



# **Bolsas Universidade de Lisboa / Fundação Amadeu Dias**

**Edição 2011/2012**

## **Relatório de Projeto**

### **Ação anti-tumoral de complexos organometálicos de ouro (I)**

Bolseiro(a): Fátima Cardoso

**Faculdade de Ciências**  
Curso: Biologia em 2012  
Ano: 2º ano

Tutor(a): Margarida Meireles

Julho de 2012

## Índice

Introdução/Enquadramento.....	3
O cancro.....	3
Compostos com ouro.....	3
A enzima tioredoxina redutase.....	3
Compostos organometálicos com ouro (I).....	4
Objetivos do projeto.....	4
Procedimento Experimental.....	5
Linha celular.....	5
Manutenção da linha celular.....	5
Equipamento.....	5
Meio de cultura.....	5
Passagem de células.....	6
Contagem de células.....	6
Preparação de placas de 96 poços.....	7
Preparação das soluções dos compostos a testar.....	7
Determinação da citotoxicidade (IC <sub>50</sub> ).....	7
Determinação da cinética de ação de um complexo de ouro.....	8
Ensaio da tioredoxina redutase.....	8
Preparação de extratos celulares.....	8
Ensaio enzimático.....	9
Cálculo da atividade da tioredoxina redutase.....	9
Doseamento de proteína.....	10
Resultados e discussão.....	10
Ensaio de citotoxicidade.....	10
Cinética da ação dos compostos.....	12
Atividade da tioredoxina redutase.....	13
Execução financeira.....	17
Conclusões.....	17
Bibliografia.....	17

## Introdução/Enquadramento

Data do ano 2500 a.C. a utilização do ouro para fins medicinais pelos árabes, chineses e índios. De facto, ao longo do tempo, os compostos de ouro foram utilizados por várias civilizações para curar vários males, fazer poções ou para efetuar variados tipos de tratamentos. Por exemplo, no século I, Plínio receitava ouro para o tratamento de verrugas, na Europa medieval os alquimistas tinham receitas para um elixir denominado *aurum potable* (solução alcoólica com vários extratos de ervas, óleos essenciais e ouro) e no século XIX, Chrestien receitava cloreto de ouro e sódio para o tratamento da sífilis. No final desse mesmo século o cloreto de ouro e sódio também era usado na cura do alcoolismo crónico.

Foi em 1890 que se descobriu que o ouro possuía propriedades bactericidas, mais concretamente o cianeto de ouro e, devido a esta descoberta que se pensa ter marcado o início do uso do ouro em medicina com base em observação científica, o ouro passou a ser usado no tratamento da tuberculose.

As terapias baseadas no ouro foram alargadas ao tratamento de outras doenças como por exemplo a artrite reumatoide. <sup>[1]</sup>

## O cancro

O cancro surge quando as células normais se transformam em células malignas adquirindo a capacidade de se multiplicarem e invadirem os tecidos e outros órgãos. Para que se desenvolva um cancro é preciso que, de uma forma cumulativa e continuada se produzam alterações que levam a essa multiplicação descontrolada das células.

O desenvolvimento de fármacos anticancerígenos, com capacidade de inibir o crescimento celular, tem sido nos últimos anos uma área relevante na área dos estudos do cancro. Vários compostos têm sido sintetizados e estudados embora a possibilidade da sua utilização como agente terapêutico tenha que ser avaliada em muitos aspetos nomeadamente no que diz respeito à sua toxicidade.

## Compostos com ouro

Os compostos organometálicos contendo ouro têm sido alvo de vários estudos devido tanto à sua capacidade de impedir a proliferação celular como à sua capacidade de inibir a atividade de enzimas importante no metabolismo das células.

## A enzima tioredoxina redutase

A enzima tioredoxina redutase catalisa a reação que reduz a tioredoxina utilizando o NADPH como agente redutor. As tioredoxinas são proteínas que participam em várias reações fisiológicas, nomeadamente em muitos processos reguladores dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigénio, ou seja, é capaz de regular o ambiente

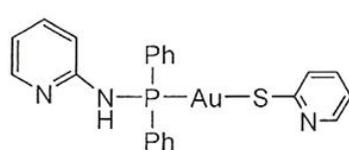
redox intracelular atuando na defesa antioxidante e no controle da regulação redox de diversos processos celulares.

As proteínas existentes no meio intracelular são sensíveis ao stress oxidativo e por isso, a ação do sistema da tioredoxina (que inclui a tioredoxina, a tioredoxina redutase e o NADPH) previne e intervém na reparação de possíveis danos que ocorram nas proteínas e, conseqüentemente, é responsável pela regulação da apoptose, entre outras vias metabólicas. A atividade desta enzima é assim fundamental para a sobrevivência das células e a inibição da sua atividade dá origem à morte celular.

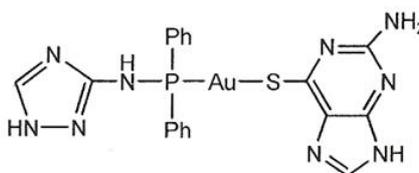
Hoje sabe-se que a atividade da tioredoxina pode ser afetada por vários íons metálicos assim como por compostos de ouro. Assim, o tratamento com inibidores da tioredoxina redutase está associado à inibição do crescimento celular [2] e os compostos utilizados poderão constituir potenciais agentes terapêuticos.

### Compostos organometálicos com ouro (I)

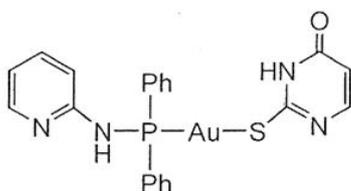
Os compostos testados neste trabalho foram preparados a partir de bioconjugados contendo ouro por síntese química [3] e estão apresentados a seguir:



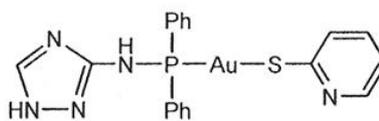
LOC 392



LOC 524



LOC 431



LOC 514

Figura 1- Estrutura química dos compostos estudados

### Objetivos do projeto

Com este projeto pretenderam-se estudar os mecanismos de ação de compostos organometálicos de ouro (I) nomeadamente a sua capacidade para inibir a atividade da enzima tioredoxina redutase.

## Procedimento Experimental

### Linha celular

Para a realização deste trabalho foi usada a linha celular HeLa. Esta linha advém do epitélio do adenocarcinoma humano do colo do útero. Foi isolada em 1951 a partir de uma paciente de nome Henrietta Lacks. É de salientar que as células HeLa são bastante tolerantes a condições adversas e portanto é relativamente fácil mantê-las em cultura celular.

### Manutenção da linha celular

#### Equipamento

De modo a manter as células em condições apropriadas ao seu crescimento e posterior estudo foi necessário usar um equipamento específico, nomeadamente:

1. Câmara de fluxo laminar – Permitiu a obtenção de um ambiente de esterilidade controlado de modo a diminuir em grande escala a probabilidade de contaminação do material celular.
2. Incubadora de CO<sub>2</sub> – Permitiu o estabelecimento das condições apropriadas ao crescimento celular (temperatura a 37 °C, concentração de CO<sub>2</sub> a 5% e humidade relativa a 90%).
3. Microscópio ótico – A partir de observações microscópicas foi possível comprovar e controlar o crescimento celular assim como verificar a possível existência de contaminações.

#### Meio de cultura

Para crescerem, as células necessitam de um meio no qual estejam presentes nutrientes essenciais, antibióticos, um indicador de pH, entres outros componentes. Ao longo do trabalho com as células HeLa foi usado o meio RPMI suplementado com glutamina (1%), Pen-Strep (1%) e soro fetal bovino (10 %).

À medida que as células iam crescendo era necessário renovar o meio para que o crescimento pudesse continuar, ou seja, era de extrema importância substituir o meio já consumido por um novo meio com todas as substâncias necessárias. Para tal retirava-se o meio por sucção tendo o cuidado de tocar o menos possível no fundo da placa, local onde se encontravam aderentes as células. De seguida a placa era lavada com PBS e colocava-se o meio novo levando novamente as placas à incubadora.

## Passagem de células

Quando as células atingem a confluência desejada (80 a 90% de células na placa) é necessário propagá-las com o objetivo de ter um número de células suficiente para que os vários ensaios possam ser realizados. Desta forma procede-se à preparação de subculturas celulares, processo vulgarmente designado por passagem celular.

O método consiste em remover o meio antigo com o cuidado de não atingir o fundo da placa seguindo-se a lavagem com PBS. Após a lavagem adiciona-se tripsina com o objetivo de hidrolisar as ligações de proteínas de adesão ao fundo da placa onde se encontram as células. A placa com tripsina suficiente para abranger a superfície inferior do suporte foi incubada durante 5 minutos a 37°C.

Após a incubação adicionou-se PBS e as células foram ressuspendidas. Por fim todo o conteúdo foi retirado e distribuído por novas placas com meio RPMI devidamente suplementado.

## Contagem de células

Para que se possam realizar os diversos ensaios de uma forma mais eficiente é vantajoso ter conhecimento do número de células existentes em suspensão. Para tal é necessário proceder à sua contagem utilizando um hemocitómetro.

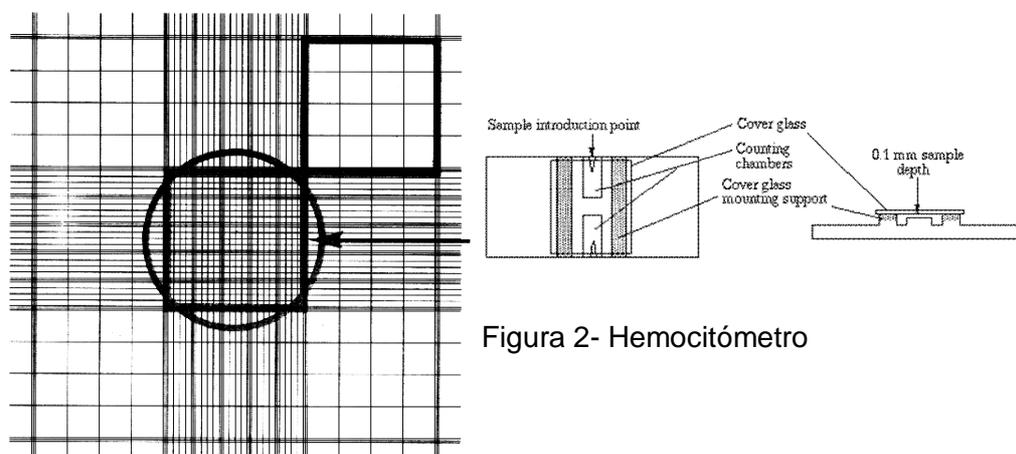


Figura 2- Hemocitómetro

Uma amostra da suspensão celular foi introduzida por capilaridade nas câmaras de contagem do hemocitómetro.

A contagem foi feita na grelha mais densa (125x125) sendo o volume total de suspensão que foi contado igual a 10µL em cada uma das câmaras (20µL no total). Por fim procedeu-se ao seguinte cálculo:

$$\text{Total células / mL} = \text{média do nº células contadas} \times 1 \text{ mm}^2 \times 10^4$$

### Preparação de placas de 96 poços

Para preparar as microplacas de 96 poços nas quais se vão realizar os ensaios e posteriores leituras de resultados, é primeiro necessário calcular a quantidade de suspensão celular que se vai aplicar em cada poço. O objetivo é introduzir cerca de 5000 células em cada poço de modo a que, 48h depois, as placas estejam com a confluência desejada. Após 48h de incubação o meio foi retirado e procedeu-se à aplicação dos compostos a estudar.

Os compostos foram testados em concentrações finais entre 1 e 200  $\mu\text{M}$ . Para garantir a qualidade dos ensaios foram também preparados poços controlo apenas com meio e com a concentração de DMSO utilizada no ensaio (0,5%).

### Preparação das soluções dos compostos a testar

Os compostos a testar são pouco solúveis em água e portanto houve a necessidade de os dissolver em DMSO que é incolor, polar e aprótico, usado para dissolver compostos polares e apolares.

Preparou-se de cada composto de ouro (LOC524, LOC392, LOC514 e LOC431) uma solução mãe com a concentração de 40 mM e a partir dela foram feitas diluições de modo a obter concentrações finais nos poços entre 1 e 200  $\mu\text{M}$ .

### Determinação da citotoxicidade ( $\text{IC}_{50}$ )

Para determinar os efeitos celulares dos compostos organometálicos estudados fizeram-se testes de citotoxicidade e determinou-se o valor de  $\text{IC}_{50}$  desses mesmos compostos. Para tal usou-se o método do MTT [brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-ilo)-2,5-difenilo] que consiste num processo na quantificação de cristais de formazano a partir de medições espectrofotométricas.

Após a aplicação dos compostos nas placas de 96 poços, as células foram incubadas a 37°C durante 48 horas. Após este período o meio velho foi retirado e foi adicionada uma solução de MTT (0,5mg / mL) e meio RPMI deixando-se atuar durante duas horas. Posteriormente o meio foi novamente removido e foi adicionado DMSO às microplacas. O DMSO foi usado com o objetivo de dissolver os cristais de MTT. Por fim fizeram-se as leituras de absorvância e a partir de tais leituras foi possível verificar a atividade celular. O MTT é reduzido, com a consequente formação de cristais, pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase que só se encontra ativo se a célula se encontrar viável. Portanto quanto menor for o valor de absorvância significa que a célula não se encontra viva sendo esse o resultado pretendido.

O IC<sub>50</sub> corresponde ao valor de concentração de composto necessária para impedir o crescimento de 50% das células. Para determinar esse valor, calculou-se a percentagem de sobrevivência celular:

$$\% \text{ sobrevivência} = \frac{\text{Abs}(\text{células vivas depois da aplicação dos compostos})}{\text{Abs}(\text{células vivas: controlo})} \times 100$$

Usou-se o software *Origin8* que permitiu obter uma regressão não linear com os valores de absorvância obtidos a partir da qual se determinou o valor do IC<sub>50</sub> assim como os respectivos erros associados.

### Determinação da cinética de ação de um complexo de ouro

Foi estudada a cinética de ação de um dos compostos ao longo do tempo (LOC524). Para tal determinaram-se os valores da sobrevivência celular e respetivos IC<sub>50</sub> para vários tempos de incubação dos compostos com as células (1,3,7,12,48 horas).

### Ensaio da tioredoxina redutase

Para o ensaio da tioredoxina redutase foram cultivadas células HeLa em placas P100. Quando as células atingiram a confluência desejada foi retirado o meio de cultura e adicionado novo meio contendo os compostos em teste, com a concentração final de 5 µM.

A escolha desta concentração deveu-se ao facto de ela ser ligeiramente superior aos valores dos IC<sub>50</sub> de todos os compostos a testar e assim, estar-se-ia garantidamente numa gama de concentração de compostos que resultaria numa percentagem de morte celular significativa.

Os ensaios não foram todos realizados na mesma altura pelo que para cada ensaio foi preparada uma placa com células que não estiveram em contacto com compostos (controlo).

### Preparação de extratos celulares

Para detetar a atividade enzimática foi preciso numa primeira fase extrair o conteúdo celular e para tal foi usado o reagente CellLytic da Sigma-Aldrich.

As células foram tripsinizadas e centrifugadas (450 x g). Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o sedimento de células foi lavado com PBS e posteriormente colocado num tubo de 2 mL. O sedimento foi então ressuspenso em 150 µL de solução de lise. Nesta altura foi adicionada uma mistura de inibidores de proteases (Sigma).

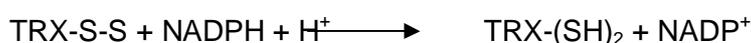
A suspensão foi incubada com agitação durante 15 minutos, tempo necessário para a completa lise celular. Após a incubação a solução foi novamente centrifugada (16 100 x g)

e o sedimento foi desprezado. O sobrenadante que contém as proteínas solúveis, entre as quais a tioredoxina redutase foi colocado num tubo arrefecido e a partir daí fizeram-se alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  que foram armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$  para serem utilizadas em ensaios posteriores.

### Ensaio enzimático

Para proceder a deteção da atividade da tioredoxina redutase usou-se o kit Thioredoxin Reductase Assay da Sigma-Aldrich.

A reação da tioredoxina redutase que ocorre *in vivo* está representada a seguir com a tioredoxina como substrato:



A atividade da tioredoxina nas culturas de células foi determinada usando ácido 5,5' – ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) como substrato:



Dois moles de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) são formados por cada mole de NADPH oxidado. O ensaio foi realizado a  $25^\circ\text{C}$  e o TNB tem um máximo de absorção a 412 nm (coeficiente de extinção molar de  $14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Nas amostras biológicas, outras enzimas como a glutatióno peroxidase e glutatióno redutase também reduzem o DTNB, aumentando a sua taxa de redução. A contribuição destas atividades para a redução total do DTNB pode ser determinada usando um inibidor específico da tioredoxina redutase. Para determinar a redução do DTNB devida apenas à atividade da tioredoxina redutase presente na amostra, o ensaio deve medir inicialmente a redução total de DTNB e depois a redução do DTNB na presença do inibidor específico da tioredoxina redutase. A diferença dos resultados corresponde à redução de DTNB devida à atividade da tioredoxina redutase.

A reação foi realizada num volume de 1 mL e foram utilizadas as soluções tampão, enzima (controlo positivo), inibidor específico da tioredoxina redutase e DTNB fornecidas no kit.

### Cálculo da atividade da tioredoxina redutase

A velocidade de formação de TNB (resultante da ação enzimática) foi calculada através do valor do declive da curva traçada durante o tempo de reação traduzida pelo aumento da absorvância a 412nm. A diferença do declive determinado na ausência e na presença de inibidor irá corresponder à atividade da tioredoxina redutase celular. Os ensaios

foram feitos em triplicado. Foi também determinada a atividade da enzima por mg de proteína.

### Doseamento de proteína

Para determinar a concentração de proteína no extrato celular usou-se o reagente Bradford (Sigma). Este procedimento baseia-se na formação de um complexo entre o corante, o Azul Brilhante G (“Brilliant Blue G”) e a proteína que se encontra na solução. Este complexo é responsável por uma alteração do máximo de absorção do corante de 465nm para 595nm. Procedeu-se à construção de uma curva de calibração com BSA (“bovine serum albumin”) com concentrações entre 0 e 5 µg de proteína.

A curva de calibração foi realizada para um volume final de 1mL e foram usados 200 µL do reagente de Bradford. A incubação foi feita à temperatura ambiente durante 5 minutos. A partir dos valores de absorvância obtidos foi possível construir a curva de calibração e determinar a concentração em proteína dos extratos celulares utilizados nos ensaios da tioredoxina redutase.

## Resultados e discussão

### Ensaio de citotoxicidade

Para iniciar um estudo biológico relativo a determinados compostos é importante fazer ensaios de citotoxicidade. Para tal determinaram-se em primeiro lugar os valores de  $IC_{50}$  de cada composto para que se compreenda a sua ação inibidora nas culturas celulares.

Foi importante comparar os valores de  $IC_{50}$  para ambos os compostos, para averiguar qual seria o grupo químico mais diretamente responsável pela inviabilidade celular.

Neste sentido foram calculados os valores de  $IC_{50}$  para os compostos LOC392 e LOC524.

Embora tal procedimento já tenha sido efetuado anteriormente <sup>[3]</sup> foi importante voltar a fazê-lo pois existe sempre alguma variabilidade de resultados e, no âmbito do presente projeto, para tirar algumas conclusões, era relevante repetir o processo. Por outro lado era também importante obter a experiência laboratorial nesta área.

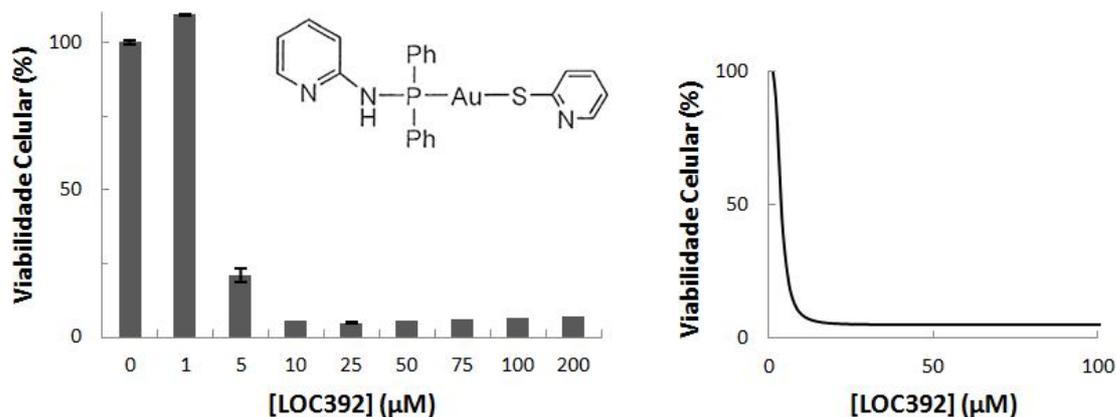


Figura 3- Representações gráficas da % da viabilidade celular em função da concentração de LOC392

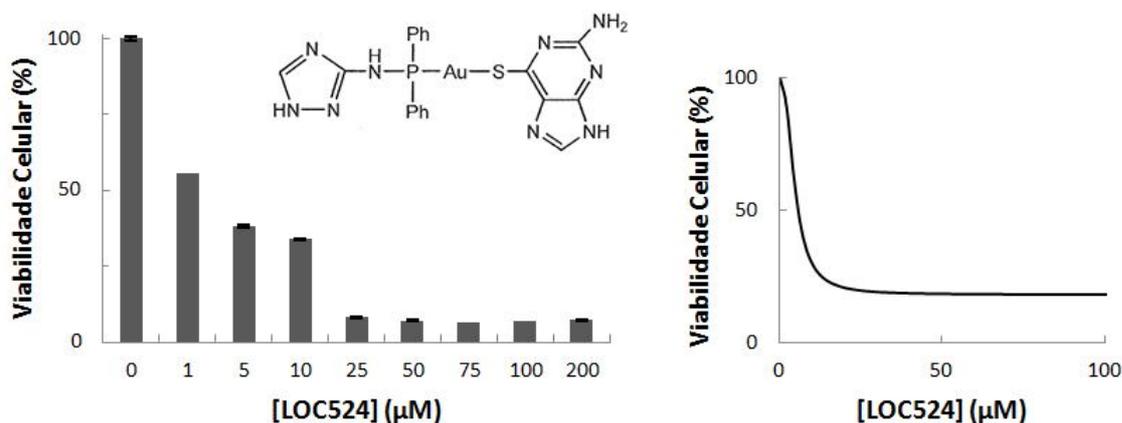


Figura 4- Representações gráficas da % da viabilidade celular em função da concentração de LOC524

Como se pode observar nas figuras ambos os compostos inibem o crescimento celular, contudo o composto LOC524 apresenta um valor de IC<sub>50</sub> mais pequeno do que o composto LOC392. Isto permite-nos concluir que o LOC524 será mais eficaz do que o LOC392 na inibição do crescimento celular.

A seguinte tabela sumariza os resultados obtidos:

Tabela 1-Valores de IC<sub>50</sub> determinados para os compostos estudados.

	IC <sub>50</sub>	Desvio Padrão
<b>LOC392</b>	3,4μM	Não obtido
<b>LOC524</b>	1,2μM	0,04

Os valores de IC<sub>50</sub> determinados neste trabalho embora diferentes, são da mesma ordem de grandeza dos previamente determinados noutros trabalhos <sup>[3]</sup>.

### Cinética da ação dos compostos

Para determinar a cinética de ação fez-se a determinação dos IC<sub>50</sub> ao longo do tempo. Desta forma seria possível concluir acerca da relação entre a viabilidade celular e o tempo de exposição ao composto.

A figura seguinte apresenta a relação entre a viabilidade celular e o tempo de exposição ao composto LOC524.

Tabela 2- Resultados da cinética de ação do complexo LOC524

[Composto] (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	Desvio Padrão
1	78	3,46
3	75	3,98
8	42	2,69
12	26	2,84
48	10	0,86

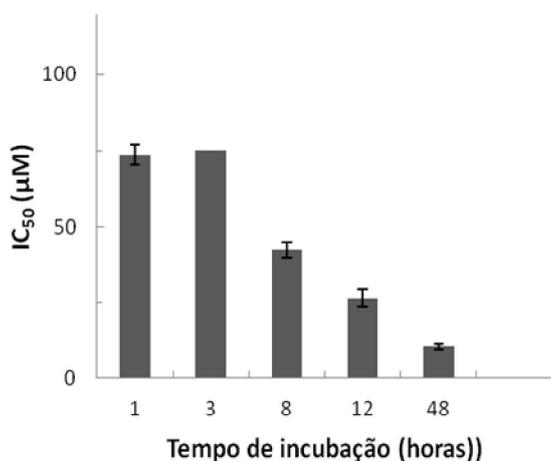
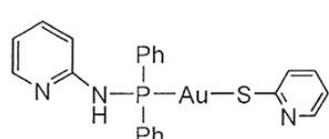


Figura 5- IC<sub>50</sub> em função do tempo de incubação

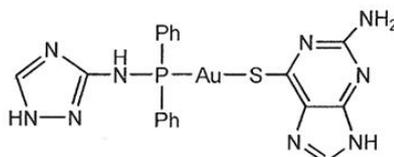
Este estudo demonstrou que a citotoxicidade é máxima às 48 horas, no entanto a ação inibidora do composto evidencia-se a partir das 3 horas de incubação. Isto está certamente relacionado com os mecanismos de entrada na célula e à ação sobre as biomoléculas.

### Atividade da tioredoxina redutase

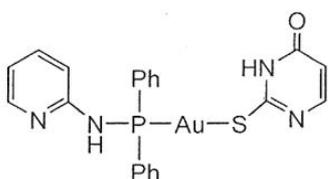
Além dos dois compostos referidos anteriormente e para os quais foram determinados os valores de  $IC_{50}$ , foram também testados outros dois, LOC431 e LOC514, que por pertencerem à mesma família química <sup>[3]</sup> poderiam contribuir para a compreensão do papel dos vários grupos químicos na ação antiproliferativa. São apresentadas a seguir as estruturas químicas dos compostos testados para a atividade da tioredoxina redutase.



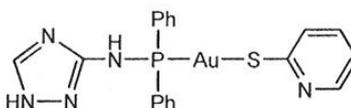
LOC 392



LOC 524



LOC 431



LOC 514

Figura 6- Estrutura química dos compostos estudados

Células HeLa foram incubadas com os compostos para uma concentração final de 5  $\mu$ M, durante 48 horas. Para cada experiência foram também cultivadas células que não estiveram em contacto com qualquer composto. Foram preparados extratos de cada cultura celular e a proteína presente nos extratos celulares foi quantificada. Foi seguidamente determinada a atividade da tioredoxina redutase. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

Para a determinação da quantidade de proteína presente nos extratos celulares foi traçada uma curva de calibração entre 0 e 5  $\mu$ M, usando como padrão a proteína de soro bovino (BSA). A curva obtida foi a seguinte:

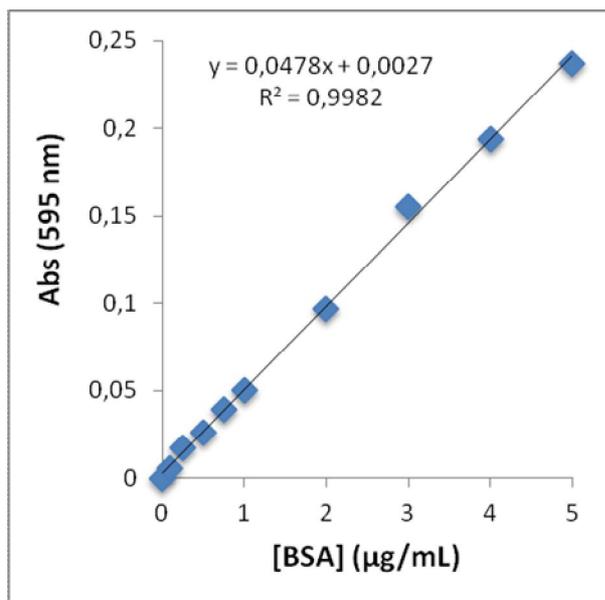


Figura 7- Curva de calibração de BSA

A partir desta curva foi possível calcular a concentração (mg/mL) de proteína nos extratos celulares.

Tabela 3- Resultados do doseamento de proteína

	[proteína] mg/mL	Quantidade de proteína no ensaio/20µl (mg)
<b>Controlo 1</b>	5,818	0,135
<b>LOC524</b>	0,850	0,017
<b>LOC392</b>	5,138	0,103
<b>Controlo 2</b>	6,760	0,116
<b>LOC514</b>	4,982	0,0996
<b>LOC431</b>	2,690	0,0538

Foi em seguida determinada a atividade da tioredoxina redutase conforme descrito nos métodos.

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos para a atividade da tioredoxina redutase nas células controlo e nas que estiveram, em contacto com os 4 compostos atrás referidos.

Para obter o valor da atividade da enzima nas várias condições, foi utilizado o valor do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) a 412 nm do produto formado na reação (TNB) de  $14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Tabela 4-Resultados da determinação da atividade enzimática.

	Velocidade de formação de TNB $\Delta A_{412}/\text{min}$	Proteína no ensaio (mg de proteína em 20 $\mu\text{l}$ )	Atividade da tioredoxina redutase ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	Atividade da tioredoxina redutase/mg de proteína ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	Inibição da atividade (%)
<b>Controlo 1</b>	0,116	0,135	8,198	60,726	0
<b>LOC524</b>	0,009	0,017	0,636	37,412	38,4
<b>LOC392</b>	0,020	0,103	1,413	13,720	77,4
<b>Controlo 2</b>	0,113	0,116	7,986	68,840	0
<b>LOC514</b>	0,044	0,100	3,110	31,10	54,8
<b>LOC431</b>	0,008	0,054	0,565	10,479	84,8

Relativamente ao controlo, os compostos 524 e 514 inibiram a atividade da tioredoxina redutase cerca de 40 a 50% enquanto os compostos 392 e 431 têm uma ação inibitória mais drástica, na ordem dos 80%.

Observa-se também na tabela anterior que os compostos 524 e 431 são mais citotóxicos, uma vez que a morte celular se traduz numa menor quantidade de proteína no ensaio. Por outro lado os compostos 392 e 514 têm uma atividade citotóxica menor, dando origem a uma quantidade de proteína no ensaio semelhante aos controlos e apresentam uma atividade inibitória muito interessante.

Estas diferenças na capacidade de inibir a atividade enzimática, dando origem à morte celular, devem-se certamente às diferenças na estrutura química dos vários compostos.

A inibição da atividade da tioredoxina redutase por parte dos compostos com ouro envolve a ligação do átomo de ouro do inibidor ao átomo de enxofre de uma cisteína presente no local ativo da enzima. Quanto mais forte for esta ligação maior será o poder inibitório do complexo.

Então, a diferença na capacidade de inibição dos diferentes compostos testados, residirá na força da ligação dos diferentes tióis ao átomo de ouro. Quanto mais facilmente estes grupos abandonarem o complexo mais provável será a sua ligação ao centro ativo da enzima provocando a sua inibição.

Os compostos 524 e 514 diferem no tiol ligado ao átomo de ouro – uma tioguanina no caso do 524 e uma mercaptopiridina no 514.

Os compostos 392 e 431 do mesmo modo apresentam diferentes tióis ligados ao átomo de ouro - uma mercaptopiridina no caso do 392 e um tiouracilo no 431.

Poder-se-ia tentar estabelecer uma relação entre a inibição da tioredoxina redutase e o valor determinado para os  $IC_{50}$  dos vários compostos.

A tabela apresentada a seguir resume essas informações. Os valores de  $IC_{50}$  colocados na tabela são os referidos em <sup>[3]</sup> para a linha celular HeLa.

Tabela 5- Comparação da atividade inibitória com os valores de  $IC_{50}$  <sup>[3]</sup>

<b>Composto</b>	<b>% inibição da tioredoxina redutase</b>	<b><math>IC_{50}</math> HeLa</b>
LOC 524	38,4	0,34
LOC 392	77,4	1,7
LOC 514	54,8	4,3
LOC431	84,8	3,3

É difícil estabelecer uma relação direta entre a atividade inibitória e o valor dos  $IC_{50}$ . Todos os composto são muito eficazes em promover a morte celular mas certamente a sua ação envolve vários tipos de acontecimentos no interior das células que porventura não incluem apenas a inibição de um único enzima, embora este seja um fator relevante. De facto o sistema de controlo do stress oxidativo das células inclui outras enzimas, como a glutationo peroxidase e a glutationo redutase cujas atividades são certamente afetadas por estes compostos.

No nosso laboratório estão a decorrer estudos computacionais de reatividade do composto LOC524 na presença de proteínas, que certamente irão contribuir para um conhecimento mais profundo sobre o mecanismo de ação desta família de complexos organometálicos contendo ouro.

## Execução financeira

Uma vez que este projeto se inseriu no plano de trabalho geral a decorrer no laboratório e que não teve associada qualquer verba destinada a consumíveis, poder-se-á afirmar que os custos associados aos ensaios de atividade biológica dos compostos em estudo e à determinação da sua influência na atividade da enzima tioredoxina redutase estiveram de acordo com o plano orçamentado.

## Conclusões

Os trabalhos realizados permitiram concluir que os complexos organometálicos contendo ouro estudados são muito interessantes do ponto de vista da sua atividade biológica.

O estudo da cinética de ação dos complexos, em que se observa que são necessárias 48h para a sua eficácia atingir níveis elevados, parece indicar que o seu modo de atuação envolve vários acontecimentos, todos conduzindo no final à morte celular.

Os vários compostos testados inibem em diferentes extensões a atividade da tioredoxina redutase, sendo estas diferenças devidas à sua estrutura química e nomeadamente às características dos grupos tióis ligados ao átomo de ouro.

Embora interessantes, estes resultados deverão ser considerados um ponto de partida, sendo necessário aprofundar os estudos sobre o mecanismo de ação destes complexos organometálicos, nomeadamente a sua ação sobre outras biomoléculas.

Lisboa, 23 de Julho de 2012

Fátima Cardoso

Margarida Meireles

## Bibliografia

[1] Marcel Gielen and Edward R. T. Tiekink; *“Metallotherapeutic Drugs & Metal-based Diagnostic Agents”*; Wiley, 2005.

[2] Arne Holmgren and Mikael Björnstedt; Thioredoxin and thioredoxin Reductase, *Methods in Enzymology*. **252**; 199-208, 1995.



[3] M<sup>a</sup> Lourdes Ortego Cañaveras; *“Síntesis de complejos de metales del grupo 11 com ligandos derivados de aminoácidos y aminofosfinas. Estudios Biológicos”*, Tesis Doctoral, 2011.