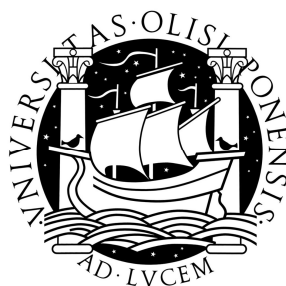


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



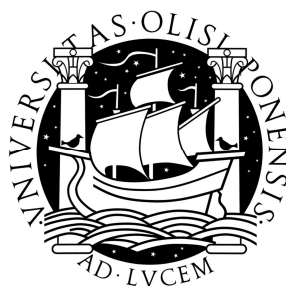
**Estudo da Actividade Anti-tumoral de Complexos
Organometálicos**

Joana Margarida Marto Sampaio de Almeida

MESTRADO EM BIOQUIMICA

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Estudo da Actividade Anti-tumoral de Complexos
Organometálicos**

Joana Margarida Marto Sampaio de Almeida

Mestrado em Bioquímica

Dissertação orientada pela Prof. Doutora Margarida Meireles

2009

AGRADECIMENTOS

Fazer ciência é uma grande aventura. São momentos de grande alegria e entusiasmo e momentos de algum insucesso e tristeza. Mas sem dúvida vale a pena! Sinto-me muito satisfeita e lisonjeada por ter ido a oportunidade de integrar este projecto. Neste último ano trabalhei e convivi com diversas pessoas e a elas agradeço todo o apoio, ajuda e paciência. Agradeço por isso:

Ao **DQB** por me ter dado a oportunidade de integrar este mestrado.

À minha orientadora, Prof. Doutora **Margarida Meireles**, por me ter aceite, por ter acreditado em mim e tanto me ter ensinado. Por toda a sua disponibilidade, simpatia, alegria e força em todos os momentos. Além de admirável orientadora, para sempre a recordarei com uma excelente amiga.

À **Catarina**, amiga, companheira e confidente de todas as horas. Sem ti tudo teria sido mais difícil. Obrigada por me aturares, por toda a tua amizade e por fazeres os dias passarem a correr!

À **Telma** por toda a sua amizade, ajuda, disponibilidade. O meu trabalho foi a continuação do trabalho iniciado por ela, agradeço-lhe por todas as portas que me abriu.

À Prof. Doutora **Maria José Calhorda**, por ter fornecido os compostos com que trabalhei. Por estar sempre disponível para esclarecer dúvidas sobre a parte “mais química” do trabalho e pela ajuda na revisão do presente trabalho.

A todos os docentes do DQB que partilharam comigo os seus conhecimentos. A todos os não docentes do mesmo departamento, por nunca me terem deixado ficar sem material ou reagentes para trabalhar, como a **Marta, Francisco, Simão, Filipa, Pedro, Joaquim, André**.

Ao Prof. Doutor **Fernando Antunes** por toda a sua simpatia e disponibilização da linha celular HeLa e de diverso material, sem o qual teria sido impossível realizar os nossos objectivos.

Ao Prof. Doutor **Pedro Lima** pela sua disponibilização em nos ceder a linha de neuroblastomas, por toda a sua simpatia na partilha da câmara de fluxo e de diversos materiais, que muito nos facilitaram a vida.

À Prof. Doutora **Luísa Cyrne** pela disponibilização de diverso material.

Ao Prof. **Fernando Santos**, por toda a sua disponibilidade, simpatia e ajuda na explicação e manuseio dos aparelhos de viscosidades.

Ao **Rui Gardner** pela oportunidade cedida de irmos ao IGC trabalhar em citometria de fluxo e participar no *workshop* desta mesma técnica.

Às pessoas com quem partilhei o laboratório nos últimos tempos: à **Neusa** por toda a tua simplicidade, amizade, carinho, sempre disposta a ajudar e à **Diana**, pela sua amizade e pela enorme boa disposição. Obrigada pelo companheirismo e excelente ambiente criado no nosso laboratório.

Ao **Luís, Vanessa, Lara, Ana, João e Karina**, amigos de curso, que eu tanto estimo e ao quais muito devo neste meu percurso académico.

Aos colegas de piso, com os quais partilhei vários momentos e que, sem dúvida alegraram os meus dias, ao **Pedro, Francisco (Xico), André, Margarida, Cordel, Joaquim, Catarina, Vânia e Mariana**.

À **Maria** e à **Salta** minhas químicas preferidas.

À, **Ana Isabel, Carolina, Charlotte, Joana, Marisa Marta, Olga, Ana Quinoy e Hugo**, obrigada pela vossa amizade!

Ao **Nuno (Bidú)** por toda a sua amizade, simpatia, paciência, ajuda e disponibilidade na revisão da tese e não só.

Aos meus **pais** por sempre terem acreditado em mim e me terem apoiado. E aos meus **irmãos** por toda a paciência e amor para comigo. A eles dedico o meu trabalho. Obrigada!

RESUMO

Estudo da Actividade Anti-tumoral de Complexos Organometálicos

Estudos anteriores demonstraram que os complexos organometálicos de molibdénio (II) possuem boas actividades anti-tumorais. Assim, sintetizaram-se novos complexos, de forma a expandir a gama de compostos com estas características, e realizar experiências mais esclarecedoras.

A maioria dos complexos estudados apresentou actividades anti-tumorais interessantes. Foram feitos testes de inibição de crescimento para 8 compostos (A, B, C, D, E, F, G e H) em três linhas celulares: HeLa (linha celular derivada do cancro cervical humano), MCF-7 (linha celular derivada do cancro mamário humano) e N1E-115 (neuroblastoma derivado de rato, células não diferenciadas e diferenciadas). As células foram incubadas com os compostos numa gama de concentrações (1 a 1000 μM) durante 48 horas. O efeito antiproliferativo foi medido pelo ensaio do MTT. Os valores de IC_{50} obtidos para os diferentes compostos, variaram entre 2,1 e 458,6 μM , apresentando diferenças entre as linhas celulares.

Estudou-se igualmente a estabilidade dos compostos durante o tempo de incubação, e concluiu-se que os compostos B e E mantêm a sua estrutura.

Para avaliar a possibilidade de intercalação dos compostos com a molécula de DNA, efectuaram-se estudos espectrofotométricos e determinou-se a viscosidade de soluções de DNA com diferentes concentrações de compostos. Os resultados obtidos parecem indicar que os compostos B, G e H são intercaladores.

Finalmente, os estudos biológicos, mostraram que existe degradação do DNA das células incubadas com os compostos. Embora a análise morfológica e a citometria de fluxo permitissem identificar células em apoptose, esta não foi detectada por electroforese. Por citometria de fluxo foi também possível detectar o aumento de espécies reactivas de oxigénio nas células incubadas com os compostos em estudo. Os mecanismos de acção dos compostos parecem assim envolver a indução de apoptose e a produção de espécies reactivas de oxigénio, contudo os estudos realizados não permitiram esclarecer a relevância de cada um destes processos.

Palavras-chave: molibdénio, inibição do crescimento celular, células cancerígenas, apoptose, DNA

ABSTRACT

Antitumoral activity studies of organometallic complexes

Organometallic complexes of molybdenum (II) have shown antitumor activity in previous studies. In order to expand the range of compounds and to perform more complete experiments, new complexes were synthesized.

The majority of organometallic studied complexes have interesting antitumoral properties. Cytotoxicity studies were developed for 8 compounds (A, B, C, D, E, F, G and H), in three cell lines: HeLa (cervical cancer cells), MCF-7 (breast cancer cells) and N1E-115 (mouse neuroblastoma cells, in two different states: non-differentiated, and differentiated). Cells were incubated with compounds in concentrations ranging from 1 to 1000 μM , during 48 hours. The antiproliferative effect was evaluated using MTT viability assay. The IC_{50} values ranged from 2, 1 to 458,6 μM , showing some differences between the cell lines.

Stability studies were performed and showed that both compounds B and E, kept their structure during the incubation intervals.

Spectrofotometric assays and determination of the viscosity of DNA solutions with increasing amounts of compounds were undertaken to evaluate the possibility of interaction between the compounds and the DNA molecule. The results showed that B, G and H compounds may be intercalative agents.

Electrophoresis of cellular DNA confirmed the degradation of DNA after the incubation of the cells with the compounds. Morphological analysis of cells, by staining with Hoechst 33342 and flow cytometry, allowed the identification of apoptotic cells. Flow cytometry showed the increase of reactive oxygen species (ROS) in cells incubated with the compounds. The results didn't allow the elucidation of the relevance of each of these processes, but suggest that the mechanisms of action of the compounds are related to the induction of apoptosis and production of ROS.

Keywords: molybdenum; cancer growth inhibition; cancer cells; apoptosis, DNA

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Biologia do cancro.....	2
1.2 Apoptose no cancro	4
1.3 <i>Stress</i> Oxidativo	6
1.4 Agentes anti-cancerígenos – compostos inorgânicos	7
1.5 Complexos organometálicos.....	13
1.5.1 Molibdénio (Mo) e tungsténio (W).....	13
1.6 Enquadramento e objectivos.....	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS	17
2.1 Compostos químicos em estudo.....	18
2.2 Linhas celulares.....	20
2.2.1 Células epiteliais do cancro cervical humano (HeLa).....	20
2.2.2 Células epiteliais do cancro mamário (MCF-7).....	21
2.2.3 Neuroblastomas (N1E-115)	21
2.3 Manutenção das culturas celulares	22
2.3.1 Preparação do meio de cultura.....	23
2.3.2 Tripsinização	24
2.3.3 Contagem de células.....	25
2.4 Preparação das soluções dos compostos organometálicos	26
2.5 Testes de inibição do crescimento/ viabilidade celular.....	26
2.5.1 Ensaio de MTT – (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazólio).....	27
2.5.2 Estudos da cinética de actuação dos complexos.....	29

2.6	Crio-preservação e descongelamento.....	30
2.7	Estudos de interacção dos compostos com o DNA	31
	2.7.1 Estabilidade dos compostos organometálicos.....	31
	2.7.2 Espectroscopia de absorção	32
	2.7.3 Determinação de viscosidades	33
2.8	Estudos biológicos	35
	2.8.1 Extração de DNA celular	35
	2.8.2 Quantificação e análise da pureza do DNA	36
	2.8.3 Electroforese de DNA em gel de agarose.....	37
	2.8.4 Determinação da morte celular – Coloração com o corante Hoeschst33342	38
	2.8.5 Citometria de fluxo	39
	2.8.5.1 Determinação da produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS)..	39
	2.8.5.2 Avaliação de morte celular pela dupla coloração com HO 33342/PI ..	40
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1	Estudos de citotoxicidade	43
3.2	Estudos de cinética de actuação de compostos.....	53
3.3	Estudos de ligação ao DNA	55
	3.3.1 Estudos espectrofotométricos.....	56
	3.3.1.1 Estudo de estabilidade das soluções dos compostos ao longo do tempo	56
	3.3.1.2 Espectroscopia de Absorção UV-visível	57
	3.3.1.3 Medições de viscosidade	60
3.4	Estudos biológicos	63
	3.4.1 Electroforese de DNA em gel de agarose.....	63
	3.4.2 Avaliação da morte celular pela coloração com Hoechst 33342.....	66
	3.4.3 Citometria de Fluxo	70
	3.4.3.1 Produção de espécies reactivas de oxigénio.....	70
	3.4.3.2 Avaliação de morte celular pela dupla coloração com HO33342/PI ...	72
4.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	78
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Dez principais causas de morte: taxas de mortalidade. (Dados retirados do <i>National Heart Lung and Blood Institute</i> , estudo realizado nos Estados Unidos em 2004).....	3
Fig. 2: Esquema ilustrativo das alterações morfológicas e bioquímicas que ocorrem durante os fenómenos de apoptose e de necrose (Adaptado de [1]).....	4
Fig 3: Representação do mecanismo de intercalação com a molécula de DNA, por inibição da topoisomerase II e conseqüentemente morte celular. (Adaptado de Martínez & Chacón-García, 2005).....	9
Fig. 4: Representação da estrutura química dos complexos anti-cancerígenos de platina (II) (cisplatina, carboplatina e oxaliplatina) e da satraplatina.....	11
Fig. 5: Estrutura química da doxorubicina (Adaptado de [5]).....	12
Fig. 6: Imagem morfológica da linha celular HeLa (Adaptado de [2]).....	20
Fig. 7: Imagem de uma monocamada de células MCF-7 (20 X), retirada por microscopia óptica (Adaptado de [3]).....	21
Fig. 8: Aparência morfológica de células N1e-115 confluentes. A – células controlo, não diferenciadas (NDif); B – células plaqueadas na presença de 1% DMSO, células diferenciadas (Dif), (Adaptado de Kimhi <i>et al.</i> , 1976).....	22
Fig. 9: A) Hematocitómetro; B) Representação da depressão de volume $1,0 \times 10^4$ ml onde se coloca a suspensão de células e a partir da qual se vai contar e estimar o número de células por ml (Adaptado de [4]).....	25
Fig. 10: Esquema de aplicação da gama de concentrações do composto e dos controlos, nas placas de 96 poços (1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10 e 1 μ M); no centro estão os 3 controlos: 1º corresponde ao meio (controlo negativo); 2º corresponde ao meio com 0,1 % DMSO e o 3º corresponde ao meio com 1 % DMSO.....	27
Fig. 11: Estruturas químicas do MTT e do MTT formazano (Adaptado de Liu, 1999).....	28
Fig.12: Placa de 96 poços onde se observaram cristais de formazano dissolvidos em DMSO, seguindo-se o ensaio com o aparecimento da cor púrpura nos poços.....	28
Fig. 13: Viscosímetro de Ostwald (Adaptado de Russo, 2008).....	34
Fig. 14: A) Estrutura química do corante Hoeschst 33342; B) Exemplo da marcação nuclear deste composto, onde se observa do lado esquerdo uma célula apoptótica com o núcleo fragmentado, dividida em corpos apoptóticos e com uma maior fluorescência. Nas 2 células do lado direito observam-se núcleos inteiros, indicando a viabilidade dessas células. (Adaptado de [5]).....	38
Fig 15: Efeito do substituinte I na proliferação da linha celular HeLa, MCF-7, N1E-115 NDif e N1E-115 Dif. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão, considerando os resultados obtidos para pelo menos 3 experiências independentes.....	44

- Fig. 16:** Efeito do substituinte J na proliferação na linha HeLa, MCF-7, N1E-115 NDif e N1E-115 Dif. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão, considerando os resultados obtidos para, pelo menos, 3 experiências independentes.....45
- Fig. 17:** Efeito do composto A e do composto C na proliferação da linha celular HeLa e MCF-7. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão, considerando os resultados obtidos para pelo menos 3 experiências independentes (gama de concentrações de 1- 10 μ M).....46
- Fig. 18:** Representação dos gráficos de viabilidade celular para o composto B. **A)** Percentagem de sobrevivência das células incubadas com o respectivo composto; Cada coluna representa a média \pm desvio padrão, considerando os resultados obtidos para, pelo menos, 3 experiências independentes **B)** Curva de dose-resposta da actividade citotóxica; **C)** Estrutura do complexo.....47
- Fig. 19:** Representação dos gráficos de viabilidade celular para o composto E; **A)** Percentagem de sobrevivência das células incubadas com o respectivo composto; Cada coluna representa a média \pm desvio padrão, considerando os resultados obtidos para, pelo menos, 3 experiências independentes **B)** Curva de dose-resposta da actividade citotóxica; **C)** Estrutura do complexo.....48
- Fig. 20:** Representação dos gráficos de viabilidade celular para o composto G. **A)** Percentagem de sobrevivência das células incubadas com o respectivo composto; Cada coluna representa a média \pm desvio padrão, considerando os resultados obtidos para, pelo menos, 3 experiências independentes **B)** Curva de dose-resposta da actividade citotóxica; **C)** Estrutura do complexo.....49
- Fig. 21:** Representação dos gráficos de viabilidade celular para o composto F; **A)** Percentagem de sobrevivência das células incubadas com o respectivo composto; Cada coluna representa a média \pm desvio padrão, considerando os resultados obtidos para, pelo menos, 3 experiências independentes **B)** Curva de dose-resposta da actividade citotóxica; **C)** Estrutura do complexo.....50
- Fig. 22:** Representação dos gráficos de viabilidade celular para o composto D. **A)** Percentagem de sobrevivência das células incubadas com o respectivo composto. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão, considerando os resultados obtidos para, pelo menos, 3 experiências independentes; **B)** Curva de dose-resposta da actividade citotóxica; **C)** Estrutura do complexo.....51
- Fig. 23:** Representação dos gráficos de viabilidade celular para o composto H. **A)** Percentagem de sobrevivência das células incubadas com o respectivo composto. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão, considerando os resultados obtidos para, pelo menos, 3 experiências independentes; **B)** Curva de dose-resposta da actividade citotóxica; **C)** Estrutura do complexo.....52
- Fig. 24:** Ensaios cinéticos para os vários compostos estudados, nas três linhas celulares, durante os vários tempos de incubação (1, 2, 3 e 48 horas).....54
- Fig. 25:** Espectros de UV-vis do composto B. **A)** valores do composto em PBS, no tempo zero (azul), ao fim de 2 horas (amarelo), ao fim de 24 horas (verde) e ao fim das 48 horas

(vermelho). B) Valores do composto em meio RPMI, no tempo zero (azul), ao fim de 2 horas (amarelo), ao fim de 24 horas (verde) e ao fim das 48 horas (vermelho).....	56.
Fig. 26: Espectros de UV-vis do composto E. A) valores do composto em PBS, no tempo zero (azul), ao fim de 2 horas (amarelo), ao fim de 24 horas (verde) e ao fim das 48 horas (vermelho). B) Valores do composto em meio RPMI, no tempo zero (azul), ao fim de 2 horas (amarelo), ao fim de 24 horas (verde) e ao fim das 48 horas (vermelho).....	56
Fig. 27: Espectros de absorção dos compostos na ausência e na presença de DNA, em tampão PES. A absorvência muda à medida que aumenta a concentração de DNA. (adicionaram-se concentrações crescentes de DNA: 10µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl, 50 µl, 60 µl), [composto] = 50 µM. As linhas mostram o decréscimo na intensidade à medida que aumentou a concentração de DNA.....	58
Fig. 28: Espectros de absorção dos compostos na ausência e na presença de DNA, em tampão PES. A absorvência muda à medida que aumenta a concentração de DNA. (adicionaram-se concentrações crescentes de DNA: 10µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl, 50 µl, 60 µl), [composto] = 50 µM. As linhas mostram o decréscimo na intensidade à medida que aumentou a concentração de DNA.....	59
Fig. 29: Controlo 1: representação do tempo de escoamento com adições crescentes de BrEt, de forma a ver o aumento de intercalação deste composto com o DNA (50 µM).....	61
Fig. 30: Controlo 2: representação do tempo de escoamento com adições crescentes de DMSO ao tampão PES (cinzento) e ao DNA (preto).....	61
Fig. 31: Compostos B, D: representação do tempo de escoamento com adições crescentes de composto (1, 10, 25, 50 e 100 µM), de forma a verificar ou não o aumento de intercalação destes compostos com o DNA (50 µM).....	62
Fig. 32: Composto E: representação do tempo de escoamento com adições crescentes de composto (1, 10, 25, 50 e 100 µM), de forma a verificar ou não o aumento de intercalação deste composto com o DNA (50 µM).....	63
Fig. 33: Gel de Agarose de DNA de células HeLa após exposição a concentrações crescentes (10, 50 e 100µM) de composto B, D, E e G . M - marcador do bacteriófago λ digerido com o enzima HindIII; C – Células controlo, incubadas sem adição de composto; H₂O₂ – controlo positivo.....	64
Fig. 34: Gel de Agarose de DNA de células MCF-7 após exposição a concentrações crescentes (10, 50 e 100µM) de composto B, D e E. M - marcador do bacteriófago λ digerido com o enzima HindIII; C – Células controlo, incubadas sem adição de composto.....	65
Fig. 35: Análise da morfologia da linha celular MCF-7. Após adesão das células a lamelas, estas foram incubadas com os compostos B, D e E nas concentrações de 10 e 100 µM, durante 48 horas. De seguida foram marcadas com o corante fluorescente Hoechst 33342, de	

modo a determinar a sua viabilidade. Os corpos apoptóticos estão evidenciados e identificados com uma seta.....67

Fig. 36: Análise da morfologia da linha celular N1E-115 NDif. Após adesão das células a lamelas, estas foram incubadas com os compostos B, D e E nas concentrações de 10 e 100 μM , durante 48 horas. De seguida foram marcadas com o corante fluorescente Hoechst 33342, de modo a determinar a sua viabilidade. Os corpos apoptóticos estão evidenciados e identificados com uma seta.....69

Fig. 37: Exemplificação da representação dos resultados. Células vivas surgem no quadrante R5, as células apoptóticas no quadrante R3 e as mortas no quadrante 4 (Adaptado de Diamond & DeMaggio, 2000).....73

Fig. 38: Análise por citometria de fluxo de células apoptóticas, coloração com o corante Hoechst 33342 e PI **A)** controlo negativo (células viáveis); **B)** controlo para células apoptóticas (Hoechst 33342) **C)** controlo para células mortas (PI); **D)** controlo positivo (células tratadas com H_2O_2); **E)** compilação dos valores obtidos por citometria de fluxo, correspondendo à percentagem de viabilidade celular.....74

Fig. 39: Análise por citometria de fluxo de células apoptóticas, coloração com o corante Hoechst 33342 e PI na linha celular MCF-7. Composto E: **A)** 10 μM com 3 horas de incubação; **B)** 10 μM com 24 horas de incubação; **C)** 50 μM com 3 horas de incubação; **D)** 50 μM com 24 horas de incubação; **E)** Compilação dos valores obtidos por citometria de fluxo, correspondendo à percentagem de viabilidade celular.....76

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Complexos organometálicos de molibdênio e tungstênio estudados.....	19
Tabela II: Valores de inibição do crescimento celular, com os vários complexos organometálicos estudados, nas três linhas celulares estudadas, expressos como valores de IC_{50} ($n=3$) \pm desvio padrão.....	53
Tabela III: Compilação dos resultados obtidos para a produção de ROS.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorvência
Bp	Pares de bases
BrEt	Brometo de etídeo
CO₂	Dióxido de carbono
c.d.o	Comprimento de onda
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Desoxyribonucleotic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DQB	Departamento de Química e Bioquímica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FBS	<i>Fetal calf serum</i> (soro de feto de bovino)
FCUL	Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
h	Tempo em horas
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
HeLa	Linha celular derivada do cancro do colo do úterol humano
HO33342	Hoechst 33342
IC₅₀	<i>half maximal inhibitory concentration</i> (concentração que inibe metade do crescimento máximo)
MCF-7	Linha celular derivada do cancro da mama humano
Mo	Molibdénio
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
N1E -115	Linha celular de neuroblastomas de ratos

N1E -115 Dif	Neuroblastomas diferenciados
N1E -115 NDif	Neuroblastomas não diferenciados
¹O₂	Oxigénio singuleto
OD	Densidade óptica
PES	Tampão fosfato 0,1 M pH 7.0, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM
PI	Iodeto de propídeo
PS	Fosfatidilserina
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
s	Tempo em segundos
SDS	Detergente <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
t	Tempo
TAE	Tampão de electroforese contendo Tris, acetato e EDTA
TE	Tampão Tris-Cl (10 mM, pH 8.0) e EDTA 1 mM
Tm	Temperatura de desnaturação
UV/visível	Radiação ultravioleta/ visível
W	Tungsténio

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biologia do cancro

Todas as nossas células têm uma duração de vida limitada, de modo a poderem ser substituídas por células mais saudáveis. Quando termina o seu tempo de vida natural, as células vizinhas intervêm para remover os detritos. A este processo de morte dá-se o nome de apoptose. Quando funciona em condições normais, ajuda a manter um bom equilíbrio entre células mortas e células novas. Contudo, este processo pode funcionar de forma desordenada e descontrolada dentro de um tecido, fazendo com que se inicie a produção de uma massa celular diferenciada do resto, a que se dá o nome de tumor. Este pode apresentar-se de duas formas: não invasiva e invasiva. Na forma não invasiva fazem parte um conjunto de células que permanecem “encapsuladas” no local de origem, sem produzir danos maiores nos tecidos adjacentes. Neste caso considera-se o tumor benigno; este tipo de tumor não avança necessariamente para a malignidade e normalmente mantém-se parecido com o tecido de origem. Nem todos os tipos de tecidos estão implicados e muitas vezes estão separados do tecido normal por uma espécie de membrana de tecido conjuntivo. Não se diferenciam muito das células normais e os problemas clínicos surgem, em muitos casos, de maneira indirecta por pressão da massa tumoral sobre nervos ou outros tecidos próximos. O tumor pode também apresentar-se na forma invasiva, quando, para além das células crescerem e proliferarem descontroladamente, têm a capacidade de invadir e se dispersar para outros tecidos, com produção de metástases (tumores secundários originados pela disseminação de células cancerosas precedentes de outro tumor). Neste caso o tumor é conotado como maligno. Ao contrário do benigno, este apresenta numerosas anormalidades citológicas, tais como, variações na forma e tamanho, aumento da densidade e tamanho do núcleo celular, mitoses descontroladas, não se “encapsulam” e destroem a membrana basal invadindo os vasos sanguíneos e nódulos linfáticos (Perera, 1997). A estas células chamar-se-ão, a partir de agora, de células cancerígenas, sendo a doença denominada de cancro. Outra designação possível é neoplasia, que significa multiplicação progressiva de células, que também se pode iniciar a partir de células normais, em qualquer tecido saudável (Lowe & Lin, 2000).

O cancro é um processo multifásico que se desenvolve ao longo do tempo. Esta doença surge então como uma consequência da desregulação do ciclo celular, resultando numa perda progressiva da diferenciação celular e num crescimento celular descontrolado (Garret, 2001). A origem deste fenómeno é multifactorial, compreendendo vários factores, entre os quais, ambientais (*e.g.* produtos químicos, exposição a radiação UV, radiação ionizante ou à luz solar), modo de vida (alimentação, consumo de bebidas alcoólicas, uso de drogas ou de tabaco), assim como factores genéticos e hereditários (Hanahan & Weinberg, 2000).

As células cancerígenas divergem das células normais em várias características, como perda de diferenciação, aumento da capacidade de invasão e diminuição da sensibilidade a drogas. Para além disso, podem dar-se variadas alterações cromossómicas, como a perda ou ganho de cromossomas, mudanças na ploidia ou aberrações estruturais (Garret, 2001).

As principais causas de morte dos países desenvolvidos são as doenças cancerígenas juntamente com doenças cardiovasculares (Fig 1). Apesar de estarem a ser feitos grandes progressos para desvendar os processos moleculares, celulares e genéticos que originam o cancro, este conhecimento ainda não permitiu obter curas significativas (Srivastava, 2003). Desta forma, os projectos mais recentes baseiam-se na detecção precoce da doença e dependem dos avanços em variadas áreas, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, sendo que, uma vez espalhado o tumor metastático a quimioterapia provavelmente a única solução (Ho *et al.*, 2003).

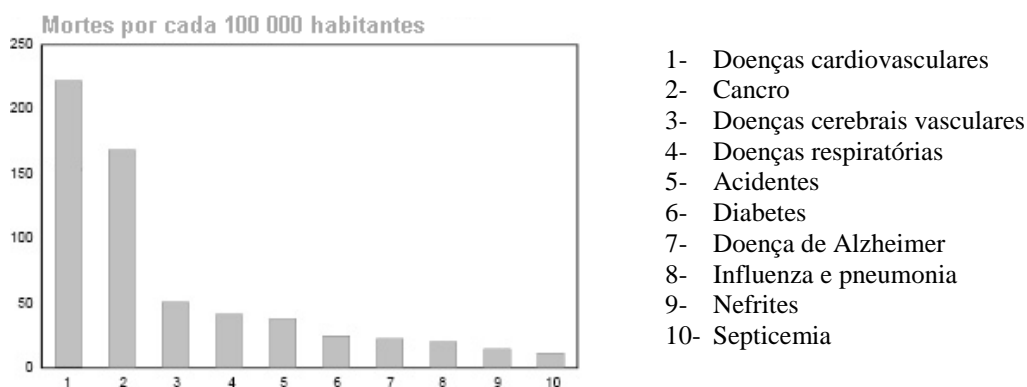


Fig. 1: Dez principais causas de morte: taxas de mortalidade. (Dados retirados do *National Heart Lung and Blood Institute*, estudo realizado nos Estados Unidos em 2004).

1.2 Apoptose no cancro

A morte celular pode ocorrer por apoptose ou necrose (Fig. 2), podendo também ocorrer por mecanismos com características de ambas as vias (Lowe & Lin, 2000; Golstein & Kroemer, 2007).

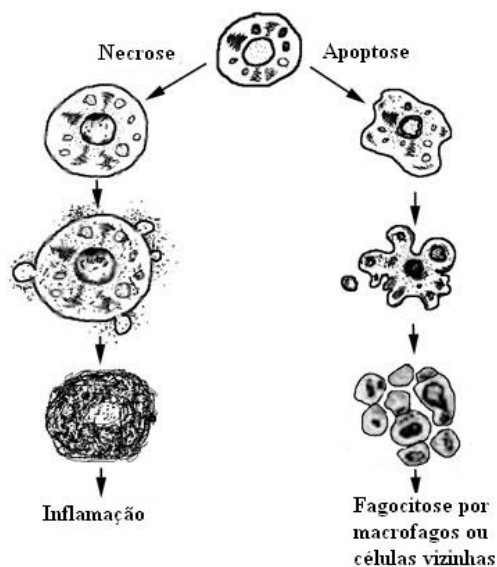


Fig. 2: Esquema ilustrativo das alterações morfológicas e bioquímicas que ocorrem durante os fenómenos de apoptose e de necrose (Adaptado de [1]).

A necrose é o processo resultante de uma disfunção celular aguda em resposta a condições de *stress* ou após exposição das células a agentes tóxicos. É um processo passivo, associado a uma rápida depleção de ATP celular. Morfologicamente, a necrose caracteriza-se pelo aumento do volume celular e pela ruptura da membrana plasmática, seguida da libertação dos compostos degradados para o meio intercelular (Fig. 2). A libertação desses conteúdos pode provocar danos nas células vizinhas, assim como resultar no desenvolvimento de uma resposta inflamatória. Por outro lado, a apoptose é um processo activo de morte celular programada que desempenha um papel crucial na homeostasia e no desenvolvimento das células. Este processo permite a remoção das células danificadas ou indesejadas, que de alguma forma vão prejudicar o bom funcionamento das células circundantes (Leist & Jaattela, 2001). Durante a apoptose ocorre a diminuição do tamanho celular, condensação da

cromatina e formação de corpos apoptóticos (vesículas de pequenas dimensões que contêm no seu interior componentes celulares que são posteriormente fagocitados por células adjacentes) (Fig. 2). Para além disso, verifica-se a clivagem da molécula de DNA em regiões internucleossómicas, resultando no aparecimento de fragmentos de DNA. O conhecimento das vias activadoras deste processo de morte celular não está todavia totalmente compreendido, mas sabe-se que estão envolvidas várias proteínas que vão ser activadas e reformuladas promovendo a sinalização sequencial. A apoptose ocorre por meio de duas vias principais: a via extrínseca ou citoplasmática, que é activada pelo receptor de morte Fas, membro da família de receptores do factor de necrose tumoral (TNF); a segunda é a via intrínseca ou mitocondrial que, quando estimulada, leva à libertação do citocromo c do mitocondrio e à activação do sinal de morte. Esta via é despoletada por *stress* intra e extracelular, como a supressão de factores de crescimento, hipoxia e danos na molécula de DNA. Ambas as vias convergem para uma via final comum que envolve a activação de caspases (proteases específicas para o ácido aspártico). As proteases existem no citoplasma, como precursores inactivos de enzimas, no espaço intermembranar e na matriz nuclear. Estes enzimas são responsáveis pela clivagem e activação de moléculas reguladoras e estruturais, levando à morte da célula (Ghobrial *et al.*, 2005; Golstein & Kroemer, 2007). As células apoptóticas são fagocitadas muito rapidamente, minimizando a resposta inflamatória e possibilitando a sobrevivência das restantes células (Leist & Jaattele, 2001; Jarzab & Stryjeaka-Zimmer, 2008). Tanto a necrose como a apoptose podem resultar da exposição a *stress* oxidativo, tema abordado no ponto seguinte (1.3).

Um dos avanços mais importantes foi a constatação de que a apoptose e os genes que controlam este processo têm um grande peso no surgimento do fenótipo maligno (Rudin & Thompson, 1997). Por exemplo, já é do conhecimento comum que certas mutações oncogénicas vão perturbar o processo normal de apoptose, levando ao aparecimento do tumor, à sua progressão ou mesmo metástase (Kerr *et al.*, 1972; Simstein *et al.*, 2003).

O processo de apoptose é essencial para o desenvolvimento e subsistência da vida. É definida como um conjunto de mudanças morfológicas discretas que levam à

morte da célula, com a destruição inerente do DNA, compactação e segregação da cromatina ao longo da membrana nuclear (Simstein *et al.*, 2003). Este acontecimento tornou-se um foco de interesse cada vez maior na área da oncologia, pois a desregulação do seu processo pode provocar a malignidade de alguns tumores e, porque vários dos tratamentos anti-tumorais actuam por indução da apoptose (Belloc *et al.*, 1994; Kerr *et al.*, 1994). Vários estudos biológicos indicam que o primeiro alvo intracelular dos compostos anticancerígenos é o DNA, sendo que a interacção destas moléculas com o DNA vai provocar-lhe danos, bloqueando a divisão e levando à morte (Zhang *et al.*, 2005).

Assim sendo, um dos focos das descobertas na área da oncologia é de identificar moléculas importantes na regulação da apoptose das células tumorais (Lovborg *et al.*, 2004).

1.3 *Stress* Oxidativo

O oxigénio apareceu na atmosfera terrestre há cerca de 2 biliões de anos. Nesta altura apenas existiam organismos anaeróbios, que necessitaram de se adaptar às novas condições do meio envolvente. Começaram então a surgir organismos capazes de realizar tanto, processos aeróbios como anaeróbios. Mais tarde deu-se o aparecimento de espécies que utilizam o oxigénio como única fonte de obtenção de energia, organismos aeróbios (Behl & Moosmann, 2002).

Os organismos aeróbios produzem e degradam espécies reactivas de oxigénio (ROS), dando origem tanto a concentrações fisiológicas (resultantes da realização de funções celulares normais), como a quantidades excessivas que, ao ultrapassarem as defesas anti-oxidantes naturais dão origem a um estado denominado de *stress* oxidativo. Resumidamente, o *stress* oxidativo pode resultar de dois factores: da diminuição e/ou depleção dos anti-oxidantes, devido a mutações afectando enzimas antioxidantes ou da redução dos constituintes essenciais na dieta humana; ou da produção elevada de espécies reactivas de oxigénio e de azoto, por exemplo através da exposição a níveis elevados de oxigénio ou da presença de toxinas que são

metabolizadas para produzir ROS. Devido aos seus potenciais efeitos indesejáveis, as espécies reactivas de oxigénio e todos os eventos associados ao *stress* oxidativo têm sido relacionados com uma grande variedade de patologias, nas quais se inclui o cancro (Benhar *et al.*, 2002; Ushio-Fukai, 2009) e envelhecimento (Spiteller, 2007)

Os radicais livres intracelulares (moléculas livres de baixo peso molecular, com um electrão desemparelhado) são considerados ROS. Estudos realizados por Tonissen & Trapani (2009) demonstraram que o mitocôndrio é a principal fonte de radicais livres intracelulares. Esse facto deve-se à presença da cadeia de transporte de electrões, onde cerca de 95 % do oxigénio é reduzido pelo citocromo oxidase, levando o restante à formação de radicais livres. Uma diminuição da actividade do citocromo oxidase pode assim levar a uma maior libertação de radicais livres a partir da cadeia respiratória mitocondrial.

O anião superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) estão presentes em vários cancros em quantidades desmedidas (Benhar *et al.*, 2002). O superóxido é uma das mais nocivas espécies reactivas de oxigénio. A sua formação ocorre na membrana mitocondrial interna pela adição de um electrão ao oxigénio molecular induzido pelo NADPH oxidase. Este radical não é capaz de atravessar as membranas lipídicas, limitando a sua acção ao local onde é produzido. Por sua vez, o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), embora não seja um radical livre, também é considerado uma espécie reactiva de oxigénio, uma vez que pode funcionar como intermediário na produção de espécies mais reactivas. O peróxido de hidrogénio tem a capacidade de atravessar as membranas biológicas, o que lhe confere uma maior perigosidade. (Spiteller, 2007; Ushio-Fukai & Nakamura, 2009).

1.4 Agentes anti-cancerígenos – compostos inorgânicos

A grande maioria dos agentes anti-cancerígenos actua inibindo as mitoses, interferindo com o metabolismo dos ácidos nucleicos ou promovendo distúrbios específicos nos processos bioquímicos, como a inibição de reacções enzimáticas chaves. De acordo com o seu modo de acção, podem ser classificados em quatro

classe de agentes (Salaman *et al.*, 1981; Martínez & Chacón-García, 2005): agentes alquilantes, promovem a libertação de radicais alquilo, após metabolização. Apresentam normalmente 2 ou mais grupos cíclicos ou grupos terminais insaturados, ou são convertidos nestas formas em meio aquoso. Por sua vez, os grupos formados têm a capacidade de se ligar a outras moléculas, podendo fazer ligações cruzadas com o DNA, bloqueando a sua divisão (exemplos: mostarda de azoto, ciclofosfamida, cisplatina); antimetabolitos que vão interferir na síntese de proteínas por competição e bloqueio de receptores específicos. Interferem também, na biossíntese de purinas e pirimidinas, inibindo a produção de precursores normais, privando as células de substratos ou co-factores essenciais à síntese do DNA. De forma geral estes agentes actuam nas células que se encontram no período S do ciclo celular (exemplos: análogos do ácido fólico e de purinas ou pirimidinas); antibióticos ou alcalóides (medicamentos obtidos naturalmente) que são substâncias provenientes de plantas ou microorganismos que têm a capacidade de se ligar a proteínas dos microtúbulos celulares, interferindo com a formação do fuso cromático, levando à interrupção da divisão mitótica, na metáfase (*e.g.* extraídos de plantas – vincristina, vimblastina; enzima – 1- asparginase) (Salaman *et al.*, 1981) e por último agentes intercalantes, moléculas que se inserem perpendicularmente no DNA, sem formarem ligações covalentes. As forças que mantêm a estabilidade entre o complexo intercalador-DNA são as forças de *van der Waals*, ligações de hidrogénio e /ou forças eléctricas (Martínez & Chacón-García, 2005). Este tipo de agentes vai impedir a replicação e transcrição celular, por inibição do topoisomerase II, tal como se pode observar na figura 3 (*e.g.* brometo de etídio, derivados de acridina e antraciclina).

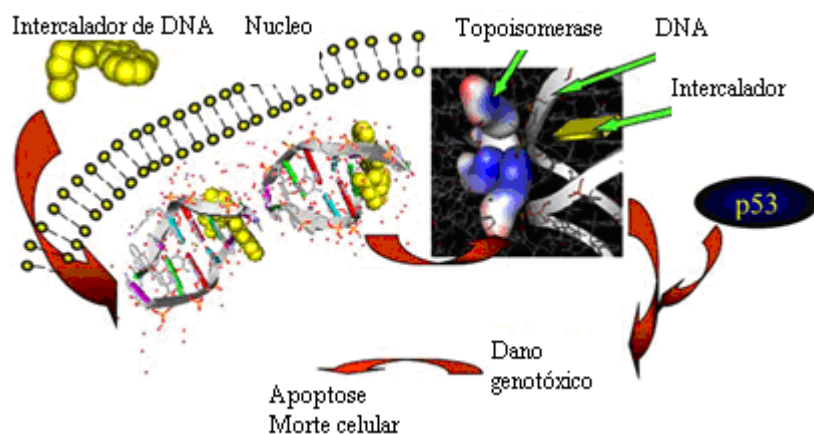


Fig 3: Representação do mecanismo de intercalação com a molécula de DNA, por inibição da topoisomerase II e consequentemente morte celular. (Adaptado de Martínez & Chacón-García, 2005).

Os compostos inorgânicos, em particular os metais, são essenciais à vida, participando em variados processos bioquímicos vitais, como é o caso do ferro, responsável pela cor avermelhada do sangue e primordial no transporte de oxigénio a todas as células, ou mesmo o cobre, indispensável ao organismo dos mamíferos, devido à sua associação em processos de produção de hemoglobina, assim como nas plantas devido ao papel preponderante na formação de clorofila. Porém, muito deles apresentam uma elevada toxicidade, o que adiou o interesse dos cientistas em desenvolver aplicações terapêuticas com estes complexos metálicos (Bonire & Fricke, 2001).

O processo de reconhecimento da eficiência farmacológica dos metais foi lento. Data do início do século XX, o aparecimento dos primeiros medicamentos contendo metais (*e.g.* salvarsan, medicamento contendo arsénio eficiente no tratamento da sífilis; novasural e saligran, medicamentos contendo mercúrio e usados como agentes diuréticos) (Matos, 2001).

Apenas no final dos anos 70 se provou o impacto dos complexos metálicos na medicina devido à descoberta de Rosenberg e seus colaboradores de um complexo de estrutura plana de platina (Pt), a que se deu o nome de cisplatina (*cis*-diaminodichloroplatina (II), $cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$) (Fig. 4), com capacidade de inibição da divisão bacteriana. Este composto foi aprovado como droga anti-cancerígena em

1978 (Jakupec *et al.*, 2007) e, continua a ser usado em cerca de 50-70 % dos pacientes com cancros, com uma actividade particular em tumores sólidos, cancro do testículo, dos ovários, bexiga e pescoço (Kelland *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2008).

Actualmente as principais classes de anti-tumorais com metais incluem: platina (II), ouro (I) e ouro (III), metalopurinas, ruténio (II) e ruténio (III), bismuto (III), rénio (I) e cobre (II) (Wang & Chiu, 2008).

Nos dias de hoje, a cisplatina continua a representar o fármaco mais potente na terapia do cancro. Pensa-se que a sua acção se dá no DNA através da ligação aos átomos N-7 das purinas que estão colocados na volta maior da dupla hélice e não estão envolvidos nas ligações de hidrogénio dos pares de bases. Esta ligação vai causar danos na molécula levando assim à morte celular (Ho *et al.*, 2003; Wang & Chiu, 2008). Este composto apresenta, no entanto, efeitos secundários muito agressivos tais como, nefrotoxicidade, náuseas e vómitos (Ho *et al.*, 2003). Para além disso, muitos dos cancros humanos têm uma resistência inata à cisplatina, ou adquirem-na durante o tratamento (Pereira *et al.*, 2008). Num esforço para ultrapassar estes problemas, têm sido estudadas versões modificadas deste composto (os chamados análogos ou drogas de segunda geração), tais como o complexo carboplatina, que apresenta uma toxicidade reduzida e a satraplatina que foi o primeiro fármaco oralmente biodisponível (Jakupec *et al.*, 2007). Na figura 4, estão representados quatro candidatos promissores a anti-cancerígenos que estão neste momento na fase III dos testes clínicos.

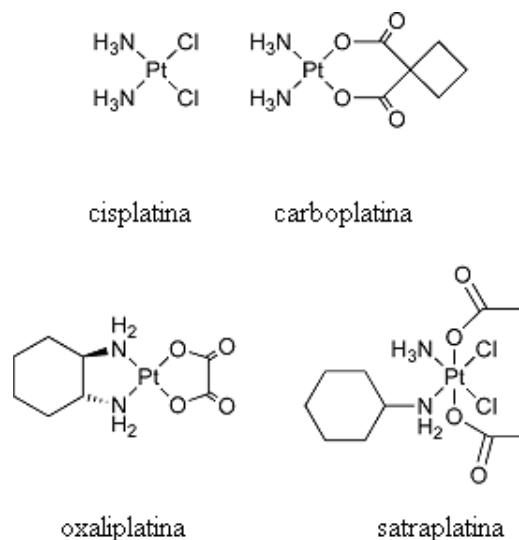


Fig. 4: Representação da estrutura química dos complexos anti-cancerígenos de platina (II) (cisplatina, carboplatina e oxaliplatina) e da satraplatina.

Um outro composto anti-cancerígeno muito conhecido é a doxorubicina (nome genérico adriamicina, Fig. 5). Este composto foi isolado do fungo *Streptomyces peucetius* tendo uso clínico desde os anos 60. É conhecido com um dos fármacos mais eficazes no tratamento de linfomas, adenocarcinomas da mama e de outros tumores malignos. Este anti-cancerígeno pertence à família das antraciclina e vai induzir a apoptose, bloqueando o ciclo celular na fase G2 (Rozados *et al.* 2008). A doxorubicina intercala em zonas desenroladas da dupla hélice. Apesar de o mecanismo não ser ainda totalmente claro, parece que esta ligação directa ao DNA, por intercalação entre os pares de bases e a inibição da reparação do DNA, por inibição do topoisomerase II, resulta no bloqueio da síntese de DNA e RNA e na fragmentação do DNA. A doxorubicina é também um poderoso quelante de ferro. O complexo ferro-doxorubicina pode ligar-se ao DNA e às membranas celulares produzindo radicais livres que clivam o DNA e membranas celulares. Infelizmente, tem um perfil de toxicidade elevado, com efeitos prejudiciais para o dia a dia dos pacientes tratados. Os principais efeitos colaterais das antraciclina são a mielosupressão, cardiotoxicidade e a alopecia (Briasoulis *et al.*, 2004).

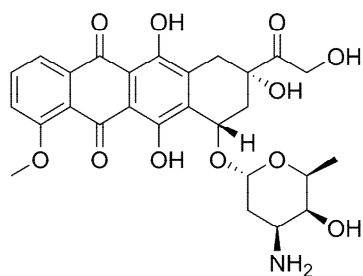


Fig. 5: Estrutura química da doxorubicina (Adaptado de [5]).

Os análogos podem melhorar a eficácia do medicamento original, o que significa que doses mais baixas poderão ter a capacidade de produzir os mesmos efeitos benéficos. O perfil de toxicidade dos análogos também poderá ser vantajoso relativamente ao medicamento original, visto que os análogos podem ter menos efeitos colaterais tóxicos. Os análogos podem ser usados para tratar casos em que os pacientes se tornam resistentes ao medicamento original. Finalmente, se o medicamento original só puder ser administrado por via intravenosa, os análogos podem ser capazes de ser tomados por via oral. Rozados *et al.* (2008) estudaram a actividade anti-tumoral da doxorubicina acoplada a um agente hipolipidémico, lovastatin. Estudos anteriores com murganhos tinham demonstrado que o lovastatin captura células tumorais na fase G1 do ciclo celular, induzindo a apoptose (Maltese *et al.*, 1985). No estudo de Rozados *et al.* (2008) reduziram-se as doses de doxorubicina, porém observou-se um aumento da resposta apoptótica e diminuição da toxicidade da combinação destes agentes anti-tumorais, relativamente aos compostos isolados. Actualmente já se usam nanopartículas, que transportam doxorubicina e outros fármacos permitindo o acesso directo às células infectadas, para o tratamento do cancro. Estas partículas permitem que haja uma modificação delicada da ligação às membranas celulares cancerosas, no ambiente ou nos locais dos receptores citoplasmáticos ou nucleares. Isto resulta numa entrega com altas concentrações de droga nas células cancerosas alvo, e numa reduzida toxicidade no tecido saudável (Haley & Frenkel, 2008).

1.5 Complexos organometálicos

A aplicação de compostos organometálicos como fármacos data do trabalho pioneiro de Köpf e Köpf-Maier, em 1979. Estes dois cientistas investigaram a actividade anti-tumoral de vários complexos, do tipo Cp_2MX_2 ($M = Ti, V, Nb, Mo, X = Cl, Br$, halogeneto ou ligando diácido) em murganhos e humanos com cancro. Estes complexos são considerados bons candidatos para fármacos, por existirem em vários estados de oxidação com uma variedade de ligandos acoplados (Pereira *et al.*, 2008). Para além disso, têm uma grande estabilidade e versatilidade, características estas ganhas pelas interacções entre o metal e o ligando (Waern *et al.*, 2005).

Estes metais têm sido usados, com muito sucesso, na síntese de antibióticos, anti-histamínicos, alcalóides e numa variada gama de substâncias activas farmacologicamente. Infelizmente, tanto a estrutura dos produtos como o mecanismo das reacções envolvidas estas ainda muito longe de ser totalmente compreendidos (Jelkic-Stankov *et al.*, 2006). O primeiro composto a entrar em ensaios clínicos foi o dicloreto de titanoceno (Cp_2TiCl_2). Waern *et al.* (2006) estudaram um composto semelhante, substituindo o titânio por Mo, o que levou a concluírem que a incorporação de grupos tiol em substituição dos halogéneos promove derivados mais estáveis e solúveis em água, tendo alguns desses derivados uma boa capacidade de entrar nas células, mas bloqueiam a citotoxicidade do complexo original

1.5.1 Molibdénio (Mo) e tungsténio (W)

O Mo é um metal de transição muito versátil. Forma compostos numa variada gama de estados de oxidação que são facilmente interconvertíveis, com ligandos inorgânicos e orgânicos, incluindo compostos fisiológicos muito importantes, com espécies bi e polinucleares envolvendo ligandos promotores de pontes (óxidos, hidróxidos, sulfitos) ou ligações directas metal-metal entre átomos de Mo ou entre compostos nos quais o número de coordenação do Mo vai de 4 a 8 (Mitchell, 2003).

Nos sistemas biológicos o Mo é um constituinte essencial dos enzimas, estando presente nos centros activos de mais de 30 enzimas (Stiefel, 2002). Este metal catalisa reacções *redox*, como a oxidação de aldeídos, xantinas, purinas e catalisa a redução de nitratos e de azoto molecular (Burriss & Roberts, 1993; Kim *et al.*, 1993; Stiefel, 2002). Para além disso desempenha um papel crucial na activação de agentes anti-tumorais (Pritsos & Gustafson, 1994). A sua presença nos centros activos faz com que desempenhe funções biológicas importantes. Estes estão coordenados com um co-factor orgânico (MoCo) que fornece electrões às vias (devido à sua fácil interconvertibilidade em diferentes estados de oxidação), formando ligações com azoto, oxigénio, e dadores de sulfato, que são suficientemente fortes para permitir a formação de complexos. Este cofactor é o componente chave do hidroxilase e oxidoreductase que são fundamentais nos ciclos biológicos do azoto, carbono e enxofre. (Stiefel, 2002; Williams & Silva, 2002)

Dos primeiros estudos com este metal, Stoner *et al.* (1976) relataram o trióxido de Mo como sendo um fraco anti-cancerígeno em ratos com adenoma no pulmão (estudos realizados durante 30 semanas a elevadas doses). Num outro estudo, Maltoni (1976) injectou subcutaneamente um pigmento laranja de Mo, constituído por uma mistura de cromato de chumbo e molibdénio, e descreveu este composto como potencial anti-cancerígeno devido às propriedades do cromato. Outros estudos foram feitos para testar a fisiologia e toxicidade do molibdénio, considerando este, um potencial anti-tumoral, pouco tóxico a baixas concentrações (Lewis *et al.*, 1996; Wargovich *et al.*, 1996).

O molibdénio, visto como anti-cancerígeno começou com o estudo de Luo *et al.* (1983), em que se administrou molibdato de sódio (Na_2MoO_4) a uma solução aquosa e se observou a inibição da indução de cancro em ratos. A sua acção no esófago e estômago de ratos foi descrita por Komada *et al.* (1990). Surgiu mais tarde o estudo de Fujita *et al.* (1992), no seguimento dos trabalhos de Yamase *et al.* (1988), onde se aprofundou o estudo de estruturas que formam agregados rodeados de átomos de oxigénio, os polioxomolibdatos. O composto $[\text{NH}_3\text{Pr}^i]_6[\text{Mo}_7\text{O}_{24}]$, constituído por 7 átomos de Mo organizados de forma octaédrica, apresentou uma boa actividade anti-tumoral no cancro do colo do útero de ratos. Mais tarde, Mitsui *et*

al. (2006) voltaram a testar a actividade anti-tumoral deste complexo na linha celular humana derivada cancro gástrico e também confirmaram o seu sucesso nesta linha. Em 2008, Ogata *et al.* estudaram novos complexos de polioxomolibdato, sintetizados a partir da redução do $[\text{NH}_3\text{Pr}^{\text{I}}]_6[\text{Mo}_7\text{O}_{24}]$. Tiveram como objectivo observar a indução da apoptose. Foi efectivamente possível observar este tipo de morte celular na linha celular derivada do cancro gástrico humano e em células derivadas de cancro pancreático humano, sendo este complexo mais citotóxico que o original.

Em 2000, Hall *et al.* estudaram novos complexos de molibdénio, complexos estes acoplados a ligandos de carbono, C_2B_4 e C_2B_3 . Os resultados deste estudo permitiram aferir que estes complexos fragmentam o DNA de células leucémicas e de linfomas assim como a inibição da actividade do topoisomerase II.

Em 2006, Cindrić *et al.* sintetizaram novos compostos de Mo, γ -octamolibdatos contendo aminoácidos e péptidos. Observaram a inibição do crescimento celular na linha celular derivada do cancro da mama humano e na linha celular derivado do cancro hepático.

Jelkic-Stankov *et al.* (2006) relataram que os complexos de Mo e W tinham capacidade de complexar moléculas biologicamente activas, como aminoácidos, sistemas enzimáticos e factores responsáveis pelo estado anti-oxidativo. Em relação à sua toxicidade observaram que esta é aumentada com sulfitos devido à inibição da actividade do sulfito oxidase hepático. Sabe-se também que quantidades vestigiais deste complexo são inofensivas, tanto para os animais como para os humanos. A sua toxicidade aguda foi apenas estudada em experiências animais.

Mais recentemente Matos *et al.* (2008) patentearam vários complexos de molibdénio (II) com citotoxicidade, em diferentes linhas celulares.

1.6 Enquadramento e objectivos

O presente trabalho enquadra-se no Mestrado em Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e centra-se na determinação da acção

biológica de novos compostos com potencial antiproliferativo, visando o seu eventual desenvolvimento como moléculas de interesse farmacológico em doenças cancerígenas. Os novos compostos a testar neste trabalho são complexos organometálicos de molibdénio e tungsténio, sintetizados no grupo de Química Inorgânica e Teórica.

O objectivo geral do presente trabalho foi a avaliação da actividade citotóxica de 8 compostos em três linhas celulares, HeLa (linha celular derivada do cancro cervical humano), MCF-7 (linha celular derivada do cancro mamário humano) e N1E-115 (neuroblastoma derivado de rato).

Numa segunda fase, para os compostos mais promissores (menores valores de IC_{50}) fizeram-se estudos biológicos e físico-químicos no sentido de contribuir para o conhecimento do seu mecanismo de acção.

2. MATERIAIS E **MÉTODOS**

2 Materiais e métodos

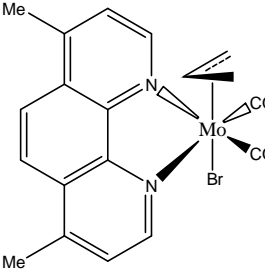
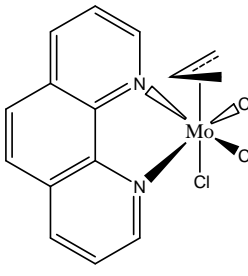
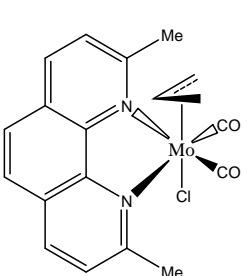
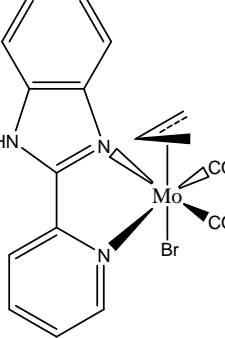
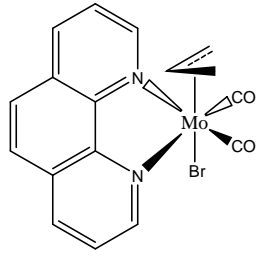
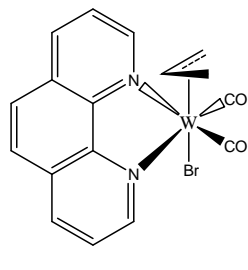
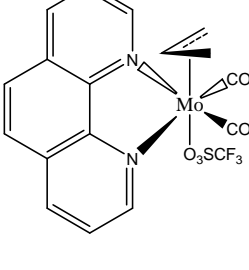
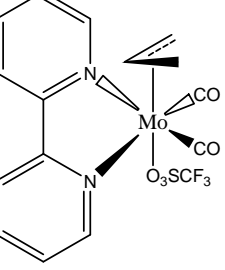
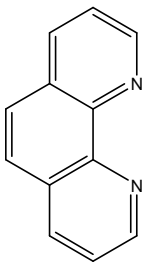
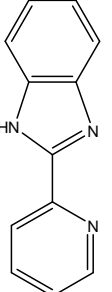
2.1 Compostos químicos em estudo

Os compostos químicos estudados foram os complexos organometálicos de molibdénio (II) e de tungsténio (W), assim como os seus ligandos de azoto livres (Tabela I).

Os compostos testados foram sintetizados pelo grupo de Investigação de Química Inorgânica e Teórica do Centro de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL).

Os complexos foram preparados através das reacções entre $[\text{Mo}(\eta^5\text{-C}_3\text{H}_5)(\text{CO})_2(\text{NCMe})_2\text{X}]$ e os ligandos, 1,10-fenantrolina (Ligando I), 2-(2'-piridil)-benzimidazole (Ligando J) ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$; $\text{X} = \text{Br}, \text{J}$) e o 2,2'-bipiridil e, de igual forma foi sintetizado um complexo organometálico de tungsténio a partir de $[\text{W}(\eta^5\text{-C}_3\text{H}_5)(\text{CO})_2(\text{NCMe})_2\text{Br}]$. Os complexos em estudo não são solúveis em água, pelo que foram dissolvidos no solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO, Lab-Scan-analytical science), previamente esterilizado.

Tabela I: Complexos organometálicos de molibdénio e tungsténio estudados.

A	B	C	D
			
E	F	G	H
			
I		J	
			

2.2 Linhas celulares

No presente trabalho foram utilizadas três linhas celulares tumorais, duas humanas, células epiteliais do cancro cervical humano (HeLa) e células epiteliais do cancro mamário (MCF-7), e uma outra derivada de neuroblastomas de rato (N1E-115). Todas estas linhas provêm de culturas primárias e têm a capacidade de se multiplicar indefinidamente, desde que se criem as condições apropriadas para o seu crescimento e proliferação (Freshney, 1987).

2.2.1 Células epiteliais do cancro cervical humano (HeLa)

HeLa foi a primeira linha celular cancerígena humana contínua estudada. Foi pela primeira vez diagnosticada em 1952 numa mulher afro-americana e, por análises subsequentes da patologia e fenótipo do tumor, identificou-se este tumor como um adenocarcinoma raro. Visto ter sido a primeira a ser vastamente cultivada, apresenta uma adaptação muito forte às condições de cultura. Tem uma aparência fenotópica tipicamente epitelial (Fig. 6), de rápido crescimento (duplicação em cerca de 24 h), e não possui inibição por contacto (Rahbari *et al.*, 2009).



Fig. 6: Imagem morfológica da linha celular HeLa (Adaptado de [2]).

2.2.2 Células epiteliais do cancro mamário (MCF-7)

Esta linha celular é amplamente usada em estudos do cancro da mama e estudos de mecanismos de acção hormonais (Fig. 7). Foi isolada em 1970 de uma mulher em fase de pós-menopausa com cancro da mama metastático, na Fundação de Cancro de Michigan. Estas células expressam receptores com funções biológicas para variadas hormonas, incluindo estrogénio, progesterona, glucocorticóides, insulina entre outros (Osborne *et al.*, 1987). São considerados receptores de estrogénio, bem caracterizados (ou seja, as células são positivas para os receptores de estrogénio citoplasmáticos) (Hamelers *et al.*, 2003). A homeostasia desta linha necessita que exista um balanço da proliferação celular com a morte celular programada, apoptose. Muitos tumores respondem inicialmente à terapia e as células morrem, mas acontece que posteriormente, muitas delas ganham resistência a esses tratamentos, como é o caso da doxorrubicina e da cisplatina (Simstein *et al.*, 2003).

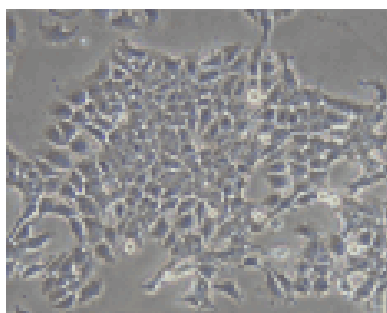


Fig. 7: Imagem de uma monocamada de células MCF-7 (20 X), retirada por microscopia óptica (Adaptado de [3]).

2.2.3 Neuroblastomas (N1E-115)

Esta linha deriva de um clone celular de neuroblastomas de rato C-1300. É considerada uma linha económica, de fácil cultura, crescimento e diferenciação (Fig. 8-A). Após a diferenciação perde a capacidade de se multiplicar, originando longos prolongamentos citoplasmáticos e membranas altamente excitáveis (Rodrigues *et al.*,

2005) que produzem enzimas que metabolizam neurotransmissores (tirosina hidroxilase e acetilcolinesterase) (Kimhi *et al.*, 1976) (Fig. 8-B). Estas células proliferam facilmente em meio de cultura normal iniciando a sua diferenciação após a adição de 1 % DMSO ao meio (> 1 % inibição da mitose) (Rodrigues *et al.*, 2005).

No presente trabalho testou-se os compostos em neuroblastomas não diferenciados (NDif) e diferenciados (Dif), sendo estes últimos mais complexos e porventura mais qualificados para estudos posteriores (Rodrigues *et al.*, 2005).

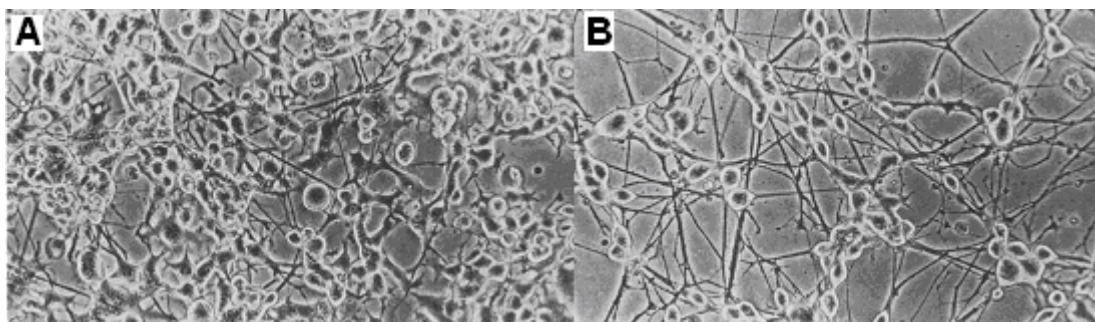


Fig. 8: Aparência morfológica de células N1e-115 confluentes. **A** – células controlo, não diferenciadas (NDif); **B** – células plaqueadas na presença de 1 % DMSO, células diferenciadas (Dif), (Adaptado de Kimhi *et al.*, 1976).

2.3 Manutenção das culturas celulares

A manutenção da cultura celular foi feita em superfícies planas de plástico, em frascos e placas, de modo a permitir o crescimento de células, *in vitro*, formando uma monocamada celular (Freshney, 1987).

Na manutenção das culturas celulares trabalhar em condições de assepsia é fundamental e, para isso recorreu-se à sala de cultura celular onde se encontra uma câmara de fluxo laminar (Esco, classe II), uma incubadora de CO₂ (Shel Lab), um microscópio óptico (Motic). Todos estes aparelhos estão instalados numa sala isolada que é limpa com grande regularidade. A câmara permite trabalhar em condições de esterilidade, protegendo tanto o operador como os produtos manipulados. Para além de as células necessitarem de um suporte sólido para crescerem e se dividirem, são sensíveis a vários factores, como o pH, temperatura, pressão e composição do meio, sendo incubadas na estufa de CO₂, que proporciona um ambiente constante e

reproduzível para o seu crescimento: temperatura de 37°C, humidade relativa de 90 % e concentração de CO₂ de 5 %, assegurando assim um pH de 7,0-7,2. O microscópio óptico permitiu ir controlando a confluência das placas e o possível aparecimento de contaminações. O operador deve usar bata e luvas descartáveis e, antes de entrar em contacto com o material, deve desinfectar sempre as mãos com álcool a 70 % (suficiente para desinfectar sem haver risco de combustão). Alguns materiais são adquiridos já estéreis e os que não são, passam pela autoclave, que os esteriliza usando o calor húmido e pressão. Antes de entrar para a câmara todos os reagentes e utensílios são desinfectados com álcool a 70 %. Dentro da câmara apenas deve estar o material essencial para o trabalho para não perturbar o normal fluxo de ar dentro desta. Todas as pipetas volumétricas, pontas, frascos e caixas são descartáveis e, após utilização, são desinfectados com lixívia e por último descontaminados na autoclave.

2.3.1 Preparação do meio de cultura

É essencial ter um meio de cultura suplementado com aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos, soro, proteínas (em meios sem soro) e antibióticos para que haja um bom crescimento e diferenciação celular.

Ambas as linhas celulares tumorais humanas foram cultivadas, em meio RPMI 1640 (Lonza) suplementado com 10 % de soro fetal de bovino (FBS, Cambrex), 1 % de L-glutamina (Lonza) ($2,10^{-3}$ mol/dm⁻³), 1% de antibiótico (P/S: penicilina/ estreptomina, Lonza) e mantidas em monocamada na incubadora de CO₂. A linha celular tumoral neuronal foi cultivada em DMEM (Lonza), sendo este suplementado com 10 % de FBS, 0,1 % de P/S e 1 % de glutamina. O meio de diferenciação continha, além dos suplementos atrás referidos 1 % de DMSO. Os meios suplementados são armazenados a 4°C.

As células foram cultivadas em placas de 100 mm, com uma área de 60,09 cm² (Orange Scientific) ou em frascos *OrCap* com uma área de 150 cm² (Orange Scientific).

Quando necessário o meio foi substituído pelo seguinte procedimento: o meio de incubação foi aspirado e, de seguida lavou-se a placa com um volume suficiente de PBS (Lonza) para abranger a totalidade da placa para remover vestígios de meio. Seguidamente, adicionaram-se cerca de 9 ml de novo meio suplementado e acompanhou-se diariamente o desenvolvimento das culturas utilizando um microscópio óptico. Quando se observou uma confluência de cerca de 80-90 % procedeu-se à tripsinização (ponto 2.3.2) e cultivo em novas placas/ frascos.

2.3.2 Tripsinização

Como foi referido anteriormente, a tripsinização é feita quando as células apresentam cerca de 80-90 % de confluência, procedendo-se à passagem de células saudáveis para novas placas.

Devido à adesão das células à placa pela segregação de colagénio e outros componentes da matriz extracelular que se ligam ao suporte (Freshney, 1987), utiliza-se a tripsina, enzima este, que tem a capacidade de quebrar as ligações das proteínas ao suporte.

Todas as soluções utilizadas no processo foram previamente aquecidas até atingirem a temperatura óptima das células, 37°C. As células foram lavadas com PBS, (1^a a 2^{as} vezes para as células HeLa e MCF-7, e 3 vezes para as N1E-115). Esta lavagem é fundamental pois a solução salina vai eliminar vestígios de meio, meio este que contém soro que inibe o enzima tripsina, essencial no prosseguimento do processo. No caso das linhas celulares humanas (HeLa e MCF-7) adicionaram-se cerca de 2 ml de tripsina e as placas foram incubadas durante 5 minutos a 37°C, agitando-se a placa durante esse intervalo. Deste modo, cerca de \pm 90 % das células soltaram-se, ficando em suspensão. No caso das N1E-115, após a adição dos 2 ml de tripsina, retirou-se o excesso de tripsina e num movimento rápido bateu-se com a placa numa superfície dura e observou-se ao microscópio até estas se soltarem. Adicionaram-se mais 2 ml de PBS para soltar o resto das células e ressuspenderam-se num tubo falcon de 15 ml (OrTube, Orange Scientific). Em cada nova placa de

100 mm adicionaram-se cerca de 1/3 das células da placa de origem e acrescentou-se a quantidade de meio suplementado de forma a ter um volume final de 10 ml.

2.3.3 Contagem de células

A partir de uma suspensão de células facilmente se pode determinar a concentração celular com base no número de células existente num determinado volume. Para isso, recorreu-se à utilização de uma câmara de *Neubauer* ou hematocitómetro (Fig. 9-A) que se adapta ao microscópio óptico. A câmara é muito semelhante a uma lâmina, dividida em duas partes iguais. Cada uma delas apresenta 5×5 quadrados, no centro, possuindo uma depressão de volume $1,0 \times 10^4$ ml, na qual se introduz a suspensão celular (Fig. 9-B). Para proceder à contagem homogeneizou-se bem a suspensão de células, ressuspendendo-se várias vezes de forma a evitar sedimentação ou formação de aglomerados por parte das células, transferindo-se por capilaridade cerca de 20 μ l para as 2 câmaras (10 μ l para cada) do hematocitómetro. Para a contagem, recorreu-se a um contador estatístico e ao microscópio óptico (ampliação $40\times$). Contadas as células nas duas câmaras, calculou-se a média e multiplicou-se o valor obtido por 10^4 de forma a obter o número de células por ml.

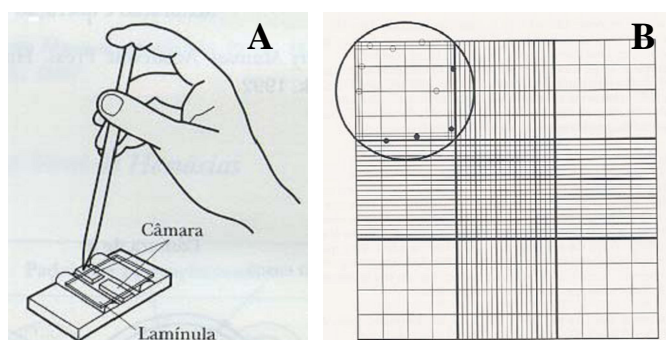


Fig. 9: **A)** Hematocitómetro; **B)** Representação da depressão de volume $1,0 \times 10^4$ ml onde se coloca a suspensão de células e a partir da qual se vai contar e estimar o número de células por ml (Adaptado de [4]).

2.4 Preparação das soluções dos compostos organometálicos

Os compostos organometálicos de molibdénio foram dissolvidos em DMSO para uma concentração final de 100 mM. Para a preparação da gama de concentrações (1-1000 μ M para os compostos B, D, E, G e H e 1-10 μ M para os compostos A e C) de composto, prepararam-se as soluções no respectivo meio de cultura. No caso dos ensaios de estabilidade, prepararam-se também soluções em PBS e no caso das medições de viscosidades começou-se por dissolver o composto em DMSO (5 μ l) e prepararam-se as soluções em tampão PES (5 ml).

2.5 Testes de inibição do crescimento/ viabilidade celular

De forma a avaliar a inibição do crescimento pelos complexos organometálicos, as células foram semeadas em microplacas de 96 poços (Orange Scientific), e incubadas a 37°C numa atmosfera de 5 % de CO₂. O uso destas placas permitiu testar várias amostras em simultâneo. Foram semeadas cerca de 2500 células por poço de forma a haver cerca de 5000 células/poço ao fim de dois dias. No final desse período, tendo as células já duplicado e fixado à placa, o meio foi removido e foram aplicadas as soluções dos compostos em estudo. A cada poço adicionaram-se 100 μ l de solução de composto. O esquema de aplicação está representado na figura 10. A cada gama de concentrações correspondem 10 poços, sendo os poços centrais relativos a três controlos: o 1º controlo continha apenas meio de cultura assegurando uma densidade óptima e ajudando a confirmar a viabilidade e homogeneização celular (controlo positivo); o 2º controlo constituído por meio contendo 2 μ l DMSO, serviu de branco para as soluções preparadas com esta quantidade de DMSO, e por último, o 3º controlo constituído por meio contendo 20 μ l de DMSO, funcionou como branco para as restantes soluções preparadas com aquela quantidade de DMSO.

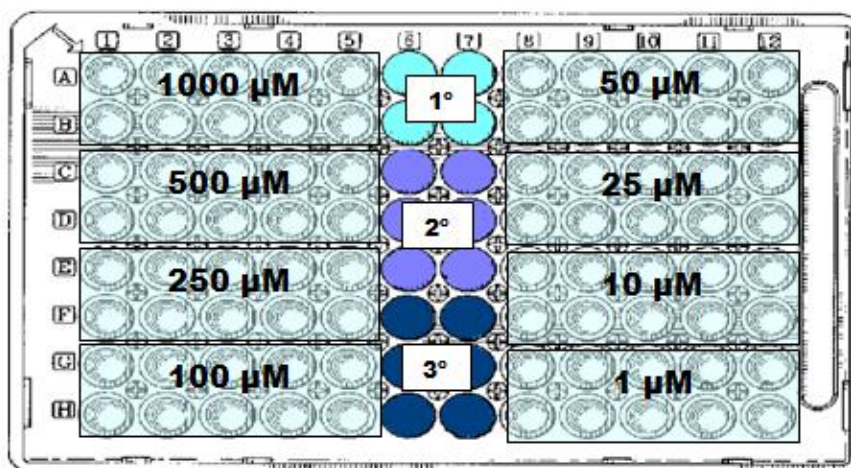


Fig. 10: Esquema de aplicação da gama de concentrações do composto e dos controlos, nas placas de 96 poços (1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10 e 1 μM); no centro estão os 3 controlos: 1º corresponde ao meio (controlo negativo); 2º corresponde ao meio com 0,1 % DMSO e o 3º corresponde ao meio com 1 % DMSO.

2.5.1 Ensaio de MTT – (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

A supressão do crescimento das células tumorais pelos compostos organometálicos foi medida pelo ensaio do MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (Aldrich). Escolheu-se este ensaio por ser rápido, versátil e ter uma alta reprodutibilidade (Supino, 1995). De acordo com Liu (1999), é um ensaio quantitativo que permite determinar a interrupção de uma função bioquímica chave existente no ambiente biológico em estudo, ou seja, quantifica a actividade mitocondrial pela medição da formação de cristais de formazano de cor púrpura, no interior das células, produto formado pela redução do MTT (sais amarelos dissolvidos em água ou PBS) (Fig. 11). Esta redução ocorre principalmente dentro do mitocôndrio, através da acção da succinato desidrogenase fornecendo uma medida de função mitocondrial. O mesmo autor aponta que, estudos mais recentes demonstraram que o mitocôndrio não tem um papel exclusivo na redução do MTT, uma vez que outras fracções subcelulares importantes (incluindo a nuclear, a microsomal e a citosólica) podem igualmente reduzir o MTT, funcionando o NADH

ou o NADPH citoplasmáticos eventualmente como melhores substratos para a redução do MTT do que o próprio succinato. Esta redução só é verificada em células vivas, ou seja, metabolicamente activas.

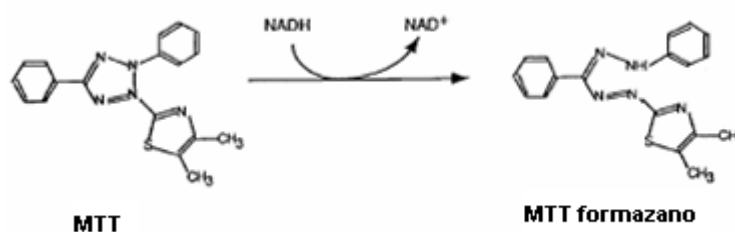


Fig. 11: Estruturas químicas do MTT e do MTT formazano (Adaptado de Liu, 1999).

O método utilizado foi adaptado de Mosmann (1983). Após 48 horas de incubação das células com o composto, nas condições descritas anteriormente, adicionou-se a cada um dos 96 poços, 10 μ l da solução de MTT (5 mg/ml preparado em PBS). O tempo de incubação variou de linha para linha, de acordo com o número de células. Para as células HeLa e MCF-7 o tempo de incubação foi cerca de 1 hora e 30 minutos, enquanto que para as N1E-115 1 hora foi suficiente para observar a formação dos cristais, recorrendo-se sempre ao microscópio óptico. Após a incubação, os cristais de formazano foram dissolvidos em 100 μ l de DMSO/poço, e quantificados por espectrofotometria (Fig. 12) (Freshney, 1987; Supino, 1995).

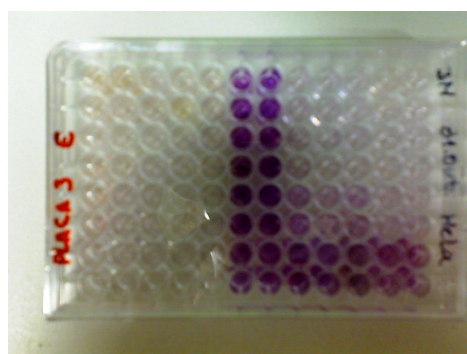


Fig.12: Placa de 96 poços onde se observaram cristais de formazano dissolvidos em DMSO, seguindo-se o ensaio com o aparecimento da cor púrpura nos poços.

As absorvências de cada poço foram determinadas a 570 nm (tendo como referência 630 nm) recorrendo-se a um leitor de microplacas (Tecan Sunrise). Antes de cada medição a placa foi agitada durante 2 segundos de forma a obter uma solução homogénea. Obtidos os valores, as placas foram lavadas com lixívia e posteriormente descontaminadas na autoclave.

Com os valores de absorvência obtidos foi possível calcular as percentagens de sobrevivência convertendo os valores a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Sobrevivência} = \frac{\text{Abs}(n^\circ \text{ decélulasvivas}(\text{incubadascomcomposto}))}{\text{Abs}(n^\circ \text{ decélulasvivas}(\text{controlo}))} \times 100$$

Após calculadas as percentagens de sobrevivência e respectivos desvios padrão determinou-se a concentração de composto que inibe em 50 % o crescimento celular em cada poço, a que se dá o nome de IC₅₀. Para esse efeito usou-se o pacote estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software) a partir do qual se calcularam os valores de IC₅₀ através de uma regressão não linear. Através deste programa foi também possível obter as curvas de citotoxicidade para cada composto e concluir quais os compostos mais promissores, excluindo aqueles que tiveram uma fraca ou mesmo nula capacidade de inibição do crescimento celular.

2.5.2 Estudos da cinética de actuação dos complexos

Para a realização dos ensaios utilizaram-se microplacas de 96 poços, e de acordo com o valor de IC₅₀ determinado, prepararam-se as soluções dos compostos com a concentração correspondente para realizar os ensaios. Após a realização de alguns ensaios preliminares, os tempos de contacto escolhidos foram de 1, 2, 3 e 48 horas, sendo incubados a 37°C em atmosfera de 5 % de CO₂. Ao fim dos períodos de tempo seleccionados, retirou-se o meio com o composto e adicionou-se novo meio de cultura. No fim das 48 horas realizou-se o ensaio de viabilidade celular (Método de Mosmann, ponto 2.5.1).

2.6 Crio-preservação e descongelamento

A crio-preservação consiste no armazenamento de material biológico em azoto líquido a -196°C para uma preservação a longo prazo, ou a -80°C para uma preservação a curto prazo.

O objectivo da crio-preservação no presente estudo teve como base a criação de stocks de células, de forma a evitar a necessidade de ter linhas celulares indefinidamente em cultura. Para além disso, reduz o risco de contaminação microbiana, de contaminação cruzada com outras linhas celulares, de alterações morfológicas, redução de custos e produtos (Freshney, 1987). Deve-se ter um conhecimento prévio dos mecanismos bioquímicos e biofísicos da resposta dos tecidos à desidratação e ao congelamento, de forma a criar um protocolo viável (Izulmé, 2000).

Para a realização deste processo partiu-se de placas com uma confluência de aproximadamente 80-90 %. Após tripsinização, transferiu-se a suspensão para um microtubo e submeteu-se as células a uma centrifugação de 9 minutos a $3000 \times g$. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células, dentro de microtubos estéreis, (Cryovial Simport). Para as células HeLa e MCF-7 adicionou-se 10 % DMSO e 90 % de FBS, nas N1E-115 adicionaram-se 20 % de FBS, 10 % de DMSO e 70 % de meio. Após a suspensão, as células foram guardadas e imediatamente colocadas num refrigerador, Cryfreezer (Nalgene), composto por um anticongelante, o etilenoglicol, que possibilita um congelamento lento e controlado (cerca de -1°C por minuto). Este congelamento lento visa não danificar as células. O refrigerador foi armazenado numa arca refrigeradora (Snijders) a -80°C durante a noite. No dia seguinte, quando o objectivo era o armazenamento de longa duração, os tubos foram colocados em azoto líquido.

Tal como o congelamento, o descongelamento é também uma etapa crítica num protocolo de crio-preservação. Durante esta fase poderão formar-se cristais de gelo, que danificam as células, logo este processo deve ser rápido, por imersão em água, a $35-40^{\circ}\text{C}$ (Izulmé, 2000). As células foram seguidamente incubadas à temperatura ambiente durante um minuto, seguido de outro minuto, num banho a 37

°C. Com uma pipeta volumétrica retiraram-se as células e semearam-se numa placa de 100 mm, adicionando-se 9 ml de meio suplementado, previamente aquecido. A placa foi colocada na incubadora de CO₂ a 37°C.

2.7 Estudos de interacção dos compostos com o DNA

A importância deste estudo remete-se ao facto do DNA ser o primeiro alvo intracelular de drogas anti-tumorais. Têm sido feitos vários estudos sobre interacções de complexos metálicos de transição com o DNA (Xu *et al.*, 2003; Nagababu *et al.*, 2007) e dos seus ligandos, com especial interesse para os ligandos estudados no presente trabalho: 1,10-fenantrolina (I) e 2-(2'-piridil)-benzimidazole (J).

Devido à presença na estrutura do DNA de bases aromáticas (adenina, timina, guanina e citosina), é possível realizar ensaios espectrofotométricos. A detecção/quantificação do DNA é feita a 260 nm.

2.7.1 Estabilidade dos compostos organometálicos

Visto que as células estão em contacto com os vários compostos durante 48 horas, foi essencial estudar a estabilidade destes ao longo do tempo. Numa primeira análise traçaram-se espectros UV/Visível (Jasco V560) de soluções dos compostos em PBS e em meio RPMI, ao fim de vários períodos: 0, 2, 24 e 48 horas de incubação. Como brancos utilizaram-se, respectivamente, PBS e meio, com a quantidade de DMSO usada para preparar as soluções com os compostos (ver ponto 2.5). Foram estudados os compostos B e E, por serem dos que apresentavam menores valores de IC₅₀. Estas medições foram feitas a 20°C em cuvetes de quartzo de 1 cm de largura e devidamente agitadas durante cerca de 5 minutos (Asadi *et al.*, 2004; Nagababu *et al.*, 2007).

2.7.2 Espectroscopia de absorção

A aplicação da espectroscopia de absorção electrónica é uma das técnicas mais usadas para os estudos de ligação ao DNA (Nagababu *et al.*, 2007). Com estes ensaios é possível aferir o tipo de interacção entre os vários complexos e o DNA.

Estudos anteriores indicam que a ligação dos complexos metálicos ao DNA através de intercalação resultava num hipocromismo (diminuição da absorvidade molar) ou no batocromismo (deslocamento para a região do vermelho do comprimento de onda de absorção máxima) no DNA devido a uma interacção forte entre os cromóforos aromáticos e os pares de bases do DNA. A extensão do fenómeno hipocromático está directamente ligada à força de ligação intercalante, ou seja, quando o DNA se encontra na sua forma nativa os electrões π dos anéis aromáticos estão nos níveis de energia mais baixos, absorvendo a um comprimento de onda inferior. Pelo contrário quando o DNA está intercalado com algum composto ou está desnaturado, os electrões movimentam-se com uma maior liberdade entre os vários níveis de energia, aumentando a absorvência (Nagababu *et al.*, 2007).

O espectro de absorção de um cromóforo é determinado pela estrutura química da molécula mas também por factores relacionados com o meio como, mudanças no pH (que induzem mudanças estruturais da molécula), polaridade do solvente ou de moléculas vizinhas e a orientação relativa de cromóforos vizinhos (Asadi *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2007).

Para a realização destes estudos, preparou-se uma solução de DNA de testículo de Salmão (Sigma) de 200 mg/ml em tampão PES (tampão fosfato 0,1M pH 7 NaCl 100 mM EDTA 0,1 mM), efectuando-se as medições a 20°C em cuvetes de quartzo de 1 cm de largura devidamente agitadas durante cerca de 5 minutos. Para isso, foram feitas medições em que a concentração do composto foi sempre fixa (50 μ M) e a concentração de DNA aumentada, adicionando-se volumes crescentes de DNA (10, 20, 30, 40, 50 e 60 μ l) com o intuito de observar possíveis intercalações dos compostos com o DNA. Entre cada adição aguardou-se 10 minutos.

2.7.3 Determinação de viscosidades

A viscosidade (inverso de fluidez) de um líquido mede o atrito interno oferecido ao movimento relativo de diferentes partes desse líquido. Num escoamento existem forças dissipativas provocadas pelas moléculas do fluído que vão provocar resistências ao seu movimento (Russo, 2008). É uma característica particular de cada líquido e é quantificada pelo coeficiente de viscosidade, η . Este está dependente da temperatura (o aumento desta provoca a diminuição da viscosidade) e é independente da pressão, exceptuando para pressões muito elevadas. Numa tentativa de identificar os possíveis modos de ligação do composto ao DNA mediram-se as viscosidades de solução de DNA na ausência e na presença dos compostos em estudo à temperatura de 25°C (*e.g.* Suh & Chaires, 1995).

Para proceder à determinação das viscosidades, começou-se pela calibração do viscosímetro capilar (Fig. 13): ligou-se o termóstato de forma a obter uma temperatura de 25°C. De seguida encheu-se o viscosímetro capilar com água até ao menisco do bolbo inferior e aguardou-se cerca de 15 minutos para se atingir a temperatura pretendida. Bombeou-se a água até ultrapassar o menisco do bolbo superior do viscosímetro e accionou-se o cronómetro *Viscoclock* (Schott Instruments) quando a água passa um pouco antes do menisco anteriormente referido. Após a paragem do cronómetro registou-se o valor do tempo de escoamento para a respectiva temperatura. Efectuaram-se vários ensaios para a mesma temperatura e para o mesmo líquido, de modo a ter um valor médio do tempo de escoamento.

O banho (Julabo ME-18V com controlo de temperatura) utilizado serviu para manter a temperatura das amostras nos 25° C. O fluído deste banho é constituído por água e etilglicerol. Usou-se um viscosímetro de escoamento capilar de vidro (Cannon: Ostwald) (Fig. 13) que permite a medição de viscosidades de substâncias puras ou de misturas. O líquido em contacto com a parede do capilar possui velocidade igual a zero, atingindo a velocidade máxima no centro do capilar. Num líquido muito viscoso, a velocidade varia pouco da parede para o centro do capilar e o líquido escoar lentamente, acontecendo o contrário num líquido pouco viscoso. A viscosidade (η) é proporcional ao tempo de escoamento mas inversamente

proporcional ao gradiente de velocidade de escoamento do fluido. O tempo que um dado volume de fluido demora a escoar através do capilar, foi a grandeza utilizada para medir esta propriedade.

Após lavagem e secagem cuidadosa, encheu-se o viscosímetro com a solução a medir, cerca de 5 ml. Esperou-se 10 minutos para a solução atingir a temperatura desejada (25° C). De seguida, com uma mangueira de azoto bombeou-se a solução até esta ultrapassar o menisco do bolbo superior (Fig. 13) e accionou-se o cronómetro. A contagem iniciou-se quando a solução passa o 1º menisco. Para a contagem, registou-se o tempo de escoamento. Este ensaio foi repetido várias vezes com o mesmo composto, de forma a ter um desvio padrão inferior a 0,01.

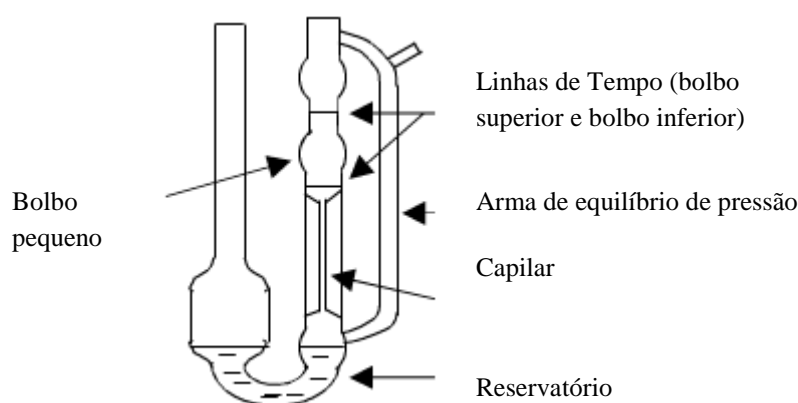


Fig. 13: Viscosímetro de Ostwald (Adaptado de Russo, 2008).

Para o cálculo da viscosidade cinemática (η) (mPa.s) usou-se a equação: $\eta = K \times t$, em que k ($\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-2}$) corresponde à constante do viscosímetro e t (s) ao tempo de escoamento da solução entre as duas marcas no capilar.

O estudo iniciou-se com a determinação dos tempos de escoamento dos vários controlos, sendo posteriormente medidas as soluções de DNA com os compostos seleccionados. Preparou-se a solução de DNA de testículo de salmão (50 μM) (Sigma) em tampão PES (tampão fosfato 0,1 M, pH 7, NaCl 100 mM, EDTA 0, mM) e os compostos foram dissolvidos em DMSO. O DMSO é um solvente orgânico incolor e é relativamente denso (1,1004 g/cm^3). Para além disso, sabe-se que este composto químico tem uma capacidade higroscópica elevada, devido à sua intensa afinidade com o hidrogénio, formando pontes mais fortes comparativamente

com as formadas entre moléculas de água isoladas (Shashkov *et al.*, 1999). Assim, era importante observar se este solvente teria algum efeito sobre a viscosidade da solução de DNA. Os primeiros brancos (controles) foram soluções de tampão PES em DMSO e de DNA com DMSO (as soluções foram preparadas com quantidades crescentes de solvente orgânico até se atingir o máximo de 1 %, isto porque acima deste valor o DMSO por si só, é tóxico para as células). Preparou-se também um controlo positivo, solução de DNA com um agente intercalador conhecido, o brometo de etídio (BrEt), de forma a ter algum termo de comparação, facilitando a análise dos resultados obtidos. Foram testados três dos compostos com maior capacidade de inibição (B, D e E), previamente dissolvidos em DMSO. Meia hora antes de se iniciarem as medições, adicionou-se o composto à solução de DNA deixando em agitação lenta durante esse tempo. A gama de concentrações foi de 0 a 100 μM para um volume final de 5 ml.

2.8 Estudos biológicos

Estes estudos tiveram como objectivo determinar se os compostos estudados interactuavam com o DNA e em caso positivo, tentar identificar possíveis mecanismos de morte celular.

2.8.1 Extracção de DNA celular

Com o objectivo de averiguar se a capacidade inibitória dos compostos organometálicos no crescimento celular estava relacionada com a danificação do DNA, incubaram-se as células durante 48 horas com os compostos e extraiu-se o DNA das várias preparações. Para cada linha testaram-se três compostos em três concentrações (10, 50 e 100 μM) e fez-se um controlo com células que não estiveram em contacto com composto.

As células foram incubadas em placas de 100 mm a 37 °C numa atmosfera de 5 % CO_2 , até se formar uma monocamada de células. De seguida, retirou-se o meio

de cultura existente na placa e adicionou-se novo meio com o composto na concentração pretendida. Após nova incubação das células durante 48 horas a 37° C numa atmosfera de 5 % de CO₂, estas foram raspadas para o meio, e transferidas para um tubo falcon de 15 ml. Foram centrifugadas a 1500 × g, durante 10 minutos. Retirou-se o meio e ressuspendeu-se o sedimento resultante em 0,5 ml de TE (Tris Cl 10 mM; pH 8,0; EDTA 1 mM) num microtubo de 2 ml. Adicionou-se o enzima proteinase K para uma concentração final de 100 µg/ml e 0,5 % do detergente, SDS que actua desnaturando as proteínas em solução. A suspensão foi incubada durante uma hora a 50° C. Extraíu-se o DNA com fenol, utilizando o mesmo volume da suspensão. Desprezou-se a fase orgânica (inferior) e centrifugou-se a fase aquosa a 3000 × g durante 5 minutos, fase onde se encontra o DNA. De seguida, adicionou-se RNase para uma concentração final de 50 µg/ml e incubou-se durante uma hora a 37° C. Este enzima catalisa a degradação do RNA em componentes mais pequenos. No fim da incubação extraíu-se a solução com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) numa tentativa de eliminar qualquer vestígio proteico ou não que possa ter resistido. Posteriormente adicionou-se 1/10 de volume de NaOAc 3M, pH 5,2 e dois volumes de etanol frio. Misturou-se a solução que ficou a precipitar durante a noite a -20° C. No dia seguinte centrifugou-se a 12000 × g durante 10 minutos e ressuspendeu-se o sedimento em TE (100 µM).

2.8.2 Quantificação e análise da pureza do DNA

A quantificação do DNA foi feita por espectrofotometria, medindo-se a absorvência a 260 nm, considerando-se que uma unidade de densidade óptica (OD) corresponde a 50 µg/ml de DNA de dupla cadeia. A determinação do grau de pureza, por sua vez, foi obtida, pela razão entre as leituras Abs₂₆₀/Abs₂₈₀, sendo desejado um valor próximo de 1,8. Uma extracção deficiente, com vestígios de proteínas, RNA ou fenol, alteram esta razão impossibilitando uma quantificação exacta do DNA. Para realizar as medições fez-se uma diluição da solução de DNA de 1/200, em água.

2.8.3 Electroforese de DNA em gel de agarose

A electroforese em gel de agarose é muito usada para separar, identificar e purificar fragmentos de DNA, por aplicação de uma diferença de potencial. É relativamente simples, rápida e permite localizar o DNA pela sua coloração através de fluoróforos. Neste trabalho usou-se o BrEt. Este intercala-se na molécula de DNA a cada 2,5 pb formando ligações de *van der Waals* permitindo a observação do gel quando sujeito a luz UV. O gel de agarose permite separar fragmentos de DNA longos (50 a 20,000 pares de bases (bp)), porém tem uma capacidade de resolução intermédia. A porosidade do gel varia de acordo com o tamanho do que se pretende separar (quanto menor a concentração do gel maior a porosidade e consequentemente maiores os fragmentos de DNA que poderão ser separados) (Sambrook *et al.*, 2001). O objectivo, neste ponto do trabalho, foi de observar o estado de degradação do DNA após incubação com os compostos.

No presente estudo fizeram-se géis de agarose com concentração de 0,7 %, preparados em tampão de electroforese, TAE (Tris base 4 M, acetato de sódio 1 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8) e BrEt (1 µg/ml). Aqueceu-se a solução até ferver, arrefeceu-se e adicionou-se à placa, previamente montada com o pente, que permitiu formar os poços onde se aplicaram as amostras.

Após polimerização do gel, retiraram-se com muito cuidado os pentes, sendo o gel mergulhado em tampão de electroforese de forma a ficar totalmente submerso.

O tampão de carregamento (*loading*), contém marcadores de migração como o azul de bromofenol e glicerol que aumenta a densidade das amostras. Colocou-se em cada poço cerca de 250 µg de DNA. Em cada gel também se incluiu uma amostra de marcadores de peso molecular constituída por fragmentos do DNA bacteriófago λ digerido com o enzima Hind III. Após aplicação das amostras e controlos, forneceu-se uma corrente eléctrica ao sistema (voltagem de 12 V), e observou-se a migração das amostras do pólo negativo para o pólo positivo. Passadas cerca de 24 horas de corrida do gel, recorreu-se a um dispositivo de transiluminação (Kodak), com radiação UV que permitiu observar o DNA devido à fluorescência do BrEt.

2.8.4 Determinação da morte celular – Coloração com o corante Hoeschst 33342

A apoptose é um tipo de morte celular caracterizado por mudanças morfológicas na condensação da cromatina, degradação do envelope nuclear, fragmentação do núcleo e pela libertação de corpos apoptóticos. Por conseguinte, os marcadores de ácidos nucleicos tornam-se ferramentas úteis na identificação de células apoptóticas, no meio de uma população celular (Belloc *et al.*, 1994).

O método utilizado permite detectar diferenças na condensação da cromatina. O corante Hoeschst 33342 (HO33342, AppliedChem) (Fig. 14-A) penetra livremente em todas as células, porém apenas permanece nas células mortas ou apoptóticas, visto que as vivas têm a capacidade de o bombear para fora destas. Deste modo, os núcleos das células em apoptose ou necrose ficam marcados com uma cor azul fluorescente (Fig. 14-B) (Bungo *et al.*, 2006; Darzynkiewicz *et al.* 1997).

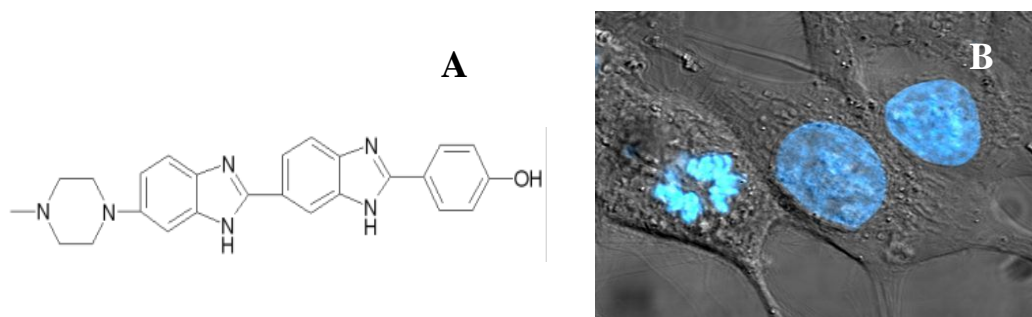


Fig. 14: **A)** Estrutura química do corante Hoeschst 33342; **B)** Exemplo da marcação nuclear deste composto, onde se observa do lado esquerdo uma célula apoptótica com o núcleo fragmentado, dividida em corpos apoptóticos e com uma maior fluorescência. Nas 2 células do lado direito observam-se núcleos inteiros, indicando a viabilidade dessas células. (Adaptado de [5]).

Para a realização deste procedimento, incubaram-se as células com três compostos (B, D e E), em três concentrações (10, 50 e 100 μM), durante 48 horas em microplacas de 24 poços (Orange Scientific). As células foram inoculadas, dentro de cada poço, sob uma lamela circular.

Como controlo negativo usaram-se células que não estiveram em contacto com os compostos e como controlo positivo utilizaram-se células que foram

incubadas com o agente oxidante, peróxido de hidrogénio (H_2O_2), conhecido indutor de apoptose, numa concentração de $500 \mu\text{M}$ durante 2 horas.

Após as 48 horas de incubação a 37°C , em atmosfera de 5 % de CO_2 , as lamelas, sobre as quais cresceram as células, foram retiradas gentilmente com recurso a uma pinça, e colocadas numa lâmina. Adicionou-se uma gota do corante HO33342 (solução de 1mg/ml), observou-se no microscópio de fluorescência (Olympus BX41) e tiraram-se diversas fotos ao acoplar uma máquina fotográfica digital ao microscópio.

2.8.5 Citometria de fluxo

2.8.5.1 Determinação da produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS)

As espécies reactivas de oxigénio (ROS) englobam várias moléculas e radicais livres (espécies químicas com um electrão desemparelhado) derivadas do oxigénio molecular. A molécula de oxigénio, no estado fundamental, corresponde a um di-radical, contendo dois electrões desemparelhados no seu exterior. Visto que os dois electrões tripleto têm o mesmo *spin*, o oxigénio apenas pode reagir com um electrão de cada vez, tendo assim uma baixa reactividade com os electrões numa ligação química. Por outro lado, a excitação electrónica do oxigénio molecular provoca a inversão de *spin* do electrão, e a molécula fica num estado excitado, denominado estado singuleto ($^1\text{O}_2$). Este estado é caracterizado por possuir *spins* opostos e, esta molécula, é considerada a forma mais reactiva do oxigénio, apresentando uma maior capacidade oxidativa (Turrens, 2003).

Neste estudo utilizou-se o corante diacetato de 2,7-diclorofluorescina (DCFH-DA) de forma a detectar os ROS intracelulares. Este composto não é fluorescente e tem a capacidade de atravessar livremente as membranas celulares, incorporando-se nas regiões lipídicas das células. Quando é removido o grupo acetato, por esterases celulares, transforma-se em 2,7-diclorofluorescina (DCFH), tornando-se fluorescente (570 nm). Vai ser medida a fluorescência que é proporcional à produção de H_2O_2

(Cárter *et al.*, 1994; Shashi *et al.*, 2006). Embora este composto não seja um radical livre é considerado como uma espécie reactiva de oxigénio, pois pode funcionar com intermediário na produção de espécies mais reactivas, como o ácido hipocloroso e o radical hidroxilo (Nordberg *et al.*, 2001)

O estudo do efeito dos complexos organometálicos na produção de ROS foi feito por citometria de fluxo (Beckman coulter Epics XL flow center), tendo os compostos sido incubados com as células durante 3 e 6 horas e, posteriormente com o corante durante 30 minutos. Foram apenas feitos estudos preliminares tendo-se estudado apenas o composto E nas concentrações de 10 e 50 μM . Foi feito um controlo negativo, com células que não estiveram em contacto com composto e um controlo positivo em que as células foram incubadas com H_2O_2 , 500 μM , durante 1 hora e 30 minutos.

2.8.5.2 Avaliação de morte celular pela dupla coloração com HO 33342/PI

A citometria de fluxo serviu para contar, examinar e classificar as células em solução.

Este processo consiste em forçar as células a passar por um tubo, muito estreito, onde existem detectores capazes de analisar as características físicas e químicas das células, separando-se subpopulações homogéneas, consoante as suas características.

Este método tem a possibilidade de combinar os sinais de dispersão com marcadores fluorescentes. As células foram coradas com dois fluoró cromos (armazenados a 4°C no escuro), que sofreram excitação do laser, emitindo uma radiação de acordo com as suas características fluorescentes. O corante HO33342 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) é incorporado pelas células apoptóticas mais rapidamente e em maior quantidade que nas células viáveis. Este marcador é excitado a 360 nm, zona ultravioleta. O outro fluoró cromos, iodeto de propídeo (PI, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) permite distinguir as células que perderam a sua integridade membranar (células necróticas e células em

estado avançado de apoptose) fluorescendo a 488 nm, na zona do vermelho (Vermes *et al.*, 2000).

Parte da execução deste trabalho foi feita em colaboração com o Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC) em Oeiras.

Para a realização desta experiência seguiu-se o protocolo de Diamond e DeMaggio (2000). As células foram incubadas durante 48 horas com os devidos compostos, nas concentrações de 10 e 50 μM , a 37°C, em atmosfera de 5 % de CO_2 . As células foram raspadas e colocadas em tubos falcon de 15 ml e centrifugadas a $3000 \times g$ durante 10 minutos. De seguida ressuspendeu-se o *pellet* em cerca de 2 ml de PBS, para lavar as células e voltou-se a centrifugar. Desprezou-se o PBS e ressuspenderam-se as células em novo meio, mantendo-as em gelo. Antes da realização da experiência, procedeu-se a uma nova centrifugação de $3000 \times g$ durante 5 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se novamente as células em cerca de 1 ml de PBS. Para o ensaio com o corante HO33342, adicionou-se 2 μl do mesmo e incubou-se durante 10 minutos. Para o ensaio com o PI, seguiu-se o mesmo protocolo e adicionou-se 3 μl de PI (5g/ml) e analisou-se por citometria de fluxo (MoFlo Stem cell Sorting da Beckman Coulter).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram utilizados compostos organometálicos com centros metálicos de molibdénio e tungsténio (ver Tabela I, Cap. 2), com estruturas químicas bem definidas, podendo estes funcionar como anti-tumorais, devido à sua baixa toxicidade em seres humanos, à sua boa capacidade de fornecer electrões para cadeias transportadoras e à sua capacidade de facilitar a formação de ligações com oxigénio, azoto e enxofre, entre outros (Stankov *et al.*; 2007 Pereira *et al.*, 2008).

3.1 Estudos de citotoxicidade

Nos dias de hoje, a utilização de culturas celulares em placas “multiposos” é uma prática corrente, para a avaliação de novos compostos com potencialidade farmacológica, pois permite a manipulação de várias amostras em simultâneo, relativa automatização por ser um procedimento de baixo custo económico (Freshney, 1987).

De forma a analisar o efeito dos vários complexos de molibdénio, nas três linhas celulares: HeLa, MCF-7 e N1E-115 (não diferenciados (NDif) e diferenciados (Dif)), estas foram tratadas com diferentes concentrações de composto (1-1000 μM), avaliando-se o seu efeito através do ensaio do MTT. Uma vez obtidos os valores correspondentes às várias concentrações dos compostos, estes foram representados num gráfico semi-logarítmico, em função da concentração de fármaco utilizada (% sobrevivência vs logaritmo da concentração (Log (C))). Na maioria das vezes, obtém-se uma curva sigmoideal, a partir da qual se determinam os valores de IC_{50} . Estes valores correspondem à percentagem de sobrevivência de 50 % de uma determinada linha celular, por inibição da sua actividade biológica. Os valores foram calculados, por uma análise de regressão não-linear, no programa GraphPad Prism5. A compilação de todos os resultados obtidos encontra-se na tabela II (página 53).

Este parágrafo tem como objectivo elucidar sobre a organização da exposição dos resultados apresentados neste ponto Começou-se por expor os resultados obtidos

para dois dos ligandos usados (I e J). São apresentados os gráficos de % de sobrevivência em função do logaritmo das concentrações escolhidas para os compostos (1- 1000 μM) e da sua respectiva estrutura. Discutem-se e comparam-se estes dois ligandos livres. De seguida são apresentados os resultados obtidos para os compostos A e C. Segue-se a apresentação e comparação dos resultados obtidos para os compostos B, E e G visto apresentarem uma estrutura muito semelhante, variando apenas num dos substituintes, Cl, Br e O_3SCF_3 , respectivamente. No seguimento destes resultados destaca-se o complexo F, que é semelhante ao complexo E, contudo o metal central é substituído por tungsténio. Por último são apresentados, individualmente os complexos D e H.

Uma das características que diferencia os compostos é o seu ligando acoplado. Assim, começou-se por testar a actividade inibitória dos dois ligandos (I e J) de forma a verificar se estes possuíam actividade anti-tumoral.

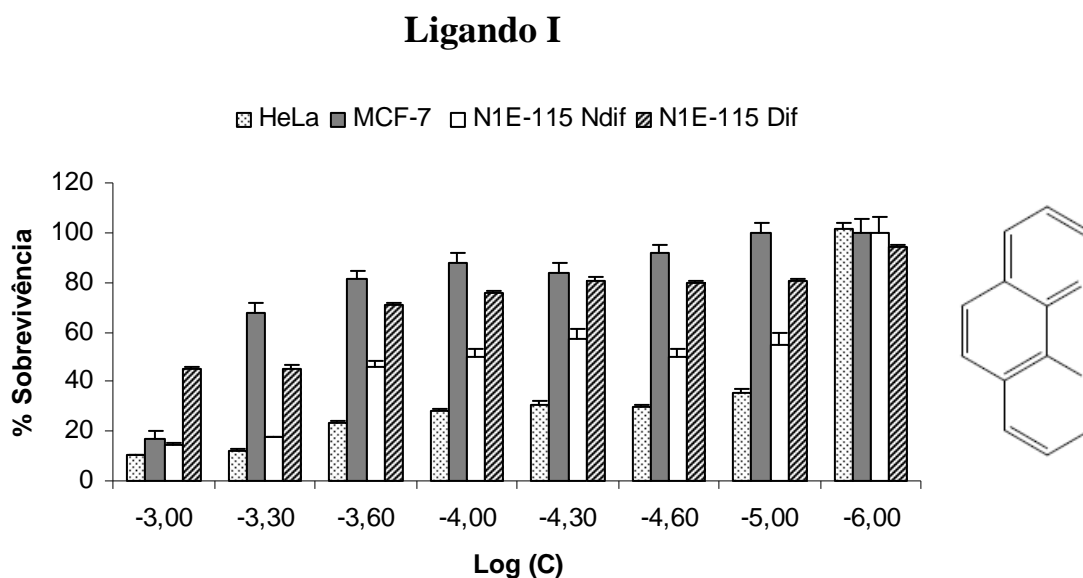


Fig. 15: Efeito do ligando I na proliferação da linha celular HeLa, MCF-7, N1E-115 NDif e N1E-115 Dif. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão, considerando os resultados obtidos para pelo menos 3 experiências independentes.

O ligando I apresentou uma boa actividade anti-tumoral para as células HeLa (2,1 μM) e N1E-115 NDif (3,1 μM). Nas células MCF-7 não foi possível calcular o

valor de IC_{50} , e para as N1E-115 Dif o valor de IC_{50} foi muito elevado, cerca de 500 μM (Tabela II, Fig. 15).

Na figura 16 estão representados os valores de sobrevivência das células, obtidos pelo ligando J numa gama de concentrações variando de 1-1000 μM .

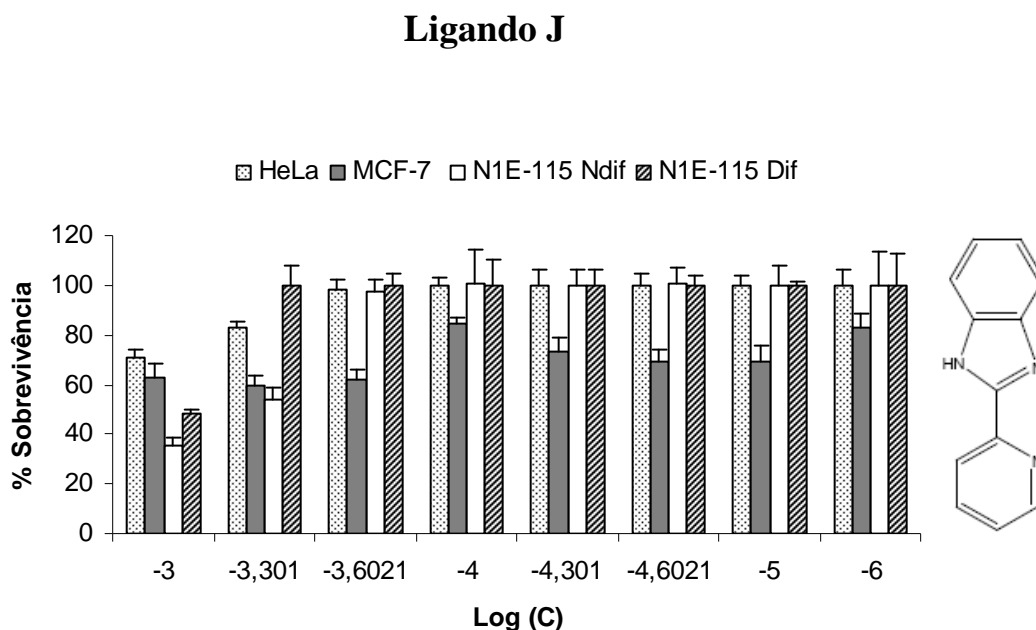


Fig. 16: Efeito do substituinte J na proliferação na linha HeLa, MCF-7, N1E-115 NDif e N1E-115 Dif. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão, considerando os resultados obtidos para, pelo menos, 3 experiências independentes.

Relativamente à estrutura de J sabe-se que ambos os heteroátomos no anel imidazole, e a posição do átomo de azoto na molécula de piridina desempenham um papel crucial para a actividade biológica (Garuti, 2004), porém este composto não apresenta actividade citotóxica significativa tendo sido impossível calcular o valor de IC_{50} para todas as linhas celulares (visto os valores de % sobrevivência serem muito altos (> 50 %) (Fig.16).

Satyanarayana *et al.* (1993) provaram que existe interacção entre o ligando I e o DNA. Para além disso, estes ligandos já foram testados acoplados a outros metais,

em diversas linhas celulares, observando-se actividades antitumorais na mesma ordem de grandeza deste estudo (Brodie *et al.*, 2004).

De seguida estão representados os gráficos referentes aos compostos A e C (Fig. 17). Ambos os compostos contêm o ligando fenantrolina (I), mas este está acoplado a dois grupos metilo em diferentes posições. Para além disso, estes complexos diferem no halogéneo (Br para o composto A e Cl para o composto C).

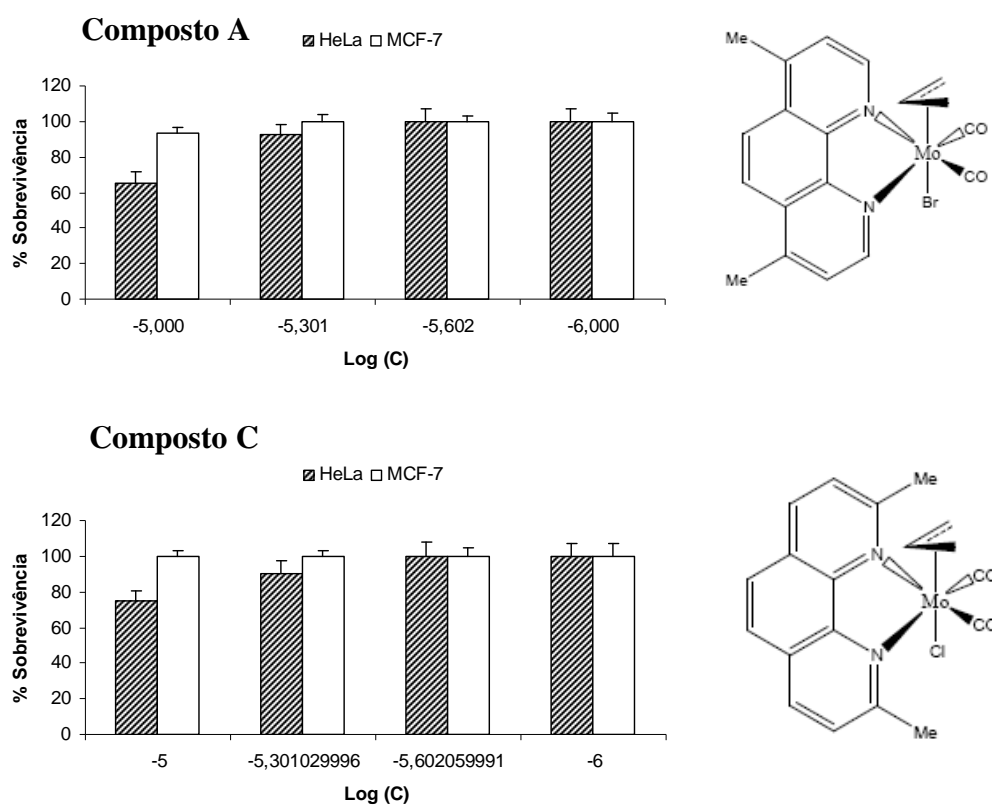


Fig. 17: Efeito do composto A e do composto C na proliferação da linha celular HeLa e MCF-7. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão, considerando os resultados obtidos para pelo menos 3 experiências independentes (gama de concentrações de 1- 10 μ M).

Os compostos A e C apresentaram uma grande dificuldade na sua dissolução, tanto em água como em DMSO, sendo esta incompleta. Contudo realizaram-se ensaios de citotoxicidade nas linhas HeLa e MCF-7 numa gama de concentração de 1 a 10 μ M. Os resultados obtidos, mostraram que não houve qualquer inibição do crescimento celular (a percentagem de sobrevivência é praticamente 100 % para todas as concentrações) (Fig. 17). Ambos os compostos têm uma característica

comum, a presença de um ligando fenantrolina (I), com dois grupos metilo em diferentes posições (4,4' e 6,6'). Pela sua polaridade, dificilmente interagem com a água, dificultando a abertura da estrutura e, conseqüentemente a sua possível interacção com o DNA. Devido a estes resultados estes compostos não foram testados na outra linha nem foram utilizados em mais estudos.

De seguida, estão representados os gráficos relativos aos compostos B, E e G (Fig. 18, 19 e 20).

Composto B

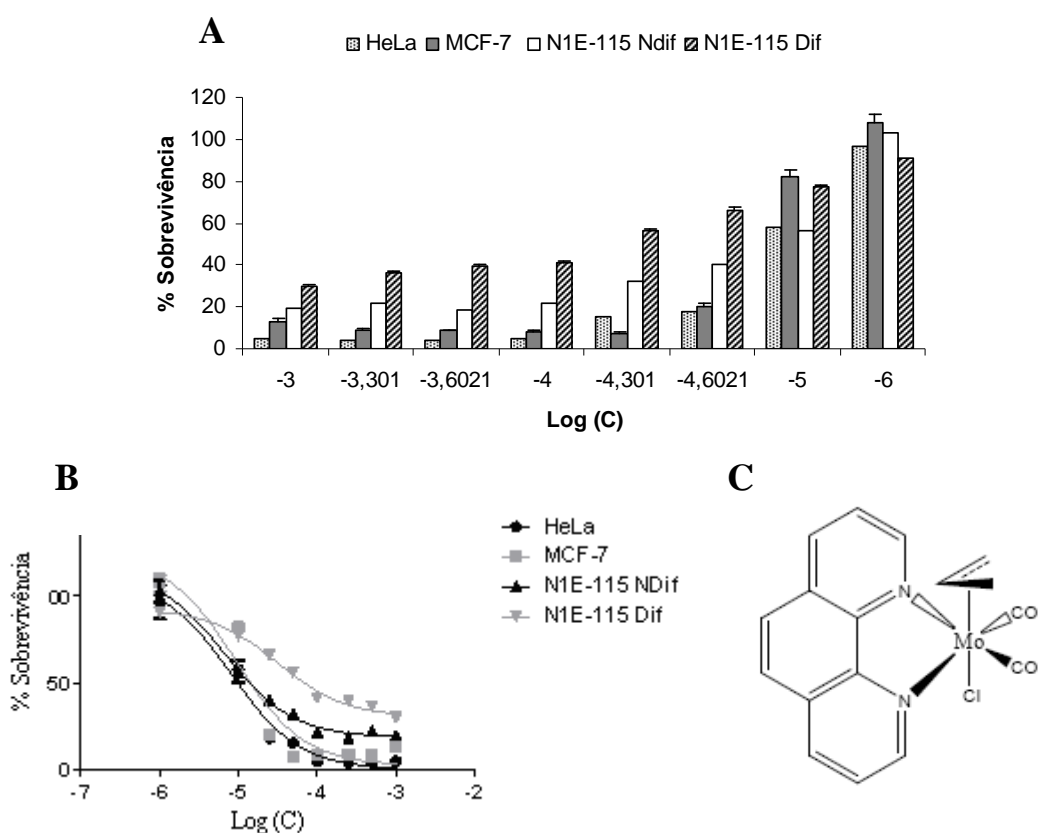


Fig. 18: Representação dos gráficos de viabilidade celular para o composto B: **A)** Percentagem de sobrevivência das células incubadas com o respectivo composto; Cada coluna representa a média \pm desvio padrão, considerando os resultados obtidos para, pelo menos, 3 experiências independentes; **B)** Curva de dose-resposta da actividade citotóxica; **C)** Estrutura do complexo.

Composto E

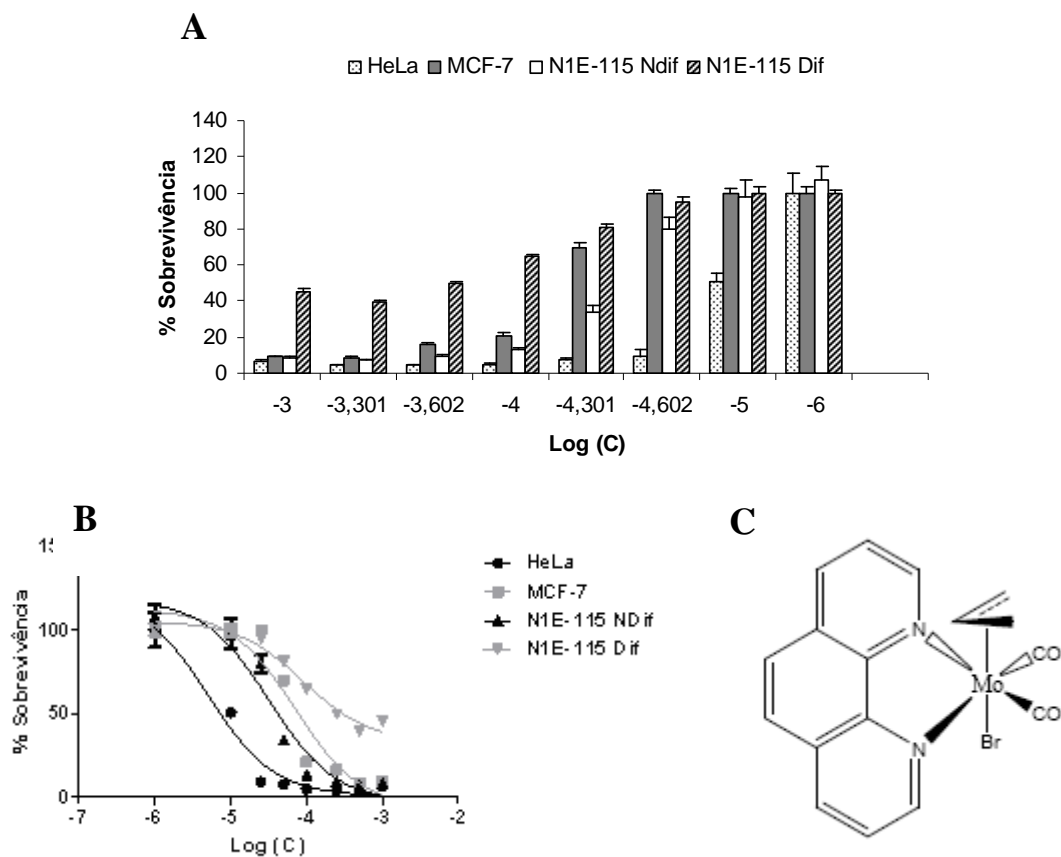


Fig. 19: Representação dos gráficos de viabilidade celular para o composto E; **A)** Percentagem de sobrevivência das células incubadas com o respectivo composto; Cada coluna representa a média \pm desvio padrão, considerando os resultados obtidos para, pelo menos, 3 experiências independentes; **B)** Curva de dose-resposta da actividade citotóxica; **C)** Estrutura do complexo.

Composto G

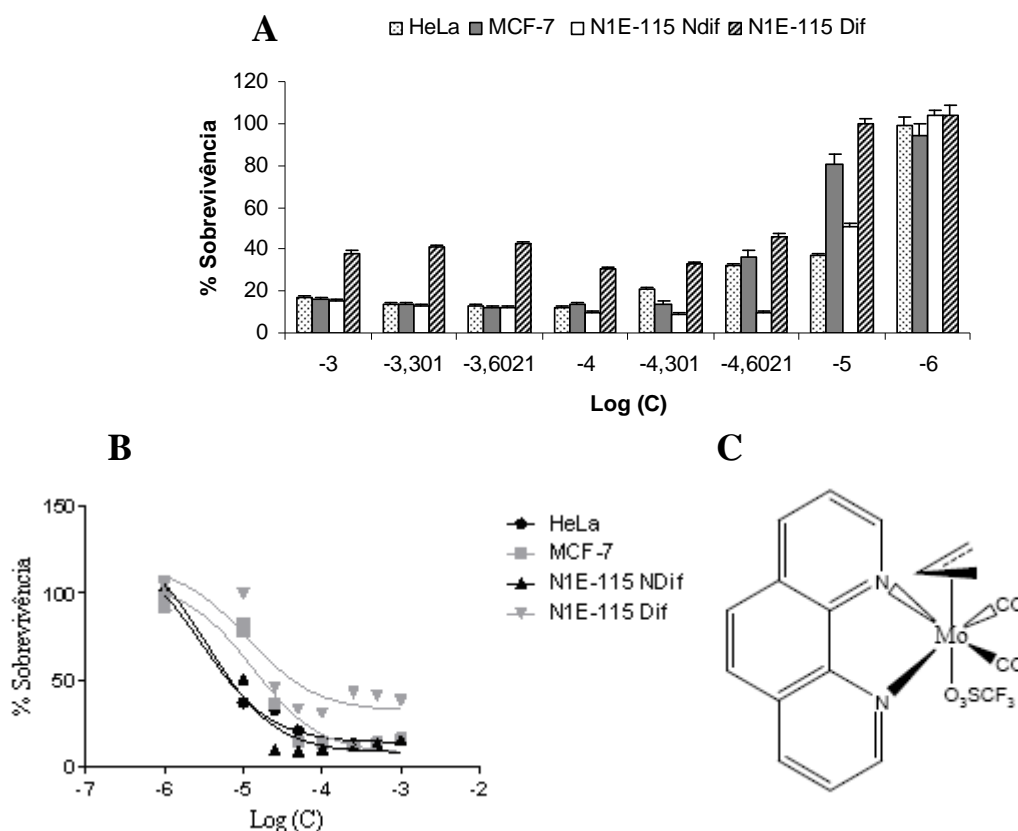


Fig. 20: Representação dos gráficos de viabilidade celular para o composto G. **A)** Percentagem de sobrevivência das células incubadas com o respectivo composto; Cada coluna representa a média \pm desvio padrão, considerando os resultados obtidos para, pelo menos, 3 experiências independentes; **B)** Curva de dose-resposta da actividade citotóxica; **C)** Estrutura do complexo.

O composto B contém o ligando fenantrolina e o halogéneo é o cloro (Cl). Apresentou muito bons resultados para todas as linhas celulares (HeLa - 8,2 μ M; MCF-7 - 9,3 μ M; N1E-115 NDif - 6,7 μ M e N1E-115 Dif - 31,8 μ M), podendo mesmo ser considerado um dos compostos com maior capacidade inibitória neste estudo. Foi mais eficaz nas linhas celulares humanas e menos nos neuroblastomas vistos estes serem mais resistentes. Outro composto com uma estrutura muito semelhante ao B, é o composto E cujo halogéneo é o bromo (Br). Este também apresentou uma boa capacidade inibitória, primeiramente nas HeLa (5,1 μ M), depois nas N1E-115 NDif (32,5 μ M), MCF-7 (70,7 μ M) e por último nas N1E-115 Dif (90,8 μ M). (Tabela II). O composto G é constituído pelo grupo triflato (CF_3SO_3) e pelo

ligando I, apresentando boa actividade inibitória do crescimento celular em todas as linhas, em particular nas humanas (HeLa – 3 μ M, MCF-7 – 13,4 μ M, N1E-115 NDif – 3,5 μ M e N1E-115 Dif – 11,4 μ M). Este grupo parece melhorar a interacção do complexo com o DNA, provavelmente pela formação de maior número de ligações com o meio envolvente.

De seguida são apresentados os resultados relativos ao composto F, em que o metal foi substituído pelo W (Fig. 21).

Composto F

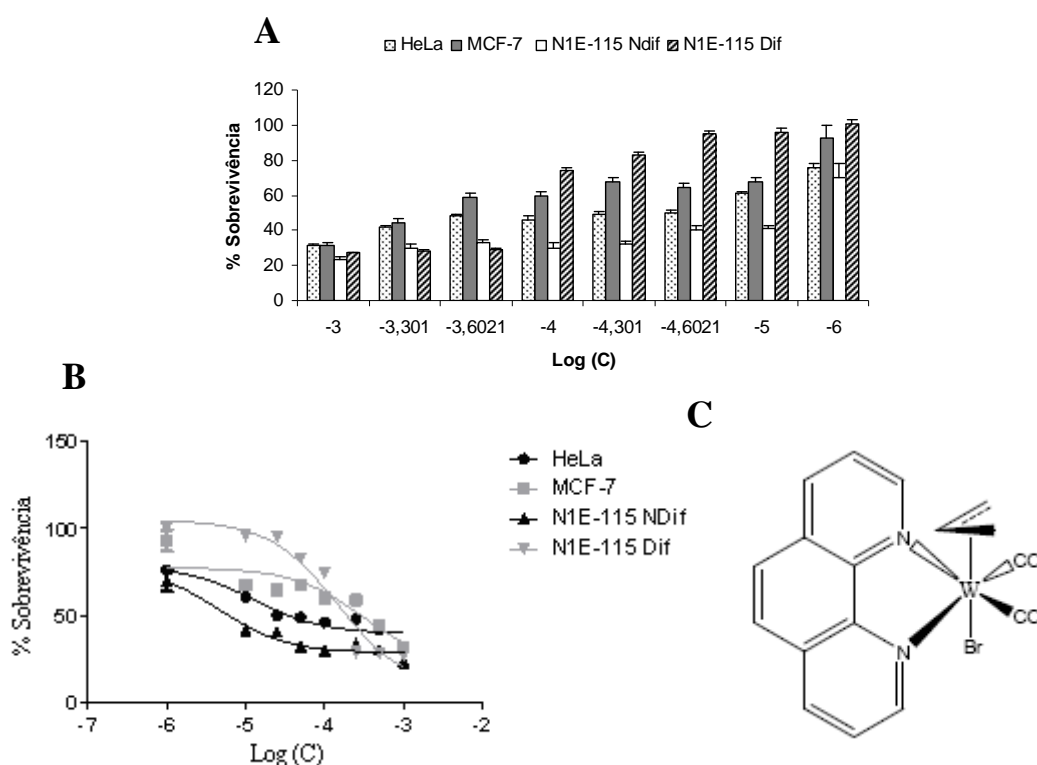


Fig. 21: Representação dos gráficos de viabilidade celular para o composto F; **A)** Percentagem de sobrevivência das células incubadas com o respectivo composto; Cada coluna representa a média \pm desvio padrão, considerando os resultados obtidos para, pelo menos, 3 experiências independentes; **B)** Curva de dose-resposta da actividade citotóxica; **C)** Estrutura do complexo.

O composto F é muito semelhante ao composto E, sendo o metal constituído pelo tungsténio (W) e o ligando I. O tungsténio é já conhecido pelas suas capacidades anti-tumorais em tumores sólidos (Matos, 2005). Apresentou boa capacidade de inibição na linha HeLa e N1E-115 NDif (12,8 e 4,6 μ M,

respectivamente). Para as outras linhas os valores de IC_{50} foram superiores a 100 μM (MCF-7 – 295 μM , N1E-115 Dif – 147 μM).

Composto D

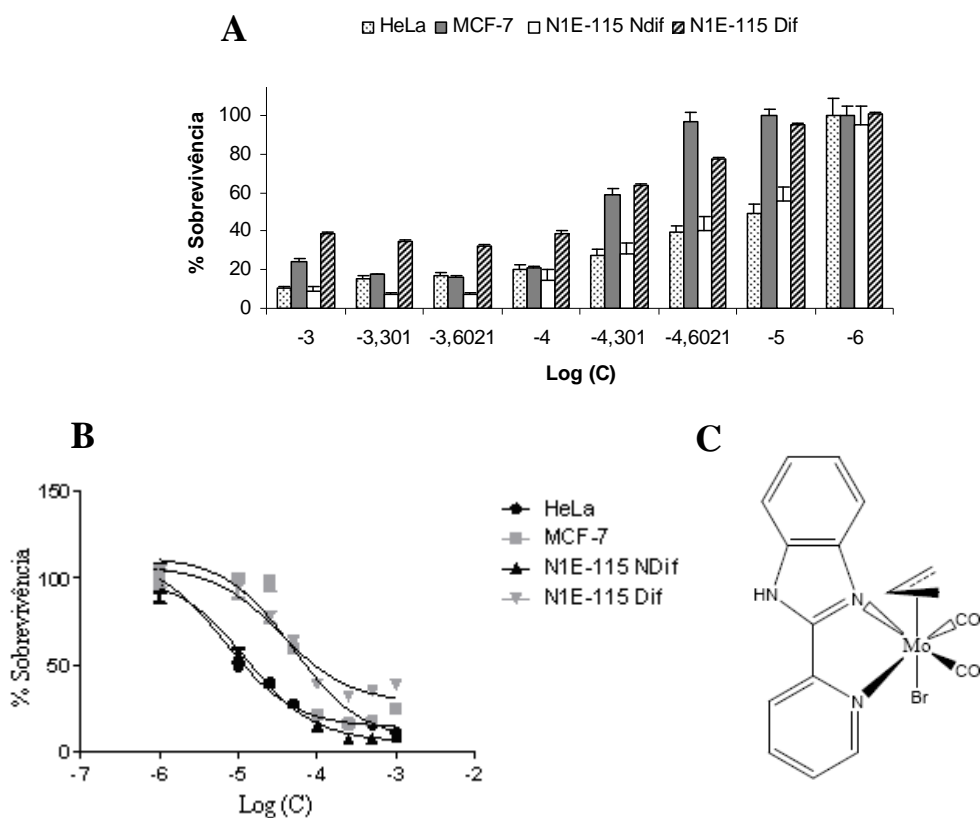


Fig. 22: Representação dos gráficos de viabilidade celular para o composto D. **A)** Percentagem de sobrevivência das células incubadas com o respectivo composto. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão, considerando os resultados obtidos para, pelo menos, 3 experiências independentes; **B)** Curva de dose-resposta da actividade citotóxica; **C)** Estrutura do complexo.

O composto D é constituído pelo complexo J e o halogéneo Br. Comparando este composto com o E, são ambos bastaste eficazes nas HeLa mas para as restantes linhas exigem uma maior concentração (10 vezes superior) (tabela II), indicando que este substituinte não será tão eficaz como a fenantrolina (Fig. 22).

Composto H

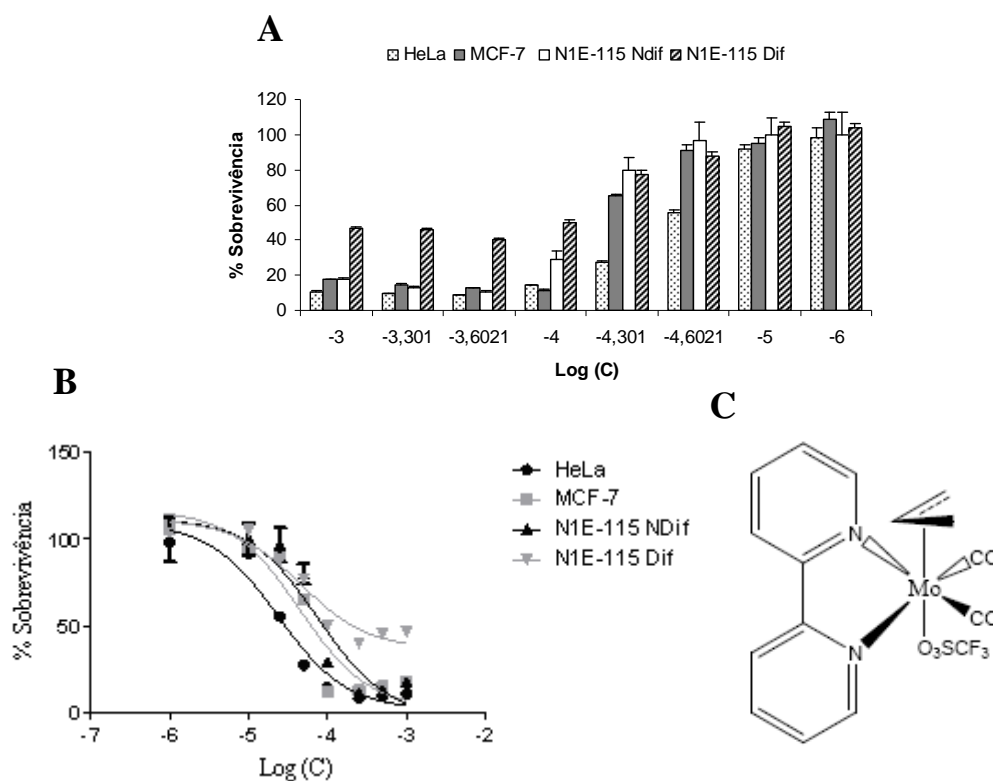


Fig. 23: Representação dos gráficos de viabilidade celular para o composto H: **A)** Percentagem de sobrevivência das células incubadas com o respectivo composto. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão, considerando os resultados obtidos para, pelo menos, 3 experiências independentes; **B)** Curva de dose-resposta da actividade citotóxica; **C)** Estrutura do complexo

O composto H também é constituído pelo mesmo grupo substituinte que o composto G (triflato) mas o seu ligando é o 2,2'-bipiridil. Comparando este composto com o H (Fig. 20), observou-se que o H apresentou boa capacidade inibitória, mas numa ordem de grandeza 10 vezes superior ao G, provavelmente devido à menor eficácia do seu ligando associado (HeLa – 23,7 μ M, MCF-7 – 44,6 μ M, N1E-115 NDif – 60 μ M e N1E-115 Dif – 46 μ M).

De forma geral pode-se concluir que a maioria dos compostos de molibdénio (II) testados apresenta boa actividade inibitória, com excepção dos compostos A e C, pela impossibilidade de dissolução. A linha celular HeLa apresentou valores de IC_{50} mais baixos para a maioria dos compostos, e pelo contrário, a N1E-115 Dif foi a mais difícil de atingir. Quanto aos grupos substituintes, o triflato, parece conseguir

melhorar as interacções do composto com o DNA pela sua maior capacidade de interacção com o meio envolvente.

Por último apresenta-se a tabela com a compilação de todos dos valores obtidos para todos os compostos testados (Tabela II).

Tabela II: Valores de inibição do crescimento celular, com os vários complexos organometálicos estudados, nas três linhas celulares estudadas, expressos como valores de IC_{50} ($n=3$) \pm desvio padrão.

<i>Compostos</i>	IC_{50} (μM)			
	HeLA	MCF-7	N1E-115 NDif	N1E-115 Dif
B	$8,2 \pm 0,8$	$9,3 \pm 0,6$	$6,7 \pm 1,5$	$31,8 \pm 0,4$
D	$6,8 \pm 1,1$	$37,6 \pm 0,8$	$12,7 \pm 1,7$	$35,2 \pm 1,1$
E	$5,1 \pm 1$	$70,7 \pm 0,6$	$32,5 \pm 1,3$	$90,8 \pm 0,6$
F	$12,8 \pm 0,5$	$294,6 \pm 1,4$	$4,6 \pm 2,1$	$146 \pm 0,5$
G	$2,9 \pm 0,004$	$13,4 \pm 0,7$	$3,5 \pm 1,0$	$11,4 \pm 0,6$
H	$23,7 \pm 0,005$	$44,5 \pm 0,6$	$60 \pm 0,4$	$46,1 \pm 0,6$
I	$2,1 \pm 0,4$	nd	$3,1 \pm 1,1$	$458,6 \pm 0,5$
J	nd	nd	nd	nd

3.2 Estudos de cinética de actuação de compostos

Após a avaliação da citotoxicidade dos compostos propostos para estudo, outra análise importante foi averiguar qual o tempo necessário para a sua acção e eventuais relações entre estes tempos e a citotoxicidade dos compostos. Os tempos de incubação escolhidos foram de 1, 2, 3 e 48 horas, após estudos preliminares destes ensaios. Para cada ensaio a concentração de composto usada foi um pouco acima do valor de IC_{50} calculado (Tabela II), sendo para a linha celular HeLa a concentração dos compostos de $15 \mu M$, com excepção do composto H para o qual foi usada uma concentração de $30 \mu M$. A concentração escolhida para as linhas, MCF-7 e N1E-115, foi de $50 \mu M$.

Na figura seguinte (Fig. 24) estão agrupados os gráficos que representam a acção dos vários compostos, para as 3 linhas celulares, HeLa, MCF-7 e N1E-11 NDif nos vários tempos de exposição.

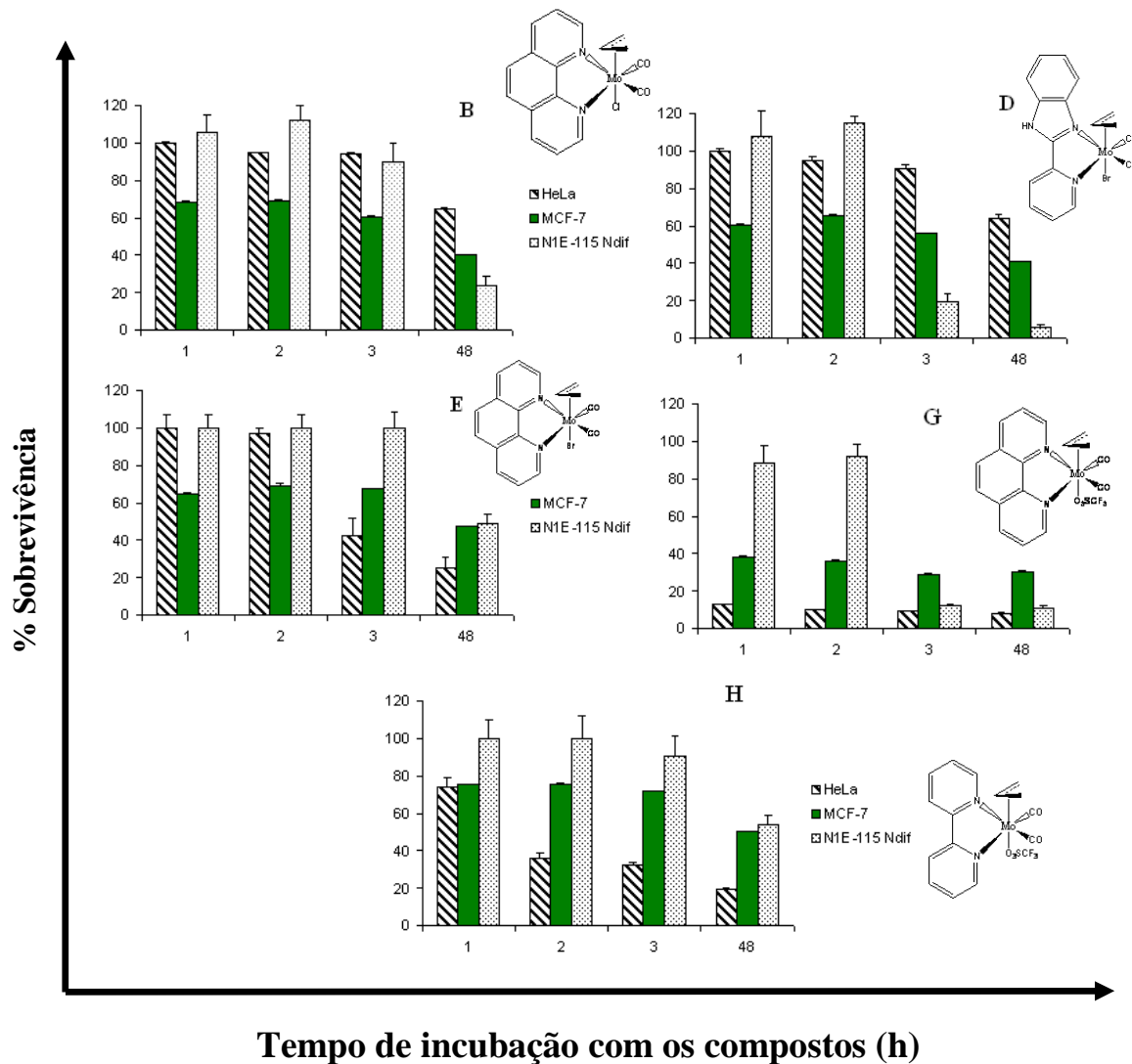


Fig. 24: Ensaio cinético para os vários compostos estudados, nas três linhas celulares, durante os vários tempos de incubação (1, 2, 3 e 48 horas).

Os compostos B, D, E apresentam cinéticas de actuação semelhante para as 3 linhas. Em relação ao composto B, observou-se a redução da população para metade, para todas as linhas, ao fim das 48 horas. Quanto ao composto D para a linha HeLa e MCF-7 observou-se redução para metade às 48 horas de incubação, enquanto que para a N1E-115 NDif se observou esta redução ao final das 3 horas. O composto E actua ao fim de 3 horas nas células HeLa enquanto que nas MCF-7 e N1E-115

apenas actuou no fim das 48 horas. O composto G é o mais rápido de todos, actuando logo na 1 hora de exposição tanto para as células HeLa como para as MCF-7, sendo que para as células N1E-115 actua apenas ao fim de 3 horas de incubação com o composto. Por último, o composto H actua ao fim de 2 horas nas HeLa e ao fim de 48 horas de incubação para as restantes linhas.

De acordo com os resultados pode-se concluir que o composto G parece ser o mais eficiente e rápido para todas as linhas celulares testadas. Os compostos têm uma actuação mais rápida nas células MCF-7. No entanto, não se podem extrair relações entre a velocidade de actuação dos compostos e a sua citotoxicidade, visto os resultados obtidos serem muito divergentes de composto para composto e de linha para linha. Teria sido interessante testar a actuação dos vários compostos às 24 horas, visto a inibição do crescimento se ter dado, na grande maioria dos casos, entre as 3 e as 48 horas.

3.3 Estudos de ligação ao DNA

Estudos anteriores sugerem que o DNA é o primeiro alvo intracelular das drogas anti-tumorais, visto que a interacção de pequenas moléculas com o DNA pode causar danos nas células cancerígenas, bloqueando a sua divisão e levando à morte celular. É assim importante perceber as propriedades destas ligações, no desenvolvimento de potenciais drogas. Sabe-se que os complexos metálicos podem interagir com a dupla cadeia de DNA de forma covalente ou não-covalente, sendo a intercalação uma das mais importantes formas de ligação ao DNA (Zhang *et al.*, 2005). Os intercaladores são moléculas que se inserem perpendicularmente na estrutura do DNA, por ligações não-covalentes (Martínez & Chacón-García, 2005).

De acordo com Xu e seus colaboradores (2003), a capacidade de intercalação aumenta com ligandos planares, mas deve-se ter também sempre em atenção, na determinação da ligação do complexo ao DNA, a geometria de coordenação e o tipo de átomo dador do ligando (Zhang *et al.*, 2005).

De forma a investigar os modos de ligação dos complexos ao DNA foram feitos ensaios espectrofotométricos e determinação de viscosidades.

3.3.1 Estudos espectrofotométricos

3.3.1.1 Estudo de estabilidade das soluções dos compostos ao longo do tempo

Estes ensaios permitiram estudar a estabilidade dos compostos em meio de cultura RPMI e em PBS. Para isso incubaram-se os compostos nestas duas soluções e traçaram-se os espectros. Estes ensaios foram apenas feitos para dois dos compostos com menor valor de IC_{50} , compostos B e E.

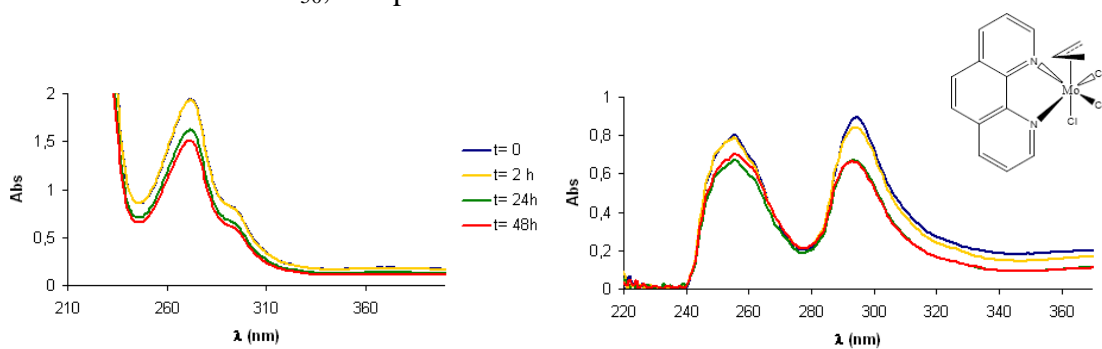


Fig. 25: Espectros de UV-vis do composto B. **A)** valores do composto em PBS, no tempo zero (azul), ao fim de 2 horas (amarelo), ao fim de 24 horas (verde) e ao fim das 48 horas (vermelho). **B)** Valores do composto em meio RPMI, no tempo zero (azul), ao fim de 2 horas (amarelo), ao fim de 24 horas (verde) e ao fim das 48 horas (vermelho).

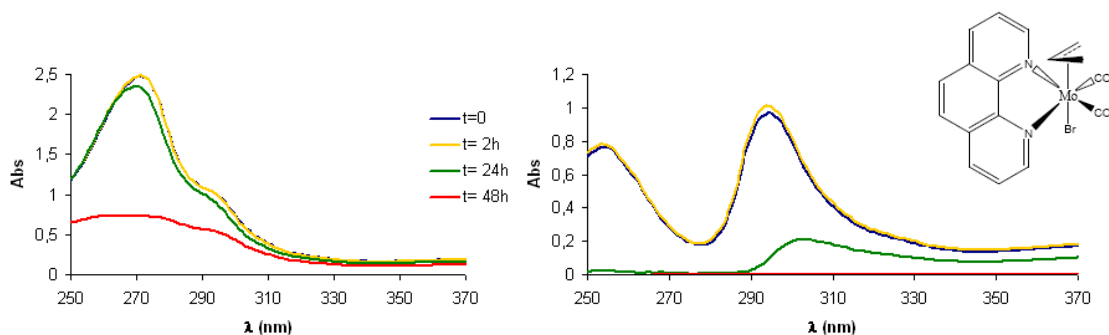


Fig. 26: Espectros de UV-vis do composto E. **A)** valores do composto em PBS, no tempo zero (azul), ao fim de 2 horas (amarelo), ao fim de 24 horas (verde) e ao fim das 48 horas (vermelho). **B)** Valores do composto em meio RPMI, no tempo zero (azul), ao fim de 2 horas (amarelo), ao fim de 24 horas (verde) e ao fim das 48 horas (vermelho).

Pela observação das figuras 25 e 26, verificou-se que o composto B é muito estável, não se observando diferenças significativas do tempo zero para as 48 horas.

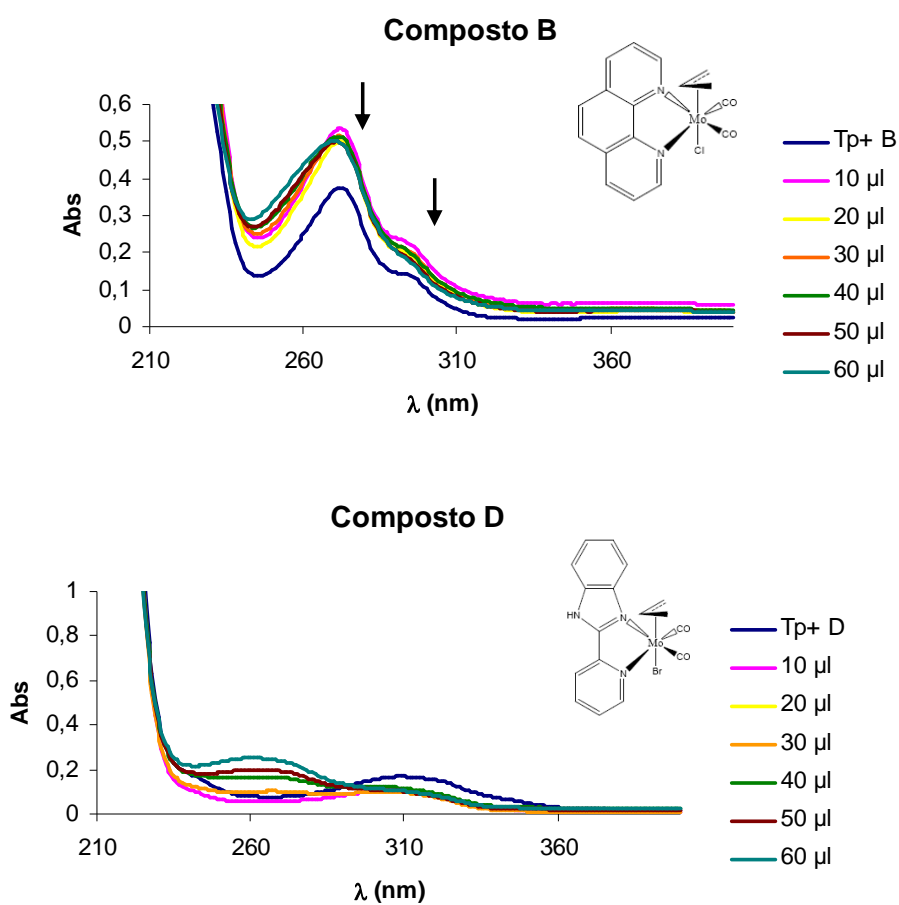
Pelo contrário, o composto E apresenta diferenças significativas a partir das 3 horas em PBS e das 24 horas com o meio, indicando que os compostos se alteraram, tendo possivelmente sofrido hidrólise.

Conclui-se que o composto B é mais estável que o E e, provavelmente, os seus melhores resultados de IC_{50} se deverão também a esta estabilidade.

3.3.1.2 Espectroscopia de Absorção UV-visível

A espectroscopia de absorção electrónica, tal como já foi referido anteriormente, é uma das técnicas mais comuns para os estudos de ligações ao DNA. A intercalação do complexo ao DNA resulta em hipocromismo (diminuição da absorvidade molar à medida que a concentração de DNA aumenta) e batocromismo (ligeiro deslocamento das bandas para a região do vermelho).

As figuras seguintes representam os espectros de UV-vis traçados para os vários compostos em estudo quando entram em contacto com uma solução de DNA. Para cada um deles mediu-se a absorvência do composto sem DNA, em tampão PES e foram traçados espectros com sucessivas adições de DNA 50 μ M (10-60 μ l). A concentração de composto foi fixa (50 μ M).



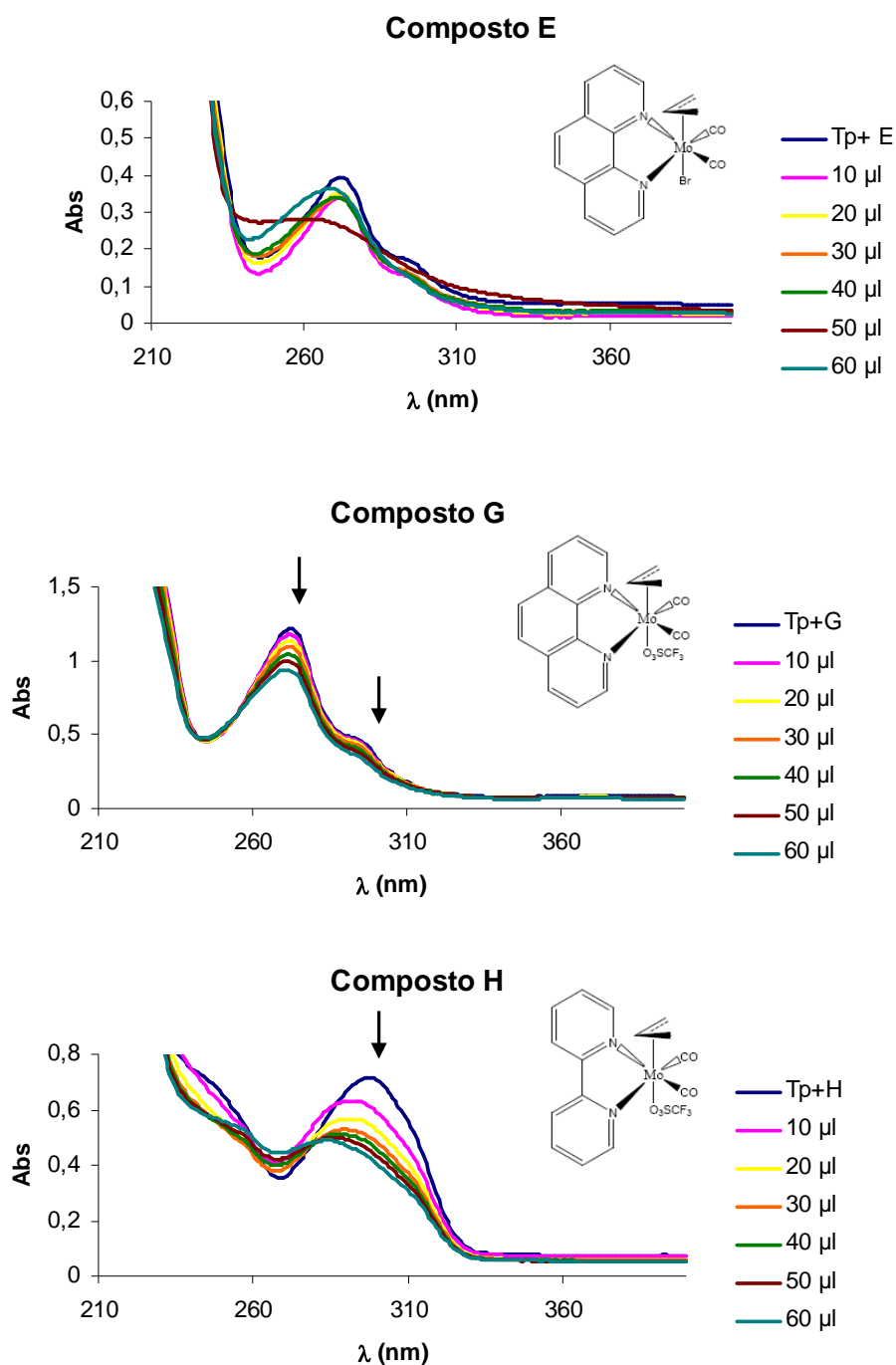


Fig 28: Espectros de absorção dos compostos na ausência e na presença de DNA, em tampão PES. A absorvência muda à medida que aumenta a concentração de DNA. (adicionaram-se concentrações crescentes de DNA: 10 μ l, 20 μ l, 30 μ l, 40 μ l, 50 μ l, 60 μ l), [composto] = 50 μ M. As linhas mostram o decréscimo na intensidade à medida que aumentou a concentração de DNA.

De acordo com os resultados obtidos (Fig. 27 e 28) verificou-se a existência de hipocromismo e batocromismo para os compostos B, G e H, com especial ênfase para os compostos G e H onde foi possível observar tanto o hipocromismo como o batocromismo. Estes compostos apresentam uma constante de ligação superior por terem o grupo O_3SCF_3 que permite melhorar as interações deste com as soluções aquosas do meio celular envolvente. Verificou-se, para todos os compostos, um desvio na absorção do pico máximo (260 nm) para a zona do vermelho, dados estes indicativos de batocromismo. Não foi possível observar hipocromismo nos compostos D e E, pelo contrário, com a adição de DNA observou-se um aumento da absorção (hipercromismo).

Conclui-se assim que o mecanismo de interacção dos compostos B, G e H com o DNA, poderá ser por intercalação. Em relação aos compostos D e E não foi possível tirar ilações pois os dados obtidos são insuficientes e pouco conclusivos.

Todavia, deve-se ter presente que a citotoxicidade de um composto não está apenas dependente da sua capacidade de interacção com o DNA. A droga, para ser eficaz, tem de ultrapassar várias barreiras, como as vias metabólicas e as membranas citoplasmáticas e nucleares e, uma vez no núcleo deve ser capaz de se intercalar com o DNA formando um complexo estável com um tempo de meia vida relativamente longo (Martínez & Chacón-García, 2005).

3.3.1.3 Medições de viscosidade

Foram feitas medidas de viscosidade de soluções de DNA incubadas com os compostos B, D e E, numa tentativa de, uma vez mais, contribuir para a identificação de possíveis modos de ligação destes compostos ao DNA. Partindo do princípio de que a viscosidade é directamente proporcional ao tempo de escoamento, e que, o aumento de viscosidade está associado com a possível intercalação do composto na molécula de DNA, abrindo a estrutura e aumentando então a sua viscosidade.

Tal como foi descrito no capítulo 2 (materiais e métodos), foram feitos três controlos.

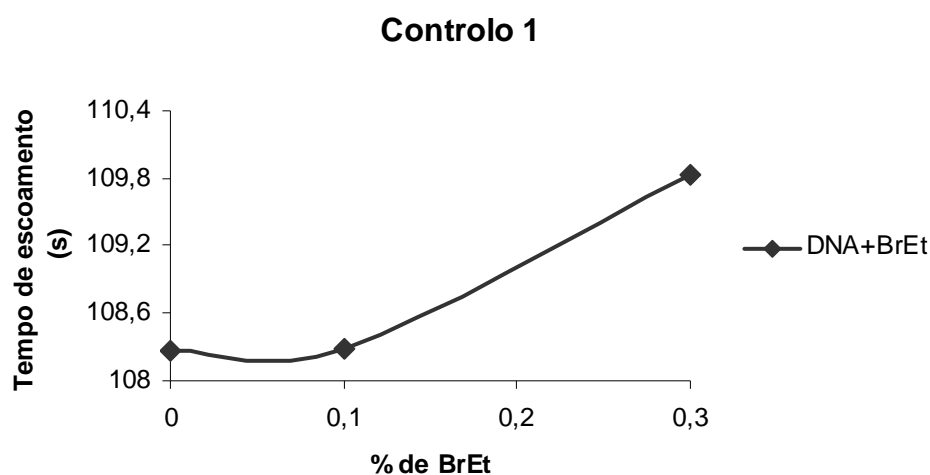


Fig. 29: Controlo 1: representação do tempo de escoamento com adições crescentes de BrEt, de forma a ver o aumento de intercalação deste composto com o DNA (50 μ M).

O controlo 1 foi feito com uma solução de DNA e o intercalante BrEt (Fig. 29). Pela análise da figura observou-se um aumento no tempo de escoamento à medida que a percentagem de BrEt aumenta na solução, aumento este, indicativo da intercalação do BrEt na molécula de DNA.

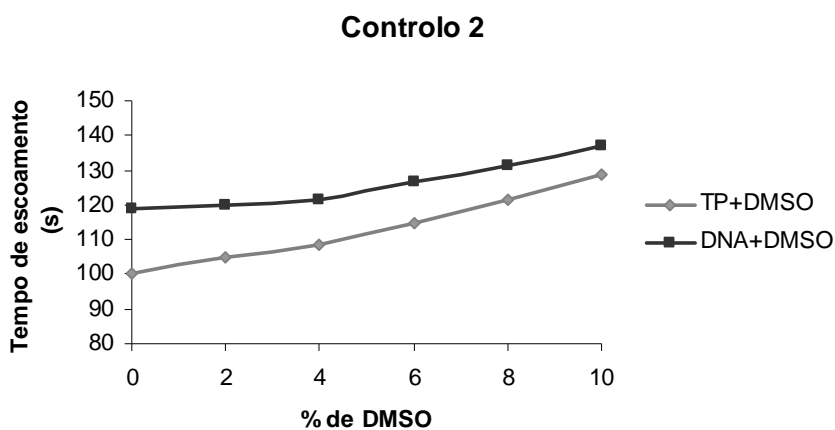


Fig. 30: Controlo 2: representação do tempo de escoamento com adições crescentes de DMSO ao tampão PES (cinzento) e ao DNA (preto).

O controlo 2 (Fig. 30) apresenta o comportamento dos brancos: tampão PES + DMSO e DNA + DMSO. As duas curvas apresentam um aumento à medida que aumenta a concentração de DMSO, indicando que este contribui para o aumento de

viscosidade, tal como já foi dito nos materiais. Contudo, considerou-se que esta alteração não era significativa, visto que a quantidade de DMSO usada para preparar as soluções foi de 0,1 %.

De seguida estão representados os gráficos das medições das soluções de DNA incubado com os três compostos em estudo, B, D e E (Fig. 31 e 32).

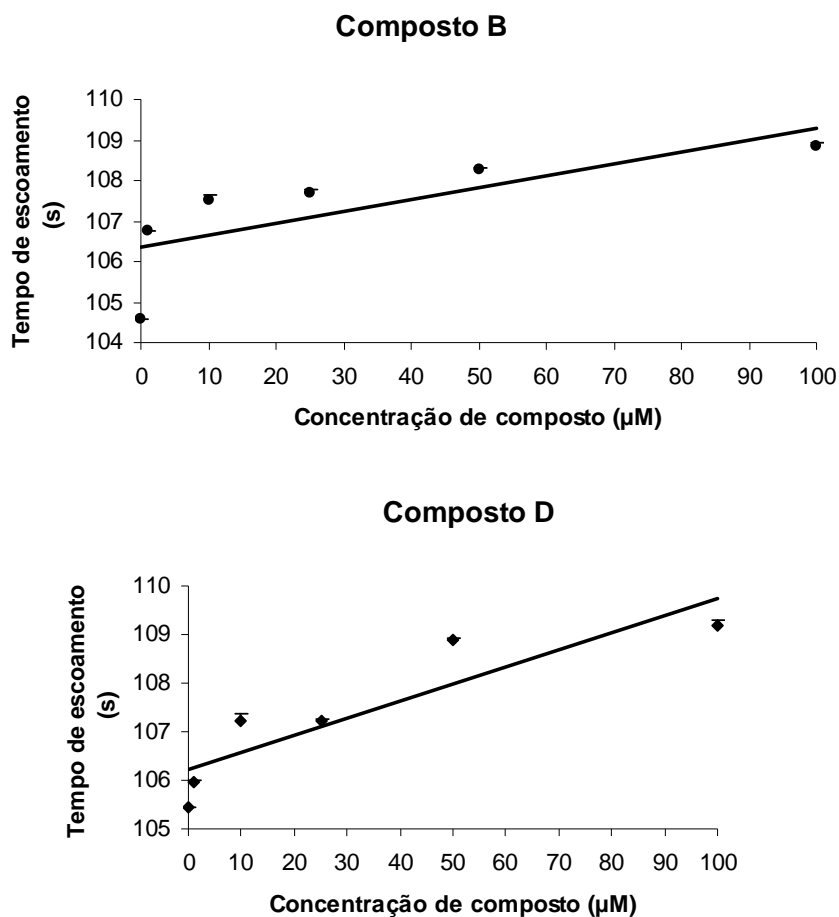


Fig. 31: Compostos B, D: representação do tempo de escoamento com adições crescentes de composto (1, 10, 25, 50 e 100 μM), de forma a verificar ou não o aumento de intercalação destes compostos com o DNA (50 μM).

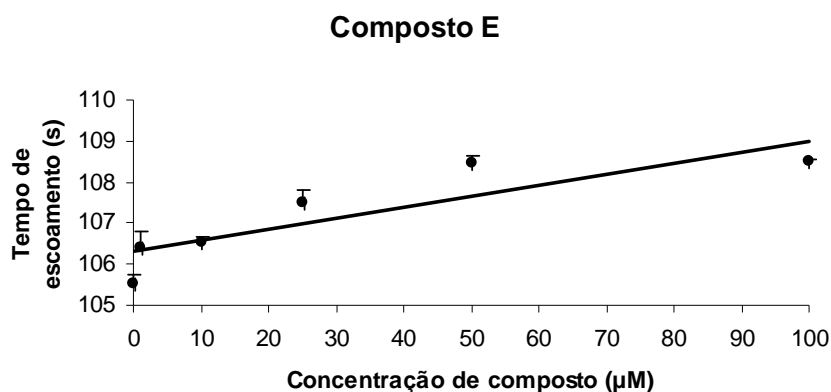


Fig. 32: Composto E: representação do tempo de escoamento com adições crescentes de composto (1, 10, 25, 50 e 100 µM), de forma a verificar ou não o aumento de intercalação deste composto com o DNA (50 µM).

Analisando os 3 gráficos referentes aos 3 compostos estudados, observou-se um aumento significativo do tempo de escoamento em função do aumento de concentração de composto (1, 10, 25, 50 e 100 µM). Estes resultados obtidos permitem confirmar, que estes composto actuarão com o DNA pelo mecanismo de intercalação.

3.4 Estudos biológicos

3.4.1 Electroforese de DNA em gel de agarose

A morte celular fisiológica é caracterizada pela morfologia apoptótica, que inclui a condensação da cromatina, degradação inter-nucleossomal do DNA e formação de corpos apoptóticos (Zhou *et al.*, 2003; Noda *et al.*, 2007). A electroforese foi feita com o objectivo de observar o estado do DNA. No caso haver apoptose dever-se-á detectar o *ladder*. Se houver degradação não específica observar-se-á um *smear*.

Extraiu-se DNA genómico das linhas celulares HeLa (Fig.33) e MCF-7 (Fig. 34), previamente incubadas durante 48 horas, com os compostos. Quantificou-se o

DNA isolado e verificou-se o grau de pureza. Para cada composto foram testadas 3 concentrações (10, 50 e 100 μM).

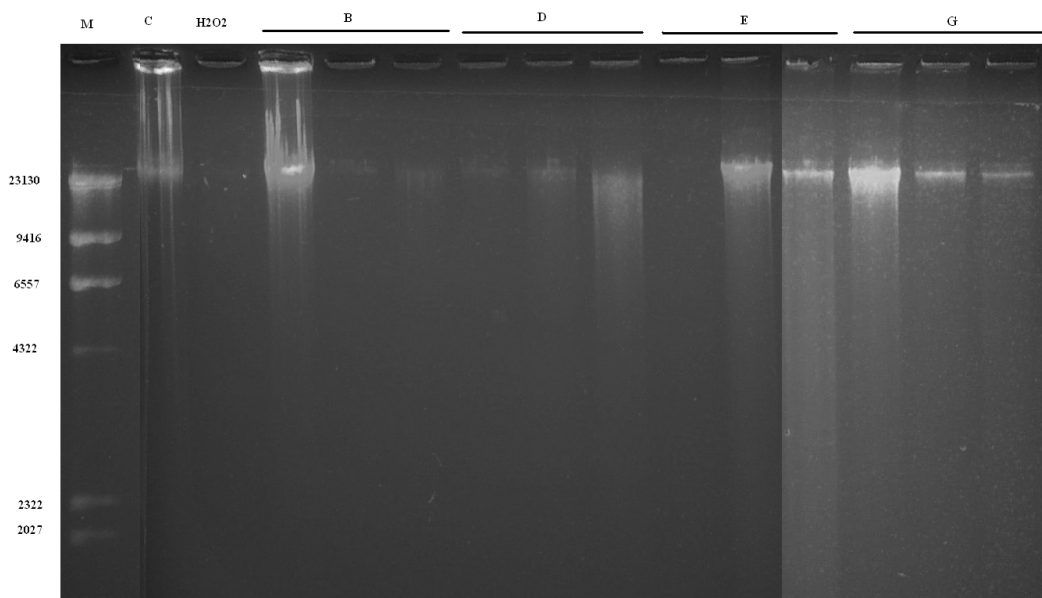


Fig. 33: Gel de Agarose de DNA de células HeLa após exposição a concentrações crescentes (10, 50 e 100 μM) de composto B, D, E e G . **M** - marcador do bacteriófago λ digerido com o enzima HindIII; **C** – Células controle, incubadas sem adição de composto; **H₂O₂** – controle positivo.

No gel obtido para as células HeLa (Fig. 33), o controle (C) apresenta uma banda bem definida com um elevado peso molecular. A banda correspondente à incubação das células com H₂O₂ (indutor de apoptose), deveria servir como controle positivo, contudo não se observa nenhuma banda, provavelmente devido a uma degradação total do DNA. Em relação às faixas dos DNAs genómicos das células incubadas com os compostos, observa-se o aparecimento de bandas alargadas, *smear*, indicativo de degradação do DNA. À medida que aumenta a concentração aumenta a largura da banda, o que indica aumento de degradação.

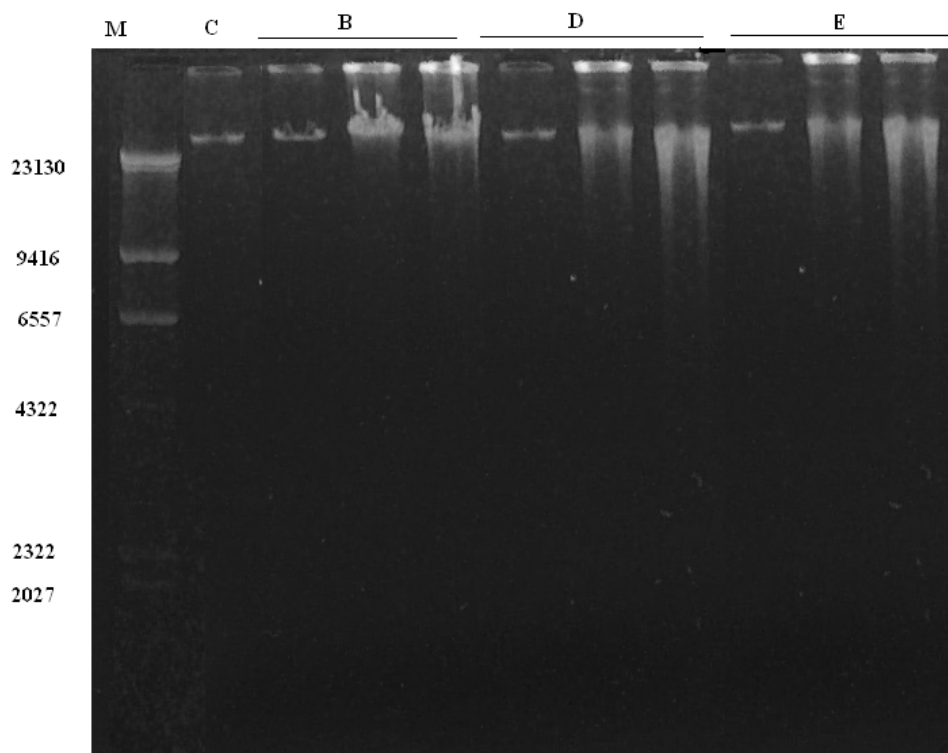


Fig. 34: Gel de Agarose de DNA de células MCF-7 após exposição a concentrações crescentes (10, 50 e 100 μ M) de composto B, D e E. **M** - marcador do bacteriófago λ digerido com o enzima HindIII; **C** - Células controlo, incubadas sem adição de composto.

O gel correspondente ao tratamento das células MCF-7 (Fig. 34) é muito semelhante ao obtido para a linha celular Hela.

Os resultados obtidos são indicativos de degradação do DNA, apresentando fragmentos de variados tamanhos, resultantes de cortes não específicos. Não foi possível observar um *ladder* organizado, indicativo de apoptose, pelo que se poderá concluir que este não será o processo mais relevante de morte celular. A fragmentação de DNA de forma não específica poderá então resultar de outros processos, nomeadamente de acção de espécies reactivas de oxigénio produzidas pela célula, como consequência do contacto com os compostos.

3.4.2 Avaliação da morte celular pela coloração com Hoechst

33342

Este ensaio permite avaliar o processo de morte por apoptose. Baseia-se na análise da alteração morfológica nuclear, usando para isso o corante HO33342 que marca os núcleos das células de azul fluorescente, sendo que, para as células em apoptose a intensidade da fluorescência é superior, os núcleos apresentam menores dimensões, a cromatina está condensada e possivelmente fragmentada dando origem aos corpos apoptóticos (Bonfoco *et al.*, 1997)

Este ensaio foi realizado nas linhas celulares MCF-7 (Fig. 35) e N1E-115 (Fig. 36). As células foram incubadas com os compostos durante 48 horas a 37°C em atmosfera de CO₂. Para cada linha foram testados 3 compostos, B, D e E a 2 concentrações, 10 e 100 µM. Como controlo negativo usaram-se células que não estiveram em contacto com compostos e como controlo positivo incubaram-se as células com H₂O₂, a duas concentrações, 50 e 500 µM (Fig. 35 e 36 respectivamente).

As imagens obtidas têm uma baixa qualidade, pelo que se torna um pouco mais difícil a análise dos resultados.

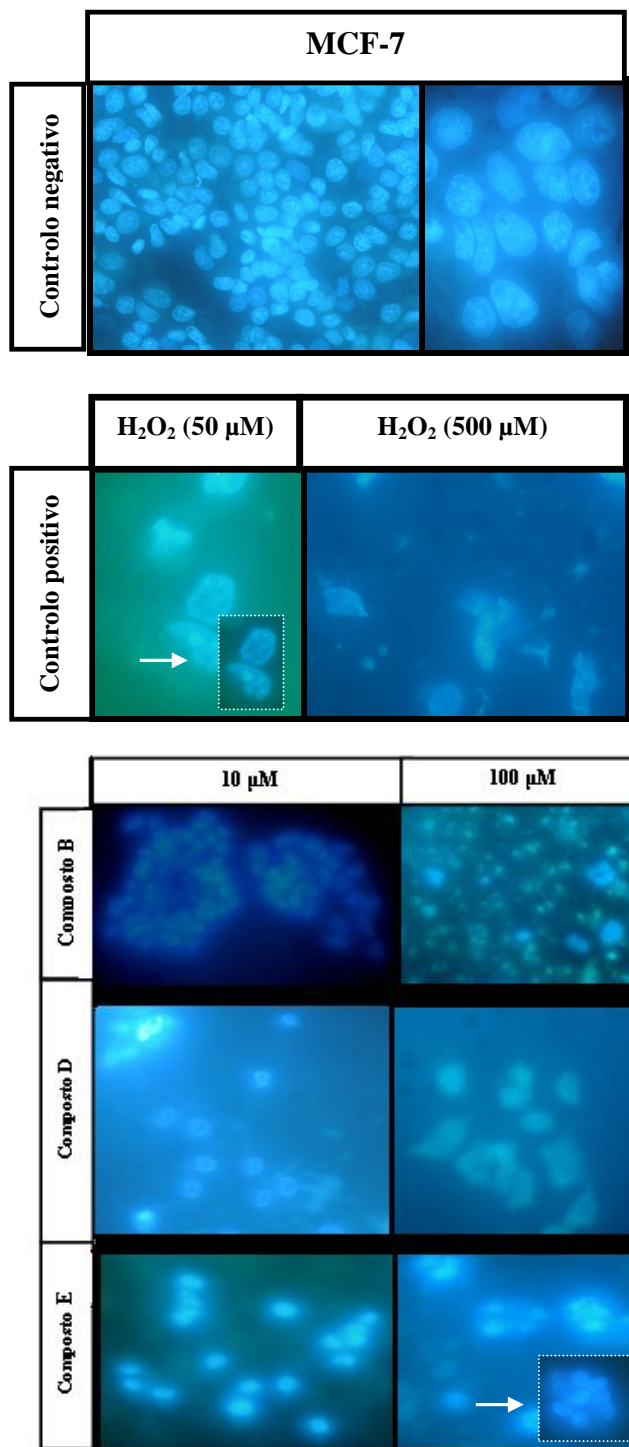


Fig. 35: Análise da morfologia da linha celular MCF-7. Após adesão das células a lamelas, estas foram incubadas com os compostos B, D e E nas concentrações de 10 e 100 μM , durante 48 horas. De seguida foram marcadas com o corante fluorescente Hoechst 33342, de modo a determinar a sua viabilidade. Os corpos apoptóticos estão evidenciados e identificados com uma seta.

Na figura 35 estão apresentadas as fotografias das linhas celulares MCF-7 tiradas no microscópio de fluorescência. As duas primeiras imagens de cada figura, correspondem ao controlo negativo. Observam-se núcleos de grandes dimensões, redondos, que ocupam grande parte da célula. Nas imagens referentes ao controlo positivo (H_2O_2), para a concentração de 50 μM , observaram-se núcleos mais pequenos e o aparecimento de corpos apoptóticos. Para a concentração mais elevada (500 μM) observaram-se muitos fragmentos celulares, indicando que as células estão totalmente degradadas. Relativamente aos ensaios com os compostos observa-se para os compostos B e D a formação de alguns corpos apoptóticos na concentração de 10 μM e total degradação na concentração de 100 μM . Estes resultados estão de acordo com os ensaios citotóxicos anteriormente feitos, visto que ambos os compostos actuam eficazmente a concentrações inferiores a 100 μM . No ensaio com o composto E é possível observar grande quantidade de células viáveis na concentração mais baixa e formação de corpos apoptóticos na concentração mais alta.

Na figura 36 estão compiladas as fotografias da linha celular N1E-115. A esquematização dos resultados é semelhante à apresentada para as células MCF-7.

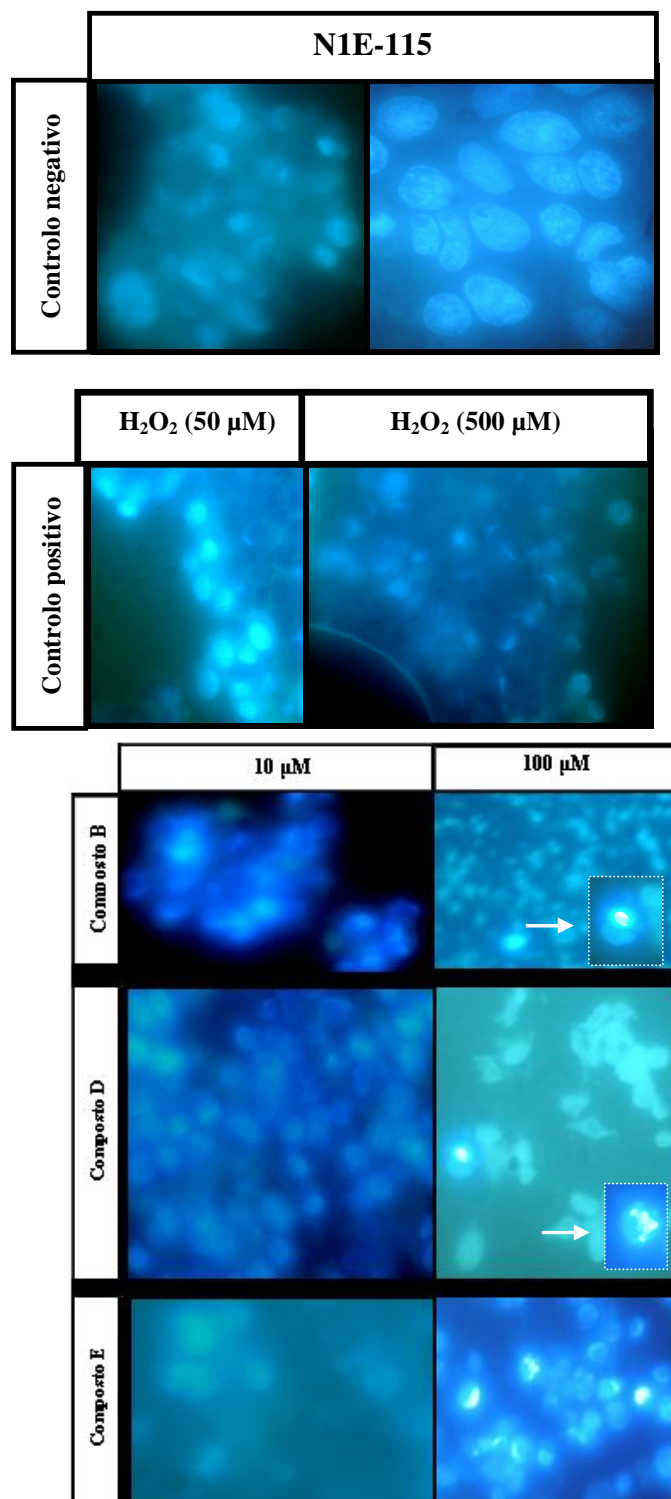


Fig. 36: Análise da morfologia da linha celular N1E-115 NDif. Após adesão das células a lamelas, estas foram incubadas com os compostos B, D e E nas concentrações de 10 e 100 μM, durante 48 horas. De seguida foram marcadas com o corante fluorescente Hoechst 33342, de modo a determinar a sua viabilidade. Os corpos apoptóticos estão evidenciados e identificados com uma seta.

No estudo com as células N1E-115 NDif também se observaram diferenças marcantes nas imagens da concentração de 10 μM , onde a grande maioria das células se encontra ainda viável. Para a concentração mais alta, observou-se a formação de corpos apoptóticos e condensação da cromatina, pelo aumento da intensidade da fluorescência.

Assim, o ensaio com o corante Hoechst 33342 permitiu concluir que parte das células, na presença de todos os compostos estudados, são induzidas a entrar em apoptose.

Relacionando estes resultados com os obtidos anteriormente, conclui-se que a apoptose existe mas não será o único processo de morte celular. Ou seja, o número de células a entrar em apoptose pode ser diminuto relativamente ao total e o *ladder* correspondente não é assim visível no gel.

3.4.3 Citometria de Fluxo

3.4.3.1 Produção de espécies reactivas de oxigénio

Para a detecção das espécies reactivas de oxigénio intracelulares, recorreu-se ao corante DCFH₂-DA. Este composto tem a capacidade de atravessar livremente as membranas celulares e, quando lhe é removido o grupo acetato, por esterases específicas existentes no meio, dá-se a sua oxidação dando origem ao DCF, que fica retido no interior das células e fluoresce. Assim sendo, vai ser medida a fluorescência por citometria de fluxo. Esta fluorescência é proporcional ao número de ROS produzidos, principalmente à produção de H₂O₂, (Cárter *et al.*, 1994).

Para a execução deste estudo foi usado o composto E, a duas concentrações (10 e 50 μM) e a dois tempos de incubação (3 e 6 horas). Para além disto prepararam-se dois controlos: controlo negativo, em que as células não estiveram em contacto com compostos tóxicos e um controlo positivo, em que as células estiveram em contacto com H₂O₂, já utilizado em outras experiências, mas neste ponto do trabalho foi importante como produtor de ROS.

Tabela III: Compilação dos resultados obtidos para a produção de ROS

	Gráficos	Concentrações (μM)	Tempo de incubação (h)	% ROS
Controlo negativo		-	-	2,46
Controlo positivo (H₂O₂)		500	2,30	55,6
Composto E		10	3	57,7
			6	61,2
		50	3	62,1
			6	85,3

Na tabela III estão compilados os resultados obtidos, gráficos e percentagens (número de eventos vs intensidade de fluorescência do DCF) de produção de ROS pelas células. Analisando os resultados, observou-se que em células viáveis houve uma percentagem de produção de ROS muito pequena (2,46 %) e, pelo contrário para o controlo positivo, a percentagem de ROS foi de 55,6 %. Na presença do composto E, observou-se produção de ROS, e verificou-se uma diferença significativa com o aumento, tanto do tempo de incubação como da concentração de composto.

Visto ter-se dado uma produção significativa de ROS pelas células (> 50 %), é possível que a morte celular esteja relacionada com esta. Assim sendo, conclui-se que a acção destes compostos se poderá dar também no mitocôndrio, visto este ser o organelo principal responsável pela produção de ROS assim como pela morte celular por apoptose. Contudo, devem ser feitos mais estudos, visto que estes resultados serem muito preliminares.

3.4.3.2 Avaliação de morte celular pela dupla coloração com HO33342/PI

Tal como já foi dito anteriormente, este estudo consiste na contagem, avaliação e classificação das células em solução de forma rápida e precisa, permitindo também a combinação de sinais de dispersão com marcadores fluorescentes. O objectivo deste estudo foi averiguar qual o processo de morte das células quando incubadas com os complexos de molibdénio e quantificar essas células. Para este estudo trabalhou-se com a linha celular MCF-7 e foi avaliado o composto E, a duas concentrações (10 e 50 μM) para dois tempos de incubação para cada concentração: 3 e 24 horas. As células foram coradas com dois fluorocromos: o corante HO33342 que é incorporado mais rapidamente e em maior quantidade pelas células apoptóticas que pelas células viáveis, devido à alteração da membrana plasmática, e o iodeto de propídeo (PI) que permite distinguir as células que perderam a integridade membranar, ou seja, células necróticas e células em estado avançado de apoptose das

células vivas (exclui-se as células apoptóticas, visto estas ainda terem a membrana intacta).

Fizeram-se três controlos, um controlo negativo de células não marcadas, um controlo de células só com HO33342 e outro controlo de células só com PI. Estes controlos foram necessário para calibrar a máquina e para saber quanto HO entrava no canal do PI e vice-versa, neste caso foi necessário ajustar um pouco a compensação do PI a entrar no canal do HO. Utilizou-se também uma amostra onde as células foram incubadas com H_2O_2 durante 30 minutos, como se sabe que este composto mata as células por apoptose, sendo então utilizado como controlo positivo. Este controlo não sendo totalmente necessário, é útil para compararmos os gráficos obtidos com os nossos compostos.

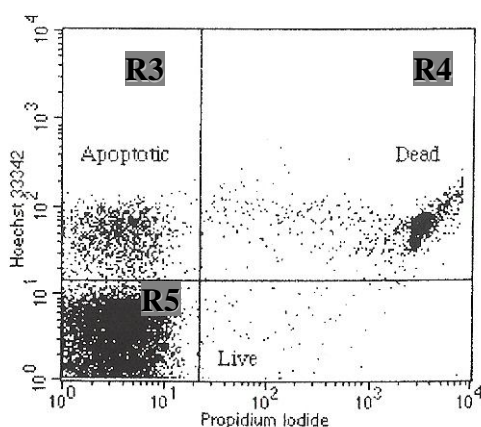


Fig. 37: Exemplificação da representação dos resultados. Células vivas surgem no quadrante R5, as células apoptóticas no quadrante R3 e as mortas no quadrante 4 (Adaptado de Diamond & DeMaggio, 2000).

De forma a analisar os gráficos obtidos por esta técnica, recorreu-se ao modelo apresentado na figura 37, em que, as células vivas se encontram no quadrante R5, as células apoptóticas no quadrante R3 e as células mortas no quadrante R4. Foi possível obter a percentagem de células em cada quadrante compilando-se então os valores nos gráficos apresentados nas figuras 38 e 39.

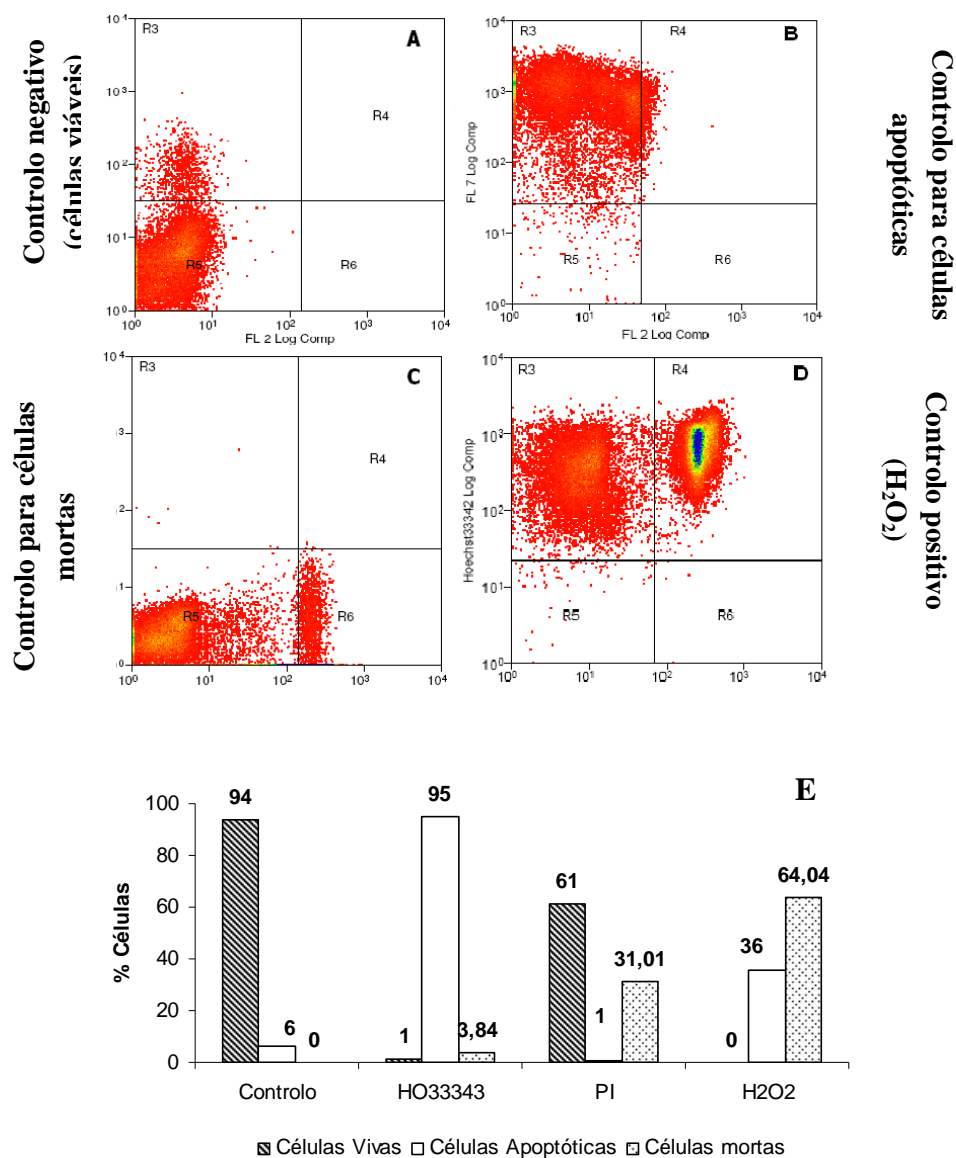


Fig. 38: Análise por citometria de fluxo de células apoptóticas, coloração com o corante Hoechst 33342 e PI **A)** controlo negativo (células viáveis); **B)** controlo para células apoptóticas (Hoechst 33342) **C)** controlo para células mortas (PI); **D)** controlo positivo (células tratadas com H₂O₂); **E)** compilação dos valores obtidos por citometria de fluxo, correspondendo à percentagem de viabilidade celular.

A figura 38 mostra que no controlo negativo se confirma a existência de células viáveis (94 %), sem marcador. Os ensaios com os corantes servem de brancos para os ensaios posteriores, em que as células foram previamente incubadas com composto. No controlo de células apoptóticas com o corante HO33342, 95 % das células estavam em apoptose. No controlo de células mortas, com o PI, obteve-se

cerca de 31 % de células mortas. Por último, no controlo positivo com H_2O_2 , todas as células se encontravam em apoptose ou mortas (100 %).

Por análise dos resultados obtidos pode constatar-se que os valores para os ensaios controlo estão bastante aceitáveis. Para as células controlo e para as células coradas com o Hoechst33342 a percentagem de células que respondeu positivamente foi superior a 90 %. Quanto ao PI, 61.54 % das células responderam positivamente a este corante, os 38.42 % podem dever-se ao facto do corante não ter estado tempo suficiente em contacto com as células. Assim, foi necessário proceder-se a um pequeno ajuste na compensação do PI.

De seguida são apresentados os gráficos correspondentes à dupla coloração HO33342/PI de células MCF-7 incubadas com o composto E, a duas concentrações (10 e 50 μM) e a dois tempos de incubação (3 e 24 horas) (Fig. 39).

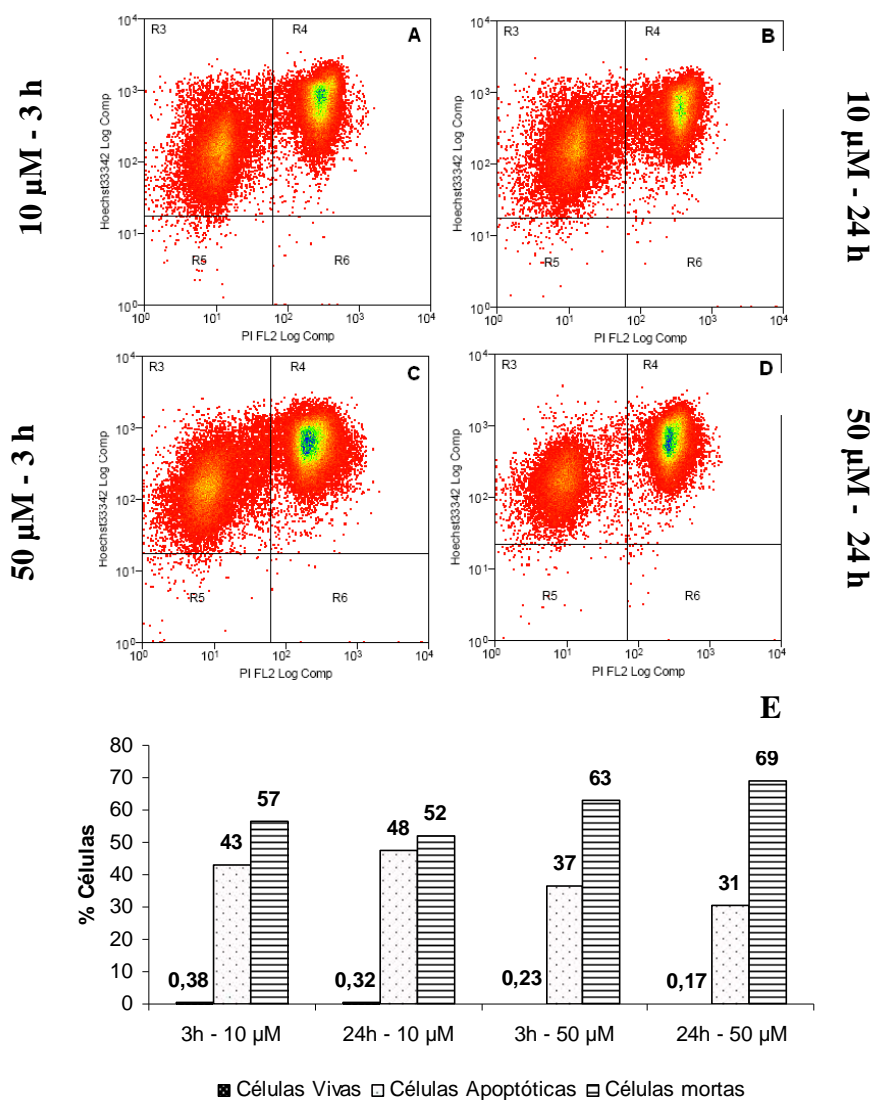


Fig. 39: Análise por citometria de fluxo de células apoptóticas, coloração com o corante Hoechst 33342 e PI na linha celular MCF-7. Composto E: **A)** 10μM com 3 horas de incubação; **B)** 10 μM com 24 horas de incubação; **C)** 50 μM com 3 horas de incubação; **D)** 50μM com 24 horas de incubação; **E)** Compilação dos valores obtidos por citometria de fluxo, correspondendo à percentagem de viabilidade celular.

É visível na figura 39 que, à medida que aumenta o tempo de incubação (de 3 para 24 horas) diminui o número de células viáveis e aumenta o número de células apoptóticas e de células mortas. Para além disso, verificou-se que, para a concentração de 50 μM, aumenta o número de células mortas e diminui substancialmente o número de células em apoptose, indicando que, quanto maior a

concentração do composto, mais tóxico se torna para as células levando a uma morte mais rápida e de um maior número de células.

Este ensaio permitiu obter resultados de acordo com o esperado, tanto para os controlos, como para os ensaios com o composto. A apoptose é então considerada como um dos possíveis mecanismos de morte destas células visto que, existem em todos os ensaios, num número bastante significativo. Relembrar que para a execução deste protocolo as células foram sujeitas a algumas condições adversas, podendo levar à morte de algumas destas células de forma brusca.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho testaram-se complexos organometálicos de Mo (II) com vários ligandos azotados em 3 linhas celulares tumorais, 2 humanas e uma animal. É fundamental ter em conta na escolha do metal o seu estado de oxidação e os ligandos escolhidos, de forma a melhorar o seu comportamento electrónico e estereoquímico. Dois dos compostos estudados (A e C) foram impossíveis de dissolver devido à presença de grupos metilo no ligando, bloqueando a acção do complexo.

Os valores de IC_{50} variaram entre 5,1 e 90,8 μ M, mostrando algumas diferenças entre as linhas celulares, sendo que para a linha celular N1E-115 Dif se observou uma diminuição de actividade citotóxica significativa, comparando com a linha celular N1E-115 NDif. O complexo B é o mais eficiente, mas todos eles representam potenciais agentes anti-tumorais. A cinética de actuação dos compostos demonstrou que os complexos B, D necessitam de 48h para a sua acção completa, enquanto que os complexos G e H apresentaram uma actividade citotóxica significativa após 3 horas de contacto, sendo que, a velocidade a que estes actuam não está necessariamente relacionada com a sua eficácia de actuação.

Nos estudos de ligação ao DNA, a espectroscopia de absorção permitiu observar o aparecimento de hipocromismo e batocromismo para os complexos B, G e H, indicando a provável a intercalação destes com a molécula de DNA. O aumento da viscosidade dos complexos B, D e E em soluções de DNA confirmaram, uma vez mais a interacção com a cadeia de DNA por intercalação.

A electroforese do DNA genómico em gel de agarose apenas revela a degradação do DNA para os complexos B, D, E e G na linha celular HeLa e nos complexos B, D e E para a linha celular MCF-7. Por outro lado, a formação de corpos apoptóticos e condensação da cromatina, resultados estes reflectidos pelo aumento da intensidade da fluorescência do corante HO 33342, indicaram que a apoptose é um dos possíveis mecanismos de acção dos complexos estudados (B, D e E) nas linhas celulares MCF-7 e N1E-115 NDif.

Por citometria de fluxo efectuaram-se duas experiências independentes: a medição de espécies reactivas de oxigénio foi realizada utilizando o corante DCFH₂-DA e mostrou a formação de quantidades crescentes destas espécies. Por outro lado a dupla coloração com HO 33342/PI permitiu confirmar, uma vez mais, a apoptose

como mecanismo de morte celular para o composto E na linha celular MCF-7. Assim sendo, conclui-se que os mecanismos de morte celular incluem a produção de espécies reactivas de oxigénio e a apoptose.

Os resultados mais interessantes foram obtidos para o composto E em que os resultados quer relativamente à intercalação do composto com o DNA quer à morte celular por apoptose, foram mais concludentes. Os estudos de estabilidade deste complexo mostraram que a alteração deste acontece das 2 para as 24 horas. Seria interessante ter realizado também os ensaios de citotoxicidade nas 24 horas.

Perspectivas Futuras:

De forma a melhor compreender o mecanismo de actuação dos complexos nas células teria sido muito interessante e vantajoso realizar também outro tipo de ensaios. Seria então essencial conhecer o comportamento dos compostos organometálicos em solução sob condições biológicas, de forma a compreender a sua reactividade e estabilidade nas condições dos ensaios. Relativamente ao complexo em si, é importante compreender de que forma este actua nas células, se entra na sua totalidade, se sofre alguma alteração química, como hidrólise, por exemplo e de que forma interactua com o DNA. Para isso os estudos de difracção de raio X, RMN ou de HPLC ajudam concretização destes objectivos.

Seria também importante modificar os ligandos de forma a melhorar a actividade anti-proliferativa ou mesmo testar novos intercaladores como anti-tumorais. Já existem diversos estudos que fazem referência a novos compostos intercaladores, como por exemplo ligar a aminoácidos ou a ligandos de etilenodiamina, que são estáveis, solúveis em água e exibem actividade anti-tumoral *in vivo* e *in vitro*. (Martínez & Chacón-Garcia, 2005).

Realizar ensaios cinéticos a mais tempos, incluindo certamente as 24 horas. Fazer pré-incubações de 0, 1, 2, 24 e 48 horas dos compostos em meio e só depois aplicá-los nas culturas celulares.

Efectuar ensaios de calorimetria diferencial que permitem calcular a T_m do DNA após incubação com o composto e aferir qual o mecanismo de acção do complexo com o DNA.

A técnica de dicroísmo celular (CD) permite estudar variações conformacionais no DNA após ligação ao composto pela medição da T_m , permitindo aferir se o mecanismo de acção passa pela intercalação ao DNA (ligação não-covalente) ou por uma ligação covalente.

Neste estudo houve a oportunidade de trabalhar com a técnica de citometria de fluxo. A partir desta, foram alcançadas varias conclusões determinantes. Contudo existem ainda diversos trabalhos inerentes a esta técnica que podem ser explorados, e de acordo com os resultados obtidos seria vantajoso estudar, como descobrir qual o principal alvo dos complexos dentro da célula. Poder-se-ia recorrer, por exemplo ao kit Anexina V que é destinado à dosagem rápida e fácil do acontecimento de apoptose em vários tipos celulares. Durante a apoptose as células modificam a estrutura das suas membranas plasmáticas para sinalizar a sua morte ao ambiente envolvente. Os fagócitos captam este sinal e removem a célula por fagocitose. O aparecimento da fosfatidilserina (PS) na superfície celular é uma das mudanças estruturais que ocorre sendo reconhecida pelos fagócitos. A anexina V é uma proteína de ligação para fosfolípidos que pertence à família das Anexinas. Na presença de iões de cálcio expressa uma grande afinidade para ligação selectiva a PS. Para além desta proteína existe uma outra muito conhecida, rodamina que faz parte da família das fluoronas. (*e.g.* Rodamina 123). É muito usada como marcador fluorescente e pode ser facilmente detectada, permitindo avaliar o potencial de membrana celular. Para além destes estudos existem outros que permitem descobrir em que fase do ciclo celular se dá o bloqueio, após interacção com o composto, ou mesmo estudos, que permitem avaliar quais as vias celulares que estão na origem da apoptose. Nestes estudos, recorre-se a anticorpos específicos, como o caso da caspase 3 ou anticorpos da família Bcl-2 (Lee & Jung, 2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Asadi, M., Safaei, E., Ranjbar, B. & Hasani, L. 2004. Thermodynamic and spectroscopic study on binding of cationic Zn(II) and Co(II) tetrapyridinoporphyrazines to calf thymus DNA: the role of the central metal in binding parameters. *New Journal of Chemistry*, 28: 1227-1234.

Behl, C. & Moosmann, B. 2002. Antioxidant Neuroprotection in Alzheimer's Disease As Preventive and Therapeutic Approach. *Free Radical Biology and Medicine*, 33: 182-191.

Belloc, F., Dumain, P., Boisseau, M.R., Jalloustre, C., Reiffers, J., Bernard, P. & Lacombe, F. 1994. A Flow Cytometric Method Using Hoechst 33343 and Propidium Iodide for Simultaneous Cell Cycle Analysis and Apoptosis Determination in Unfixed Cells. *Cytometry*, 17: 59-65.

Benhar, M., Engelberg, D. & Levitzki, A. 2002. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *European Molecular Biology Organization Reports*, 3: 420-425.

Bonfoco, E.A.M., Krainc, D., Nicotera, P. & Lipton, S. 1997. Techniques for distinguishing apoptosis from necrosis in cerebrocortical and cerebellar neurons: pp. 237–253. Poirier J. (ed) *In Neuromethods: Apoptosis Techniques and Protocols*, Humana Press, New Jersey.

Bonire, J.J. & Fricke, S. P. 2001. The in vitro antitumour profile of some 1,2 diaminocyclohexane organotin complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 83: 217-22.

Briasoulis, E., Pentheroudakis, G., Karavasilis, V., Tzamakou, E., Rammou, D. & Pavlidis, N. 2004. Weekly paclitaxel combined with pegylated liposomal doxorubicin (Caelyxe) given every 4 weeks: dose-finding and pharmacokinetic study in patients with advanced solid tumors. *Annals of Oncology*, 15: 1566-1573.

Brodie, C. R., Collins, J. G. & Aldrich-Wright, J. R. 2004. DNA binding and biological activity of some platinum(II) intercalating compounds containing methyl substituted 1,10 phenanthrolines. *Dalton Trans*, 8: 1145-1152.

- Bungo, L., Frost, C.L., Brauns, S.C. & Venter, M. 2006. Tulbaghia violácea inhibits growth and induces apoptosis in cancer cells in vitro. *African Journal of Biotechnology*, 5: 1936-1943.
- Burris, R.H., Roberts & G.P. 1993. Biological nitrogen fixation. *Annual Review of Nutrition*, 13: 317-335.
- Cárter, W.O., Narayanan, P.D. & Robinson, J.P. 1994. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 55: 253-258.
- Cindrić, M., Novak, T.K., Kraljević, S., Kralj, M. & Kamena, B. 2006. Structural and antitumor activity study of γ -octamolybdates containing aminoacids and peptides. *Inorganica Chimica Acta*, 359: 1673-1680.
- Darzynkiewicz, Z., Li, X., Gong, J. & Traganos 1997. Methods for analysis of apoptosis by flow cytometry: pp. 334-343, Albert Balows PhD (ed). *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 5^a ed, Washington, DC, USA.
- Diamond, R. & DeMaggio, S. 2000. *In living color – Protocols in flow cytometry and cell sorting*, Spinger Lab. Manusls, 1^a ed.
- Freshney, R.J. 1987. *Culture of Animal Cells. A manual of Basic Techique*, Wiley-Liss, 2^o ed, Canada.
- Fujita, H., Fujita, T., Sakurati, T., Yamase, T., & Seto, Y. 1992. Antitumor Activity of New Antitumor Substance, Polyoxomolybdate, against Human Cancers in Athymic Nude Mice. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 168: 421-426.
- Garret, M.D. 2001. Cell cycle control and cancer. *Current Science*, 81: 515- 522.
- Garuti L., Roberti, M., Pizzirani, D., Pession, A., Leoncini, E., Cenci, V. & Hrelia, S. 2004. Differential antiproliferative activity of new benzimidazole-4,7-diones. *Il Farmaco*, 59: 663-668.
- Ghobrial, I.M., Witzig, T.E. & Adjei, A.A. 2005. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *A Cancer Journal for Clinicians*, 55: 178-194.

- Golstein, P. & Kroemer, G. 2007. A multiplicity of cell death pathways. Symposium on Apoptotic and Non-Apoptotic Cell Death Pathways. *European molecular biology organization reports*, 8: 829–833.
- Haley, B. & Frenkel, E. 2008. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Official Journal of the Society Urologic Oncology*, 26: 57-64.
- Hall, I.H., Lackey, C.B., Kistler, T.D., Durham, R.W., Russell, J.M. & Grimes, R.N. 2000. Antitumor activity of mono- and dimetallic transition metal carborane complexes of Ta, Fe, Co, Mo, or W. *Anticancer research*, 20: 2345-2354.
- Hamelers, I. H.L., Schaik, R., Sussenbach, J.S. & Steenbergh, P.H. 2003. 17 β -Estradiol responsiveness of MCF-7 laboratory strains is dependent on an autocrine signal activating the IGF type I receptor. *Cancer Cell International*, 3: 0-10.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100: 57-70.
- Ho, Y., Au-Yeung, S.C.F & To, K.K.W. 2003. Platinum-Based Anticancer Agents: Innovative Design Strategies and Biological Perspectives. *Medicinal Research Reviews*, 23: 633-655.
- Izulmé, R.I.S 2000. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12: 70-84.
- Jakupec, M.A., Galanski, M., Arion, V.B., Hartinger, C.G. & Keppler, B.K. 2007. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. *Dalton transactions*, 183-194.
- Jarzab, A. & Stryjecka-Zimmer, M. 2008. Oxidative stress and apoptosis. *Annales*, 48: 10.
- Jelkic-Stankov, M., Uskokovic-Markovic, S., Holclajtner-Antunovic, I. Todorovic, M. & Djurdjevic, P. 2006. Compounds of Mo, V and W in biochemistry and their biomedical activity. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21: 8-16.
- Kelland, L.R., Sharp, S.Y., O'Neill, C., Raynaud, F.I., Beale, P.J. & Judson, I.R. 1999. Mini-review: discovery and development of platinum complexes designed to circumvent cisplatin resistance. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 77: 111-115.

- Kerr, J.F.R., Winterford, C.M. & Harmon, B.V. 1994. Apoptosis-its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73: 2013-2026.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. 1972. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26: 239-257.
- Kim, J, Woo, D. & Rees, D.C. 1993. X-ray crystal structure of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Clostridium pasteurianum* at 3.0-Å resolution. *Biochemistry*, 32: 7104.
- Kimhi, Y., Palfrey, C., Spector, I., Barak, Y. & Littauer, U.Z. 1976. Maturation of neuroblastoma cells in the presence of dimethylsulfoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73: 462-466.
- Komada, H., Nakagawa, M., Yamamura, M., Hioki, K. & Yamamoto 1990. Effect of dietary molybdenum on esophageal carcinogenesis in rats induced by N-methyl-N-benzyl-nitrosamine. *Cancer Research*, 50: 2418-2422.
- Lee, S.A. & Jung, M. 2007. The Nucleoside Analog Sangivamycin Induces Apoptotic Cell Death in Breast Carcinoma MCF7/Adriamycin-resistant Cells via Protein Kinase C_α and JNK Activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 15271–15283.
- Leist, M. & Jaattela, M. 2001. Four Deaths and a Funeral: From Caspases to Alternative Mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2: 589-598.
- Lewis, D.F.V., Ioannides & C., Parke, D.V. 1996. Compact And Molecular-Structure In Toxicity Assessment - A Prospective Evaluation Of 30 Chemicals Currently Being Tested For Rodent Carcinogenicity. *Environmental Health Perspectives*, 104: 1011-1016.
- Liu, Y. 1999. Understanding the biological activity of amyloid proteins in vitro: from inhibited cellular MTT reduction to altered cellular cholesterol homeostasis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 23: 377-395.
- Lovborg, H., Nygren, P. & Larsson, R. 2004. Multiparametric evaluation of apoptosis: Effects of standard cytotoxic agents and the cyanoguanidine CHS 828. *Molecular Cancer Therapeutics*, 521- 526.
- Lowe, S.W. & Lin, A.W. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21: 485-495.

- Luo, X.M., Wei, H J. & Yang, S. P. 1983. Inhibitory effects of molybdenum, on esophageal and forestomach carcinogenesis in rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 71: 75-78.
- Maltese, W.A., Defendini, R., Green, R.A., Sheridan, K.M. & Donley, D.K. 1985. Suppression of murine neuroblastoma growth in vivo by mevinolin, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl- coenzyme A reductase. *The Journal of Clinical Investigation*, 76: 1748-1754.
- Maltoni, C. 1976. Carcinogenic Effects of Benzene: Cesare Maltoni's Contributions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 271: 431.
- Matos, M.R.P.N 2001. Complexos Metálicos na terapêutica do Cancro. *Sociedade Portuguesa de Química*, 85: 61- 68.
- Matos, M.R.P.N, Romão, M. R., Pereira, C.C.L., Rodrigues, S.S., Mora, M., Silva, M.J.P.S., Alves, P.M. & Reis, C.A. 2008. *Compositions Comprising Organometallic Molybdenum Compounds For Treating Cancer*, Patent Docs, nº WO/2005/087783.
- Matos, M. R., Romão, C.C., Pereira, C.C.L., Rodrigues, S.S., Mora, M., Silva, M. J. P., Alves, P. & Reis, C.A. 2005. *Compositions Comprising Organometallic Molybdenum Compounds for Treating Cancer*, Patente Internacional WO 2005/087783 A1.
- Martínez, R. & Chacón-García, L. 2005. The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What is Worked and What did not Work. *Current Medicinal Chemistry*, 12: 127-151.
- Mitchell, P.C.H. 2003. Chemical and Engineering News. *Molybdenum*, 81: 108.
- Mitsui, S., Ogata, A., Yanagie, H., Kasano, H., Hisa, T., Yamase, T. & Eriguchi, M. 2006. Antitumor activity of polyoxomolybdate, $[\text{NH}_3\text{Pr}^{\text{I}}]_6[\text{Mo}_7\text{O}_{24}] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, against, human gastric cancer model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60: 353-358.
- Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63.
- Nagababu, P. & Satyanarayana, S. 2007. DNA Binding and Photocleavage Studies of Cobalt(III) Polypyridine Complexes: $[\text{Co}(\text{en})_2\text{PIP}]^{3+}$, $[\text{Co}(\text{en})_2\text{IP}]^{3+}$, and $[\text{Co}(\text{en})_2\text{phe-dione}]^{3+}$. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2007:8.

- Noda, C., He, J., Takano, T., Tanaka, C., Kondo, T., Tohyama, K., Yamamura, H. & Tohyama, Y. 2007. Induction of apoptosis by epigallocatechin-3-gallate in human lymphoblastoid B cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362: 951-957.
- Nordberg, J. & Arner, E. S. 2001. Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology and Medicine*, 31: 1287-1312.
- Ogata, A., Yanagie, H., Ishikawa, Y., Mitsui, Y., Yamashita, A., Hasumi, K., Takamoto, S., Yamase, T. & Eriguchi, M. 2008. Antitumour effect of polyoxomolybdates: induction of apoptotic cell death and autophagy *in vitro* and *in vivo* models. *British Journal of Cancer*, 98: 399-409.
- Osborne, C.K., Hobbs, K. & Trent, J. M. 1987. Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Research and Treatment*, 9: 111-121.
- Pereira, C.C.L., Diogo, C.V., Burgeiro, C.V., Oliveira, P.J., Marques, M.P.M., Braga, S.S., Paz, F.A.A., Pillinger, M. & Gonçalves, I.S. 2008. Complex Formation between Heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin and Cyclopentadienyl Molybdenum (II) Dicarbonyl Complexes: Structural Studies and Cytotoxicity Evaluations. *Organometallics*, 27: 4948-4956.
- Perera, FP. 1997. Environment and Cancer: Who are Suceptible. *Science*, 278: 1536-1542.
- Pritsos, C.A. & Gustafson, D.I. 1994. Xanthine dehydrogenase and its role in cancer hemotherapy. *Oncology Research*, 6: 477-481.
- Rahbari, R., Sheahan, T., Modes, V., Collier, P., Macfarlane, C. & Badge, R.M. 2009. A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *BioTechniques*, 46: 277-284.
- Richter, C. 1998. Nitric Oxide and Its Congeners in Mitochondria: Implications for Apoptosis. *Environmental Health Perspectives Supplements*, 106: 1125-1130.
- Rodrigues, J.M., Luís, A.L., Lobato, J.V., Pinto, M.V., Faustino, A., Soorajhussain, N., Lopes, M.A., Veloso, A.P., Freitas, M., Geuna, S., Santos, J.D. & Maurício, A.C. 2005.

Intracellular Ca^{2+} concentration in the N1E-115 neuronal cell line and its use for peripheral nerve regeneration. *Acta Médica Portuguesa*, 18: 323-328.

Rozados, V.R., Hinrichsen, L.I., Binda, M.M., Gervasoni, S.I., Matar, P., Bonfil, R.D. & Scharovsky, O.G. 2008. Lovastatin enhances the antitumoral and apoptotic activity of doxorubicin in murine tumor models. *Oncology reports*, 19: 1205-1211.

Rudin, C.M. & Thompson, C.B. 1997. APOPTOSIS AND DISEASE: Regulation and Clinical Relevance of Programmed Cell Death. *Annual Review of Medicine*, 48: 267-281.

Russo, P. 2008. Intrinsic Viscosity, *IntrinsicVisc.doc*, 10.

Salaman, J.R., M.A., M.B., Chir, M. & F.R.C.S. 1981. Pharmacological immunosuppressive agents. *Ulster Medical Society*, 50: 36-42.

Sambrook, J.R. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold. Spring Harbour Laboratory Press, 3a ed, Melbourne, Austrália.

Satyanarayana, S., Dabrowiak, J. & Chaires, J. 1993. Tris(phenanthroline)ruthenium (II) Enantiomer Interactions with DNA: Mode and Specific of Binding, *Biochemistry*, 32: 2573-2584.

Shashi, B., Jaswant, S., Madhusudana, R.J., Kumar, S.A. & Nabi, Q.G. 2006. A novel lignan composition from Cedrus deodara induces apoptosis and early nitric oxide generation in human leukemia Molt-4 and HL-60 cells. *Nitric Oxid*, 14: 72-88.

Shashkov, S.N., Kiselev, M.A., Tioutiounnikov, S.N., Kiselev, A.M. & Lesieur, P. 1999. The study of DMSO/ water and DPPC/DMSO/ water system by means of the X-ray, neutron small-angle scattering, calorimetry and IR spectroscopy. *Physica B*, 271: 184-191.

Simstein, R., Burow, M., Parker, A., Weldon, C. & Beckman, B. 2003. Apoptosis, Chemoresistance, and Breast Cancer: Insights From the MCF-7 Cell Model System. *Experimental Biology and Medicine*, 228: 995-1003.

Spiteller, G. 2007. The Important Role of Lipid Peroxidation Processes in Aging and Age Dependent Diseases. *Molecular Biotechnology*, 37: 5-12.

- Srivastava, P.K. 2003. Hypothesis: Controlled necrosis as a tool for immunotherapy of human cancer. *Cancer Immunity*, 3: 4.
- Stankov, J.M. & Markovic, U.S. 2007. Compounds of Mo, V and W in biochemistry and their biomedical activity. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21: 8-16.
- Stiefel, E.I. 2002. The biogeochemistry of molybdenum and tungsten, Molybdenum and Tungsten: Their Roles in Biological Processes. *Metal Ions in Biological Systems*, 39: 1-29.
- Stoner, G.D., Shimkin, M.B., Troxell, M.C., Thompson, T.L. & Terry, L.S. 1976. Test for carcinogenicity of metallic compounds by the pulmonary tumor response in strain A mice. *Cancer Research*, 36: 1744.
- Suh, D. & Chaires, J.B. 1995. Criteria for the Mode of Binding of DNA Binding Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 3: 723-728.
- Supino, R. 1995. *MTT Assays in Methods in Molecular Biology: In Vitro Toxicity Testing Protocols*, O'Hara, S. e Atterwill, C. K., Human Press Inc., Totowa, NJ, USA.
- Tan, J., Lu, Y., Huang, Z., Gu, L. & Wu, J. 2007. Spectroscopic studies of DNA binding modes of cation-substituted anthrapyrazoles derived from emodin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42: 1169-1175.
- Tonissen, K.F. & Trapani, G. 2009. Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53: 87-103.
- Turrens, J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal Physiology*, 552: 335-344.
- Ushio-Fukai e Nakamura, Y. 2009. Reactive Oxygen Species and Angiogenesis: NADPH Oxidase as Target for Cancer Therapy. *National Institutes of Health*, 266: 37-52.
- Vermes, I., Haanen, C. & Reutelingsperger, C. 2000. Flow Citometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods*, 243: 167-190.
- Waern, J.B., Dillon, C.T. & Harding, M.M. 2005. Organometallic Anticancer Agents: Cellular Uptake and Cytotoxicity Studies on Thiol Derivates of the Antitumor Agent Molybdocene Dichloride. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48: 2093-2099.

Wang, Y. & Chiu, J. 2008. Proteomic Approaches in Understanding Action Mechanisms of Metal-Based Anticancer Drugs. *Metal-Based Drugs Journal*, 9.

Wargovich, M.J., Chen, C.D., Jimenez, A., Steele, V.E., Velasco, M., Stephens, L.C., Price, R., Gray, K. & Kelloff, G.J 1996. Aberrant Crypts As A Biomarker For Colon-Cancer - Evaluation Of Potential Chemopreventive Agents In The Rat. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 5: 355-360.

Williams, R.J.P. & Silva, J. J.R.F.2002. The involvement of molybdenum in life. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292: 293-299.

Xu, H., Zheng, K., Deng, H, Lin, L., Zhang, Q. & Ji, L. 2003. Effects of the ancillary ligands of polypyridyl ruthenium(II) complexes on the DNA-binding behaviors. *New Journal of Chemistry*, 27: 1255-1263.

Yamase, T., Fujita, H. & Fukushima, K. 1988. Medical chemistry of polyoxometalates- Part I, Potent antitumor activity of polyoxomolybdates on animal transplantable tumors and human cancer xenographs. *Inorganica Chimica Acta*, 151: 15-18.

Zhang, H., Liu, C., Bu, X. & Yang, M. 2005. Synthesis, crystal structure, cytotoxic activity and DNA-binding properties of the copper (II) and zinc (II) complexes with 1-[3-(2-pyridyl)pyrazol-1-ylmethyl]naphthalene. *Inorganic Biochemistry Journal*, 99: 1119-1125

Zhou, N., Xiao, H., Li, T., Nur-E-Kamal, A.& Liu, L.F. 2003. DNA Damage-mediated Apoptosis Induced by Selenium Compounds. *The journal of Biological chemistry*, 278: 29532-29537.

[1] www.herkules.oulu.fi/isbn9514266676/html/i267388.html acessado em 23/07/2009.

[2] www.exploratorium.edu/imaging_station/index.php acessado em 02/09/2009.

[3] www.sciencedaily.com/gallery/health_medicine/breast_cancer/ acessado em 12/06/2009.

[4] www.icb.usp.br/~bmm/materiais/P3a%20Contagem%20de%20celulas%20em%20camara%20de%20Neubauer.pdf acessado em 15/07/2009.

[5] www.wikipedia.com acessado em 23/07/2009.