p. 38022, 2017.

MORITZ, Christian P. 40 years Western blotting: A scientific birthday toast. **Journal of proteomics**, v. 212, p. 103575, 2020.

NI, Yanhan et al. Cathepsin B turning bioluminescence “on” for tumor imaging. **Analytical chemistry**, v. 91, n. 23, p. 14834-14837, 2019.

NICOLETTO, Rachel E.; OFNER III, Clyde M. Cytotoxic mechanisms of doxorubicin at clinically relevant concentrations in breast cancer cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 89, n. 3, p. 285-311, 2022.

OLIVEIRA, Ana Luiza Ramos et al. Fatores de risco e prevenção do câncer de mama. **Cadernos da Medicina-UNIFESO**, v. 2, n. 3, 2020.

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

PILCO-FERRETO, Nesstor; CALAF, Gloria M. Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. **International journal of oncology**, v. 49, n. 2, p. 753-762, 2016.

POREBA, Marcin et al. Selective imaging of cathepsin L in breast cancer by fluorescent activity-based probes. **Chemical Science**, v. 9, n. 8, p. 2113-2129, 2018.

QUILLES Junior, José Carlos. 2019. *Planejamento molecular, atividade tripanossomicida e anticancerígena de inibidores covalentes reversíveis de cisteína proteases*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

REDZA-DUTORDOIR, Maureen; AVERILL-BATES, Diana A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977-2992, 2016.

ROCHA, Heloisa Z. et al. Análise comparativa do perfil histopatológico e epidemiológico dos carcinomas ductal e lobular da mama diagnosticados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná entre 2008 e 2013. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 55, p. 69-86, 2019.

RODRIGUES, Fabiana Passos. Efeito de organometálicos de paládio na atividade das cisteína proteases lisossomais catepsinas B e L. *Revista Científica UMC*, v. 3, n. 3, 2018.

RUAN, Hang et al. Targeting cathepsin B for cancer therapies. **Horizons in cancer research**, v. 56, p. 23, 2015.

- RUDZIŃSKA, Magdalena et al. The role of cysteine cathepsins in cancer progression and drug resistance. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 14, p. 3602, 2019.
- RUDZIŃSKA, Magdalena et al. Cysteine cathepsins inhibition affects their expression and human renal cancer cell phenotype. **Cancers**, v. 12, n. 5, p. 1310, 2020.
- SAAD, Everardo D.; FACINA, Gil; GEBRIM, Luiz Henrique. Epirubicina no tratamento do câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 1, p. 47-53, 2007.
- SANTOS, Guilherme Rodrigo Reis Monteiro dos et al. Estudos funcionais de uma possível cisteína protease de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. 2007.
- SARMIENTO-SALINAS, Fabiola Lilí et al. Breast cancer subtypes present a differential production of reactive oxygen species (ROS) and susceptibility to antioxidant treatment. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 480, 2019.
- SHOCKEY, W. Andrew et al. Dynamic model of protease state and inhibitor trafficking to predict protease activity in breast cancer cells. **Cellular and Molecular Bioengineering**, v. 12, p. 275-288, 2019.
- SHOKOOHINIA, Y.; Hosseinzadeh, L.; Moieni-Arya, M.; Mostafaie, A.; Mohammadi-Motlagh, H.R. Osthole attenuates DOX-induced apoptosis in PC12 cells through inhibition of mitochondrial dysfunction and ROS production. *Biomed. Res. Int.* 2014, 2014.
- SIKLOS, Marton; BENAÏSSA, Manel; THATCHER, Gregory RJ. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 6, p. 506-519, 2015.
- SONGBO, Mei et al. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Toxicology letters**, v. 307, p. 41-48, 2019.
- SOSA, Venus et al. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing research reviews**, v. 12, n. 1, p. 376-390, 2013.
- SOUZA, V.O.; GRANDO, J.P.S.; FILHO, J.O.; Tempo decorrido entre o diagnóstico de câncer de mama e o início do tratamento, em pacientes atendidas no Instituto de Câncer de Londrina (ICL). *RBM Rev Bras Med*, 2008.
- SUN, T. A. O. et al. Expression profile of cathepsins indicates the potential of cathepsins B and D as prognostic factors in breast cancer patients. **Oncology letters**, v. 11, n. 1, p. 575-583, 2016.

SWISHER, Luxi Z. et al. Quantitative electrochemical detection of cathepsin B activity in breast cancer cell lysates using carbon nanofiber nanoelectrode arrays toward identification of cancer formation. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 7, p. 1695-1704, 2015.

TELANG, Nitin T. The divergent effects of ovarian steroid hormones in the MCF-7 model for Luminal A breast cancer: Mechanistic leads for therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4800, 2022.

TESTA, Laura; MANO, Max S. Quimioterapia em câncer de mama. **Rev Bras Mast**, v. 20, n. 4, p. 190-8, 2010.

TRAYES, Kathryn P.; COKENAKES, Sarah EH. Breast cancer treatment. **American family physician**, v. 104, n. 2, p. 171-178, 2021.

TRUFELLI, DC; MIRANDA, VC; SANTOS, MBB; FRAILE, NMP; PECORINI, PG; GONZAGA, SFR; et al. Análise do atraso no diagnóstico e tratamento do câncer de mama em um Hospital Público. *Rev Assoc Med Brasileira*, 2008.

TURK, D.; Podobnik, M.; Kuhelj, R.; Dolinar, M.; Turk, V. Crystalstructures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Angstroms resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Lett.*, v. 384, p. 211–214, 1996.

WANG, Zhicheng et al. Mitochondria-derived reactive oxygen species play an important role in Doxorubicin-induced platelet apoptosis. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 5, p. 11087-11100, 2015.

YANG, Bowen; CHEN, Yu; SHI, Jianlin. Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine. **Chemical reviews**, v. 119, n. 8, p. 4881-4985, 2019.

YUSTE, V. J. et al. Cysteine protease inhibition prevents mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF) release. **Cell Death & Differentiation**, v. 12, n. 11, p. 1445-1448, 2005.

ZHAO, Tian et al. Esomeprazole inhibits the lysosomal cysteine protease legumain to prevent cancer metastasis. **Investigational New Drugs**, v. 39, p. 337-347, 2021.

ZHAO, Y.; McLaughlin, D.; Robinson, E.; Harvey, A.P.; Hookham, M.B.; Shah, A.M.; McDermott, B.J.; Grieve, D.J. Nox2 NADPH oxidase promotes pathologic cardiac remodeling associated with DOX chemotherapy. *Cancer Res.* 2010, 70, 9287–9297.

ZHONG, Z.-F. et al. Combined effects of furanodiene and doxorubicin on the migration and invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro. **Oncology Reports**, v. 37, n.4, p. 2016–2024, mar. 2017.