



Joana Filipa Pires Silva

Licenciada

**Caracterização do Potencial Citotóxico e Mecanismos
de Acção de um Complexo de Platina de Configuração
trans em Células Animais**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos Fernandes,
Professora Doutora, FCT/UNL

Co-orientadora: Susana Isabel Rodrigues dos Santos, Professora Doutora,
IST/UTL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Paula Maria Theriaga Mendes Bernardo Gonçalves

Arguente: Prof. Doutora Paula Alexandra Quintela Videira

Vogal: Prof. Doutora Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos Fernandes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro 2012

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

Joana Filipa Pires Silva

**Caracterização do Potencial Citotóxico e Mecanismos de
Acção de um Complexo de Platina de Configuração *trans*
em Células Animais**

*Dissertação apresentada para obtenção do Grau de
Mestre em Genética Molecular e Biomedicina, pela
Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e
Tecnologia*

Orientadora:

Professora Doutora Alexandra Fernandes
(FCT/UNL)

Co-orientadora:

Professora Doutora Susana Santos (IST/UTL)

LISBOA
2012

Parte do trabalho apresentado nesta dissertação encontra-se no Poster:

Silva, J.F., Silva, A.C., Luís, D.V., Santos, S., Borralho, P.M., Rodrigues, C.M., Cabral, G., Videira, P., Rodrigues, A.S., Lasri, J., Charmier, A., Silva, M.F.C.G., Pombeiro, A. e Fernandes, A.R. 2012.
Characterization of the Antiproliferative Potential and Biological Targets of a New Platinum Complex.
XXV International Conference on Organometallic Chemistry, Lisboa, Portugal.

O mesmo encontra-se em anexo nesta dissertação.

Caracterização do Potencial Citotóxico e Mecanismos de Acção de um Complexo de Platina de Configuração *trans* em Células Animais

Copyright Joana Silva, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, à **Professora Doutora Alexandra Fernandes**, minha orientadora, que apostou em mim para a realização deste trabalho experimental, e permitiu que o mesmo fosse exequível. Agradeço ainda por estar sempre disponível e por auxiliar em qualquer momento.

Agradeço, à **Professora Doutora Susana Santos**, minha co-orientadora, que permitiu que este estudo fosse possível, por estar sempre presente e por auxiliar durante este percurso.

Ao **Professor Doutor Jamal Lasri**, pela síntese do complexo organometálico de coordenação de *trans*-Pt, o qual consiste no objectivo de estudo desta tese.

Ao Doutor **Joaquim Henriques**, pela cisplatina disponibilizada, permitindo os estudos realizados com a cisplatina, a fim de enriquecer este trabalho.

À **Professora Doutora Guadalupe Cabral**, pela colaboração e disponibilidade prestada para a realização dos ensaios de citometria de fluxo.

Ao **Professor Doutor António Sebastião Rodrigues**, pela colaboração prestada na realização dos ensaios de genotoxicidade, por ter cedido a linha celular epitelial mamária MCF-10A para os estudos de toxicidade, e pelos conhecimentos transmitidos.

À **Professora Doutora Cecília Rodrigues**, por ter disponibilizado as linhas celulares tumorais HCT116 e HepG2 para a realização dos estudos de citotoxicidade.

À **Professora Doutora Isabel Carreira**, por ter cedido a cultura celular primária de fibroblastos para os estudos de toxicidade.

À **Ana Silva** e ao **Daniel Luís**, por toda a paciência que tiveram para me aturar durante este ano inteiro, por estarem sempre dispostos a ajudar em qualquer altura, e por permitirem que esta tese fosse realizável. Muito obrigada pelo vosso apoio.

À **Ana Cláudia Nunes**, por se ter revelado uma grande amiga, presente nos momentos difíceis, não só no trabalho como no dia-a-dia, e estando sempre pronta a ajudar sem nada em troca.

Aos meus colegas de laboratório, **Vanda Marques, Marina Pires, Helena Oliveira, Sónia Silva, Patrícia Justiniano** e **Luís Raposo**, por me acompanharem durante este ano e intervirem sempre que necessário ajudando no dia-a-dia.

Às minhas grandes amigas **Catarina Rodrigues** e **Catarina Godinho**, que embora longe nunca deixaram de me ajudar, de me dar uma palavra amiga de força. Obrigada por me acompanharem durante este percurso.

Ao meu padrinho **Sérgio Faria**, pelo grande apoio que me deu durante este ano, não só ao permitir que a realização desta tese estivesse mais acessível, mas também pela confiança que depositou em mim.

Ao meu **padrasto** e irmão **Daniel**, por estarem sempre do meu lado e por toda a paciência que tiveram quando eu parecia quase pronta a explodir. Agradeço ainda por todo o esforço que empenharam para

me ajudar a manter-me de pé. E ao meu irmão, um pedido de desculpa, por nem sempre estar presente, nem poder sempre ajudar!

Um MUITO OBRIGADA muito especial à minha **mãe Maria Francisca Pires Ralo**, por me amar incondicionalmente, por me apoiar sempre, sem contestar, em todos os momentos da minha vida. Obrigada por lutares por mim, por me fazeres erguer a cabeça em momentos de grande angústia, e me fazeres lutar durante este ano e durante toda a minha vida. Um muito obrigada a esta pessoa linda que até hoje, não parou de lutar e não baixou os braços para que eu pudesse alcançar todos os meus sonhos e chegar onde cheguei. Um MUITO OBRIGADA com todo o meu coração, por acreditares em mim e tornares toda a minha vida possível. Amo-te muito!

Resumo

Muitos agentes quimioterapêuticos actuais são ineficazes devido à sua elevada toxicidade em tecidos saudáveis e à resistência intrínseca ou adquirida das células cancerígenas. Assim, é imprescindível a síntese de novos compostos com elevado potencial citotóxico em células tumorais e com reduzidos efeitos secundários. Esta tese teve como objectivo a caracterização do potencial anti-tumoral do complexo de coordenação *trans*-[PtCl₂{RC(=O)N=CN-(H)C(Me)₂-CH₂CH₂}₂] (R=CH₂CO₂Me). Os ensaios *in vitro* em linhas tumorais HCT116 e HepG2 revelaram que o complexo apresenta valores de IC₅₀ de 22,74 e 22,08 μM, respectivamente. Avaliou-se a sua selectividade para células tumorais, observando-se que em culturas celulares de fibroblastos e de células epiteliais MCF-10A, o complexo promoveu a diminuição da viabilidade em cerca de 15 %, enquanto em linhas tumorais a diminuição foi superior a 50 %. A marcação com Hoechst 33258 de células HCT116 e HepG2 incubadas com 35 μM do complexo permitiu observar fragmentação e condensação nuclear, características do mecanismo de apoptose. Para a mesma concentração de composto, a análise por citometria de fluxo com marcação dupla com anexina V-FITC e iodeto de propídio revelou 32,52 % de células HCT116 em apoptose. Sendo a molécula de DNA o principal alvo da cisplatina, realizaram-se estudos de interacção, para determinar a afinidade do complexo para esta molécula. A constante de afinidade, determinada por titulações UV, apresentou um valor de 6,67x10⁵ M⁻¹, que é indicativo de elevada afinidade para o DNA, comparativamente ao valor de referência obtido para a doxorubicina. Uma vez que se observou retardamento da mobilidade electroforética da forma superenrolada do DNA plasmídico, com o aumento da concentração do complexo, a interacção deste com o DNA ocorre, possivelmente, pela formação de aductos. Contudo, o complexo não apresenta genotoxicidade significativa em células V79, sendo que outros mecanismos, nomeadamente ao nível da regulação do ciclo celular, poderão estar envolvidos na actividade antiproliferativa do complexo.

Palavras-Chave: Cancro, Cisplatina, *trans*-Pt, Citotoxicidade, Selectividade, DNA

Abstract

Many of the currently used chemotherapeutic agents present important drawbacks such as their high toxicity towards healthy tissues and the intrinsic and acquired drug resistance presented by tumor cells. Thus, it is of maximum importance to find new compounds with either high cytotoxic potential against tumor cells and reduced side effects. The aim of this work was to characterize the anti-tumor potential of a coordination compound, *trans*-[PtCl₂{RC(=O)N=CN-(H)C(Me)₂-CH₂CH₂}₂] (R=CH₂CO₂Me). *In vitro* assays in tumor cell lines allowed determining IC₅₀ values of 22,74 and 22,08 μM for HCT116 and HepG2 cells, respectively. Additionally, the complex presented selectivity to tumor cells over cultured non-tumor fibroblasts and MCF-10A epithelial cells: it promoted about 15 % loss of viability in these non-tumor cells comparing to more than 50 % in tumor cells. HCT116 and HepG2 cells exposed to 35 μM of the complex presented typical features of apoptosis, namely nuclear fragmentation and condensation, as observed by Hoechst 33258 staining. Furthermore, 32,52 % of apoptotic cells were determined after flow cytometry analysis of HCT116 cells treated with 35 μM of the complex and double stained with annexinV-FITC and propidium iodide. Since DNA is the major cellular target of cisplatin, DNA interaction studies were performed in order to evaluate the ability of the complex to bind DNA. The obtained DNA affinity constant of 6.67 x 10⁵ M⁻¹ suggests that the complex interacts with DNA with high affinity, by comparison to the value obtained for doxorubicin. The complex induced a decrease of the electrophoretic mobility of supercoiled plasmid DNA in a concentration-dependent manner, which might suggest the formation of complex-DNA adducts. However, the complex didn't present relevant genotoxicity in V79 cells, and hence its antiproliferative activity must be due to other mechanisms such as cell cycle arrest.

Keywords: Cancer, Cisplatin, *trans*-Pt, Cytotoxicity, Selectivity, DNA

Índice Geral

	Página
Índice de Figuras	xvii
Índice de Tabelas	xxi
Lista de Abreviaturas	xxiii
Lista de Unidades	xxvi
Lista de Símbolos	xxvi
1. Introdução	1
1.1. O Cancro	1
1.1.1. Incidência e Mortalidade	1
1.1.2. Tumorigénese	2
1.2. Morte Celular	5
1.2.1. Apoptose	6
1.2.1.1. Via Extrínseca ou de Receptor de Morte Celular	8
1.2.1.2. Via Intrínseca ou Mitocondrial	8
1.2.2. Efeito Supressor de Tumores de p53	10
1.3. Terapêutica no Cancro	11
1.3.1. Compostos de Platina	13
1.3.1.1. Cisplatina	13
1.3.1.2. Análogos da Cisplatina	16
1.3.1.3. Compostos de Platina de Configuração <i>trans</i>	18
1.3.2. Doxorrubicina	20
1.4. Introdução ao Tema da Tese	21
2. Materiais e Métodos	23
2.1. Compostos em Estudo	23
2.2. Linhas Celulares Humanas	23
2.2.1. Cultura das Linhas Tumerais e Não-Tumerais	24
2.2.2. Manutenção das Culturas	24

2.3. Avaliação do Potencial Citotóxico	25
2.3.1. Ensaio de Viabilidade Celular	25
2.4. Avaliação do Potencial Apoptótico	26
2.4.1. Marcação com a Sonda Hoechst 33258	26
2.4.2. Marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio	27
2.4.3. Actividade das Caspases-3/7	28
2.4.4. Expressão de Genes Envolvidos no Processo de Apoptose	29
2.4.4.1. Extracção do RNA Total	29
2.4.4.2. Síntese de cDNA	29
2.4.4.3. Amplificação de cDNAs Alvo por PCR	30
2.5. Estudos de Interação com o DNA	32
2.5.1. Espectroscopia de Absorção	32
2.5.2. Ensaio de Retardamento da Mobilidade Electroforética (EMSA)	33
2.5.2.1. Cultura de <i>Escherichia coli</i>	33
2.5.2.2. Extracção de DNA Plasmídico (pBSKII)	33
2.5.2.3. Procedimento do Ensaio EMSA	33
2.5.3. Digestão com <i>SmaI</i> e <i>DraI</i>	34
2.5.4. Capacidade de Indução de Aberrações Cromossómicas (Genotoxicidade)	35
2.5.4.1. Cultura da Linha Celular V79	35
2.5.4.2. Choque Hipotónico e Fixação	35
2.5.4.3. Preparação das Lâminas para Observação das Aberrações Cromossómicas	36
2.5.5. Ensaio de Inibição da Actividade de Decatenação da Topoisomerase II	36
2.6. Análise da Progressão do Ciclo Celular	36
3. Resultados e Discussão	39
3.1. Avaliação do Potencial Citotóxico	39
3.2. Avaliação do Potencial Apoptótico	45
3.2.1. Marcação com a Sonda Hoechst 33258	45

3.2.2. Marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio	47
3.2.3. Actividade das Caspases-3/7	50
3.2.4. Expressão de Genes Envolvidos no Processo de Apoptose	51
3.3. Interação com o DNA	54
3.3.1. Espectroscopia de Absorção	54
3.3.2. Ensaio de Retardamento da Mobilidade Electroforética (EMSA)	55
3.3.3. Digestão com <i>SmaI</i> e <i>DraI</i>	58
3.3.4. Capacidade de Indução de Aberrações Cromossómicas (Genotoxicidade)	59
3.3.5. Ensaio de Inibição da Actividade de Decatenação da Topoisomerase II	62
3.4. Progressão do Ciclo Celular	64
4. Conclusão e Perspectivas Futuras	67
5. Referências Bibliográficas	69
Anexo	xxvii
Anexo I – Poster intitulado de <i>Characterization of the Antiproliferative Potential and Biological Targets of a New Platinum Complex.</i>	xxix

Índice de Figuras

	Página
Figura 1.1 – Incidência e Mortalidade a nível mundial (A) e em Portugal (B) para os principais tipos de cancro (dados referentes ao número de novos casos de morte por cancro em 100000 pessoas por ano) (Adaptado de GLOBOCAN, 2008).	1
Figura 1.2 – O processo multifásico de carcinogénese é desencadeado através de mutações em células epiteliais que permitem que estas proliferem descontroladamente (Adaptado de Albini e Sporn, 2007).	3
Figura 1.3 – Representação das principais características adquiridas pelas células durante o processo de carcinogénese (Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011).	4
Figura 1.4 – A via intrínseca ou mitocondrial da apoptose é dependente da razão entre os níveis citoplasmáticos das proteínas Bcl-2 (anti-apoptótica) e Bax (pró-apoptótica), sendo a activação da última essencial à progressão do processo apoptótico.	9
Figura 1.5 – Principais vias de indução da apoptose por p53: a via dependente da sua acção como factor de transcrição, e as vias dependentes da translocação de p53 para a mitocôndria e da sua actividade a nível citoplasmático (Adaptado de Amaral <i>et al.</i> , 2010).	11
Figura 1.6 – Estrutura do complexo <i>cis</i> -diaminodichloro-platina(II), cisplatina (Hannon, 2007).	13
Figura 1.7 – Bioactivação da cisplatina, que resulta da alteração da coordenação da platina por substituição dos átomos de cloro por moléculas de água (Adaptado de Kelland, 2007).	14
Figura 1.8 – Representação dos vários tipos de aductos formados pelo complexo activo de cisplatina na molécula de DNA (Adaptado de Masters e Köberle, 2003).	15
Figura 1.9 – Processo de síntese do complexo JL130F1, um complexo <i>trans</i> -Pt(II) contendo dois ligandos de oxadiazol em substituição das duas aminas presentes na molécula de cisplatina (Charmier <i>et al.</i> , 2004).	20
Figura 1.10 – Estrutura química da DOX (Stiborova <i>et al.</i> , 2012).	20
Figura 3.1 – Viabilidade celular das linhas celulares tumorais HCT116 e HepG2 após 48 horas de exposição ao complexo JL130F1.	40

Figura 3.2 – Viabilidade celular das linhas celulares tumorais HCT116 e HepG2 após 48 horas de exposição à cisplatina.	41
Figura 3.3 – Viabilidade celular da linha celular tumoral HCT116 após 48 horas de exposição à DOX.	41
Figura 3.4 – Viabilidade celular da linha celular MCF-10A após 48 horas de exposição ao complexo JL130F1.	44
Figura 3.5 – Viabilidade celular da linha celular de fibroblastos após 48 horas de exposição ao complexo JL130F1.	44
Figura 3.6 – Células da linha tumoral HCT116 marcadas com a sonda nuclear Hoechst 33258 após tratamento com ou sem o complexo JL130F1 nas concentrações de 20, 35 e 50 μ M, por 48 horas.	46
Figura 3.7 – Células da linha tumoral HepG2 marcadas com a sonda nuclear Hoechst 33258 após tratamento com ou sem o complexo JL130F1 nas concentrações de 20, 35 e 50 μ M, por 48 horas.	47
Figura 3.8 – Ensaio de citometria de fluxo para marcação dupla com Anexina V-FITC e IP, para quantificação de células em apoptose, inicial e tardia, e necrose, na ausência (controlo com 0,2 % (v/v) de DMSO) ou presença do complexo JL130F1 nas concentrações de 35 e 45 μ M, em células HCT116, por 48 horas.	49
Figura 3.9 – Clivagem do substrato pró-fluorescente Z-DEVD-R110 pela activação das caspases-3/7, resultando na emissão de fluorescência verde correspondente à rodamina 110 (Adaptado de Apo-One® Homogeneous Caspase-3/7 Assay, TB295, Promega 2009).	50
Figura 3.10 – Variação da actividade das caspases-3/7 em relação ao controlo (contendo 0,2 % (v/v) de DMSO), na linha celular tumoral HCT116, após exposição às concentrações de 25, 35 e 45 μ M do complexo JL130F1, por um período de 48 horas.	51
Figura 3.11 – Avaliação da variação da expressão dos genes <i>CASP3</i> , <i>BAX</i> , <i>BCL2</i> e <i>CDKN1A</i> , em células HCT116 incubadas com 35 μ M de JL130F1 ou DMSO a 0,2 % (v/v) (controlo), por 48 horas.	52
Figura 3.12 – Variação da absorvância do complexo JL130F1 (23,2 μ M) na região do UV, na ausência (linha a preto) e na presença de concentrações crescentes de CT-DNA (maior concentração de DNA representada pela linha vermelha), em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7.	54

Figura 3.13 – Representação das três formas do DNA plasmídico, Forma I, II e III (Adaptado de Yu <i>et al.</i> , 2007).	56
Figura 3.14 – Electroforese em gel de agarose a 0,7 % (p/v) dos produtos resultantes da incubação do complexo JL130F1 em concentrações crescentes (60 a 350 µM) e DNA plasmídico pBSKII.	57
Figura 3.15 – Electroforese em gel de agarose a 0,8 % (p/v) dos produtos da digestão de pUC18 com as enzimas de restrição <i>SmaI</i> (um fragmento de 2686 pb) e <i>DraI</i> (três fragmentos de 1975, 692 e 19 pb, sendo o último não visível), após tratamento com o complexo JL130F1 nas razões [complexo]/[DNA] (r) de 0,1 e 0,3.	59
Figura 3.16 – Distribuição percentual dos diferentes tipos de aberrações cromossómicas em células metafásicas de fibroblastos pulmonares de hamster chinês (V79) após tratamento com o complexo JL130F1 nas concentrações de 5, 10 e 20 µM, 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo negativo) e MMC a 1,5 µM (controlo positivo).	60
Figura 3.17 – Variação do Índice Mitótico (IM) em células V79 após tratamento com o complexo JL130F1 nas concentrações de 5, 10 e 20 µM, 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo negativo) e MMC a 1,5 µM (controlo positivo).	61
Figura 3.18 – Processo de decatenação de duas moléculas de DNA plasmídico, induzido pela topoisomerase II, através da formação de uma quebra em cadeia dupla numa molécula de DNA, com conseqüente separação das duas moléculas (Adaptado de Nitiss, 2009).	63
Figura 3.19 – Gel de electroforese a 1 % (p/v) de agarose demonstrando a capacidade inibitória da actividade de decatenação da topoisomerase II por JL130F1 e DOX.	64

Índice de Tabelas

	Página
Tabela 1.1 – Estrutura dos três derivados de cisplatina actualmente utilizados em quimioterapia, sua actividade biológica, tipo de aductos formados com o DNA, e vantagens e desvantagens da sua aplicação clínica face à cisplatina.	17
Tabela 2.1 – Propriedades dos compostos utilizados no trabalho experimental.	23
Tabela 2.2 – Concentrações utilizadas de MgCl ₂ , <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> e DNA molde e a temperatura de <i>annealing</i> , para amplificação por PCR do cDNA relativo aos genes <i>ACTB</i> , <i>CASP3</i> , <i>BAX</i> , <i>BCL2</i> e <i>CDKN1A</i> .	30
Tabela 2.3 – Sequência dos <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> e tamanho do amplicão esperado para cada um dos genes em estudo.	31
Tabela 2.4 – Programa de PCR utilizado para amplificação das amostras de cDNA correspondentes aos genes codificantes para p21, Bax, Bcl-2, caspase-3 e β-actina.	31
Tabela 2.5 – Condições reaccionais utilizadas na avaliação da interferência do complexo JL130F1 sobre a actividade de endonuclease das enzimas <i>SmaI</i> e <i>DraI</i> .	34

Lista de Abreviaturas

A	Adenina
Abs	Absorvância
Abs₂₆₀/Abs₂₃₀	Razão entre a absorvância medida a 260 nm e a absorvância a 230 nm
Abs₂₆₀/Abs₂₈₀	Razão entre a absorvância medida a 260 nm e a absorvância a 280 nm
ACTB	Gene que codifica para a proteína β -actina
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
ATP	5'-trifosfato de adenosina
BAX	Gene que codifica para a proteína pró-apoptótica Bax, da família Bcl-2
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCL2	Gene que codifica para a proteína anti-apoptótica Bcl-2, da família Bcl-2
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BSA	Albumina do Soro Bovino, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Citosina
Ca²⁺	Di-catíão de cálcio
CASP3	Gene que codifica para a protease de cisteína caspase-3
CDKN1A	Gene que codifica para a proteína p21
cDNA	DNA complementar, do inglês <i>complementar DNA</i>
Cl	Cloro
CO₂	Dióxido de carbono
CSB	Quebra cromossômica
CSG	<i>Gap</i> cromossômico
CTB	Quebra cromatídica
CT-DNA	DNA de timo de bezerro, do inglês <i>Calf Thymus-DNA</i>
CTG	<i>Gap</i> cromatídico
DACH	1,2-diaminociclohexano, do inglês <i>1,2-diaminocyclohexane</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO	Sulfóxido de dimetilo, do inglês <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DOX	Doxorrubicina
EGF	Factor de crescimento epidérmico, do inglês <i>Epidermal Growth Factor</i>
EMSA	Ensaio de Retardamento da Mobilidade Electroforética, do inglês <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ENDO	Endoreduplicação

Fas	<i>Fatty acid synthetase</i>
FBS	Soro Fetal Bovino, do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, do inglês <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
G	Guanina
HCT116	Linha celular do carcinoma colorectal humano
HepG2	Linha celular do carcinoma hepatocelular humano
HMG	Grupo de elevada mobilidade, do inglês <i>High Mobility Group</i>
IC₅₀	Concentração de composto inibitória de 50 % da viabilidade celular, do inglês <i>Inhibitory Concentration</i>
IM	Índice Mitótico, do inglês <i>Mitotic Index</i>
IP	Iodeto de Propídio, do inglês <i>Propidium Iodide</i>
JL130F1	Composto de <i>trans</i> -Pt em estudo
K₂HPO₄	Hidrofosfato de dipotássio
K_b	Constante de afinidade para o DNA
KCl	Cloreto de potássio
kDNA	DNA catenado
LB	Meio de Cultura líquido <i>Luria-Bertani</i>
MA	Células multi-aberrantes
MCF-10A	Linha celular saudável de células da glândula mamária
Mdm2	<i>Murine double minute 2</i>
MRC-5	Linha celular não-tumoral de fibroblastos humanos
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MMC	Mitomicina C
mRNA	RNA mensageiro
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
n.a.	Não adicionado
N7	Azoto na posição 7
Na₂HPO₄	Hidrofosfato de disódio
NaCl	Cloreto de sódio
NER	Reparação por Excisão de Nucleótidos, do inglês <i>Nucleotide Excision Repair</i>
Nº	Número
Noxa	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
PBS	Tampão de Fosfato Salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
pBSKII	DNA plasmídico pBluescript II <u>SK</u> +
pH	Potencial de Hidrogénico iónico

PMS	Metossulfato de fenazina, do inglês <i>Phenazine Methosulphate</i>
Pt	Átomo de Platina
Pt(II)	Átomo de Platina(II)
Puma	<i>Bcl-2 binding component 3</i>
r	Razão
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	Espécies Reactivas de Oxigénio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	Transcritase reversa – reacção em cadeia da polimerase, do inglês <i>Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction</i>
SMAC/DIABLO	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP-bind protein with low pI</i>
T	Timina
TAE	Tampão <u>T</u> ris- <u>A</u> cetato- <u>E</u> DTA
TETRA	Rearranjo tetra-radial
TNF	Factor de Necrose Tumoral, do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TOPO II	Topoisomerase II
TP53	Gene supressor de tumores que codifica para a proteína p53
TRI	Rearranjo tri-radial
Tris-HCl	Tris-Hidroclorito
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta
V79	Linha celular de fibroblastos pulmonares de <i>Cricetulus griséus</i>
Vol	Volume

Lista de Unidades

% (p/v)	Porcentagem peso/volume
% (v/v)	Porcentagem volume/volume
h	Hora
kg	Quilograma; g – grama (10^{-3} kg), mg – miligrama (10^{-6} kg), μ g – micrograma (10^{-9} kg); ng – nanograma (10^{-12} kg)
L	Litro; mL – mililitro (10^{-3} L), μ L – microlitro (10^{-6} L)
m	Metro; cm – centímetro (10^{-2} m), mm – milímetro (10^{-3} m); nm – nanometro (10^{-9} m)
M	Molar (mol/L); mM – milimolar (10^{-3} M), μ M – micromolar (10^{-6} M)
min	Minuto
mol	Mole; pmol – picomole
°C	Graus Celsius
pb	Pares de bases
rpm	Rotações por minuto
U	Unidade; mU – miliunidade
UA	Unidade de absorvância
V	Volt

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
[complexo]	Concentração de complexo
[DNA]	Concentração de DNA
Σ	Somatório
ϵ	Coefficiente de extinção molar
ϵ_a	Coefficiente de extinção molar aparente
ϵ_b	Coefficiente de extinção molar do composto ligado ao DNA
ϵ_f	Coefficiente de extinção molar do composto no estado livre
λ	Comprimento de onda
ℓ	Percurso óptico

1. Introdução

1.1. O Cancro

1.1.1. Incidência e Mortalidade

O cancro é a segunda causa de morte tanto nos países desenvolvidos como em vias de desenvolvimento (Jemal *et al.*, 2011; Fernandes, 2010). Nestes últimos anos tem-se observado um aumento na incidência de cancro devido principalmente ao crescimento e envelhecimento da população mundial e aos comportamentos de risco adoptados, de entre os quais o tabagismo, as dietas alimentares desequilibradas e a falta de exercício físico (Jemal *et al.*, 2011). Em 2008 foram estimados mundialmente 12,7 milhões de novos casos e 7,6 milhões de mortes por cancro, o equivalente a 13 % das mortes contabilizadas nesse ano (WHO, 2012; Jemal *et al.*, 2011).

Mundialmente evidenciou-se uma maior incidência de cancros do pulmão, mama, colorectal e próstata, e uma maior taxa de mortalidade associada aos cancros do pulmão, estômago, fígado, colorectal e mama (Figura 1.1A) (Adaptado de GLOBOCAN, 2008). Em Portugal observou-se uma maior incidência e taxa de mortalidade para os cancros colorectal, mama, próstata, pulmão e estômago (Figura 1.1B) (Adaptado de GLOBOCAN, 2008). A observação de uma relação próxima entre as taxas de incidência e mortalidade para alguns cancros, como é o caso dos cancros do pulmão, estômago e fígado, permitem inferir a existência de uma terapêutica ineficiente, possivelmente devida a uma detecção tardia da doença, ou à aquisição de mecanismos de resistência aos agentes quimioterapêuticos.

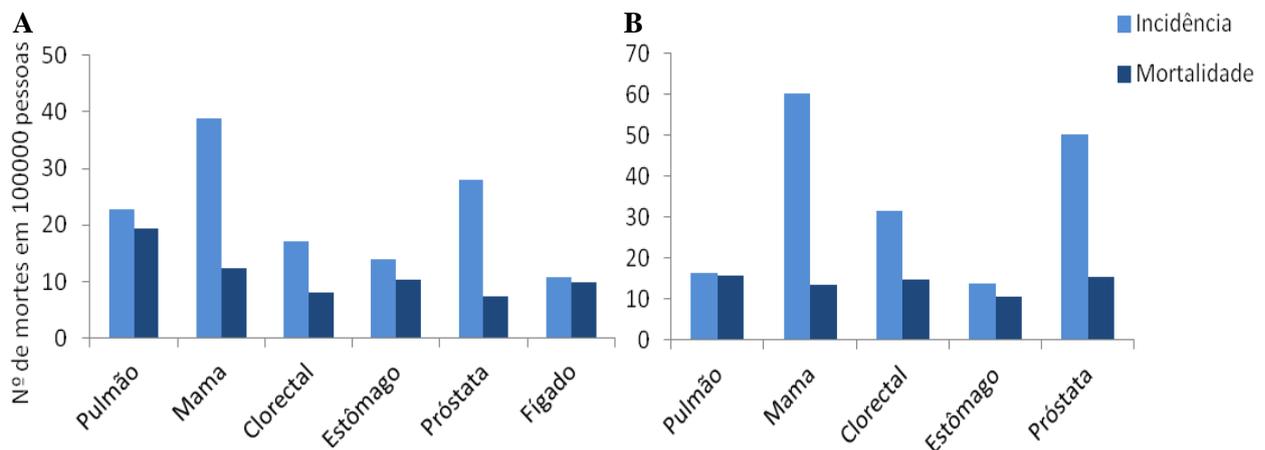


Figura 1.1 – Incidência e Mortalidade a nível mundial (A) e em Portugal (B) para os principais tipos de cancro (dados referentes ao número de novos casos de morte por cancro em 100000 pessoas por ano). Dados referentes a 2008 (Adaptado de GLOBOCAN, 2008).

Para o ano de 2030 são estimadas 12 milhões de mortes por cancro (Fernandes, 2010). Desta forma, apesar da grande investigação na área do cancro e dos avanços no tratamento desta doença, é visível um aumento da incidência bem como da mortalidade por cancro a nível mundial, sendo necessário continuar a investigação nomeadamente em novas terapias a serem aplicadas a fim de reduzir significativamente estas estimativas (Fernandes, 2010; Anand *et al.*, 2008; Kovvali, 2002).

1.1.2. Tumorigénese

O cancro é uma doença heterogénea cujos diferentes tipos apresentam em comum uma elevada desregulação da proliferação celular (Elmore, 2007; Robbins *et al.*, 2003; Garrett, 2001).

Os factores envolvidos no desencadeamento da tumorigénese podem ser englobados em dois grandes grupos: os internos, como mutações hereditárias e alterações hormonais e imunitárias e, os externos ou ambientais, dos quais são exemplo o tabagismo e o alcoolismo, a dieta alimentar desequilibrada e a obesidade, a falta de exercício físico, agentes infecciosos, poluentes ambientais, condições de *stress* e radiação (WHO, 2012; Anand *et al.*, 2008).

Mutações genéticas na linha germinal, e portanto hereditárias, estão associadas a um reduzido número de cancros (5 a 10 % de todos os cancros) (Grivennikov *et al.*, 2010; Anand *et al.*, 2008). A maioria dos casos de cancro (90 a 95 %) está associada a mutações somáticas promovidas por factores ambientais (Grivennikov *et al.*, 2010; Anand *et al.*, 2008; Robbins *et al.*, 2003).

Mutações aleatórias nos genes implicados na proliferação ou morte celular desencadeiam uma alteração no equilíbrio entre a divisão e a morte celular, impedindo que as células respondam aos normais mecanismos homeostáticos (Bertram, 2001). Desta forma, o aumento anormal e descontrolado do número de células após várias divisões sucessivas é clinicamente referido como neoplasia (Bertram, 2001).

Uma célula neoplásica apresenta potencial replicativo aumentado, não respondendo à regulação do crescimento celular e competindo com células saudáveis pelos mesmos substratos metabólicos (Robbins *et al.*, 2003). Uma neoplasia, ou tumor, pode ser classificada de benigna ou maligna (Robbins *et al.*, 2003). Ao contrário de um tumor benigno, que se apresenta espacialmente confinado, um tumor maligno, ou cancro, exhibe capacidade de invasão dos tecidos adjacentes ao foco primário e de metastização (Robbins *et al.*, 2003).

O processo de progressão tumoral é lento e bastante complexo, dependendo de uma sequência de múltiplas etapas e de uma grande mutagenicidade a qual lhe permite a aquisição de determinadas propriedades, referidas adiante, que tornam possível a progressão tumoral (Luo *et al.*, 2009; Teixeira, 2008; Hanahan e Weinberg, 2000). O processo carcinogénico é definido por três grandes etapas: iniciação, promoção e progressão (Kundu e Surh, 2004), e encontra-se esquematizado na Figura 1.2.

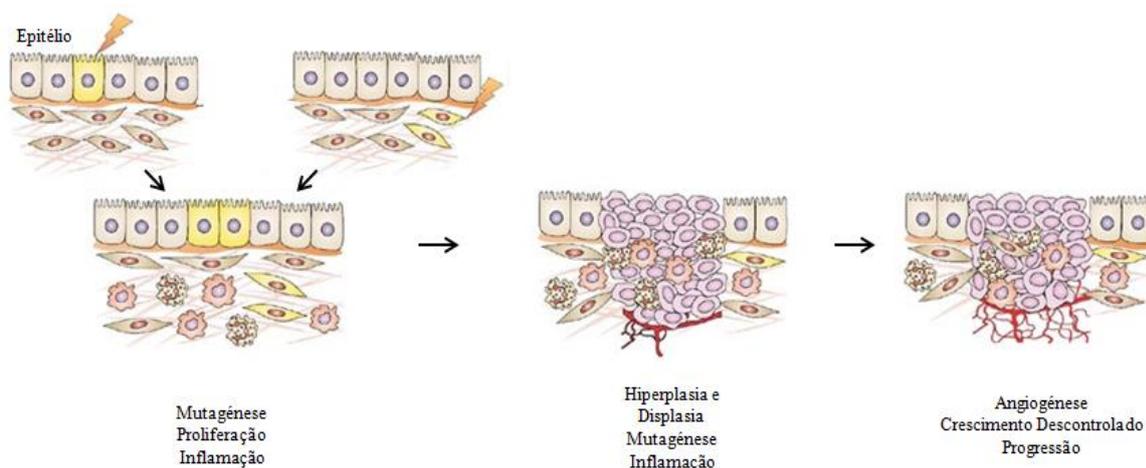


Figura 1.2 – O processo multifásico de carcinogênese é desencadeado através de mutações em células epiteliais que permitem que estas proliferem descontroladamente. O resultante desequilíbrio na homeostasia celular promove uma resposta inflamatória, e assim, o crescimento tumoral em grande parte suportado pela angiogênese. A hiperplasia e a displasia culminam no desenvolvimento do estado maligno da neoplasia, o cancro (Adaptado de Albini e Sporn, 2007).

A tumorigênese é desencadeada pela presença de alterações genéticas não letais no genoma de uma célula normal (Teixeira, 2008; Robbins *et al.*, 2003). Subsequentemente ocorre a acumulação de mutações, favorecida por danos nas vias de reparação do DNA, que impedem a reparação destas alterações por parte da célula (Teixeira, 2008; Robbins *et al.*, 2003). A acumulação destas mutações em genes essenciais ao controlo da proliferação celular, da apoptose e da manutenção da integridade do genoma, conferem vantagem em termos de sobrevivência e proliferação celular, permitindo a expansão clonal da célula inicialmente alterada e assim a transformação de uma célula normal em tumoral (Luo *et al.*, 2009; Teixeira, 2008; Hanahan e Weinberg, 2000).

As principais classes de genes envolvidas na tumorigênese incluem oncogenes e genes supressores de tumores (Croce, 2008; Lewin, 2004; Robbins *et al.*, 2003). Os primeiros são activados inadequadamente através de mutações de ganho de função e os seus produtos de expressão encontram-se envolvidos na progressão tumoral (Lewin, 2004; Robbins *et al.*, 2003; Hanahan e Weinberg, 2000). Os segundos codificam para proteínas envolvidas no controlo do ciclo celular e são inactivados por mutações de perda de função (Lewin, 2004; Robbins *et al.*, 2003; Hanahan e Weinberg, 2000). A aquisição sequencial de mutações genéticas e/ou epigenéticas adicionais tem origem numa instabilidade genómica que permite a progressão tumoral até ao aparecimento de uma neoplasia maligna, ao promoverem um aumento da proliferação celular, capacidade de invasão do tecido normal local e metastização (Hanahan e Weinberg, 2011; Teixeira, 2008; Robbins *et al.*, 2003; Bertram, 2001).

Considera-se a existência de seis características comuns a todos os cancros humanos, nomeadamente: independência/auto-suficiência de factores de crescimento; insensibilidade a sinais inibidores de crescimento; evasão aos mecanismos de morte celular programada (apoptose); potencial

replicativo ilimitado; capacidade de invasão e metastização e indução de angiogénese (capacidade de formação de novos vasos sanguíneos) sustentada (Hanahan e Weinberg, 2011), como exemplificadas na Figura 1.3. Estados inflamatórios podem encontrar-se também associados à tumorigénese e progressão tumoral, uma vez que o microambiente do tumor é enriquecido com factores de crescimento, de sobrevivência e pró-angiogénicos, bem como enzimas modificadoras da matriz extracelular, que facilitam o crescimento celular, a angiogénese, a invasão e a metastização (Hanahan e Weinberg, 2011).

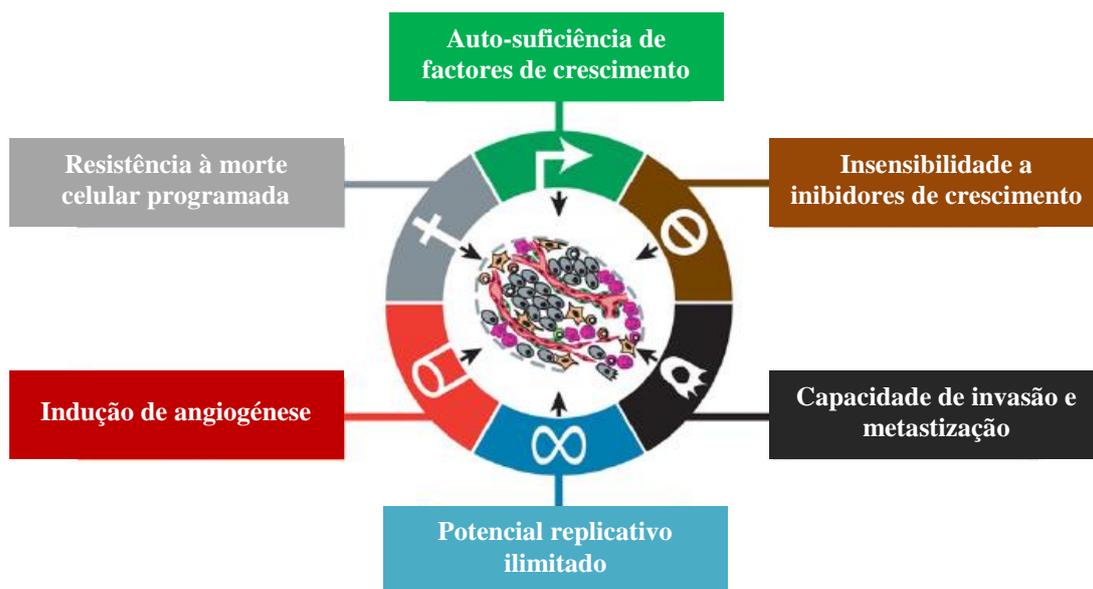


Figura 1.3 – Representação das principais características adquiridas pelas células durante o processo de carcinogénese (Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011).

A sustentação da sinalização da proliferação é uma das características mais importantes adquiridas pelas células cancerígenas, em que estas apresentam uma independência da estimulação de proliferação pelo tecido normal circundante (Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011). Assim, a sinalização da proliferação celular é coordenada pelas células cancerígenas através da produção dos seus próprios factores de crescimento (Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011). Para a proliferação contínua das células cancerígenas é igualmente necessário que as células evitem a acção dos inibidores de crescimento celular, os quais são essenciais para a homeostasia celular em tecidos normais (Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011). Defeitos nestes mecanismos de controlo do crescimento celular por *feedback* negativo permitem aumentar a sinalização da proliferação (Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011). Devido à estimulação do crescimento e divisão celular, as células tumorais sofrem uma reprogramação do metabolismo energético, dependendo da glicólise para a formação de ATP (Hanahan e Weinberg, 2011; Amaravadi e Thompson, 2007).

É ainda essencial para a progressão de células cancerígenas, a aquisição de resistência ao processo de morte celular apoptótico, que ocorre principalmente pela inibição do gene supressor tumoral *TP53*, pelo aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas ou por repressão da expressão de proteínas pró-apoptóticas (Hanahan e Weinberg, 2011; Elmore, 2007; Garrett, 2001). Sabe-se que o aumento da actividade da enzima telomerase em células cancerígenas está relacionado com a manutenção do tamanho dos seus telómeros, e consequentemente com o processo de imortalização das mesmas (Hanahan e Weinberg, 2011; Amaravadi e Thompson, 2007). A perda de inibição por contacto entre células é essencial nesta fase de aquisição de imortalidade celular (Hanahan e Weinberg, 2011; Berx e van Roy, 2009). É ainda necessário que as células cancerígenas adquiram capacidade de angiogénese, de forma a obter oxigénio e nutrientes essenciais à função e sobrevivência das células, bem como a eliminar resíduos metabólicos e dióxido de carbono (Garrett, 2001; Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011). As capacidades de invasão e metastização de células cancerígenas advêm da perda de adesão celular devido a defeitos genéticos e epigenéticos nos genes envolvidos na adesão entre células e entre a célula e a matriz extracelular, resultando na perda da capacidade de diferenciação celular e de inibição por contacto e na promoção da disseminação destas células para locais distantes do seu local de origem (Hanahan e Weinberg, 2011; Berx e van Roy, 2009; Garrett, 2001). A inibição da E-caderina, uma proteína envolvida na adesão célula-célula, por repressão da expressão e/ou mutação pontual, está associada ao desenvolvimento da invasão e metastização (Hanahan e Weinberg, 2011; Berx e van Roy, 2009). A metastização é responsável por 90 % das mortes por cancro em humanos (Hanahan e Weinberg, 2000). As células tumorais devem ainda adquirir capacidade de evasão aos mecanismos de eliminação pelo sistema imunológico, uma vez que este sistema impede quer a formação quer a progressão tumoral (Hanahan e Weinberg, 2011; Johnstone *et al.*, 2002).

1.2. Morte Celular

O processo de morte celular pode ocorrer através de dois mecanismos principais, a necrose e a apoptose (Debnath *et al.*, 2005; Ghobrial *et al.*, 2005). A capacidade de uma célula entrar em apoptose ou necrose depende de uma variedade de determinantes ambientais e fisiológicos, como sendo o tipo de tecido e o estadio de desenvolvimento em que este se encontra, o meio fisiológico, e ainda a natureza do agente indutor de morte celular (Zeiss, 2003). O processo necrótico é dependente da ocorrência de um dano externo, enquanto a apoptose pode ser desencadeada por estímulos internos ou externos (Ghobrial *et al.*, 2005; Lawen, 2003). Com base no tipo e/ou quantidade do estímulo, pode então desencadear-se um ou o outro processo de morte celular (Elmore, 2007). Neste seguimento, compostos anti-tumorais que tenham a capacidade de induzir morte celular por apoptose quando em concentrações relativamente baixas podem, em concentrações mais elevadas, constituir um *stress*

demasiado elevado para a célula, impedindo-a de concretizar o processo apoptótico e consequentemente conduzindo-a à necrose (Elmore, 2007; Kroemer *et al.*, 2007).

A permeabilização mitocondrial, uma via comum a ambos os processos de morte celular, depende entre outros factores, dos níveis de ATP, sendo que a depleção de ATP desencadeia a necrose e a existência de moléculas de ATP promove a apoptose, uma vez que a activação de caspases, essenciais neste processo, é dependente desta fonte de energia (Elmore, 2007; Kim *et al.*, 2003; Denecker *et al.*, 2001).

A necrose tem sido descrita como um processo de morte celular de grande toxicidade, que ocorre de forma passiva, independente de energia e não programada fisiologicamente, isto é, sem pré-determinação genética (Amaravadi e Thompson, 2007; Elmore, 2007; Kroemer *et al.*, 2007; Debnath *et al.*, 2005). Contudo, a necrose é considerada por alguns autores como um processo programado, resultante da activação de cascatas de transdução de sinal específicas (Golstein e Kroemer, 2007). Este processo parece ser executado segundo uma série de eventos intracelulares cumulativos, independentes de caspases (Golstein e Kroemer, 2007). No desenvolvimento desta sequência de eventos existem sinais iniciais de disfunção mitocondrial, sendo estes (i) a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) pela mitocôndria, bem como (ii) a dilatação deste organelo, (iii) depleção de ATP, (iv) desregulação da homeostasia de Ca^{2+} , (v) formação de *clusters* de organelos localizados perinuclearmente, (vi) activação de algumas proteases como as calpaínas e catepsinas, (vii) ruptura lisossomal, e por fim (viii) a perda da integridade da membrana plasmática (Golstein e Kroemer, 2007).

Morfologicamente, caracteriza-se por um aumento do volume celular (oncose), aumento do volume dos organelos e perda da integridade da membrana celular com libertação dos constituintes celulares para o microambiente circundante (Hanahan e Weinberg, 2011; Kroemer *et al.*, 2009). De entre os constituintes celulares fazem parte moléculas pró-inflamatórias cuja libertação promove o desenvolvimento de respostas inflamatórias, cuja capacidade de promover a tumorigénese foi já discutida no ponto 1.1.2 (Hanahan e Weinberg, 2011; Elmore, 2007).

1.2.1. Apoptose

A apoptose apresenta-se como um mecanismo pelo qual alguns agentes quimioterapêuticos, entre os quais os compostos de platina, exercem a sua actividade anti-tumoral (Li *et al.*, 2007; Festjens *et al.*, 2006; Lacour *et al.*, 2004; Johnstone *et al.*, 2002). Desta forma, o conhecimento do mecanismo de regulação da apoptose permite definir novos alvos terapêuticos, e assim formular uma terapia baseada no desencadeamento do processo apoptótico (Amaravadi e Thompson, 2007).

A apoptose é considerada um processo de morte celular programado ou de suicídio celular, uma vez que é desencadeada através de indicação, por parte de uma base genética intrínseca à célula, da necessidade de proceder à sua eliminação, através de uma cascata de caspases (descrita adiante e

ilustrada na Figura 1.4) (Elmore, 2007; Fuertes *et al.*, 2003). A homeostasia celular, de extrema importância durante o desenvolvimento humano e cuja perturbação está envolvida em estados de doença, é mantida por este processo de morte celular fisiológico, de grande complexidade e precisamente regulado, que pode ser desencadeado por determinantes fisiológicos ou agentes patológicos externos (Elmore, 2007; Pec *et al.*, 2003; Johnstone *et al.*, 2002).

Durante o desenvolvimento do processo apoptótico, o núcleo, a membrana celular e o citoplasma apresentam-se como alvos de alterações físicas e bioquímicas (Meyers *et al.*, 2004; Lawen, 2003). Inicialmente, a apoptose é caracterizada por uma contracção celular e pela condensação da cromatina, processo conhecido como picnose (Elmore, 2007). A formação de vesículas na membrana celular antecede a fragmentação nuclear (cariorrhexis), seguindo-se a formação de corpos apoptóticos, constituídos por conteúdo citoplasmático, que inclui produtos da degradação celular, organelos fragmentados e podendo ou não conter fragmentos nucleares (Chipuk e Green, 2008; Elmore, 2007; Golstein e Kroemer, 2007; Taylor *et al.*, 2007; Meyers *et al.*, 2004; Pec *et al.*, 2003). O surgimento de corpos apoptóticos activa eventualmente células fagocitárias que os eliminam em fagolisossomas (Elmore, 2007). A fosfatidilserina, presente na superfície externa de células apoptóticas, apresenta-se como um ligando especificamente reconhecido por células fagocitárias, o que permite concluir que a externalização destas moléculas funciona como marcador desta fase da apoptose (Elmore, 2007). A remoção célere de células apoptóticas por fagocitose concretiza-se como um processo não-inflamatório, uma vez que não é registada a libertação dos conteúdos celulares para as áreas circundantes, evitando a promoção de danos no tecido adjacente (Elmore, 2007).

A apoptose é tida como um processo coordenado e dependente de energia e de síntese proteica *de novo*, que promove a activação de caspases e por conseguinte desencadeia uma cascata de eventos que culminam na morte celular (Elmore, 2007; Fuertes *et al.*, 2003). O grupo das caspases, proteases de cisteína, que se encontram activas especificamente nas células em apoptose, é composto por duas categorias, as caspases iniciadoras (caspase-2, -8, -9 e -10) e as caspases efectoras (caspase-3, -6 e -7) (Pec *et al.*, 2003; Shi, 2002). As caspases são sintetizadas celularmente como zimogénios (proenzimas), ou seja, encontram-se presentes nas células numa forma inactiva (Elmore, 2007). As caspases iniciadoras têm a capacidade de se activar a si próprias (autoactivação), através da sua agregação (Elmore, 2007; Shi, 2002). Uma vez activas, promovem a activação subsequente das caspases efectoras, por clivagem em resíduos internos de aspartato, através de uma cascata que amplifica a via de sinalização (Elmore, 2007; Shi, 2002). As caspases efectoras são responsáveis pelo desencadeamento das várias alterações celulares apoptóticas, por clivagem proteolítica de vários substratos celulares, como proteínas reguladoras e estruturais (Pec *et al.*, 2003; Shi, 2002). Destas, são exemplo proteínas cinases, proteínas de reparação do DNA, proteínas do citoesqueleto (actina e lamina) e subunidades inibitórias das endonucleases, identificando-se também como substratos, inibidores de desoxirribonucleases, caspases e outras proteínas pró-apoptóticas (Ghobrial *et al.*, 2005; Shi, 2002). As caspases efectoras promovem, assim, a destruição de funções celulares *housekeeping*,

ao afectarem a estrutura do citoesqueleto, bem como vias de regulação do ciclo celular e sinalização celular (Elmore, 2007; Ghobrial *et al.*, 2005). Uma vez iniciada a actividade proteolítica das caspases, a morte celular por apoptose torna-se um processo irreversível (Elmore, 2007).

O estímulo inicial que desencadeia o processo apoptótico pode fazê-lo por duas vias distintas, a via extrínseca ou de receptor de morte celular ou a via intrínseca ou mitocondrial, resumidamente descritas nos pontos 1.2.1.1 e 1.2.1.2, respectivamente (Elmore, 2007; Lawen, 2003). Estas duas vias vão convergir numa mesma via de execução, considerada como sendo o estadio final deste processo, e que tem por base a activação das caspases efectoras (Elmore, 2007; Ghobrial *et al.*, 2005).

1.2.1.1. Via Extrínseca ou de Receptor de Morte Celular

A via de receptor de morte celular ou extrínseca, depende da existência de interacções por parte de um ligando específico com receptores transmembranares, designados receptores de morte (Elmore, 2007; Schmitz *et al.*, 2000). Os receptores activados mais frequentemente fazem parte da família TNF (do inglês, *Tumor Necrosis Factor*) e são caracterizados pela presença de um domínio de morte citoplasmático, necessário à transdução do sinal de morte recebido na superfície celular para as vias de sinalização internas (Elmore, 2007; Fulda e Debatin, 2006; Meyers *et al.*, 2004).

A via extrínseca pode interferir na via intrínseca, sendo verificada entre as duas vias apoptóticas um *crossstalk* através da proteína Bid (do inglês, *BH3 interacting domain death agonist*), pertencente à família de proteínas Bcl-2, com actividade pró-apoptótica (Festjens *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2005). Esta proteína é activada após clivagem proteolítica pela caspase-8, activando por sua vez a proteína Bax (do inglês, *Bcl-2-associated X*), o que vai culminar na amplificação da indução do processo apoptótico pela via intrínseca (Festjens *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2005).

1.2.1.2. Via Intrínseca ou Mitocondrial

Na via mitocondrial ou intrínseca (Figura 1.4), por outro lado, os estímulos de morte celular, como a radiação, ROS, infecções virais, compostos anti-tumorais, entre outros, promovem sinais intracelulares que actuam directamente ao nível da mitocôndria (Mondal *et al.*, 2012; Elmore, 2007). A permeabilidade da membrana mitocondrial externa é dependente de proteínas da família Bcl-2, cuja acção culmina na libertação de determinadas proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembranar mitocondrial para o citoplasma (Chipuk e Green, 2008; Saelens *et al.*, 2004). Proteínas da família Bcl-2 dividem-se em pró-apoptóticas sendo exemplo destas a Bax, e em anti-apoptóticas, como é o caso da Bcl-2 (do inglês, *B-cell lymphoma protein 2*) (Elmore, 2007; Meyers *et al.*, 2004). Bcl-2, ao estabelecer ligação com a proteína Bax, inibe a sua actividade pró-apoptótica (Edlich *et al.*, 2011; Gonzalez *et al.*, 2001). Bax, por sua vez, tem também a capacidade de inibir a proteína Bcl-2 (Edlich *et al.*, 2011; Chipuk e Green, 2008). A proporção entre os níveis citoplasmáticos destes dois grupos de

proteínas define se a célula entra em apoptose (predominância de proteínas pró-apoptóticas) ou se sobrevive (predominância de proteínas anti-apoptóticas) (Elmore, 2007; Gonzalez *et al.*, 2001).

A proteína Bax tem a capacidade de, ao ser translocada para a membrana mitocondrial externa e sofrer oligomerização, induzir a formação de poros membranares, que por sua vez levam à libertação de citocromo c e da proteína SMAC/DIABLO (do inglês, *Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP-bind protein with low pI*) para o citoplasma (Edlich *et al.*, 2011; Chipuk e Green, 2008; Ray *et al.*, 2005; Saelens *et al.*, 2004). O citocromo c, quando presente no citoplasma, tem a possibilidade de estabelecer ligação com a proteína citosólica Apaf-1 (do inglês, *Apoptotic protease activating factor 1*), que é precedida pela ligação da procaspase-9, estabelecendo-se assim um complexo proteico, designado por apoptossoma, que leva à activação da caspase-9 (Chipuk e Green, 2008; Meyers *et al.*, 2004). A caspase-9 activa subsequentemente caspases efectoras, como as caspases-3, -6 e -7, o que encaminha o processo apoptótico para a fase de execução (Chipuk e Green, 2008; Meyers *et al.*, 2004).

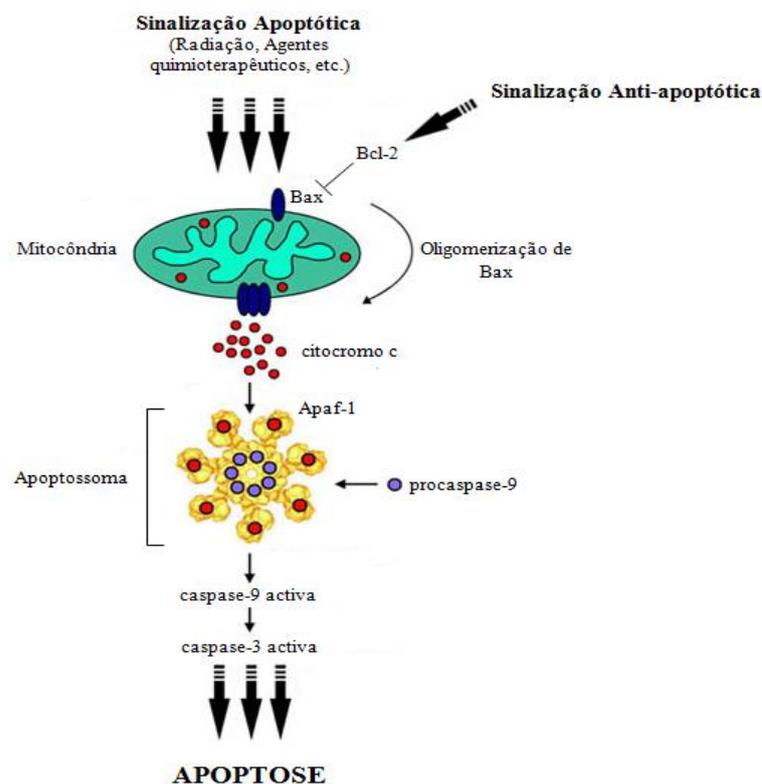


Figura 1.4 – A via intrínseca ou mitocondrial da apoptose é dependente da razão entre os níveis citoplasmáticos das proteínas Bcl-2 (anti-apoptótica) e Bax (pró-apoptótica), sendo a activação da última essencial à progressão do processo apoptótico (Adaptado de <http://www.bumc.bu.edu/phys-biophys/people/faculty/akey/akey-laboratory/projects/apoptosomes/>, acedido em Agosto de 2012).

Os agentes quimioterapêuticos que conseguem induzir a morte celular por apoptose em células tumorais, nas quais o processo está desactivado, fazem-no pela via mitocondrial (Mondal *et al.*, 2012; Lacour *et al.*, 2004).

1.2.2. Efeito Supressor de Tumores de p53

O gene supressor tumoral *TP53* é considerado como o ‘guardião do genoma’, ao promover a manutenção da estabilidade do genoma (Amaral *et al.*, 2010; Gonzalez *et al.*, 2001). Mutações somáticas neste gene são contabilizadas como as alterações genéticas mais comuns durante a gênese tumoral, estando presentes em mais de 50 % de todos os cancros registados em humanos (Amaral *et al.*, 2010; Elmore, 2007; Slee *et al.*, 2004; Nakano e Vousden, 2001).

A acumulação de p53, após um sinal de *stress*, deve-se principalmente à grande estabilidade alcançada por esta proteína, como o resultado de modificações pós-traducionais, bem como da reduzida interacção entre esta e a sua reguladora, a proteína oncogénica Mdm2 (do inglês, *murine double minute 2*) (Slee *et al.*, 2004). Mdm2 apresenta-se como um alvo transcripcional de p53, promovendo, assim, uma auto-regulação entre p53 e Mdm2 realizada em *loop* de *feedback* negativo, que controla a progressão do ciclo celular e a indução de morte por apoptose (Amaral *et al.*, 2010; Alarcon-Vargas e Ronai, 2002).

A activação e estabilização da proteína p53 promove o desencadear de vários eventos celulares, como a paragem do ciclo celular, mecanismos de reparação do DNA, diferenciação celular, apoptose, inibição da angiogénese e senescência, que em combinação permitem a inibição do crescimento tumoral e a promovem a sensibilidade aos agentes quimioterapêuticos (Amaral *et al.*, 2010; Slee *et al.*, 2004; El-Deiry, 2003; Vousden e Lu, 2002). Estas respostas celulares são desencadeadas por muitos estímulos de *stress*, tais como lesões no DNA, como as produzidas por agentes citotóxicos, activação de oncogenes, hipóxia/anóxia, perda de sinais de sobrevivência ou de suporte, depleção de ribonucleótidos, presença de agentes inibidores de microtúbulos, redução do tamanho dos telómeros e perda de contacto entre células (Speidel, 2010; Vousden e Prives, 2009; Vousden e Lu, 2002; Wu e Ding, 2002).

Aquando da ocorrência de lesões no DNA, a proteína p53 promove a paragem do ciclo celular, para que decorra a reparação das mesmas, e assim a sobrevivência celular (Amaral *et al.*, 2010; Elmore, 2007; Ghobrial *et al.*, 2005). A paragem do ciclo celular em G1/S é desencadeada pela proteína p21, um inibidor de cinases dependentes de ciclinas, sendo a transcrição do gene que a codifica regulada pela p53 (Meyers *et al.*, 2004; Slee *et al.*, 2004; Fei *et al.*, 2002). Caso as lesões não possam ser devidamente reparadas, p53 induz a morte celular ao desencadear a apoptose (Elmore, 2007; Ghobrial *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2001).

A actividade como supressor tumoral de p53 está fortemente associada à indução do processo apoptótico principalmente pela via mitocondrial, contudo a via de receptor de morte também pode ser induzida por p53 (Amaral *et al.*, 2010; Speidel, 2010; Ghobrial *et al.*, 2005). A indução do processo apoptótico é efectuada segundo vias dependentes e independentes da transcrição induzida por p53 (Figura 1.5) (Amaral *et al.*, 2010).

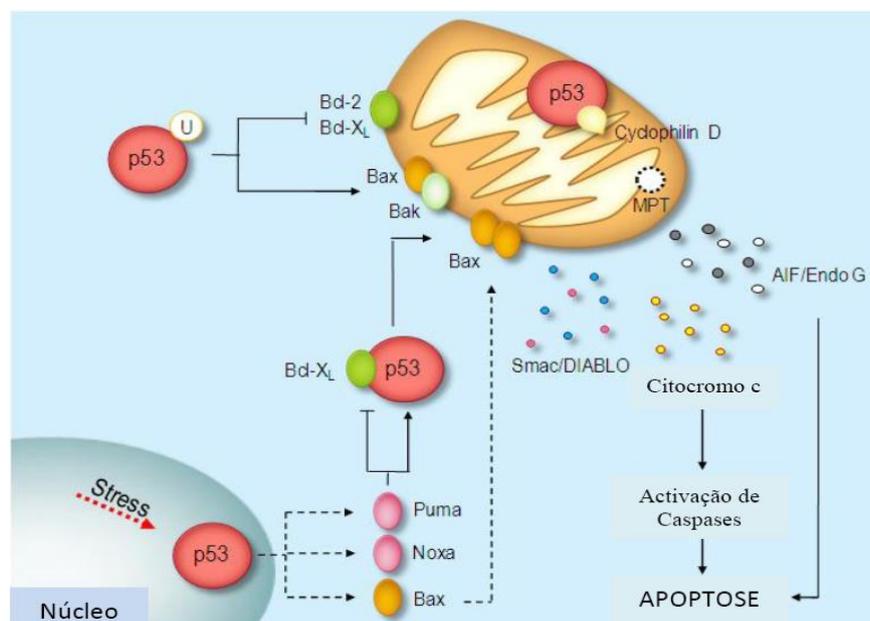


Figura 1.5 – Principais vias de indução da apoptose por p53: a via dependente da sua acção como factor de transcrição, e as vias dependentes da translocação de p53 para a mitocôndria e da sua actividade a nível citoplasmático (Adaptado de Amaral *et al.*, 2010).

A principal via pela qual p53 promove o processo apoptótico deve-se à sua função como factor de transcrição (Amaral *et al.*, 2010; Meyers *et al.*, 2004). A proteína p53 permite a transactivação de genes que codificam para proteínas pró-apoptóticas, como Bax, Puma e Noxa, pertencentes à família de proteínas Bcl-2, e Fas (Amaral *et al.*, 2010; Pietsch *et al.*, 2008; Nakano e Vousden, 2001). A proteína p53 pode, por outro lado, levar à trans-repressão de genes que codificam para proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e survivina (Pietsch *et al.*, 2008).

Adicionalmente, é conhecida a existência de duas outras vias, dependentes da acção de p53 a nível citoplasmático e mitocondrial, que estão representadas na Figura 1.5 e que se encontram descritas por Amaral e colaboradores (2010). Uma delas resulta da translocação de p53 para a mitocôndria, participando no processo de permeabilização deste organelo (Amaral *et al.*, 2010). A outra via advém da acção de p53 a nível citoplasmático, onde promove a oligomerização e translocação de Bax para a mitocôndria (Amaral *et al.*, 2010).

1.3. Terapêutica no Cancro

Os tratamentos convencionais empregues na terapêutica do cancro são a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, contudo mais recentemente têm surgido outros tipos de tratamento nomeadamente a imunoterapia, tratamentos hormonais e terapia-alvo, entre outros (American Cancer Society, 2012; Boulikas *et al.*, 2007; Kovvali, 2002). A cirurgia e a radioterapia apresentam-se como tratamentos locais enquanto a quimioterapia consiste num tratamento sistémico (Kelsen *et al.*, 1998). A remoção

cirúrgica apresenta-se como tratamento inicial aplicado a vários tipos de cancro, geralmente em conjugação com outros procedimentos pré- e/ou pós-operatórios, como a quimioterapia ou a radiação ionizante (Sousa, 2012; Beil e Wein, 2002; Kelsen *et al.*, 1998). Em situações em que a cirurgia não é possível, a radioterapia e a quimioterapia são os tratamentos viáveis (Sousa, 2012; Kelsen *et al.*, 1998). O tipo de tratamento escolhido é dependente do estadio de desenvolvimento do cancro: se for detectado precocemente a cirurgia e a radioterapia são tratamentos geralmente eficazes, enquanto, em situações em que o cancro se encontra em estadios mais avançados, como casos de metastização, a quimioterapia apresenta-se como o tratamento mais adequado (Sousa, 2012; Chabner e Roberts, 2005; Matos, 2001).

A quimioterapia, como um tratamento eficaz em diversos tipos de cancro, tem aplicação clínica há mais de 50 anos, apresentando resultados satisfatórios quanto ao aumento da sobrevivência de pacientes com cancro (Gordon e Nelson, 2012; Johnstone *et al.*, 2002). O propósito da quimioterapia consiste na aplicação de agentes químicos que promovam a morte selectiva de células cancerígenas ou a inibição da capacidade proliferativa das mesmas (NIH, 2012; Kostova, 2006; Longley e Johnston, 2005).

Um agente quimioterapêutico ideal deverá apresentar elevada especificidade para células tumorais, de modo a que os seus efeitos citotóxicos ou citostáticos recaiam preferencialmente sobre estas e não afectem significativamente células saudáveis, evitando o desenvolvimento de efeitos secundários (Kostova, 2010; Johnstone *et al.*, 2002). De facto, os efeitos secundários são um dos principais obstáculos ao tratamento eficaz de tumores, a par da resistência intrínseca e adquirida aos agentes quimioterapêuticos por parte das células tumorais (Johnstone *et al.*, 2002). A síntese de compostos com propriedades anti-tumorais é frequentemente baseada na proliferação descontrolada das células cancerígenas comparativamente a células normais, pelo que os agentes geralmente mais vantajosos para utilização em quimioterapia são aqueles que têm como alvo de acção a replicação do DNA ou o metabolismo celular (Helleday *et al.*, 2008; Johnstone *et al.*, 2002). Por este motivo, muitos destes compostos anti-tumorais apresentam também afinidade para células saudáveis de rápida proliferação como é o caso das células da medula óssea e dos enterócitos, limitando a sua utilização (Johnstone *et al.*, 2002).

Para analisar as propriedades anti-tumorais de um novo composto sintetizado, é necessário realizar estudos *in vitro* em células e tecidos em cultura e definir as biomoléculas sobre as quais actuam e, só posteriormente efectuar estudos *in vivo* de forma a validar a sua aplicação clínica (Gómez-Ruiz *et al.*, 2012; Kostova, 2006; Kostova, 2010). Entender o mecanismo de acção de um composto é essencial, uma vez que este conhecimento permite a síntese de novos compostos com propriedades melhoradas (Kostova, 2006; Kostova, 2010).

Sabe-se que vários compostos metálicos de coordenação têm a capacidade de influenciar processos celulares como a divisão celular e a expressão de genes, o que lhes confere grande potencial na terapêutica do cancro (Gasser *et al.*, 2011; Kostova, 2006). A aplicação de compostos

organometálicos no tratamento do cancro é reportada desde o século XVI, mostrando-se vantajosos sobre compostos metálicos de coordenação e potenciando a síntese de novos complexos (Gasser *et al.*, 2011; Desoize, 2004). As proteínas e os ácidos nucleicos (DNA e RNA) são alvos biológicos preferenciais para a ligação e interacção de compostos metálicos, advindo daqui a sua actividade anti-tumoral (Kostova, 2006; Orvig e Abrams, 1999). Esta acção deve-se, em parte, à interacção dos centros metálicos catiónicos dos compostos, com grupos aniónicos presentes nas biomoléculas referidas, como é o caso dos grupos fosfato nos ácidos nucleicos (Kostova, 2006).

1.3.1. Compostos de Platina

A quimioterapia baseada em compostos de platina (Pt) é clinicamente aplicada ao tratamento de uma grande variedade de cancros com maior incidência, com excepção dos cancros da mama e próstata (Gómez-Ruiz *et al.*, 2012; Kostova, 2010; Hannon, 2007). Os compostos de platina são classificados como agentes anti-tumorais indutores de lesões no DNA, estando portanto a interacção com o DNA na base do seu mecanismo de acção (Kostova, 2010; Coluccia e Natile, 2007; Ono e Moreno, 2002). Assim, o efeito anti-tumoral dos compostos de Pt resulta da incapacidade celular em reparar as lesões no DNA e consequente inibição do processo de replicação, limitando a proliferação celular das células tumorais (Alonso *et al.*, 2006; Desoize e Madoulet, 2002). De facto, compostos de platina tendem a apresentar uma cinética de substituição dos ligandos que decorre em simultâneo com a divisão celular das células neoplásicas, o que indica a capacidade dos mesmos em interferir na proliferação celular e assim justificar a sua aplicação na terapêutica do cancro (Kostova, 2010).

1.3.1.1. Cisplatina

A cisplatina (*cis*-diaminodicloro-platina(II)) (Figura 1.6), o primeiro agente de platina a ser aplicado na terapêutica do cancro, foi sintetizada e descrita pela primeira vez em 1845 pelo médico Michele Peyrone (Arnesano e Natile, 2009; Kostova, 2006; Desoize, 2004; Desoize e Madoulet, 2002). No entanto, apenas em 1965, o biofísico Barnett Rosenberg constatou a sua capacidade de inibir a divisão celular de *Escherichia coli*, tendo o isómero *trans* uma menor actividade comparativamente ao seu isómero *cis* (Bartel *et al.*, 2012; Kelland, 2007; Kostova, 2006; Desoize, 2004; Rosenberg *et al.*, 1965). A acção anti-tumoral em humanos foi apenas comprovada nos anos 70 (Boulikas *et al.*, 2007; Desoize, 2004; Desoize e Madoulet, 2002).

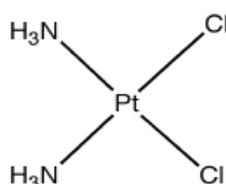


Figura 1.6 – Estrutura do complexo *cis*-diaminodicloro-platina(II), cisplatina (Hannon, 2007).

A cisplatina, um dos agentes anti-tumorais mais eficazes, é extensivamente utilizada no tratamento de vários cancros humanos, sendo particularmente activa contra o cancro dos testículos e do ovário e, apresentando ainda um efeito terapêutico considerável em outros tumores sólidos como o da bexiga, cervical, esófago, cancros das pequenas e grandes células do pulmão e da cabeça e pescoço (Lin *et al.*, 2011; Gabano *et al.*, 2008; Kostova, 2006; Schweyer *et al.*, 2004; Fuertes *et al.*, 2003). Este agente é administrado por injeção intravenosa e em cerca de 50 a 70 % dos pacientes com cancro, em combinação com outros agentes quimioterapêuticos (Dyson e Sava, 2006, Kostova, 2006).

Este complexo é classificado como um agente alquilante bifuncional, tendo cada molécula a capacidade de estabelecer duas ligações covalentes com o DNA, das quais resultam a formação de vários tipos de aductos, discutidos adiante (Helleday *et al.*, 2008).

A cisplatina é uma molécula neutra, que se mantém na sua forma não carregada até ser internalizada pelas células, onde é convertida na sua forma catiónica, biologicamente activa, através de reacções de substituição dos átomos de cloro (grupos de saída) por moléculas de água (Figura 1.7) (Gómez-Ruiz *et al.*, 2012; Kostova, 2006; Hannon, 2007; Kelland, 2007). A esta activação intracelular de um composto químico dá-se a designação de bioactivação (Walsh e Miwa, 2011).

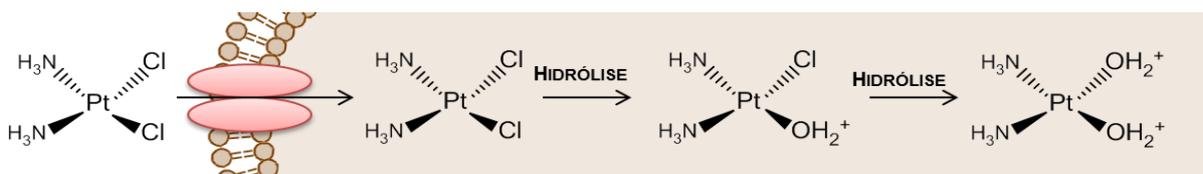


Figura 1.7 – Bioactivação da cisplatina, que resulta da alteração da coordenação da platina por substituição dos átomos de cloro por moléculas de água (Adaptado de Kelland, 2007).

As reacções de substituição são possíveis devido à existência de uma concentração intracelular de cloro muito inferior à presente no espaço extracelular (Hannon, 2007). O complexo activo apresenta reactividade para com a molécula de DNA, podendo também interagir com outras macromoléculas, como o RNA e as proteínas (Desoize, 2004). O seu mecanismo de acção envolve a sua ligação covalente às bases do DNA, principalmente na posição N7 das purinas, com preferência para a guanina (G) relativamente à adenina (A) (Gómez-Ruiz *et al.*, 2012; Hannon, 2007; Kelland, 2007; Kostova, 2006; Desoize, 2004). Em mais de 90 % dos casos a interacção entre a cisplatina e o DNA resulta na formação de aductos bifuncionais entre duas bases adjacentes na mesma cadeia destacando-se os aductos 1,2 GG intracadeia em 60 a 65 % dos casos, os aductos 1,2 AG intracadeia em 25 % dos casos e ainda os aductos 1,3 GNG intracadeia mas em menor frequência (Boulikas *et al.*, 2007; Hannon, 2007; Natile e Coluccia, 2001). Os monoadductos, que derivam da ligação da cisplatina a uma única base do DNA são, no entanto, pouco frequentes (Hannon, 2007). Podem ainda ocorrer outras formas de ligação adicionais, como ligações cruzadas entre bases de cadeias diferentes (aductos GG intercadeia) ou ligações envolvendo simultaneamente o DNA e proteínas, mas estas representam

apenas 1 % de todas as interacções formadas (Desoize, 2004). Os vários tipos de aductos formados pela cisplatina, representados na Figura 1.8, podem ser encontrados numa proporção de 1:10⁵ bases, registando-se ao nível celular uma quantidade de cerca de 10000 átomos de platina ligados ao DNA (Desoize, 2004).

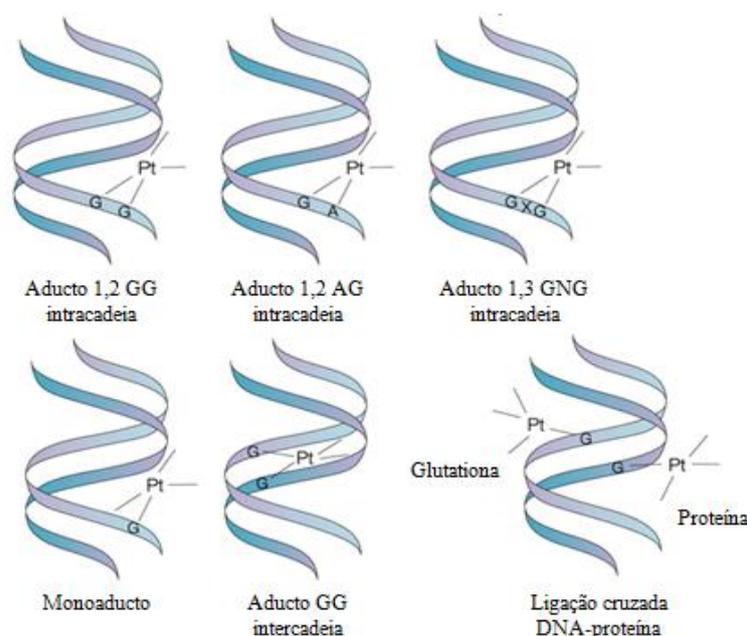


Figura 1.8 – Representação dos vários tipos de aductos formados pelo complexo activo de cisplatina na molécula de DNA (Adaptado de Masters e Köberle, 2003).

Como resultado dos vários tipos de interacções acima referidas, ocorrem alterações na estrutura do DNA que impedem, em muitos dos casos, a sua correcta replicação (Kostova, 2006). Os aductos de Pt-DNA são protegidos da acção de enzimas de reparação do DNA, por proteínas HMG (do inglês, *High Mobility Group*) que apresentam grande afinidade de ligação a estas lesões (Kostova, 2006). Estas proteínas encontram-se também envolvidas na deformação da molécula de DNA por torção da dupla hélice (Kostova, 2006). De facto, a ligação de proteínas de reconhecimento aos aductos de cisplatina-DNA parece inibir a via de reparação NER (do inglês, *Nucleotide Excision Repair*) (Ahmad, 2010). Verifica-se que o aducto principal formado pela cisplatina, 1,2 GG intracadeia (d(GpG)), não é facilmente reparado pelo sistema NER, uma vez que na sua presença a síntese do DNA é perturbada ao nível do nucleótido anterior ao aducto (Desoize, 2004). Assim, a eficácia anti-tumoral da cisplatina advém da incapacidade de reparação adequada das lesões no DNA por parte da célula, conduzindo a uma paragem do ciclo celular em G2/M ou ao desencadeamento das vias apoptóticas (Kelland, 2007; Desoize, 2004; Fuertes *et al.*, 2003; Siddik, 2003). A cisplatina apresenta a capacidade de induzir a morte celular por apoptose em diferentes tipos de células, podendo esta ocorrer pelo desencadeamento da via mitocondrial, bem como pela acção de p53 (Jiang *et al.*, 2009; Schweyer *et al.*, 2004; Siddik, 2003).

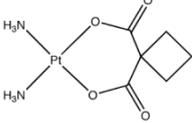
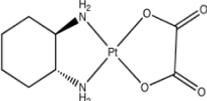
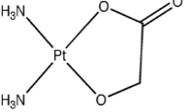
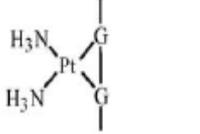
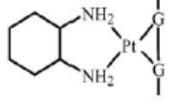
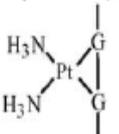
Apesar da eficácia da cisplatina, esta apresenta reduzida selectividade para células tumorais, levando ao aparecimento de efeitos secundários severos, como é o caso da grande toxicidade em tecidos normais, nomeadamente nefrotoxicidade, neurotoxicidade (com o surgimento de neuropatia periférica) e ototoxicidade, fraqueza, náuseas e vômitos, e também anemia grave em casos de tratamento com concentrações elevadas e períodos prolongados (Bouchal *et al.*, 2011; Boulikas *et al.*, 2007; Hannon, 2007; Kostova, 2006; Natile e Coluccia, 2001; Wong e Giandomenico, 1999). Estes efeitos secundários parecem resultar não só da falta de especificidade deste complexo, mas também da platinação de resíduos de enxofre em proteínas (Hannon, 2007). Por outro lado, a aquisição de resistência das células tumorais à cisplatina condiciona frequentemente a resposta à terapia, como se observa por exemplo em células de cancro dos ovários após exposição contínua a este agente (Kelland, 2007). Outra condicionante é ainda a existência de células cancerígenas que apresentam resistência intrínseca a este agente, como é o caso dos cancros do pulmão, próstata, mama e colorectal (Kelland, 2007). Um mecanismo de reparação de DNA activo leva à aquisição de resistência à cisplatina por parte de células cancerígenas, daí que a inibição dos mecanismos de reparação de DNA neste tipo de células seja essencial para o sucesso deste complexo de coordenação (Desoize, 2004).

O conhecimento do mecanismo de acção anti-tumoral de um composto, como é o caso da cisplatina, e a compreensão de como as células cancerígenas se tornam ou são resistentes, é crucial no que respeita à optimização das abordagens terapêuticas, a fim de criar novos fármacos de platina com maior potencial anti-tumor (Gómez-Ruiz *et al.*, 2012; Kelland, 2007; Siddik, 2003).

1.3.1.2. Análogos da Cisplatina

Nos últimos 30 anos, após a descoberta da citotoxicidade da cisplatina em células cancerígenas, muitos compostos de platina, análogos de cisplatina, têm vindo a ser sintetizados e analisados quanto ao seu potencial anti-tumoral (Kelland, 2007; Kostova, 2006; Kostova, 2010; Desoize, 2004). A maioria destes compostos anti-tumorais de platina apresentam uma fórmula química geral do tipo *cis*-[PtX₂(NHR₂)₂], sendo que X representa o ligando de saída, como o cloro (Cl) e R o ligando orgânico (Kostova, 2006). Assim, estes novos complexos de Pt(II), podem surgir da modificação da estrutura original da cisplatina, através de substituição dos átomos de cloro por outros ligandos, e portanto demonstrar diferentes reactividades electrofílicas e em alguns casos actividades terapêuticas distintas das evidenciadas pela cisplatina (Gabano *et al.*, 2008). Dos milhares de compostos de platina sintetizados, actualmente apenas são endereçados à clínica por todo o mundo, além da cisplatina, a carboplatina e a oxaliplatina, enquanto a nedaplatina apresenta uma utilização clínica restrita ao Japão (Jakupec *et al.*, 2008; Hannon, 2007; Dyson e Sava, 2006; Desoize e Madoulet, 2002). Na Tabela 1.1 encontram-se as estruturas químicas destes compostos, bem como as principais características em termos de mecanismos de acção e actividade anti-tumoral.

Tabela 1.1 – Estrutura dos três derivados de cisplatina actualmente utilizados em quimioterapia, sua actividade biológica, tipo de aductos formados com o DNA, e vantagens e desvantagens da sua aplicação clínica face à cisplatina.

	CARBOPLATINA	OXALIPLATINA	NEDAPLATINA
Estrutura	 <p>Grupo substituinte: Ciclobutanodicarboxilato (Hannon, 2007; Natile e Coluccia, 2001)</p>	 <p>Grupos substituintes: Oxalato e 1,2-diaminociclohexano (DACH) (Hannon, 2007; Hochster <i>et al.</i>, 2003)</p>	 <p>Grupo substituinte: anel glicolato (Candelaria <i>et al.</i>, 2006)</p>
Actividade Biológica	Espectro de actividade idêntico ao da cisplatina, mas com maior aplicação no tratamento do cancro dos ovários (Hannon, 2007; Kostova, 2006; Chaney <i>et al.</i> , 2005)	Espectro de actividade distinto do da cisplatina: alguns cancros com resistência à cisplatina em especial o cancro colorectal (Boulikas <i>et al.</i> , 2007; Hannon, 2007; Arango <i>et al.</i> , 2004)	Espectro de actividade idêntico ao da cisplatina (Candelaria <i>et al.</i> , 2006; Desoize, 2004)
Aductos	 <p>Produz os mesmos aductos que a cisplatina (Hannon, 2007; Kelland, 2007; Chaney <i>et al.</i>, 2005)</p>	 <p>Produz aductos nas mesmas bases do DNA que a cisplatina (Hannon, 2007; Chaney <i>et al.</i>, 2005)</p>	 <p>Produz os mesmos aductos que a cisplatina (Chaney <i>et al.</i>, 2005)</p>
Vantagens	- Menor nefrotoxicidade, neurotoxicidade, náuseas e vômitos (Boulikas <i>et al.</i> , 2007; Hannon, 2007; Kelland, 2007; Natile e Coluccia, 2001)	- Eficaz contra outros tipos de cancro comparativamente à cisplatina; - Capacidade em ultrapassar a resistência à cisplatina; - Menor nefrotoxicidade, ototoxicidade e mielosupressão (Boulikas <i>et al.</i> , 2007; Hannon, 2007; Wong e Giandomenico, 1999)	- Praticamente nenhuma nefrotoxicidade - Menor neurotoxicidade, toxicidade gastrointestinal e leucopenia (Boulikas <i>et al.</i> , 2007; Candelaria <i>et al.</i> , 2006; Desoize, 2004)
Desvantagens	- Mielosupressão, trombocitopenia; - Resistência por parte de alguns cancros; - Espectro de acção semelhante ao da cisplatina; - Resistência cruzada com a cisplatina (Boulikas <i>et al.</i> , 2007; Kelland, 2007; Chaney <i>et al.</i> , 2005; Desoize, 2004)	- Menor genotoxicidade que a cisplatina e carboplatina; - Neurotoxicidade, hematotoxicidade e toxicidade gastrointestinal; - Ineficaz contra alguns tipos de cancro para os quais a cisplatina demonstra actividade (Boulikas <i>et al.</i> , 2007; Desoize, 2004)	- Mielosupressão, trombocitopenia e hematotoxicidade (superior à da cisplatina); - Resistência cruzada com a cisplatina (Koshiyama <i>et al.</i> , 2005; Desoize, 2004)

Estes compostos tendem a reagir em soluções aquosas, formando um complexo activo com duas moléculas de água ligadas ao átomo de platina, após uma reacção de troca de ligandos, à semelhança do que se observa com a cisplatina (Desoize, 2004; Jamieson e Lippard, 1999). Embora estes agentes quimioterapêuticos também produzam um metabolito catiónico, a realidade é que têm diferentes cinéticas de activação, sendo a velocidade de hidrólise mais elevada para a cisplatina que para os outros compostos de platina (Desoize, 2004). Tal como a cisplatina, a formação de aductos Pt-DNA, representa o mecanismo pelo qual estes compostos apresentam actividade anti-tumoral (Desoize, 2004). Apesar do mecanismo de acção da carboplatina, oxaliplatina e nedaplatina advir da formação de aductos Pt-DNA, tal como a cisplatina, estes não são tão potentes como esta última e apresentam menor toxicidade inerente à sua acção (Tabela 1.1) (Rafique *et al.*, 2010; Desoize e Madoulet, 2002).

Embora estes complexos derivados da cisplatina se demonstrem efectivos na actual terapêutica do cancro, os problemas de resistência a estes agentes são relativamente bem conhecidos, bem como os efeitos secundários que promovem (Coley *et al.*, 2008; Kostova, 2006). Desta forma, a síntese de novos fármacos para quimioterapia, é movida principalmente pelo objectivo de superar a resistência por parte das células tumorais a estes agentes quimioterapêuticos (Alberto *et al.*, 2011; Coley *et al.*, 2008; Kelland, 2007). Ao mesmo tempo, os novos agentes devem apresentar actividades anti-tumorais idênticas ou superiores aos agentes quimioterapêuticos existentes (Alberto *et al.*, 2011; Coley *et al.*, 2008). As modificações estruturais à cisplatina têm portanto como objectivo encontrar alternativas mais seguras para o paciente, particularmente no que diz respeito à redução ou completa remoção dos efeitos secundários, como por exemplo a nefrotoxicidade imposta pela cisplatina (Gómez-Ruiz *et al.*, 2012; Kelland, 2007).

É de notar que complexos de coordenação similares à cisplatina e seus análogos mas constituídos por outros metais, não apresentam actividade anti-tumoral significativa, sendo necessária a presença de um átomo de Pt no centro de coordenação, uma vez que este promove cinéticas de trocas de ligando mais efectivas (Kostova, 2006; Kostova, 2010). A síntese de novos complexos de platina com diferentes mecanismos de interacção com o DNA, divergente da forma de ligação ao DNA da cisplatina, são de interesse a fim de serem utilizados para ultrapassar os problemas de resistência (Rafique *et al.*, 2010; Kostova, 2006). Neste sentido, despoletou-se o interesse em compostos de platina com uma configuração *trans* (Coley *et al.*, 2008).

1.3.1.3.Compostos de Platina de Configuração *trans*

Um grande número de complexos de platina de configuração *trans*, avaliados *in vitro* em várias linhas celulares humanas, apresenta uma eficiência anti-tumoral comparável à da cisplatina, demonstrando ainda capacidade em ultrapassar a resistência adquirida a esta última (Bartel *et al.*, 2012; Coluccia e Natile, 2007; Kostova, 2006; Natile e Coluccia, 2001). A regra geral, inicialmente postulada, da necessidade de dois grupos de saída posicionados em configuração *cis* para que os

complexos de Pt(II) apresentem actividade anti-tumoral tem vindo, portanto, a apresentar algumas excepções (Kostova, 2010; Coluccia e Natile, 2007; Natile e Coluccia, 2001; Montero *et al.*, 1999).

Complexos de *trans*-Pt revelam-se com uma grande permeabilidade celular, excelente capacidade de produção de aductos no DNA e demonstram ainda resistência aos mecanismos de reparação de lesões no DNA, bem como uma capacidade de actuar sobre outros tipos de cancro, comparativamente à cisplatina (Coluccia e Natile, 2007; Natile e Coluccia, 2001). As lesões no DNA promovidas pelos complexos de configuração *trans* são divergentes, qualitativa e/ou quantitativamente, das formadas pelos complexos que exibem configuração *cis*, na medida que os primeiros promovem uma maior produção de aductos monofuncionais ou ligações cruzadas em bases complementares entre cadeias diferentes (Hannon, 2007; Natile e Coluccia, 2001). Tal deve-se ao facto do aducto 1,2 intracadeia, principalmente formado pela cisplatina, ser estereoquimicamente inacessível aos complexos *trans* (Coluccia e Natile, 2007). Deste modo, são produzidas diferentes distorções na dupla hélice da molécula de DNA, o que permite que os complexos *trans* possam ser efectivos contra tumores resistentes à cisplatina (Natile e Coluccia, 2001; Wong e Giandomenico, 1999). Além disso, alguns destes complexos apresentam selectividade *in vivo* para vários tipos de tumores (Natile e Coluccia, 2001).

Coley e seus colaboradores (2008) sintetizaram quatro complexos de Pt(II) de configuração *trans*, mono- e dissustituídos, com o substituinte aromático heterocíclico oxadiazol em lugar dos grupos amina (Coley *et al.*, 2008). De um modo geral, apresentaram actividade citotóxica *in vitro* equivalente à cisplatina e à carboplatina contra as linhas celulares tumorais bem como em linhas celulares resistentes a estes dois agentes quimioterapêuticos (Coley *et al.*, 2008). Além disso, não foi verificado um bloqueio acentuado do ciclo celular, observando-se contudo, um ligeiro aumento de células em G1 em conjunto com uma pequena acumulação de células na fase sub-G1, dando indicação de apoptose precoce, contrariamente ao característico bloqueio do ciclo celular em G2/M pela cisplatina (Coley *et al.*, 2008).

Compostos com ligandos heterocíclicos permitem um maior número de interações entre o composto e o DNA, uma vez que os ligandos aromáticos possibilitam a ocorrência de intercalação com o DNA (Coley *et al.*, 2008). Além disso, se os próprios ligandos apresentarem reactividade, poderão eles próprios promover danos secundários no DNA (Coley *et al.*, 2008).

Outros compostos *trans*-Pt(II) contendo complexos bicíclicos de oxadiazol foram sintetizados por Charmier e colaboradores (2004). O composto *trans*-[PtCl₂{RC(=O)N=CN-(H)C(Me)₂-CH₂CH₂}₂] (R=CH₂CO₂Me), aqui designado por JL130F1, consiste num complexo organometálico contendo na sua esfera de coordenação de Pt dois grupos orgânicos divergentes das aminas presentes na cisplatina em configuração *trans*. A síntese deste complexo apresenta-se esquematizada na Figura 1.9.

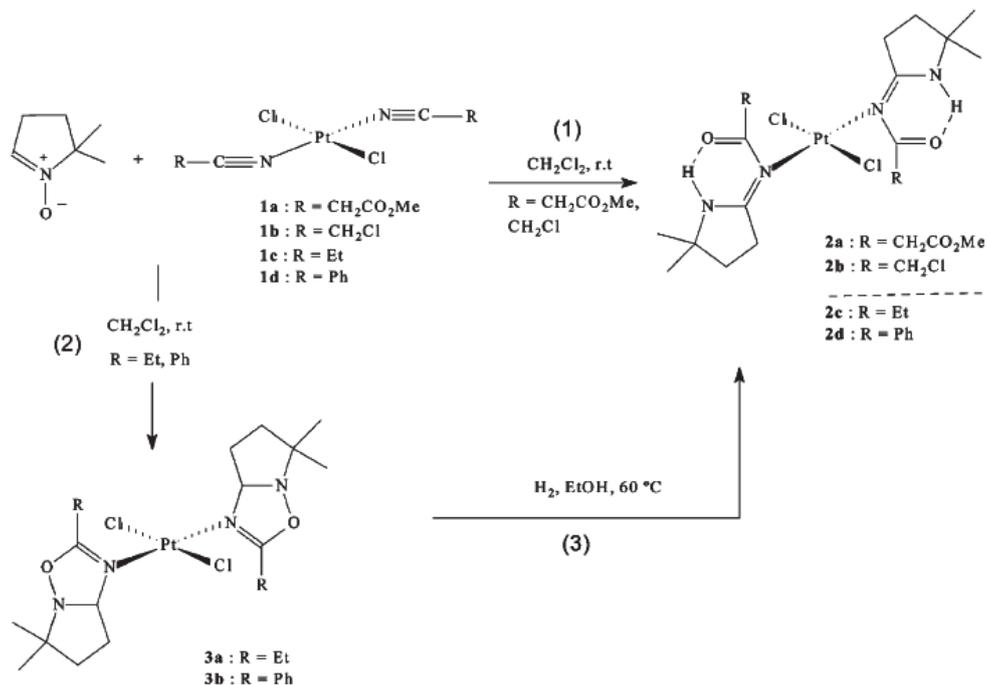


Figura 1.9 – Processo de síntese do complexo JL130F1, um complexo de *trans*-Pt(II) contendo dois ligandos de oxadiazol em substituição das duas aminas presentes na molécula de cisplatina (Charmier *et al.*, 2004).

1.3.2. Doxorrubicina

A doxorrubicina (DOX) (Figura 1.10), um dos primeiros compostos da família das antraciclina a ser isolado de *Streptomyces peucetius* no início da década de 60, consiste num agente quimioterapêutico de grande aplicação na terapêutica do cancro (Swift *et al.*, 2006; Minotti *et al.*, 2004).

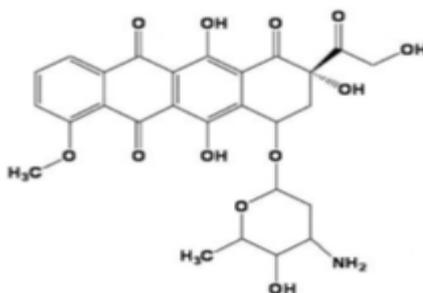


Figura 1.10 – Estrutura química da DOX (Stiborova *et al.*, 2012).

Este agente apresenta uma eficiente actividade anti-tumoral e é geralmente aplicado em regime combinado com outros agentes em linfoma não-Hodgkin's, leucemias agudas, mieloma múltiplo, cancros da mama, pulmão, ovários e outros (American Cancer Society, 2011; Swift *et al.*, 2006). A actividade anti-tumoral da DOX advém principalmente da sua capacidade de ligação e

estabilização do complexo de clivagem DNA-topoisomerase II, impedindo a re-ligação da cadeia dupla de DNA após o passo inicial de clivagem (Swift *et al.*, 2006; Minotti *et al.*, 2004). Não sendo possível a reparação desta quebra, é iniciado o processo apoptótico (Swift *et al.*, 2006). Existem também indicações de outros mecanismos envolvidos na citotoxicidade da DOX: inibição da síntese de DNA e RNA, formação de radicais livres e ainda a formação de complexos entre a DOX e o formaldeído com a posterior formação de aductos na molécula de DNA nos locais 5' GpC (Kizek *et al.*, 2012; Swift *et al.*, 2006). Contudo, até ao momento não há conhecimento de que estas respostas celulares sejam independentes da interferência na actividade da topoisomerase II, com a excepção da formação de aductos pela DOX (Swift *et al.*, 2006).

Apesar da eficácia anti-tumoral deste agente, existem graves problemas na sua aplicação clínica, sendo estes a aquisição de resistência por parte de células tumorais e a toxicidade em tecidos saudáveis, principalmente a cardiotoxicidade, com o aparecimento de casos de miocardiopatia crónica e insuficiência cardíaca congestiva (Minotti *et al.*, 2004).

1.4. Introdução ao Tema da Tese

A caracterização do potencial citotóxico do complexo JL130F1 foi o objectivo inicial desta dissertação. Para tal, foram realizados ensaios em linhas celulares tumorais e feita a comparação destes resultados em linhas celulares não-tumorais para a avaliação da sua citotoxicidade e selectividade. Foi ainda analisado o mecanismo de indução de morte celular, a capacidade deste complexo para interagir com o DNA e o seu efeito genotóxico. Como compostos anti-tumorais de referência utilizou-se a cisplatina e a DOX. Este estudo baseia-se (i) na vasta utilização dos complexos de platina na terapêutica do cancro, (ii) no facto de os complexos de platina de configuração *trans* apresentarem actividade anti-tumoral e (iii) na capacidade dos mesmos em ultrapassar os mecanismos de resistência das células tumorais relativamente a alguns agentes com aplicação clínica, como é o caso da cisplatina (Gómez-Ruiz *et al.*, 2012; Coluccia e Natile, 2007; Kostova, 2006).

2. Materiais e Métodos

2.1. Compostos em Estudo

O complexo organometálico de platina utilizado, daqui em diante referido como JL130F1, foi sintetizado no Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico, de acordo com os métodos descritos por Charmier e colaboradores (2004). Como controlos de citotoxicidade utilizaram-se dois agentes quimioterapêuticos, de actividade conhecida, a cisplatina (Teva Parenteral Medicines, Inc., Teva Pharmaceuticals, Sellersville, EUA; gentilmente cedida pelo Dr. Joaquim Henriques, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias), e a DOX (TRC - Toronto Research Chemicals, Canadá). Prepararam-se soluções *stock* de JL130F1 (23,2 mM) e de DOX (38 mM), que foram alíquotadas e armazenadas a -20 °C até à sua utilização. A cisplatina encontra-se numa solução *stock* de 1 mg/mL, sendo que 1 mL desta solução contém 1 mg de cisplatina USP e 9 mg de NaCl, em água, pH 5,5, e foi armazenada entre 20 a 25 °C. As fórmulas químicas, e os respectivos pesos moleculares de cada um dos compostos estudados, bem como os solventes utilizados na preparação das soluções *stock*, encontram-se descritos na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Propriedades dos compostos utilizados no trabalho experimental.

Composto	Fórmula Química	Peso Molecular (g/mol)	Solvente
JL130F1	C ₂₀ H ₃₂ Cl ₂ N ₄ O ₆ Pt	690,48	DMSO
Cisplatina	Cl ₂ H ₆ N ₂ Pt	300,04	Solução aquosa de NaCl 0,9 % (p/v)
DOX	C ₂₇ H ₃₀ ClNO ₁₁	579,98	DMSO

2.2. Linhas Celulares Humanas

Neste trabalho experimental utilizaram-se duas linhas celulares tumorais humanas, HCT116 e HepG2, correspondentes, respectivamente, aos carcinomas colorectal e hepatocelular, cedidas pela Professora Doutora Cecília Rodrigues do Research Institute for Medicine and Pharmaceutical Sciences (iMed), Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. A linha celular tumoral HCT116 provém do colon de um homem adulto com carcinoma colorectal, sendo constituída por células epiteliais aderentes

(<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-247&Template=cellBiology>, acedido em Junho de 2012). A linha celular tumoral HepG2 é proveniente do fígado de um adolescente de 15 anos do sexo masculino com carcinoma hepatocelular diferenciado e, é igualmente constituída por células epiteliais aderentes (<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HB-8065&Template=cellBiology>, acedido em Junho de 2012).

A fim de avaliar a toxicidade do complexo em células não-tumorais, utilizou-se a linha celular epitelial mamária MCF-10A, cedida pelo Professor Doutor António Sebastião Rodrigues do Departamento de Genética do Centro de Investigação em Genética Molecular e Humana (CIGMH), Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, e uma cultura celular primária de fibroblastos, cedida pela Professora Doutora Isabel Carreira do Laboratório de Genética Molecular de Cardiopatias e Neurociências, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. A linha celular MCF-10A, de células epiteliais aderentes, foi isolada a partir da glândula mamária de uma mulher de 36 anos, com doença fibrocística (<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-10317&Template=cellBiology>, acedido em Junho de 2012). A linha celular de fibroblastos aderentes foi propagada a partir de uma cultura primária derivada de tecido neonatal.

2.2.1. Cultura das Linhas Tumorais e Não-Tumorais

As linhas celulares tumorais HCT116 e HepG2 e a linha celular não-tumoral de fibroblastos foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Invitrogen, New York, EUA) suplementado com 10 % (v/v) de Soro Fetal Bovino (FBS; Invitrogen) e 1 % (v/v) de antibiótico/antimicótico Penicilina-Estreptomicina (*Pen-Step+Antimycotic*; Invitrogen), designado de meio de cultura completo, em frascos de cultura BD Falcon de 75 cm² (BD Biosciences, New Jersey, EUA). Para a linha celular tumoral HepG2 foi ainda adicionado 1 % (v/v) de aminoácidos *MEM Non Essential Amino Acids* 100x (Invitrogen) ao meio de cultura completo.

A linha celular não-tumoral MCF-10A foi cultivada em meio DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado com 0,5 mg/mL de hidrocortisona (1 mg/mL) (Sigma, Missouri, EUA), 5 % (v/v) de soro de cavalo (Sigma) e 20 ng/mL de EGF (100 µg/mL) (Sigma), adicionando-se posteriormente 100 ng/mL de toxina colérica (1 mg/mL) (Sigma) e 10 µg/mL de insulina (10 mg/mL) (Sigma).

Os frascos de cultura foram incubados na estufa de CO₂ (Leec, Nottingham, Reino Unido) nas seguintes condições: 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa.

2.2.2. Manutenção das Culturas

Todas as culturas foram renovadas semanalmente ao atingirem uma confluência de cerca de 80 %, determinada por visualização ao microscópio óptico invertido Olympus CXX41 (Olympus, Tóquio, Japão). Para tal, aspirou-se todo o meio de cultura e adicionaram-se 5 mL de tripsina (Invitrogen) e incubou-se a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa durante 5 minutos (min), controlando, por visualização ao microscópio, a perda de aderência à base do frasco pela totalidade das células. Foram adicionados 5 mL de meio de cultura completo a fim de neutralizar a acção da tripsina e transferiu-se o volume total para tubos BD Falcon de 50 mL (BD Biosciences),

centrifugando-se a 1500 rotações por minuto (rpm) durante 5 min numa centrífuga (Hettich EBA21, Tuttlingen, Alemanha) e eliminando-se posteriormente o sobrenadante. O sedimento foi então ressuspenso em 2 mL de meio completo. Num novo frasco de cultura de 75 cm² foram colocados 15 mL de meio apropriado a cada cultura celular, ao qual se adicionaram 50 µL de suspensão celular, incubando-se novamente a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa.

2.3. Avaliação do Potencial Citotóxico

2.3.1. Ensaio de Viabilidade Celular

A avaliação da citotoxicidade do complexo JL130F1 foi concretizada para as linhas tumorais HCT116 e HepG2 e para as linhas celulares não-tumorais de fibroblastos e MCF-10A.

Para os ensaios de viabilidade utilizou-se uma densidade celular de 0,75×10⁵ células/mL. A densidade celular pretendida foi obtida pela contagem de células viáveis num hemocítmetro (Hirschmann, Eberstadt, Alemanha) através do método de exclusão por azul de *Trypan*, um corante que penetra nas células com integridade membranar corrompida, corando-as de azul, permanecendo as células vivas sem coloração. Para tal, preparou-se uma mistura contendo 350 µL de meio completo, 100 µL de azul de *Trypan* a 0,4 % (v/v) (Sigma) e 50 µL de suspensão celular obtida no ponto 2.2.2, recorrendo posteriormente ao microscópio óptico para a contagem. A densidade celular foi então calculada através da equação (1):

$$(1) \frac{N^{\circ} \text{Células}}{\text{mL}} = \frac{\sum N^{\circ} \text{Células Quadrantes 1 a 4}}{4} \cdot 10^4 \cdot (\text{Volume Câmara em mm}^3) \cdot \text{Factor de Diluição}$$

Determina-se, assim, o volume de suspensão celular necessário para preparar uma solução de densidade 0,75×10⁵ células/mL, da qual se pipetaram 100 µL para cada poço de uma placa de 96 poços de fundo plano (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica), e incubou-se a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ e 99 % de humidade relativa por 24 horas (h). Antes da adição do complexo, a placa foi observada ao microscópio invertido para avaliar a morfologia das células e verificar a confluência (aproximadamente 80 %).

As soluções de concentrações decrescentes do complexo foram preparadas por diluição da solução *stock* em meio completo. Prepararam-se soluções com as seguintes concentrações: 0,1 a 300 µM para as linhas celulares tumorais, 20 a 100 µM para a linha celular MCF-10A e 20 a 200 µM para a linha celular de fibroblastos. Em todos os ensaios foram preparados controlos contendo apenas o solvente DMSO a 1,3 % (v/v) (Sulfóxido de dimetilo; Sigma) e sem adição do complexo.

Assim, aspirou-se o meio de cultura e em cada poço adicionaram-se 100 µL de cada uma das soluções, seguindo-se 48 h de incubação a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Concluídas as 48 h, procedeu-se então à avaliação da viabilidade celular utilizando o *Kit CellTiter 96*[®]

Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Assim, aspirou-se o meio de cada poço e adicionaram-se 100 µL de uma solução colorimétrica de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio)/PMS (metossulfato de fenazina) na proporção de 100 µL de meio completo: 20 µL de MTS: 1 µL de PMS, com posterior incubação por 30 min a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Mediu-se a absorvância a 490 nm no leitor de microplacas *Multiskan FC Microplate Photometer* (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), e determinou-se a viabilidade celular por aplicação da equação (2):

$$(2) \text{ Viabilidade celular (\%)} = \frac{Abs_{490}(\text{amostra})}{Abs_{490}(\text{controlo})} \cdot 100$$

O ensaio foi efectuado em triplicado para cada concentração de complexo testada.

O valor de IC₅₀ (do inglês, *Inhibitory Concentration*) relativo, concentração de composto necessária para redução de 50 % de viabilidade celular (Li *et al.*, 2010), foi calculado a partir do programa *GraphPad* (GraphPad Software Inc., CA, EUA).

Estes ensaios foram igualmente realizados incubando as várias linhas celulares tumorais na presença dos agentes quimioterapêuticos DOX (0,1 a 125 µM) ou cisplatina (0,1 a 50 µM) e os resultados de IC₅₀ obtidos para cada linha celular foram comparados com os respectivos valores obtidos para o complexo JL130F1.

2.4. Avaliação do Potencial Apoptótico

2.4.1. Marcação com a Sonda Hoechst 33258

A avaliação preliminar da capacidade indutora de apoptose pelo complexo JL130F1 realizou-se por microscopia de fluorescência através da marcação com a sonda Hoechst 33258. A sonda Hoechst 33258 (comprimentos de onda de excitação e emissão, quando ligado ao DNA, de 352 e 461 nm, repectivamente) possui afinidade para ácidos nucleicos, pelo que a análise por microscopia de fluorescência de células marcadas com este corante permite a detecção de alterações da morfologia nuclear (Cao *et al.*, 2011; Hoechst Stains, MP21486, Invitrogen 2005).

Ambas as linhas celulares tumorais foram utilizadas para o ensaio, tendo-se preparado para cada linha placas de cultura de 35 mm (Orange Scientific) com uma concentração celular final de $0,75 \times 10^5$ células/mL, incubando-se de seguida a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa durante 24 h. Após aspiração do meio de cultura, foram adicionados 2 mL de uma solução de DMSO a 0,2 % (v/v) (controlo) ou 2 mL de cada uma das soluções de 20, 35 e 50 µM do complexo em estudo,

preparadas por diluição da solução *stock* em meio completo. Incubaram-se as placas por 48 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂, e 99 % de humidade relativa.

Para a marcação com Hoechst 33258, as células preparadas anteriormente foram lavadas três vezes com 1 mL de Tampão de Fosfato Salino 1x (PBS 1×; Invitrogen). Fixaram-se as células por adição de 1 mL de uma solução fria de Paraformaldeído 4 % (v/v) em PBS 1× e incubação durante 10 min na ausência de luz e à temperatura ambiente. De seguida, as células foram lavadas três vezes com 1 mL de PBS 1×. A cada placa foi adicionado 1 mL de uma solução de Hoechst 33258 (Sigma), contendo 2 µL de Hoechst 33258 (5 mg/mL) em 1 mL de PBS 1×, incubando-se na ausência de luz e à temperatura ambiente durante 15 min. Repetiram-se as três lavagens com 1 mL de PBS 1×, e adicionaram-se 10 µL de uma solução de glicerol em PBS 1× na proporção de 1:3 (v/v), no centro da placa, colocando cuidadosamente uma lamela por cima. As placas foram observadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX51 e fotografadas com a máquina fotográfica Olympus DP50 (Olympus) acoplada ao microscópio. As fotografias foram adquiridas através do *software AnalySIS Soft Imaging System* (Olympus). O ensaio realizou-se em triplicado.

2.4.2. Marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio

A dupla marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio (IP) permite identificar com elevada especificidade células em apoptose, diferenciando células em apoptose inicial de células em apoptose tardia e, permitindo ainda uma distinção entre células apoptóticas e necróticas (Brumatti *et al.*, 2008). A proteína anexina V tem grande afinidade de ligação à fosfatidilserina, um fosfolípido membranar que é externalizado para o folheto externo da membrana celular durante a apoptose (Cao *et al.*, 2011; Brumatti *et al.*, 2008). A marcação de ácidos nucleicos com IP, por outro lado, está dependente da perda da integridade membranar, característica das células em necrose e apoptose tardia (Cao *et al.*, 2011; Brumatti *et al.*, 2008; Pec *et al.*, 2003).

O ensaio de marcação com Anexina V-FITC e IP foi efectuado no Laboratório de Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa no âmbito de um protocolo previamente estabelecido com a Professora Doutora Paula Videira.

Para a realização deste ensaio utilizou-se a linha celular tumoral HCT116. As células desta linha foram cultivadas em placas de 35 mm, numa densidade de $0,75 \times 10^5$ células/mL, e incubadas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, por 24 h. Após este período, aspirou-se o meio de cultura antigo e as células foram incubadas durante 48 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, na presença de 2 mL de cada uma das soluções do complexo nas concentrações finais de 35 e 45 µM (soluções preparadas por diluição da solução *stock* em meio completo) ou de 2 mL de meio de cultura completo contendo 0,2 % (v/v) de DMSO (controlo).

Para a marcação com Anexina V-FITC e IP utilizou-se o *Kit Annexin-V FITC Apoptosis* (Invitrogen). Recolheu-se o sobrenadante e as células (destacadas da placa com 1mL de tripsina e 5

min de incubação a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa) e centrifugou-se a 1500 rpm durante 5 min a 25 °C. Adicionaram-se 2 mL de PBS 1x a cada tubo de centrífuga para lavagem das células, centrifugando-se a 1500 rpm por 5 min a 25 °C, eliminando-se de seguida os sobrenadantes. Os sedimentos obtidos foram ressuspensos em 100 µL de tampão de ligação da Anexina V 1x, com posterior adição de 5 µL de Anexina V conjugada com FITC e de 10 µL de IP e incubação na ausência de luz por 15 min à temperatura ambiente. Todo o volume nos tubos de centrífuga foi transferido para novos tubos, adicionando-se 400 µL de tampão de ligação da Anexina V 1x. A avaliação da indução de apoptose pelo complexo JL130F1 foi então realizada por citometria de fluxo, no citómetro de fluxo BD FACScalibur™ (Becton Dickinson, New Jersey, EUA), pela aquisição de 10000 eventos por amostra. A análise dos resultados foi efectuada recorrendo ao *software* BD Paint a Gate (Becton Dickinson). O ensaio foi realizado em triplicado.

2.4.3. Actividade das Caspases-3/7

Caspases são proteínas exclusivamente activas em células em apoptose (Pec *et al.*, 2003). As caspases, como as efectoras-3 e -7, revelam-se de extrema importância no que respeita à progressão irreversível do processo apoptótico (Elmore, 2007). Estas proteínas consistem em proteases de cisteína e, como tal, exibem actividade proteolítica que lhes permite a clivagem de substratos proteicos em resíduos de aspartato, desencadeando na fase final as características morfológicas celulares típicas da apoptose (Elmore, 2007; Meyers *et al.*, 2004; Pec *et al.*, 2003).

O ensaio foi executado no Departamento de Genética do Centro de Investigação em Genética Molecular e Humana (CIGMH), Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

A actividade das caspases-3/7 foi avaliada utilizando o *Kit Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay* (Promega), como descrito pelo fabricante. O ensaio efectuou-se na linha celular tumoral HCT116, sendo as células cultivadas em placa preta opaca de 96 poços (Corning, New York, EUA), numa densidade celular de $0,75 \times 10^5$ células/mL, com incubação de 24 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. As células foram incubadas por 48 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, na presença de 100 µL do complexo nas concentrações finais de 25, 35 e 45 µM (soluções preparadas por diluição da solução *stock* em meio completo), ou na presença de 100 µL da solução de DMSO a 0,2 % (v/v) (controlo negativo), ou de meio de cultura completo sem células (branco). Ao fim de 48h, adicionaram-se a cada poço 100 µL do reagente Apo-ONE® Caspase-3/7, misturou-se gentilmente e incubou-se durante 2 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. A leitura da placa foi efectuada no leitor de microplacas Zenyth 3100 (Anthos Labtec, Salzburg, Áustria) com o filtro de fluorescência no comprimento de onda de excitação de 485 nm. Os dados foram obtidos pelo *software Multimode Analysis*. O tratamento dos dados realizou-se pela aplicação da equação (3):

$$(3) \text{ Variação da actividade das caspases} = \frac{\text{Amostra tratada} - \text{Branco}}{\text{Controlo negativo} - \text{Branco}}$$

O ensaio foi realizado em triplicado.

2.4.4. Expressão de Genes Envolvidos no Processo de Apoptose

A avaliação da expressão dos genes *CDKN1A*, *BAX*, *BCL2* e *CASP3* que codificam respectivamente para as proteínas p21, Bax, Bcl-2 e caspase-3, foi realizada por RT-PCR (transcritase reversa – reacção em cadeia da polimerase) na linha celular tumoral HCT116. As células da linha HCT116 foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² e incubadas por um período de 24 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Foram posteriormente sujeitas a exposição a uma concentração de 35 µM do complexo JL130F1 (solução preparada por diluição da solução *stock* em meio completo) ou 0,2 % (v/v) de DMSO (controlo) e, incubadas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, durante 48 h. Para a extracção de RNA total, utilizou-se uma densidade celular aproximada de 1x10⁶ células/mL.

2.4.4.1. Extracção do RNA Total

As células obtidas tal como descrito no ponto 2.4.4 foram colhidas dos frascos de cultura por tripsinização, centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min e ressuspensas em PBS 1x gelado para lavagem, com posterior centrifugação a 1500 rpm durante 5 min e eliminação dos sobrenadantes. A extracção do RNA total foi realizada através do *Kit SV Total RNA Isolation System* (Promega), de acordo com o procedimento descrito pelo fabricante. A concentração de RNA foi determinada espectrofotometricamente a 260 nm, no *NanoDrop2000* (Thermo Scientific), tendo em conta que 1 unidade de absorvância a 260 nm (Abs₂₆₀) corresponde a 40 µg de RNA de cadeia simples por mL. A pureza do RNA foi também avaliada no *NanoDrop* através das razões Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ e Abs₂₆₀/Abs₂₃₀. A razão Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ para uma amostra pura, sem contaminação por proteínas, deverá ser aproximadamente 2,0 (*SV Total RNA Isolation System Kit*, TM048, Promega 2009). Por outro lado, uma razão Abs₂₆₀/Abs₂₃₀ inferior a 1,8 indica uma possível contaminação com tiocianato de guanidina (*SV Total RNA Isolation System Kit*, TM048, Promega 2009). As amostras de RNA total foram armazenadas a -80 °C até posterior utilização.

2.4.4.2. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA a partir de RNA total foi efectuada através da acção da enzima transcriptase reversa, utilizando o *Kit cDNA Synthesis* (Bioline, Londres, Reino Unido), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de cDNA foram quantificadas no *NanoDrop*, por leitura de

absorvância a 260 nm, sendo que 1 unidade de Abs₂₆₀ corresponde a 33 µg de DNA de cadeia simples por mL. A pureza do cDNA foi também avaliada no *NanoDrop* pelas razões de Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ e Abs₂₆₀/Abs₂₃₀. O cDNA foi posteriormente armazenado a 4 °C até à sua utilização.

2.4.4.3. Amplificação de cDNAs Alvo por PCR

Com a finalidade de analisar variações na expressão dos genes *CDKN1A*, *BAX*, *BCL2* e *CASP3* na presença e ausência do complexo em estudo, recorreu-se à amplificação por PCR dos cDNAs obtidos. Como controlo interno para normalização das amostras foi quantificado o gene *ACTB* que codifica para a β-actina. O cDNA sintetizado (ponto 2.4.4.2) foi utilizado como molde nesta reacção. Prepararam-se as misturas reaccionais, de 20 µL de volume final por reacção, contendo 75 mU/µL de enzima *Taq Red DNA Polymerase* (Bioline), 1x *NH4-Reaction Buffer* (Bioline), 0,25x *High Spec additive* (Bioline) e 1 mM de cada dNTP (Bioline), além de concentrações variáveis, indicadas na Tabela 2.2, de cloreto de magnésio (MgCl₂; Bioline), *primers forward e reverse* e DNA molde.

Tabela 2.2 – Concentrações utilizadas de MgCl₂, *primers forward e reverse* e DNA molde e a temperatura de *annealing*, para amplificação por PCR do cDNA relativo aos genes *ACTB*, *CASP3*, *BAX*, *BCL2* e *CDKN1A*.

	<i>ACTB</i> (β-actina)	<i>CASP3</i> (caspase-3)	<i>BAX</i> (Bax)	<i>BCL2</i> (Bel-2)	<i>CDKN1A</i> (p21)
MgCl₂ (mM)	2	1	2,5	3	2
<i>Primers forward e reverse</i> (pmol primer /µL)	0,16	0,2	0,16	0,16	0,16
DNA molde (ng/ µL)	1	1	1	2	2
<i>Temp. Annealing</i> (°C)	59	57	57	57	55

A sequência dos *primers* (oligonucleótidos sintéticos) (Metabion, Martinsried, Deutschland), *forward e reverse*, bem como o tamanho do fragmento amplificado, estão indicadas na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Sequência dos *primers forward* e *reverse* e tamanho do amplicão esperado para cada um dos genes em estudo.

Genes	<i>Primer forward</i> (5'-3')	<i>Primer reverse</i> (5'-3')	Amplicão (pb)	Referência
<i>CDKN1A</i>	GCTTCATGCCAGCTACTTCC	AGGTGAGGGGACTCCAAAGT	221	Presente trabalho
<i>BAX</i>	TGCTTCAGGGTTTCATCCAGGA	ACGGCGGCAATCATCCTCTG	172	
<i>BCL2</i>	CTTCGCCGAGATGTCCAGCCA	CGCTCTCCACACACATGACCC	152	(Li <i>et al.</i> , 2010)
<i>CASP3</i>	TACCAGTGGAGGCCGACTTC	GCACAAAGCGACTGGATGAAC	103	
<i>ACTB</i>	CTACAATGAGCTGCGTGTGGC	CAGGTCCAGACGCAGGATGGC	270	

A amplificação, cujas condições se encontram descritas na Tabela 2.4, foi efectuada num termociclador MultiGene Gradient (Labnet International Inc., New Jersey, EUA). Os produtos amplificados foram sujeitos a electroforese em gel de agarose (Bioline) a 2 % (p/v), corado com 2 % (v/v) de GelRed (10000x) (Biotarget, Portugal), a 110 V durante 50 min, em solução tampão TAE 1x (composição TAE 10x: 1,7 M de NaCl, 0,03 M de KCl, 0,1 M de Na₂HPO₄ e 0,01 M de K₂HPO₄). Utilizou-se o marcador de pesos moleculares *HyperLadder IV* (Bioline). O gel foi visualizado sob luz UV num transiluminador *UVIpure* (UVITEC, Cambridge, Reino Unido), e fotografado com uma câmara *Kodak AlphaDigiDoc* (Alpha Innotech, Califórnia, EUA), sendo a aquisição da imagem efectuada através do *software* AlphaEaseFC (Alpha Innotech). As bandas correspondentes a cada um dos amplicões foram analisadas por densitometria pelo *software* *GelAnalyzer* (www.gelanalyzer.com). A normalização foi efectuada pelo cálculo da razão entre os valores obtidos para cada um dos genes em estudo e o obtido para o controlo (*ACTB*) (Li *et al.*, 2010).

Tabela 2.4 – Programa de PCR utilizado para amplificação das amostras de cDNA correspondentes aos genes codificantes para p21, Bax, Bcl-2, caspase-3 e β-actina.

Fase	Temperatura (°C)	Tempo (min)	
Desnaturação inicial	94	5	
Desnaturação	94	0,5	35 Ciclos
<i>Annealing</i>	55-59	0,5	
Extensão	72	1	
Extensão final	72	10	

2.5. Estudos de Interação com o DNA

2.5.1. Espectroscopia de Absorção

Para avaliação da possível interação de um composto com a molécula de DNA, a espectroscopia de absorção apresenta-se de grande importância (Shahabadi *et al.*, 2011). A interação do complexo JL130F1 com o DNA foi avaliada utilizando DNA de timo de bezerro (CT-DNA, do inglês *Calf Thymus*-DNA; Invitrogen). A concentração de CT-DNA, por nucleótido, foi determinada através da leitura de absorvância a 260 nm, no *NanoDrop*, e utilização do coeficiente de extinção molar de 6600 M⁻¹cm⁻¹, com posterior aplicação da equação $A = \varepsilon \cdot \ell \cdot C$ (lei de Lambert-Beer), correspondendo A à absorvância, ε ao coeficiente de extinção molar em mol⁻¹.L.cm⁻¹, ℓ ao percurso óptico em cm, e C à concentração da amostra em mol.L⁻¹ (Gallego *et al.*, 2011). Assim, para a realização das titulações na região UV, utilizou-se uma concentração constante do complexo (23,2 μM) em tampão 5 mM Tris-HCl (Merck), 50 mM NaCl (Panreac), pH 7, e efectuaram-se adições sucessivas de uma solução concentrada de CT-DNA, tanto à solução de complexo como à solução de referência (contendo tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7). Os espectros de absorção foram adquiridos num espectrofotómetro Shimadzu UV-2010PC de feixe duplo (Shimadzu, Kyoto, Japão).

Os valores de absorvância obtidos foram primeiramente corrigidos, devido à diluição resultante da adição de DNA, através da equação (4):

$$(4) \quad Abs_{\text{corrigida}} = Abs_{\text{medida}} \cdot \frac{Vol_{\text{Titulado}} + Vol_{\text{Titulante}}}{Vol_{\text{Titulado}}}$$

onde, Vol_{Titulado} corresponde ao volume de solução de complexo a ser titulado e Vol_{Titulante} ao volume total de solução de DNA adicionado à medida que decorre a titulação.

Os valores de absorvância a 265 nm, correspondentes a um máximo local de absorvância para o complexo JL130F1, foram, após a devida correcção, utilizados na determinação do valor da constante de afinidade para o DNA (K_b), pela aplicação da equação (5) (Gallego *et al.*, 2011):

$$(5) \quad \frac{[DNA]}{(\varepsilon_a - \varepsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)}$$

onde, [DNA] corresponde à concentração de DNA, ε_a ao coeficiente de extinção molar aparente, ε_f ao coeficiente de extinção molar do complexo no estado livre, ε_b ao coeficiente de extinção molar do complexo ligado ao DNA e K_b à constante de afinidade para o DNA (M⁻¹) (Gallego *et al.*, 2011). O valor de ε_f foi obtido através da equação de Lambert-Beer, pela determinação do declive de uma recta de calibração ajustada à dependência da absorvância a 265 nm com a concentração de complexo (de 11,6 a 46,4 μM) em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7 (Shahabadi *et al.*, 2011). ε_a foi calculado a partir da razão $A_{\text{obs}}/[\text{complexo}]$ (Shahabadi *et al.*, 2011). A constante K_b foi calculada pela

razão entre o declive ($1/(\epsilon_b - \epsilon_f)$) e a ordenada na origem ($1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)$) de uma recta resultante de um ajuste linear à representação de $[\text{DNA}]_{(\epsilon_a - \epsilon_f)}$ em função de $[\text{DNA}]$ (equação 5) (Shahabadi *et al.*, 2011). O ensaio foi realizado em triplicado.

2.5.2. Ensaio de Retardamento da Mobilidade Electroforética (EMSA)

2.5.2.1. Cultura de *Escherichia coli*

Os ensaios de EMSA foram realizados recorrendo ao DNA plasmídico pBluescript II SK+ (pBSK II; Agilent Technologies, Califórnia, EUA), presente em células de *Escherichia coli* da estirpe DH5 α transformadas com este plasmídeo. A estirpe foi cultivada em meio de cultura *Luria-Bertani* (LB; Applichem, Darmstadt, Alemanha) suplementado com ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Bioline), numa incubadora G25 (News Brunswick Scientific, New Jersey, EUA) com agitação orbital de 250 rpm, durante 16 h a 37 °C.

2.5.2.2. Extração de DNA Plasmídico (pBSKII)

O DNA plasmídico (pBSK II) foi extraído utilizando o *kit* de extração NZYMiniprep (Nzytech, Portugal). O protocolo foi seguido de acordo com as instruções do fabricante, à excepção do passo de eluição que ocorreu pela adição de tampão 50 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, pH 7,25, pré-aquecido a 70 °C. Procedeu-se à quantificação do DNA plasmídico por espectrofotometria no *Nanodrop*, no comprimento de onda de 260 nm, tendo em conta que 1 unidade de Abs_{260} corresponde a 50 μg de DNA em cadeia dupla por mL. A pureza do DNA plasmídico foi também avaliada por espectrofotometria no *Nanodrop*, a partir dos valores das razões $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ e $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{230}$. A razão $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ é de aproximadamente 1,8 em amostras consideradas puras, sendo que um valor inferior indica a presença principalmente de contaminação com proteínas e fenol e um valor superior a 2,0 indicará a presença de RNA (NanoDrop Technical Support Bulletin, T009, NanoDrop Technologies Inc. 2007). A razão $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{230}$ deve estar entre 2,0 a 2,2, sendo que valores inferiores indicam a presença de contaminantes que absorvem a 230 nm (NanoDrop Technical Support Bulletin, T009, NanoDrop Technologies Inc. 2007). A integridade do DNA plasmídico foi observada por electroforese em gel de agarose a 0,8 % (p/v) em solução TAE 1x, corado com 2 % (v/v) de GelRed.

2.5.2.3. Procedimento do Ensaio EMSA

Incubaram-se 200 ng de DNA plasmídico pBSK II na presença de DMSO (controlo), numa concentração final de 1,5 % (v/v), ou na presença de concentrações do complexo JL130F1 entre 60 e 350 μM , em tampão 50 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, pH 7,25, para um volume total de 20 μL por amostra. Procedeu-se à incubação das soluções por um período de 24 h a 37 °C. As amostras foram sujeitas a electroforese em gel de agarose a 0,7 % (p/v) em solução tampão TAE 1x, a 80 V por 2 h e

30 min. Como marcador de pesos moleculares utilizou-se λ DNA/*HindIII* (Fermentas, Maryland, EUA). O gel foi corado numa solução de Brometo de Etídio (Invitrogen) a 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em 100 mL de água destilada, durante 15 min com agitação, sendo posteriormente removido o excesso de corante em 100 mL de água destilada por 5 min com agitação. O gel foi visualizado em transiluminador *UVIpure* e a aquisição da imagem feita através de uma câmara *Kodak AlphaDigiDoc* e do *software AlphaEaseFC*. O ensaio foi realizado em triplicado.

2.5.3. Digestão com *SmaI* e *DraI*

A interferência do complexo JL130F1 na reacção de hidrólise do DNA pelas enzimas de restrição *SmaI* e *DraI* (Promega) foi avaliada usando o DNA plasmídico comercial pUC18 (0,5 ng/ μL) (Takara Bio Inc., Otsu, Japão). O ensaio de restrição foi realizado para razões de [complexo]/[DNA] de 0,1 e 0,3. A concentração, por nucleótido, da solução *stock* de DNA plasmídico foi calculada espectrofotometricamente, de acordo com o ponto 2.5.1. Prepararam-se misturas reaccionais, com um volume total de 20 μL , ajustado por adição de água desionizada estéril, de acordo com a Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Condições reaccionais utilizadas na avaliação da interferência do complexo JL130F1 sobre a actividade de endonuclease das enzimas *SmaI* e *DraI*. n.a. – não adicionado; * – substituição de JL130F1 por DMSO (controlo), em volume igual ao adicionado de complexo para $r = 0,1$ e $r = 0,3$.

	DNA plasmídico pUC18 (μM)	Complexo (μM)	Enzima de restrição (U/ μL)	Tampão da enzima (<i>stock</i> 10x)	BSA (mg/mL)
Controlo DNA		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>SmaI</i>	30	n.a. *	3	MC	0,1
		3 ($r = 0,1$)			
		9 ($r = 0,3$)			
<i>DraI</i>	30	n.a. *	2,5	B	
		3 ($r = 0,1$)			
		9 ($r = 0,3$)			

As soluções foram incubadas a 37 °C por 1 h e sujeitas a electroforese em gel de agarose a 0,8 % (p/v) em solução tampão TAE 1x, a 80 V por 2 h. Utilizou-se o marcador de pesos moleculares λ DNA/*HindIII*. O gel foi corado com Brometo de Etídio e fotografado de acordo com o ponto 2.5.2.3.

2.5.4. Capacidade de Indução de Aberrações Cromossómicas (Genotoxicidade)

O efeito genotóxico do complexo JL130F1 foi avaliado na linha celular de fibroblastos pulmonares de *Cricetulus griseus* (V79). O ensaio realizou-se no Departamento de Genética do Centro de Investigação em Genética Molecular e Humana, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa no âmbito de um protocolo de colaboração previamente estabelecido com o Professor Doutor António Sebastião Rodrigues.

2.5.4.1. Cultura da Linha Celular V79

A linha celular V79 foi cultivada em meio DMEM suplementado com 5 % (v/v) de FBS, em frascos de cultura de 25 cm² (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha), e incubadas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Procedeu-se à incubação das células com o complexo JL130F1 nas concentrações de 5, 10 e 20 µM (soluções preparadas por diluição da solução *stock* em DMSO), ou 1,5 µM de Mitomicina-C (MMC; Sigma) (controlo positivo) ou 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo negativo), durante 16 h nas condições anteriores. Duas horas e meia antes do término das 16 h de crescimento celular, foram adicionados a cada frasco de cultura 10 µL de uma solução de colchicina (300 µg/mL) (Sigma) previamente aquecida a 37 °C.

2.5.4.2. Choque Hipotónico e Fixação

Terminadas as 16 h de crescimento celular, removeu-se o meio de cultura com colchicina e procedeu-se à lavagem das culturas com 1 mL de uma solução de verseno suplementada com bicarbonato de sódio (solução ácida), agitando-se os frascos e eliminando-se em seguida a solução. Adicionaram-se 1,5 mL da solução de verseno e de seguida uma solução de tripsina e verseno numa proporção de 3:1 (v/v), que actuou durante um período de tempo suficiente para que as células se soltassem. Todo o conteúdo dos frascos foi removido para tubos de centrifuga, centrifugado a 1500 rpm durante 5 min e eliminados os sobrenadantes. A cada tubo foram adicionados 2 mL de uma solução de 0,56 % (p/v) de KCl, previamente aquecida a 37 °C por 5 min, com agitação no vórtex. Adicionaram-se posteriormente mais 4 mL da mesma solução, colocando-se os tubos num banho a 37 °C durante 4 min. Seguiu-se a centrifugação dos tubos a 1500 rpm durante 5 min, eliminando-se posteriormente os sobrenadantes. Foram adicionadas algumas gotas de uma solução fixadora de metanol/ácido acético na proporção de 3:1 (v/v), arrefecida a -20 °C, agitando de imediato os tubos no vórtex a fim de impedir a formação de aglomerados, e adicionou-se novamente solução fixadora, perfazendo um volume final de 5 mL. Centrifugaram-se os tubos a 1500 rpm por 5 min, eliminando-se os sobrenadantes. Realizou-se a lavagem das células com 5 mL da solução fixadora, adicionando inicialmente algumas gotas desta solução, agitando a suspensão celular no vórtex e adicionando de

seguida o restante volume. Depois de centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min, as células foram então ressuspensas em 2 mL da solução fixadora para a preparação das lâminas.

2.5.4.3. Preparação das Lâminas para Observação das Aberrações Cromossômicas

Em lâminas previamente lavadas e armazenadas em água destilada a 4 °C, sobre uma fina camada de água, pipetaram-se três gotas das suspensões celulares obtidas, a uma altura de aproximadamente 20 cm, deixando-se secar na horizontal. Depois de secas, as lâminas foram colocadas numa tina de coloração com 4 % (p/v) de Giemsa (Sigma) por um período de 10 min. As lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas a secar. Posteriormente colocaram-se 2 gotas de Entellan® (Merck) sobre lamelas e inverteram-se as lâminas sobre estas, tendo atenção para impedir a formação de bolhas de ar, e foram deixadas a secar. As preparações foram então observadas e analisadas ao microscópio óptico Leitz Dialux 20 (Leica, Wetzlar, Alemanha). A experiência foi realizada em duplicado.

2.5.5. Ensaio de Inibição da Actividade de Decatenação da Topoisomerase II

O estudo da inibição da acção de decatenação da topoisomerase II humana realizou-se pela aplicação do *Kit Human Topo II Decatenation Assay* (Inspiralis, Norwich, Reino Unido). O ensaio foi realizado segundo as instruções do fabricante, à excepção do tempo de incubação, que foi de 1 h e 30 min a 37 °C. Os reagentes foram adicionados às amostras pela seguinte ordem: complexo, topoisomerase II, DNA catenado (kDNA). Foram preparadas quatro soluções: dois controlos negativos, um na ausência da enzima topoisomerase II e outro contendo a enzima e 0,5 % (v/v) de DMSO, um controlo positivo com a enzima e 1 µM de DOX, um inibidor da topoisomerase II humana (Thakur, 2011), e uma solução contendo a enzima e o complexo em estudo na concentração de 75 µM. A inibição da actividade de decatenação da enzima foi analisada por electroforese em gel de agarose a 1 % (p/v) em solução tampão TAE 1x, por 1 h a 90 V, sendo o gel corado com 2 % (v/v) de GelRed. Como marcador de pesos moleculares utilizou-se λ DNA/*HindIII*. O gel foi visualizado em transiluminador *UVIpure* e a imagem foi adquirida através de uma câmara *Kodak AlphaDigiDoc* e do *software AlphaEaseFC*.

2.6. Análise da Progressão do Ciclo Celular

Para a análise da progressão do ciclo celular utilizou-se a linha celular tumoral HCT116. As células desta linha foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² numa densidade celular de 0,75×10⁵ células/mL e incubadas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. As células

foram sincronizadas por um duplo bloqueio com timidina, de forma a ficarem retidas no início da fase S, de acordo com o método apresentado de seguida descrito por Borralho e colaboradores, 2009. Após 8 h da cultura das células, o primeiro bloqueio foi realizado pela adição no meio de cultura de 2 mM de timidina (Sigma) e incubação por 14 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. As células foram posteriormente mantidas em meio de cultura sem timidina por 10 h. Seguidamente adicionaram-se 2 mM de timidina (2º bloqueio), e as células foram incubadas por 14 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Após este período de incubação, removeu-se o meio com timidina e procedeu-se à exposição das células ao complexo em estudo na concentração de 35 µM ou a 0,2 % (v/v) de DMSO (controlo), com incubação a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, por 4 e 6 h. As células de uma das culturas foram fixadas, de acordo com o protocolo seguinte, imediatamente após a terminação do segundo bloqueio (0 h) e utilizadas como controlo do método de sincronização.

O meio de cultura foi recolhido para tubos de centrífuga juntamente com as células colhidas por tripsinização e seguiu-se uma centrifugação a 1500 rpm durante 5 min, com posterior eliminação dos sobrenadantes. Seguidamente foram lavadas em 1 mL de PBS 1x frio e centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min, eliminando-se em seguida os sobrenadantes. Os sedimentos obtidos foram então ressuspensos em 1 mL de PBS 1x frio, adicionando-se posteriormente, gota a gota, 1 mL de uma solução de etanol a 80 % (armazenada a -20 °C), com agitação suave em vórtex, para fixação das células. As amostras foram mantidas em gelo por um período de 30 min, sendo de seguida armazenadas a 4 °C no mínimo durante 18 h. Os tubos foram centrifugados a 2000 rpm durante 5 min, desprezaram-se os sobrenadantes, e ressuspenderam-se os sedimentos em 250 µL de uma solução de 50 µg/mL de RNase A em PBS 1x. Adicionou-se iodeto de propídio a cada tubo para uma concentração final de 2,5 µg/mL e incubaram-se as amostras na ausência de luz por um período mínimo de 30 min à temperatura ambiente.

A análise da marcação com iodeto de propídio foi efectuada por citometria de fluxo, no citómetro de fluxo BD FACScaliburTM, pela aquisição de 10000 eventos por amostra. A análise da distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular foi realizada através do programa *CellQuest* (BD Biosciences). O ensaio foi realizado em triplicado.

Este ensaio foi efectuada igualmente no âmbito do protocolo previamente estabelecido com a Professora Doutora Paula Videira.

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação do Potencial Citotóxico

O desenvolvimento de métodos *in vitro* para o estudo do perfil de citotoxicidade em culturas de células tumorais é importante na identificação de novos compostos com potencial anti-tumoral (O'Toole *et al.*, 2003). Na validação destes compostos são necessários estudos de caracterização dos mecanismos de acção e estudos *in vivo* para determinação de uma potencial aplicação terapêutica, determinada através de várias fases de ensaios clínicos (McGowan *et al.*, 2011; O'Toole *et al.*, 2003). A avaliação da taxa de viabilidade celular, ou perfil de citotoxicidade, após tratamento das linhas celulares com os compostos de interesse resulta geralmente da avaliação pelos ensaios metabólicos MTS ou MTT, que medem a actividade enzimática mitocondrial presente exclusivamente em células viáveis, e portanto, proliferativas (McGowan *et al.*, 2011). O MTT consiste num sal de tetrazólio que na presença de desidrogenases mitocondriais, principalmente da succinato desidrogenase, é reduzido a cristais de formazano de coloração roxa (Wang *et al.*, 2010). A utilização de MTS no ensaio de viabilidade celular consiste numa versão melhorada do ensaio de MTT, ultrapassando alguns dos problemas associados à utilização deste último, como por exemplo, o facto de o formazano resultante da redução de MTS apresentar menor toxicidade que no caso do MTT (Wang *et al.*, 2010; O'Toole *et al.*, 2003). O MTS, um sal de tetrazólio de coloração amarela, é reduzido por desidrogenases mitocondriais em células metabolicamente activas, formando assim um formazano aquoso e solúvel, de coloração acastanhada (CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, TB169, Promega 2009; O'Toole *et al.*, 2003). A intensidade da cor do formazano produzido é proporcional ao número de células viáveis (Wang *et al.*, 2010).

O potencial antiproliferativo do complexo JL130F1 foi avaliado nas duas linhas celulares tumorais HCT116 e HepG2, pela aplicação de concentrações crescentes do complexo e exposição ao mesmo por um período de 48 horas (superior ao tempo de duplicação para as células de ambas as linhas tumorais). As taxas de viabilidade celular obtidas para HCT116 e HepG2 após tratamento com JL130F1 são evidenciadas na Figura 3.1. Sobre ambas as linhas, observou-se uma redução bastante significativa e gradual da viabilidade celular com o aumento da concentração do complexo. Este efeito é visível principalmente a partir da concentração de 15 μM em ambas as linhas tumorais. Desta forma, verifica-se que o complexo JL130F1 apresenta actividade antiproliferativa *in vitro*, e portanto uma aparente citotoxicidade, perante ambas as linhas celulares tumorais, de uma forma dependente da concentração.

A cisplatina também avaliada quanto à sua citotoxicidade em ambas as linhas tumorais HCT116 e HepG2, nas mesmas condições testadas para o complexo, pelo método MTS, demonstrou uma redução consecutiva da viabilidade celular em conformidade com o aumento da concentração deste agente. As taxas de viabilidade celular em ambas as linhas tumorais encontram-se apresentadas na

Figura 3.2. Este efeito de redução da viabilidade celular é visível em ambas as linhas tumorais a partir de uma concentração de 10 μM , revelando uma maior perda de viabilidade para as células de HepG2.

A DOX foi também estudada quanto à sua capacidade antiproliferativa. Esta foi avaliada na linha tumoral HCT116 igualmente pelo método MTS, após aplicação de concentrações crescentes da mesma por um período de 48 horas, demonstrando uma actividade antiproliferativa considerável, com uma redução de mais de 50 % de viabilidade celular a 1 μM (Figura 3.3).

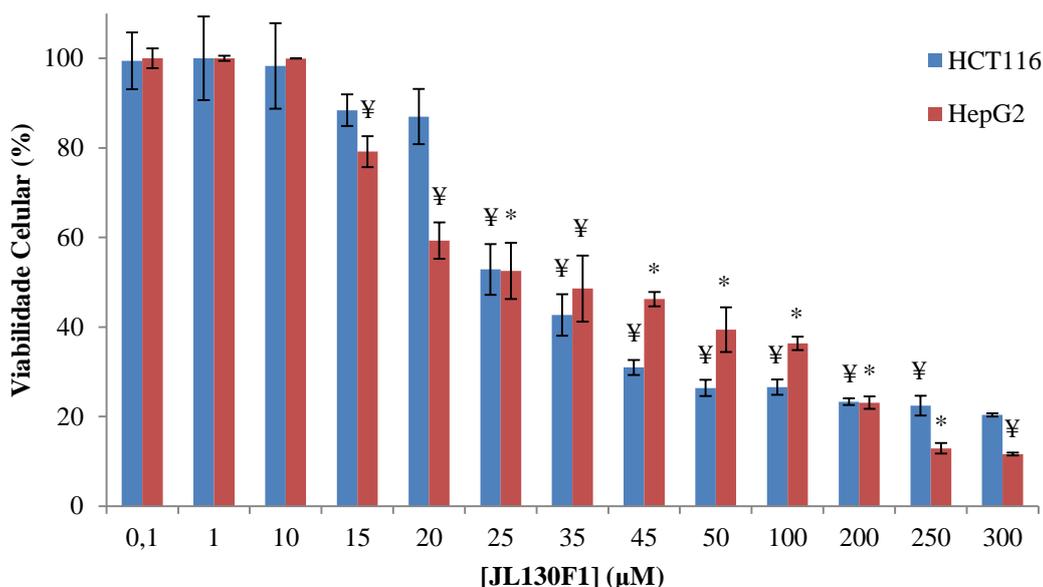


Figura 3.1 – Viabilidade celular das linhas celulares tumorais HCT116 e HepG2 após 48 horas de exposição ao complexo JL130F1. A viabilidade celular foi determinada por MTS. Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao erro padrão em relação à média (* $p < 0,01$ em relação a 0,1 μM e ¥ $p < 0,05$ em relação a 0,1 μM). Os valores de viabilidade celular foram normalizados em relação às células incubadas sem complexo, na presença de solvente (controlo).

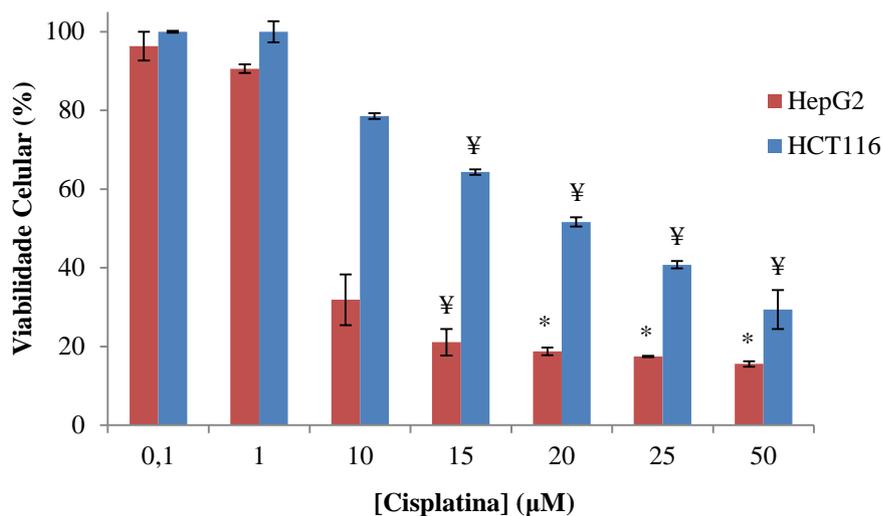


Figura 3.2 – Viabilidade celular das linhas celulares tumorais HCT116 e HepG2 após 48 horas de exposição à cisplatina. A viabilidade celular foi determinada por MTS. Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao erro padrão em relação à média (* $p < 0,01$ em relação a 1 μM e ¥ $p < 0,05$ em relação a 1 μM). Os valores de viabilidade celular foram normalizados em relação às células incubadas sem composto, na presença de solvente (controlo).

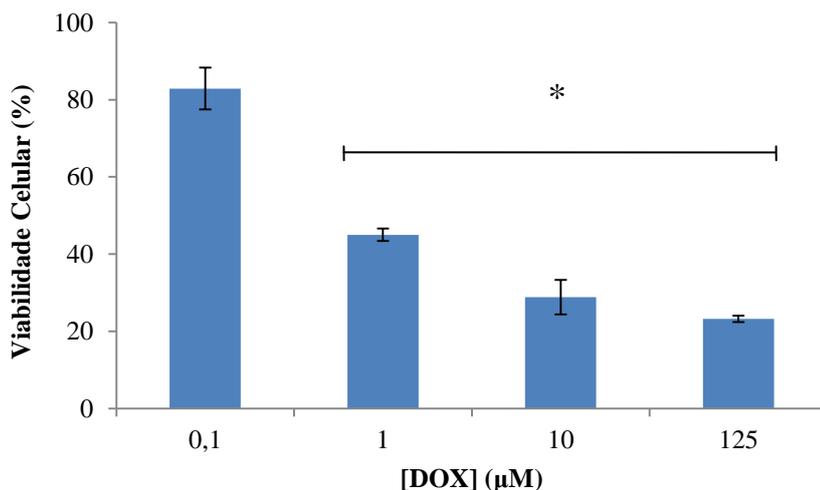


Figura 3.3 – Viabilidade celular da linha celular tumoral HCT116 após 48 horas de exposição à DOX. A viabilidade celular foi determinada por MTS. Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao erro padrão em relação à média (* $p < 0,01$ em relação a 0,1 μM). Os valores de viabilidade celular foram normalizados em relação às células incubadas sem complexo, na presença de solvente (controlo).

A partir destes resultados pode ainda estimar-se o valor de IC_{50} , concentração de complexo necessária para redução de 50 % de viabilidade celular (Li *et al.*, 2010), podendo o seu valor absoluto ser retirado directamente a partir das Figuras 3.1, 3.2 e 3.3. Os valores estimados encontram-se entre os 25 e os 35 μM para as duas linhas tumorais incubadas com o complexo JL130F1, entre 1 e 10 μM para HepG2 e entre 20 e 25 μM para HCT116 após tratamento com a cisplatina, e entre 0,1 e 1 μM para HCT116 após exposição à DOX.

De notar a ocorrência de patamares nos gráficos de viabilidade celular a cerca de 20 % para a linha HCT116, tanto no tratamento com o complexo JL130F1 como com a DOX (Figura 3.1 e 3.3, respectivamente), e a aproximadamente 10 % para HepG2 após tratamento com o complexo (Figura 3.1), e a cerca de 15 % nesta linha após exposição à cisplatina (Figura 3.2). Estes patamares devem-se à absorção de radiação a 490 nm mesmo na ausência de células. Por este motivo, foram construídas curvas dose-resposta para a determinação dos valores de IC₅₀ relativo, de forma a ultrapassar esta interferência associada à técnica. O IC₅₀ relativo é dado pela concentração de complexo correspondente ao ponto médio entre os patamares superior e inferior da curva dose-resposta. Por oposição, o IC₅₀ absoluto, referido anteriormente, corresponde simplesmente ao valor de concentração de complexo correspondente aos 50 % no eixo da viabilidade celular. Os valores de IC₅₀ relativo foram calculados através do programa *GraphPad* e são de 22,74 µM para HCT116 e 22,08 µM para HepG2 no que respeita ao tratamento com o complexo JL130F1. Os valores de IC₅₀ revelam que o complexo apresenta uma actividade antiproliferativa equivalente em ambas as linhas tumorais. Para a cisplatina foram determinados valores de IC₅₀ de 15,3 e 4,2 µM, respectivamente para HCT116 e HepG2. A cisplatina revela-se então com uma maior actividade perante a linha HepG2 em relação à linha HCT116. Além disso, estes valores registam-se inferiores aos obtidos para o complexo em ambas as linhas, mostrando a grande eficácia deste agente quimioterapêutico e o porquê da sua grande aplicação na clínica. Desta forma, uma maior concentração do complexo é necessária para que o mesmo tenha uma acção equivalente à da cisplatina. O valor de IC₅₀ para a DOX foi determinado como sendo de 0,42 µM. O valor correspondente ao IC₅₀ da DOX é significativamente inferior ao observado para JL130F1, indicando que o efeito citotóxico deste agente quimioterapêutico na linha celular HCT116 é superior ao do complexo em estudo e que por sua vez, de forma a igualar esta actividade o complexo necessita de uma concentração mais elevada. Mais ainda, tendo em conta o valor de IC₅₀ de ambos os agentes quimioterapêuticos utilizados como controlo, é possível observar-se que a DOX apresenta-se mais efectiva na redução da viabilidade celular na linha tumoral HCT116 comparativamente à cisplatina, estando de acordo com a conhecida insensibilidade desta linha à cisplatina (Arango *et al.*, 2004).

Segundo, Janar e colaboradores (2012) os valores de IC₅₀ registados para a acção da cisplatina em ambas as linhas celulares tumorais utilizadas nos ensaios desta tese foram de 16,0 µM para HCT116 e 12,3 µM para HepG2. No entanto, apesar de estes resultados corresponderem a uma exposição de 48h, foram obtidos por análise do metabolismo de MTT. O valor de IC₅₀ obtido neste estudo para a linha HCT116 após tratamento com a cisplatina apresenta-se muito próximo daquele registado por Janar e colaboradores (2012), contudo para a linha HepG2, curiosamente, o valor de IC₅₀ registado neste trabalho apresenta-se bastante inferior ao apresentado por estes autores.

Sohn e colaboradores (2010) avaliaram a citotoxicidade da oxaliplatina através do ensaio MTS em células da linha tumoral HCT116 tratadas durante 48 h. A partir deste estudo os mesmos verificaram que com o aumento da concentração havia uma redução significativa da viabilidade

celular, tendo obtido um valor de IC_{50} de 2,0 μM (determinado apenas por visualização de uma inibição de 50 % da viabilidade celular). Este valor revela-se inferior ao IC_{50} da cisplatina. Esta perspectiva vai de encontro ao observado anteriormente, em que se verifica uma resistência por parte de células de cancro do colorectal à cisplatina e o facto de a sua viabilidade diminuir de forma mais acentuada em resposta à oxaliplatina (Arango *et al.*, 2004).

Assim, embora os valores de IC_{50} para o complexo JL130F1 sejam superiores aos dos compostos cisplatina, DOX e oxaliplatina, o primeiro poderá ser avaliado futuramente em linhas tumorais resistentes à cisplatina.

A avaliação do complexo JL130F1 quanto à sua acção em linhas não-tumorais é de facto importante, tendo em conta os problemas de toxicidade que a cisplatina revela em células saudáveis (Bouchal *et al.*, 2011).

A citotoxicidade do complexo foi então testada em duas linhas celulares não-tumorais, de epitélio mamário (MCF-10A) (Figura 3.4) e fibroblastos (Figura 3.5), de forma a avaliar a existência de selectividade para células tumorais por parte de JL130F1. De um modo global, verifica-se que o decréscimo da viabilidade para as linhas celulares não-tumorais ocorre a concentrações mais elevadas comparativamente ao que se verificou para as linhas tumorais. Por exemplo, para uma concentração de 50 μM , superior aos valores de IC_{50} determinados para HCT116 e HepG2, ainda existe uma viabilidade celular superior a 85 % tanto no caso das células de epitélio mamário como dos fibroblastos. De facto, nas concentrações testadas não se verifica sequer uma diminuição da viabilidade igual ou superior a 50 %, não sendo possível a determinação de valores de IC_{50} . Desta forma, é inferido que há uma menor citotoxicidade de JL130F1 perante as linhas MCF-10A e de fibroblastos comparativamente ao efeito citotóxico mais acentuado que apresenta relativamente às linhas tumorais. Por conseguinte, o complexo parece ter alguma selectividade para células tumorais, sendo esta uma característica importante de um agente quimioterapêutico, tal como referido na introdução desta dissertação.

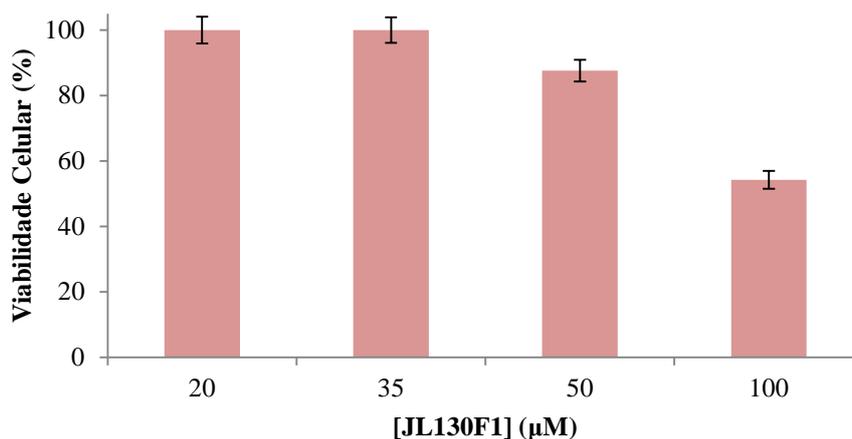


Figura 3.4 – Viabilidade celular da linha celular MCF-10A após 48 horas de exposição ao complexo JL130F1. A viabilidade celular foi determinada por MTS. Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao erro padrão em relação à média. Os valores de viabilidade celular foram normalizados em relação às células incubadas sem complexo, na presença de solvente (controle).

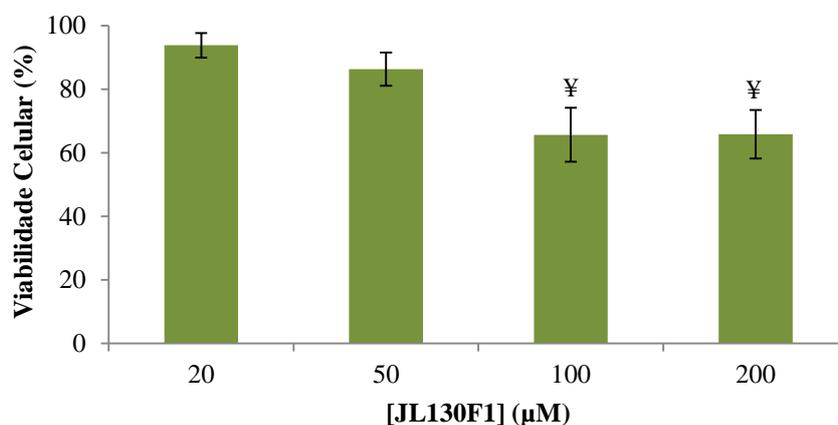


Figura 3.5 – Viabilidade celular da linha celular de fibroblastos após 48 horas de exposição ao complexo JL130F1. A viabilidade celular foi determinada por MTS. Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao erro padrão em relação à média (¥ $p < 0,05$ em relação a 20 µM). Os valores de viabilidade celular foram normalizados em relação às células incubadas sem complexo, na presença de solvente (controle).

O efeito citotóxico da cisplatina foi avaliado por Ho e colaboradores (2007) em células de MCF-10A pelo ensaio de MTS, após uma exposição de 48 horas, tendo-se obtido um valor de IC_{50} de 4,76 µM. Já, Dhar e Lippard (2009) determinaram, pelo ensaio de MTT, um valor de IC_{50} de 9,5 µM para uma linha não-tumoral de fibroblastos humanos (MRC-5) tratada durante 72 horas com cisplatina. Também a citotoxicidade da DOX foi avaliada na linha celular MCF-10A por Tapia e colaboradores (2007), pelo ensaio de MTS, por um período de 48 horas, tendo-se obtido um valor de IC_{50} no intervalo de 20 a 25 µM. Nestes casos verifica-se que a selectividade para as células tumorais por parte da DOX e cisplatina será inferior relativamente ao complexo em estudo JL130F1 na medida em que mesmo para as concentrações testadas de 100 e 200 µM de JL130F1 não foi possível

determinar um valor de IC₅₀ para ambas as linhas celulares não-tumorais. Assim, este valor de IC₅₀ será superior ao da cisplatina em fibroblastos e ao da DOX na linha MCF-10A.

3.2. Avaliação do Potencial Apoptótico

De forma a avaliar o processo de morte celular subjacente à redução do número de células viáveis resultante do tratamento de linhas celulares tumorais com o complexo, realizaram-se ensaios de (i) marcação nuclear com Hoechst 33258 e (ii) marcação dupla com anexina V-FITC e IP. A apoptose, um processo de morte celular programada que permite a eliminação de células sem causar interferência nas células adjacentes, constitui um dos mecanismos ideais pelo qual os compostos anti-tumorais promovem citotoxicidade em células cancerígenas (Elmore, 2007; Johnstone *et al.*, 2002). Desta forma, identificar o mecanismo subjacente à morte celular induzida na presença do complexo JL130F1 seria crucial.

3.2.1. Marcação com a Sonda Hoechst 33258

A sonda Hoechst 33258 é utilizada na marcação de ácidos nucleicos, devido à emissão de fluorescência azul como resultado da sua interação com o sulco menor da molécula de DNA (Martin *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1999). Assim sendo, esta sonda tem aplicabilidade na análise de alterações a nível nuclear, como aquelas denotadas em células apoptóticas, permitindo identificar núcleos com cromatina condensada e fragmentação nuclear (Yan *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010). Uma vez que este tipo de alterações da morfologia nuclear se encontra associado à apoptose, a marcação com Hoechst 33258 é útil para uma avaliação preliminar da ocorrência deste tipo de morte celular. Além disso, a membrana citoplasmática é permeável a esta molécula, permitindo a sua entrada em células viáveis, sem que a integridade membranar esteja comprometida (Hoechst Stains, MP21486, Invitrogen 2005). Desta forma, também núcleos de células que não se encontram em apoptose podem ser marcados por este fluorocromo, evidenciando-se núcleos com uma marcação uniforme, indicativa da presença de cromatina equitativamente distribuída pelo núcleo (Yan *et al.*, 2012).

O potencial apoptótico do complexo JL130F1 foi avaliado, numa primeira instância, pela marcação com a sonda Hoechst 33258, testando três diferentes concentrações do complexo, 20, 35 e 50 µM, nas linhas tumorais HCT116 e HepG2 (Figuras 3.6 e 3.7, respectivamente). Pela análise das figuras foi possível observar, em ambas as linhas celulares tumorais, a presença tanto de fragmentação como de condensação nuclear, comparativamente ao núcleo de células normais. Estas alterações morfológicas são típicas de células apoptóticas, como mencionado por Yan e colaboradores (2012) bem como por Ziegler e Groscurth (2004). A presença de condensação da cromatina é visível não só pela redução do tamanho do núcleo, como também pela grande intensidade a que a sonda Hoechst 33258 se faz apresentar. No controlo com solvente (DMSO) visualizaram-se núcleos com uma

distribuição uniforme da fluorescência, bem como a presença de células em mitose, indicando que este não induz apoptose nem impede a divisão celular, na concentração testada. Nas células incubadas com o complexo JL130F1, o número de células por preparação apresenta uma redução proporcional ao aumento da concentração, o que mais uma vez confirma o efeito citotóxico deste complexo.

A cisplatina demonstrou ser capaz de induzir apoptose em diferentes tipos celulares, incluindo as linhas HCT116 e HepG2 (Zhang *et al.*, 2009; Bragado *et al.*, 2007; Schweyer *et al.*, 2004).

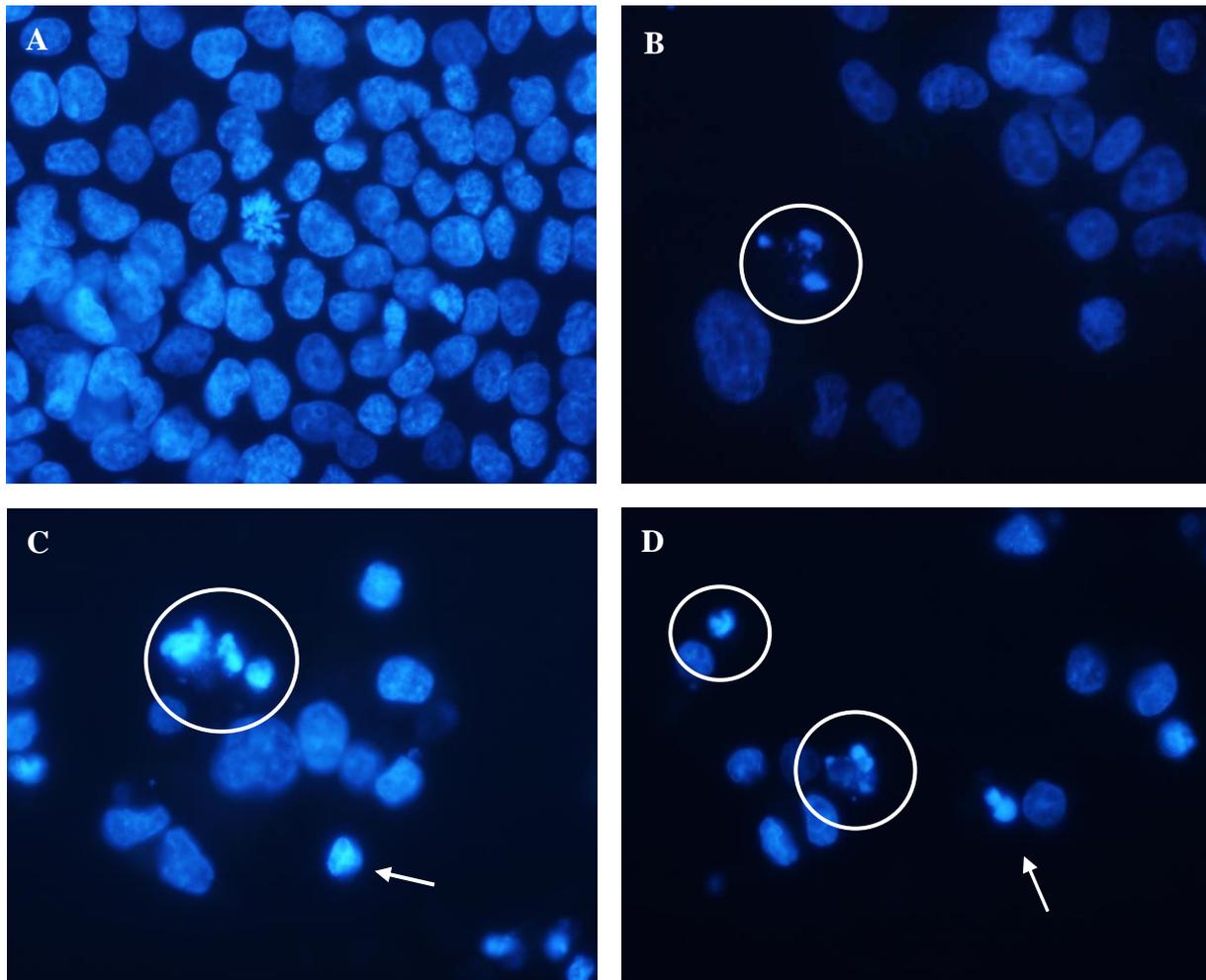


Figura 3.6 – Células da linha tumoral HCT116 marcadas com a sonda nuclear Hoechst 33258 após tratamento com ou sem o complexo JL130F1 nas concentrações de 20, 35 e 50 μM , por 48 horas: (A) Controle com DMSO a 0,2 % (v/v) e sem complexo; (B) Complexo a 20 μM ; (C) Complexo a 35 μM ; e (D) Complexo a 50 μM . Os círculos representam a fragmentação nuclear e as setas a condensação da cromatina.

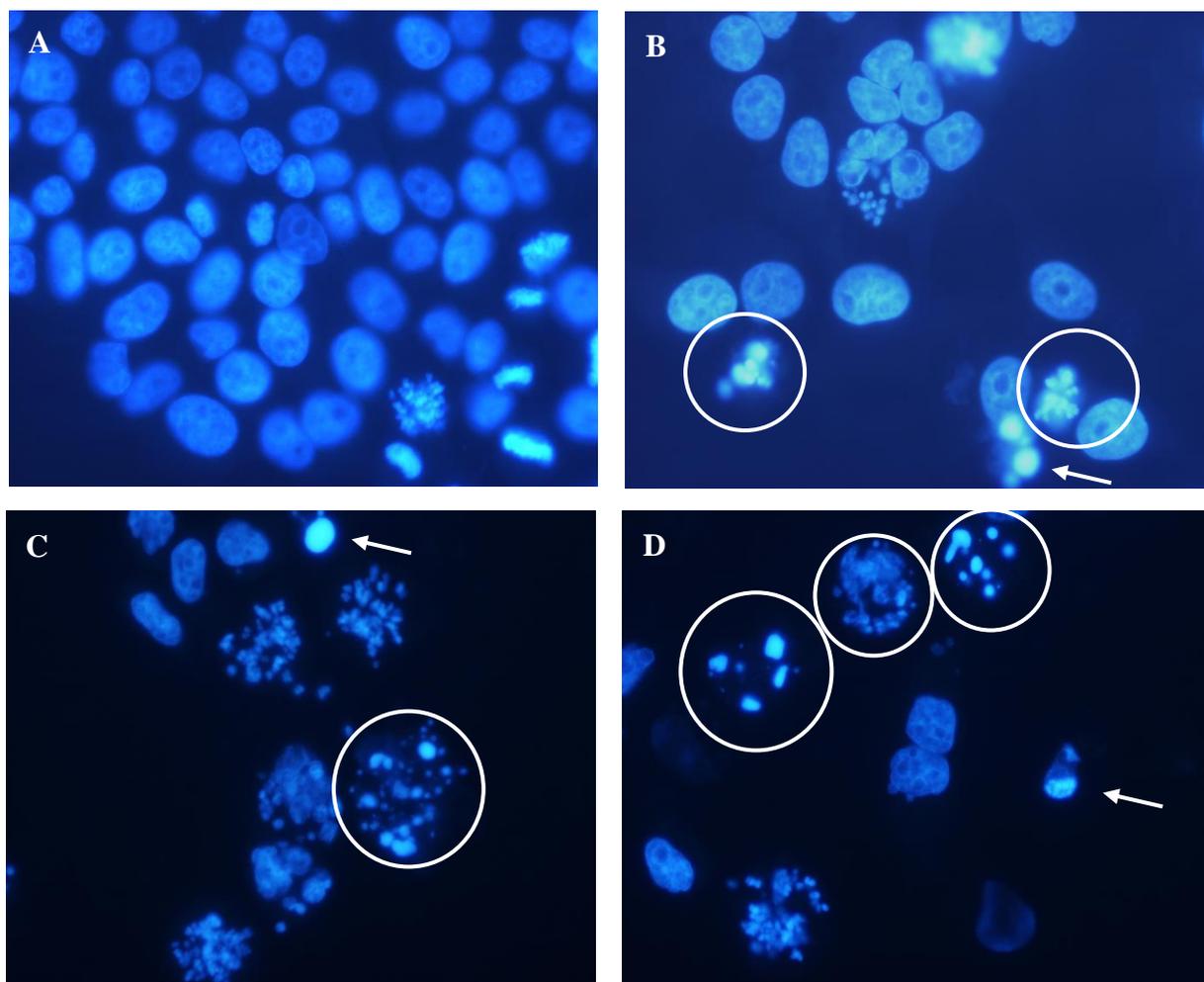


Figura 3.7 – Células da linha tumoral HepG2 marcadas com a sonda nuclear Hoechst 33258 após tratamento com ou sem o complexo JL130F1 nas concentrações de 20, 35 e 50 μM , por 48 horas: (A) Controle com DMSO a 0,2 % (v/v) e sem complexo; (B) Complexo a 20 μM ; (C) Complexo a 35 μM ; e (D) Complexo a 50 μM . Os círculos representam a fragmentação nuclear e as setas a condensação da cromatina.

3.2.2. Marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio

Os métodos que avaliam a ocorrência de apoptose pela observação de propriedades morfológicas características da mesma, como a marcação com Hoechst 33258, apresentam-se bastante subjectivos (Brumatti *et al.*, 2008). De forma a confirmar com maior especificidade e sensibilidade a indução de apoptose, sugerida pelo ensaio de marcação com Hoechst, realizou-se a marcação dupla com anexina V-FITC e IP em células de HCT116 tratadas com várias concentrações do complexo.

As anexinas são proteínas conhecidas pela capacidade de se ligarem reversivelmente a fosfolípidos na presença de Ca^{2+} (Brumatti *et al.*, 2008). A anexina V, em particular, tem uma maior afinidade de ligação para a fosfatidilserina, que se encontra permanentemente no folheto interno da membrana celular mas que, sob um efeito indutor do processo apoptótico, sofre translocação para o folheto externo (Cao *et al.*, 2011; Brumatti *et al.*, 2008). FITC (isotiocianato de fluoresceína) consiste num fluoróforo que, estando associado à anexina V, permite a detecção, por emissão de fluorescência,

das células em que houve externalização de fosfatidilserina (Brumatti *et al.*, 2008). Esta externalização ocorre numa fase inicial do processo apoptótico e, por conseguinte, antes da perda de integridade da membrana celular (Cao *et al.*, 2011; Brumatti *et al.*, 2008). A integridade membranar apresenta-se comprometida em células em fases tardias do processo apoptótico e em células necróticas (Pec *et al.*, 2003). Estas são, portanto, permeáveis ao IP, um fluoróforo de exclusão, incapaz de penetrar em células com membrana citoplasmática intacta, que emite fluorescência ao interagir com ácidos nucleicos (Brun *et al.*, 2012). Tendo isto em conta, torna-se possível distinguir entre células viáveis (FITC⁻/IP⁻), células apoptóticas em estadios iniciais (FITC⁺/IP⁻), células apoptóticas em estadios tardios (FITC⁺/IP⁺) e células em necrose (FITC⁻/IP⁺) (Sabbadini *et al.*, 2012; Sawai e Domae, 2011).

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3.8. Verifica-se a existência maioritária de células sem qualquer marcação (FITC⁻/IP⁻), e portanto viáveis, tanto para o controlo (76,48 %) como para ambas as concentrações testadas de complexo, 35 µM (65,32 %) e 45 µM (60,14 %). No que respeita aos restantes tipos de marcação (FITC⁺/IP⁻, FITC⁺/IP⁺ e FITC⁻/IP⁺), observa-se para as concentrações testadas uma predominância da apoptose em relação à necrose, registando-se 20,05 % para o controlo negativo (contendo 0,2 % (v/v) de DMSO) e 32,52 e 37,78 %, respectivamente, para as concentrações testadas de 35 e 45 µM de JL130F1. A maioria das células apoptóticas, para as três condições testadas, encontra-se em fase tardia, e portanto com marcação dupla (FITC⁺/IP⁺): 15,73 % para o controlo, 27,39 % para a concentração de 35 µM e 31,88 % para a concentração de 45 µM. É ainda inferido que a percentagem de células apoptóticas, iniciais e tardias, aumenta com o aumento da concentração de complexo. Desta forma, verifica-se para ambas as concentrações testadas, que o complexo JL130F1 promove a indução do processo apoptótico, como se tinha inicialmente constatado pela marcação com Hoechst 33258. As células em necrose (FITC⁻/IP⁺) são inferiores a 3,45 % (percentagem de células necróticas registadas para o controlo) na presença de qualquer uma das concentrações de complexo e curiosamente a sua percentagem diminui com a exposição ao mesmo. Em termos de variação comparativamente ao controlo, verifica-se, respectivamente para as concentrações de 35 e 45 µM, uma diminuição de 1,17 e 1,27 vezes em termos de células viáveis e um aumento de 1,62 e 1,88 vezes no que respeita a células apoptóticas totais.

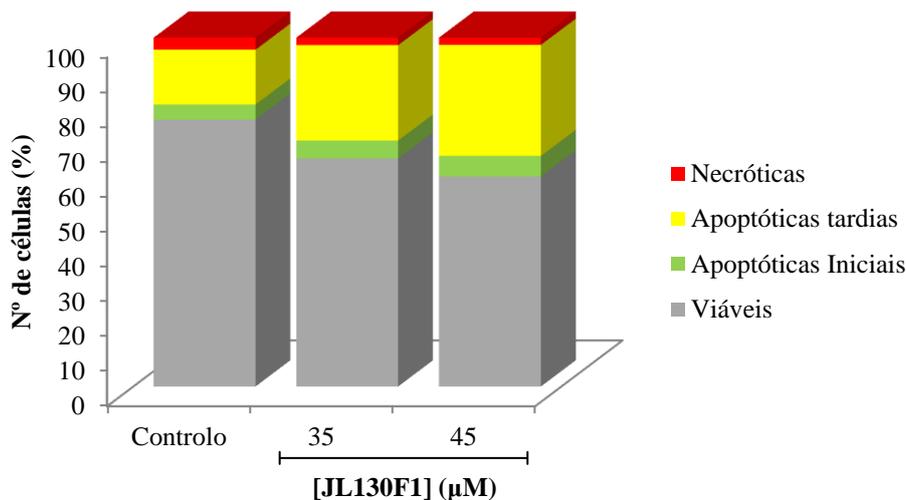


Figura 3.8 – Ensaio de citometria de fluxo para marcação dupla com Anexina V-FITC e IP, para quantificação de células em apoptose, inicial e tardia, e necrose, na ausência (controlo com 0,2 % (v/v) de DMSO) ou presença do complexo JL130F1 nas concentrações de 35 e 45 µM, em células HCT116, por 48 horas.

Comparativamente à cisplatina, cuja exposição em células HCT116 a 33 µM por 24 h foi analisada por Tseng e colaboradores (2012), o complexo JL130F1, a 35 µM, induziu mais 6,72 % de células apoptóticas e menos 3,13 % de células necróticas.

A redução do número de células viáveis não foi tão significativa quanto seria de esperar, uma vez que de acordo com os resultados de viabilidade obtidos por MTS (ponto 3.1) para estas concentrações, deveriam ser originadas perdas de viabilidade superiores a 50 %, o que não se verifica. A inexistência de proliferação celular, determinada pelos métodos de MTS e MTT (McGowan *et al.*, 2011), pode ter outra causa que não a disfunção metabólica. Assim, a observação de uma percentagem de células viáveis superior àquela registada em MTS indica que possivelmente o mecanismo pelo qual o complexo JL130F1 promove o seu efeito antiproliferativo está maioritariamente associado a uma paragem do ciclo celular e não à indução do processo apoptótico. É de salientar que a concentração de cisplatina utilizada por Tseng e colaboradores (2012) foi superior ao valor de IC_{50} registado neste trabalho experimental (15,3 µM) para a linha tumoral HCT116. Desta forma, seria de esperar que a esta concentração de cisplatina, a viabilidade celular fosse inferior a 50 %, o que leva a concluir que, também no caso da cisplatina, um outro mecanismo para além da apoptose deve estar subjacente à sua capacidade antiproliferativa nesta linha. A indução de um bloqueio do ciclo celular leva a que existam menos células em cultura comparativamente aos controlos. Desta forma, como os resultados de MTS são relativizados em função do controlo, não é possível distinguir se a diminuição da densidade celular das amostras tratadas se deve à perda de viabilidade ou ao bloqueio do ciclo celular. Por outro lado, os dados de citometria de fluxo permitem detectar especificamente a proporção de células não viáveis em cada amostra, uma vez que a marcação é dirigida a este tipo de células e que não são efectuadas relativizações face aos controlos. Serão posteriormente efectuados ensaios de citometria de fluxo para

análise da distribuição de células expostas ao complexo nas várias fases do ciclo celular, de modo a confirmar esta hipótese.

3.2.3. Actividade das Caspases-3/7

Dada a referida discrepância entre os valores de viabilidade obtidos por MTS e por marcação com Anexina V-FITC e IP, recorreu-se à quantificação da actividade das caspases efectoras-3 e -7, de forma a confirmar o papel da apoptose como mecanismo de acção do complexo. O ensaio baseia-se na existência de um substracto pró-fluorescente de rodamina 110 (Z-DEVD-R110) que, na presença de caspases-3 e/ou -7 activas, é clivado (Figura 3.9) (Apo-One® Homogeneous Caspase-3/7 Assay, TB295, Promega 2009). O produto da clivagem é quantificado através da emissão de fluorescência verde. Existe assim uma proporcionalidade entre a quantidade de fluorescência emitida e a actividade das caspases-3 e -7 (Apo-One® Homogeneous Caspase-3/7 Assay, TB295, Promega 2009).

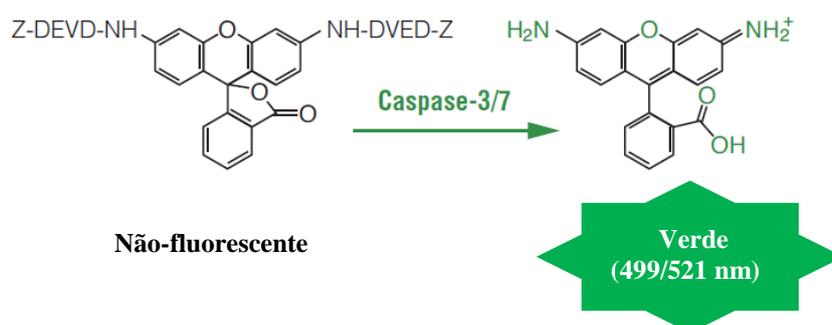


Figura 3.9 – Clivagem do substracto pró-fluorescente Z-DEVD-R110 pela activação das caspases-3/7, resultando na emissão de fluorescência verde correspondente à rodamina 110 (Adaptado de Apo-One® Homogeneous Caspase-3/7 Assay, TB295, Promega 2009).

A actividade das caspases-3/7 foi avaliada em células da linha tumoral HCT116, com uma exposição de 48 horas a concentrações crescentes (25, 35 e 45 μM) do complexo JL130F1. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3.10.

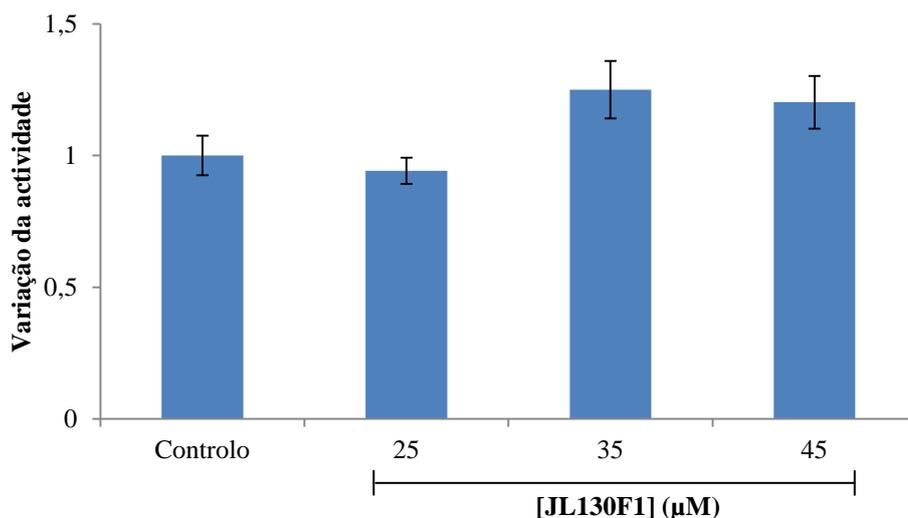


Figura 3.10 – Variação da actividade das caspases-3/7 em relação ao controlo (contendo 0,2 % (v/v) de DMSO), na linha celular tumoral HCT116, após exposição às concentrações de 25, 35 e 45 μM do complexo JL130F1, por um período de 48 horas.

O valor máximo de variação, obtido para a concentração de 35 μM, é de apenas 1,25 vezes, revelando aparentemente a ausência da indução do processo apoptótico em um número significativo de células. Este valor de actividade da caspase-3 pode ser justificado pelo extenso período de tempo (48 horas) em que o ensaio é realizado, uma vez que a caspase-3 na sua forma inactiva revela um tempo de vida de cerca de quatro horas (Hua *et al.*, 2005).

Zhang e colaboradores (2011) avaliaram a indução da actividade das caspases-3/7 pela cisplatina numa concentração de 10 μM na linha tumoral HCT116 após uma exposição de 48 horas. Verificaram que a actividade das caspases-3/7 aumenta ligeiramente, registando-se uma variação de aproximadamente 1,5 vezes relativamente ao controlo. Este ligeiro aumento da actividade de ambas as caspases efectoras foi confirmado por Zhang e colaboradores (2011), em ensaios de expressão por *Western Blot*, e aparenta ser consistente com a baixa proporção de apoptose registada.

Os resultados obtidos para o complexo JL130F1 apresentam-se então consistentes com aqueles obtidos por Zhang e colaboradores (2011) para a cisplatina, na mesma linha tumoral HCT116, na medida em que a variação da actividade das caspases efectoras-3 e -7, não é muito significativa. Estes resultados indiciam que o complexo JL130F1 apresenta menor capacidade de indução de apoptose que a cisplatina, sendo consistentes com a baixa percentagem de células apoptóticas contabilizadas através do ensaio de marcação com anexina V-FITC e IP (ponto 3.2.2).

3.2.4. Expressão de Genes Envolvidos no Processo de Apoptose

A variação da expressão dos genes *CASP3*, *BAX*, *BCL2* e *CDKN1A* que codificam, respectivamente, para as proteínas caspase-3, Bax, Bcl-2 e p21, envolvidas no processo de apoptose,

foi avaliada a fim de tentar esclarecer a indicação de que a apoptose é um dos mecanismos subjacentes à capacidade antiproliferativa do complexo JL130F1.

A partir de amostras de cDNA obtidas por transcrição reversa do RNA total extraído de células da linha tumoral HCT116 incubadas durante 48h na presença de 35 μ M de JL130F1 ou de 0,2 % (v/v) de DMSO (controlo), foram realizadas as reacções de PCR usando *primers* específicos para a amplificação de cada um dos genes referidos. A variação da expressão destes genes foi avaliada por electroforese em gel de agarose dos produtos resultantes das reacções de PCR (Figura 3.11A). A quantificação da variação dessa expressão foi realizada por análise densitométrica, normalizando os valores de expressão dos genes *CASP3*, *BAX*, *BCL2* e *CDKN1A* com a expressão do gene *ACTB*, que codifica para a β -actina (Figura 3.11B).

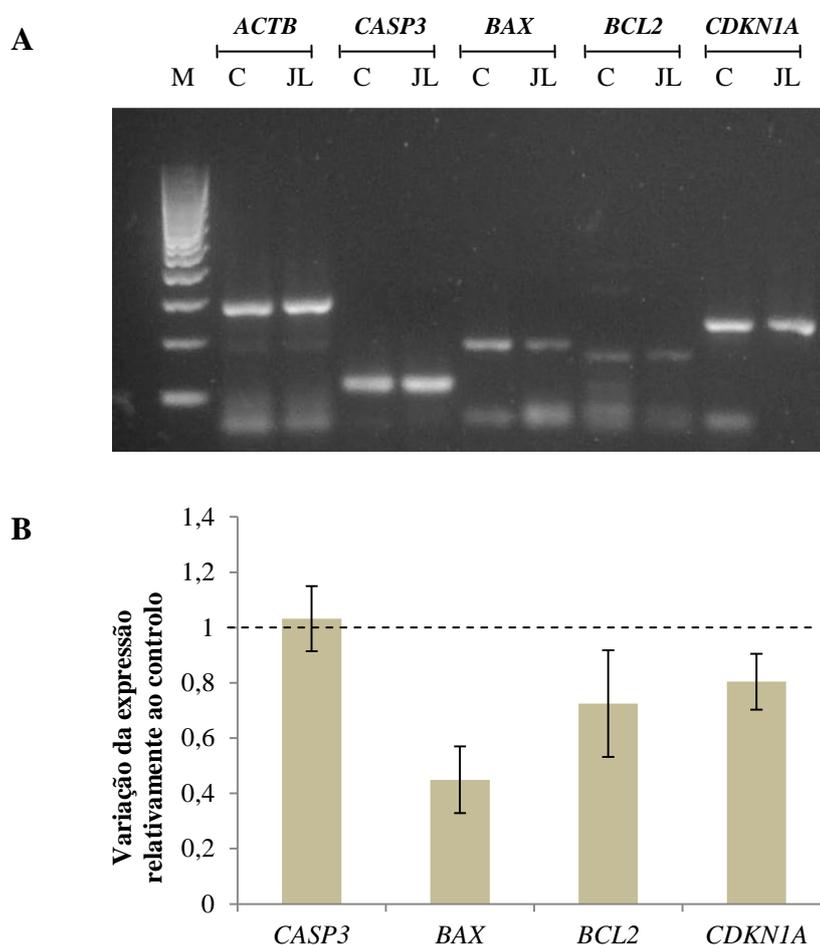


Figura 3.11 – Avaliação da variação da expressão dos genes *CASP3*, *BAX*, *BCL2* e *CDKN1A*, em células HCT116 incubadas com 35 μ M de JL130F1 ou DMSO a 0,2 % (v/v) (controlo), por 48 horas. (A) Gel de agarose a 2 % (p/v) da electroforese dos produtos de PCR obtidos a partir das amostras de cDNA. M – marcador de pesos moleculares *HyperLadder IV*; C – controlo contendo DMSO; JL – complexo JL130F1. (B) Quantificação por densitometria da intensidade das bandas no gel de agarose anterior. Dados relativizados face ao controlo após normalização em relação à expressão do gene *ACTB*.

A intensidade das bandas correspondentes à amplificação do gene de referência *ACTB* (Figura 3.11A), apresenta-se uniforme entre as amostras controlo e tratadas com o complexo JL130F1.

A análise, por densitometria, dos fragmentos obtidos por electroforese em gel de agarose após normalização em relação à expressão do gene *ACTB* e relativização face ao controlo (Figura 3.11B), permite verificar que não existe uma alteração significativa na expressão do gene *CASP3*, que codifica para a caspase-3, um marcador da indução de apoptose (Sagar *et al.*, 2009). No seu estado inactivo a caspase-3 apresenta uma redução da expressão ao longo do tempo, revelando um tempo de vida de aproximadamente quatro horas (Hua *et al.*, 2005). Desta forma, se a apoptose for desencadeada numa fase inicial da incubação com o complexo, e uma vez que a presença de mRNA no citoplasma é transiente, há necessidade da realização de estudos de expressão na dependência do tempo, nomeadamente por períodos de tempo inferiores às 48 horas efectuadas neste ensaio.

Na análise por densitometria dos genes *BAX* e *BCL2*, observou-se uma redução de expressão relativamente ao controlo. Uma razão Bax/Bcl-2 elevada é característica da via intrínseca da apoptose, que se sabe ser induzida pela cisplatina (Jiang *et al.*, 2009; Elmore, 2007). Neste ensaio, o valor desta razão obtido para a amostra tratada é inferior ao observado para o controlo, indicando que no primeiro caso existe um nível de expressão inferior do gene que codifica para a proteína pró-apoptótica Bax e superior para o gene que codifica para a proteína anti-apoptótica Bcl-2.

No que respeita ao gene *CDKN1A* que codifica para a proteína p21, um inibidor da progressão do ciclo celular (Ferrándiz *et al.*, 2012), por análise de densitometria não foi igualmente possível determinar uma variação significativa. Desta forma, uma possível interferência na progressão do ciclo celular por parte do complexo em células HCT116, não parece dever-se à acção de p21.

Contrariamente ao observado para o complexo JL130F1, foi determinada para a cisplatina a capacidade em promover a sobre-expressão do gene *CASP3* (Sagar *et al.*, 2009), bem como do gene *BAX*, conjuntamente com uma sub-expressão do gene *BCL2* (Ikeguchi *et al.*, 2002). Estes dados revelam assim a capacidade deste agente em induzir o processo apoptótico. Além disso, também foi identificada a sua capacidade em aumentar a expressão do gene *CDKN1A* (Luo *et al.*, 2010), revelando que a cisplatina leva à inibição do ciclo celular através da acção de p21.

Desta forma, observou-se uma discrepância dos resultados obtidos com esta técnica relativamente aos apresentados anteriormente pela dupla marcação com anexina V-FITC e IP (ponto 3.2.2), na qual se observou, para as células incubadas com 35 μ M de complexo, 32,52 % de células em apoptose. No entanto, tal como referido atrás será necessário fazer uma avaliação do perfil de expressão destes genes ao longo do tempo até às 48 horas, podendo-se então tentar correlacionar com os resultados obtidos por citometria de fluxo. Dado que a tecnologia de PCR em tempo real apresenta uma sensibilidade bastante superior como metodologia de quantificação da expressão, futuramente estes ensaios serão realizados recorrendo a esta tecnologia.

3.3. Interação com o DNA

Na caracterização de novos compostos com propriedades anti-tumorais, é importante a avaliação da sua interação com a molécula de DNA (Ramachandran *et al.*, 2012). O DNA constitui o alvo intracelular mais importante de agentes anti-tumorais de platina, sendo por isso um importante parâmetro a ter em conta no estudo deste tipo de compostos (Bartel *et al.*, 2012; Desoise e Madoulte, 2002, Onoa e Moreno, 2002).

3.3.1. Espectroscopia de Absorção

Os ensaios de espectroscopia de absorção apresentam-se como um dos métodos mais eficazes para a análise da ligação de um composto à molécula de DNA (Gallego *et al.*, 2011; Shahabadi *et al.*, 2011). O modo de ligação de um complexo ao DNA permite inferir sobre o seu mecanismo de acção (Liao *et al.*, 2005). Neste sentido, foram realizadas titulações UV a fim de estudar o modo de ligação do complexo JL130F1 à dupla hélice da molécula de DNA (Figura 3.12).

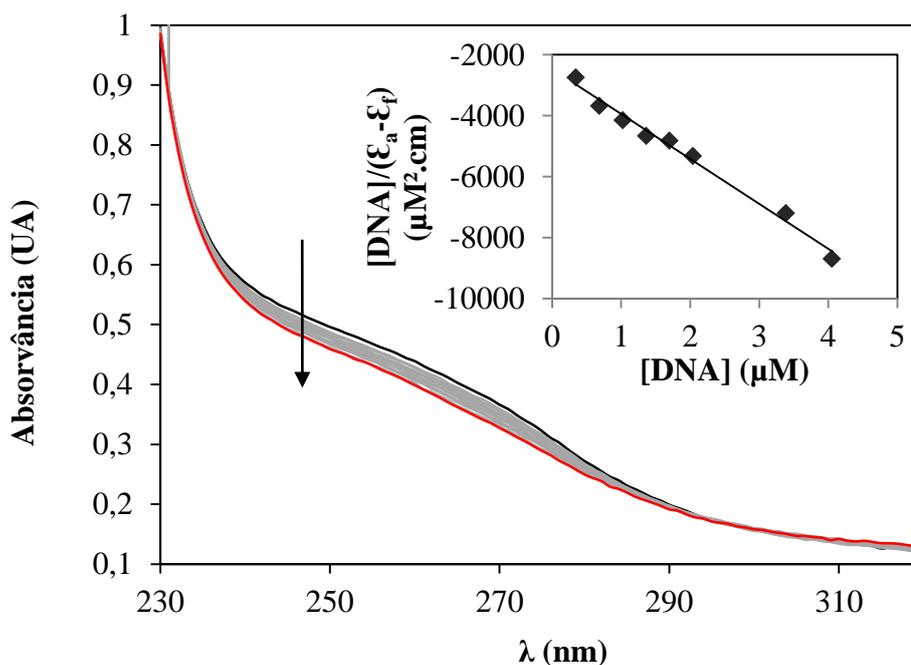


Figura 3.12 – Variação da absorvância do complexo JL130F1 (23,2 μM) na região do UV, na ausência (linha a preto) e na presença de concentrações crescentes de CT-DNA (maior concentração de DNA representada pela linha vermelha), em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7. Encontra-se também representada, no canto superior direito, a regressão linear que permite determinar o valor da constante de afinidade para o DNA (K_b). A seta indica a variação da absorvância com o aumento da concentração de DNA (0 a 22,7 μM).

As titulações efectuadas com a adição de concentrações crescentes de CT-DNA permitiram visualizar uma alteração nos espectros de absorção do complexo, visível aos 265 nm, observando-se assim hipocromismo (decréscimo na absorção molar) e a ausência de desvio batocrómico (mudança do

máximo de absorvância). O hipercromismo e hipocromismo apresentam-se como as alterações espectrais subjacentes a modificações na estrutura da dupla hélice do DNA realizadas pela interação de compostos (Efthimiadou *et al.*, 2010). A presença conjunta de hipocromismo e batocromismo está normalmente associada a um modo de interação por intercalação (Shahabadi *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2003). Com base nesta preposição, e como não foi observado qualquer desvio batocrômico, pode inferir-se que o complexo em estudo não deverá estar envolvido num mecanismo de intercalação.

A variação espectral resultante foi então comparada com a obtida para a DOX. O DNA é o alvo primário da acção desta, sendo que o seu modo de ligação ao DNA pode ocorrer por intercalação e por interacção com o sulco menor (Schonn *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2005; Cashman e Kellogg, 2004; Pratviel *et al.*, 1998). Luís (2011) traçou o espectro para a DOX, na região do UV, em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7, mantendo constante a concentração deste agente e aumentando sucessivamente a concentração de CT-DNA. Nestas condições, observou um efeito hipocrômico e uma ausência de batocromismo, tal como foi verificado para o complexo em estudo, o que é característico de ligação ao sulco, como visualizado por Liao e colaboradores (2005). Desta forma, é possível inferir que um mecanismo subjacente à acção do complexo na molécula de DNA pode dar-se por interacção com o sulco. Uma comparação com a variação espectral da cisplatina através de titulações UV não foi possível, uma vez que os ligandos que a constituem (duas aminas e dois cloros) não têm capacidade de absorver na região do UV (Lu *et al.*, 2007).

O cálculo da constante de afinidade para o DNA (K_b) permitiu determinar a intensidade de ligação do complexo, posteriormente comparada com a da DOX. A constante de ligação foi calculada através da curva $[\text{DNA}] (\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$ representada na Figura 3.12. O valor de K_b obtido para o complexo JL130F1 foi de $6,67 (\pm 0,42) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Por comparação ao valor de K_b para a DOX ($3,48 (\pm 0,04) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, Luís 2011), observa-se que ambas as constantes se encontram dentro da mesma ordem de grandeza, no entanto, o valor absoluto registado para JL130F1 apresenta-se superior ao da DOX, o que indica que o complexo em estudo tem uma afinidade de ligação ao DNA ligeiramente superior à da DOX. Adicionalmente, como referido por Coley e colaboradores (2008) a presença de ligandos heterocíclicos, como os ligandos de oxadiazol presentes no complexo JL130F1, podem, por conseguinte, explicar esta grande afinidade entre o complexo e o DNA.

3.3.2. Ensaio de Retardamento da Mobilidade Electroforética (EMSA)

Através do ensaio de espectroscopia de absorção, havia já a indicação da existência de interacção entre o complexo e a molécula de DNA. Desta forma, através da realização do ensaio de EMSA, tentou-se esclarecer o mecanismo pelo qual o complexo JL130F1 realiza esta interacção. Este ensaio permite a observação de alterações conformacionais da forma superenrolada na molécula de DNA plasmídico (Keck e Lippard, 1992). O DNA plasmídico, por ser uma molécula circular, permite observar a presença de intercalantes que, ao causarem desenrolamento da dupla hélice como

consequência do seu posicionamento entre as bases do DNA, provocam um retardamento na sua migração em gel de agarose (Palchaudhuri e Hergenrother, 2007; Choudhury e Bierbach, 2005). Contrariamente, complexos que estabelecem uma interacção com os sulcos do DNA, normalmente no sulco menor, ajustam a sua estrutura ao sulco menor e seguem a torção da molécula ao longo do eixo central, não desencadeando alterações conformacionais tão acentuadas no DNA (Armitage, 2005; Geierstanger e Wemmer, 1995). O DNA plasmídico apresenta três formas estruturais: a superenrolada (Forma I), a circular relaxada (Forma II) e a linear (Forma III) (Horn, 2005), demonstradas na Figura 3.13.

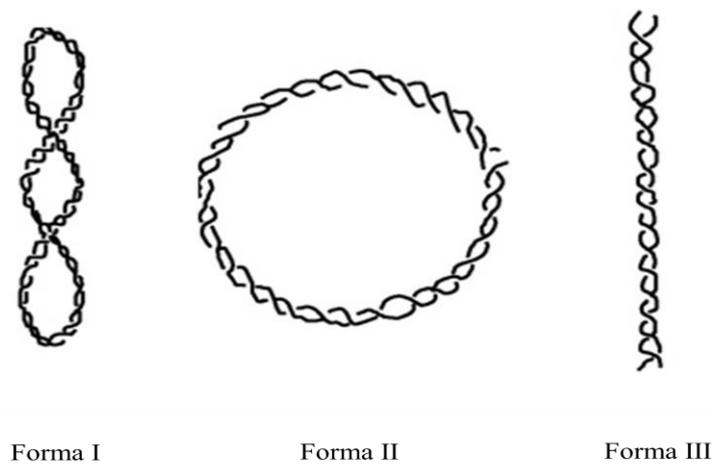


Figura 3.13 – Representação das três formas do DNA plasmídico, Forma I, II e III (Adaptado de Yu *et al.*, 2007).

A avaliação da interacção entre o complexo JL130F1 e o DNA plasmídico pBSKII (2961 pb) foi então realizada por electroforese em gel de agarose concentrado a 0,7 % (p/v), a fim de serem observadas potenciais alterações na mobilidade electroforética da banda correspondente à forma superenrolada do DNA plasmídico. A Figura 3.14 mostra o resultado da incubação do complexo com o DNA plasmídico (pBSKII) em tampão 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,25, por um período de 24 horas. De facto, o complexo parece interagir directamente com a estrutura superenrolada (Forma I) do DNA plasmídico, uma vez que na presença de concentrações crescentes de complexo, a banda correspondente a esta estrutura apresenta uma redução na sua mobilidade electroforética. Este efeito é bem visível a partir da concentração de 150 μ M. Relativamente ao controlo contendo 1,5 % (v/v) de DMSO, não se observa uma alteração na mobilidade electroforética da banda correspondente à forma superenrolada do DNA plasmídico.

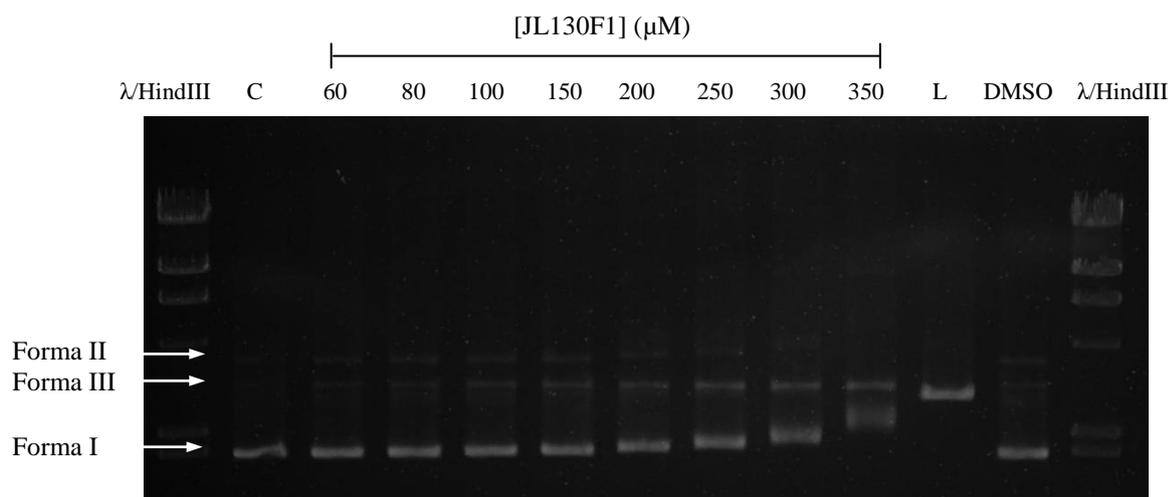


Figura 3.14 – Electroforese em gel de agarose a 0,7 % (p/v) dos produtos resultantes da incubação do complexo JL130F1 em concentrações crescentes (60 a 350 μM) e DNA plasmídico pBSKII. $\lambda\text{HindIII}$ – marcador de pesos moleculares; C – controlo com DNA plasmídico pBSKII; DMSO – controlo com DMSO a 1,5 % (v/v) e sem complexo; L – pBSKII linearizado com HindIII.

Gümüş e colaboradores (2009) visualizaram uma redução na mobilidade electroforética para a banda correspondente à forma superenrolada (Forma I) de pBR322, e um aumento na migração da banda correspondente à forma circular relaxada (Forma II) perante concentrações crescentes de cisplatina. A alteração na migração de ambas as bandas da Forma I (redução) e Forma II (aumento), converge para a coalescência das duas, sendo este ponto de união correspondente à concentração de complexo necessária para o total desenrolamento da estrutura superenrolada do DNA e conversão na forma circular relaxada (Keck e Lippard, 1992). O ponto de coalescência foi atingido para a cisplatina aos 6,25 μM (Gümüş *et al.*, 2009).

A presença de aductos de platina está associada a uma desestabilização da molécula de DNA ao provocar a distorção da mesma, e daqui resulta a capacidade anti-tumoral dos compostos de platina (Natile e Cannito, 2009). Sabe-se que o principal aducto formado pela cisplatina, 1,2 GG intracadeia, tem a capacidade de promover uma torção da hélice de DNA que a direcciona para o sulco maior onde se encontra o átomo de platina que por sua vez leva ao desenrolar local da dupla hélice do DNA (Lenglet e David-Cordonnier, 2010; Stehlikova *et al.*, 2002). De facto, compostos que ao estabelecerem ligação ao DNA, conseguem promover o desenrolamento da sua estrutura superenrolada, induzem retardamento da migração da banda correspondente a esta forma (Keck e Lippard, 1992). Assim, uma vez que este fenómeno foi observado para o complexo JL130F1, pode inferir-se que este poderá induzir a formação de aductos no DNA. Contudo, como um agente intercalante induz o desenrolamento da dupla hélice da molécula de DNA, também este poderá ser um mecanismo subjacente à actividade do complexo JL130F1 sobre o DNA. No entanto, a estrutura do complexo não deverá favorecer este mecanismo.

3.3.3. Digestão com *SmaI* e *DraI*

O efeito citotóxico da cisplatina é grandemente determinado pela sua capacidade em formar lesões na molécula de DNA, com a formação de diferentes tipos de aductos (Boulikas *et al.*, 2007). Após a bioativação da cisplatina, os aductos formados pelo complexo catiónico resultante ocorrem em ambas as purinas: adenina (A) e guanina (G), com preferência para guaninas (Hannon, 2007; Kelland, 2007; Desoize, 2004). Os principais aductos formam-se na mesma cadeia do DNA entre duas bases adjacentes, sendo os mais prevalentes os aductos 1,2 GG (60-65%), seguidos dos aductos 1,2 AG (25%) (Boulikas *et al.*, 2007; Hannon, 2007; Natile e Coluccia, 2001).

A partir da indicação de uma elevada afinidade de ligação do complexo para o DNA (ponto 3.3.1) e da possível formação de aductos pelo complexo em estudo (ponto 3.3.2), e tendo em conta a grande capacidade da cisplatina de estabelecer ligações covalentes com purinas, o objectivo deste ensaio é a análise da afinidade de ligação do complexo JL130F1 para regiões GC's e AT's. Para tal, realizou-se uma digestão enzimática com duas endonucleases, as enzimas *SmaI* e *DraI*. A enzima de restrição *SmaI* apresenta um local de reconhecimento rico em GC's, de sequência de corte 5' CCC|GGG 3', restringindo entre a citosina (C) e a guanina (G) adjacentes (<http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0141.asp>, acedido em Agosto de 2012). A enzima *DraI* tem um local de reconhecimento rico em AT's, com sequência 5' TTT|AAA 3', e local de restrição entre a primeira timina (T) e a adenina (A) adjacente (<http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0129.asp>, acedido em Agosto de 2012).

A Figura 3.15 representa a digestão enzimática do DNA plasmídico pUC18 (2686 pb) na presença do complexo nas razões [complexo]/[DNA] (r) de 0,1 e 0,3, com as duas endonucleases *SmaI* e *DraI*. Na presença do complexo JL130F1 verifica-se que ambas as enzimas de restrição mantêm a sua actividade de endonuclease, como pode ser observado pelo perfil electroforético da Figura 3.15.

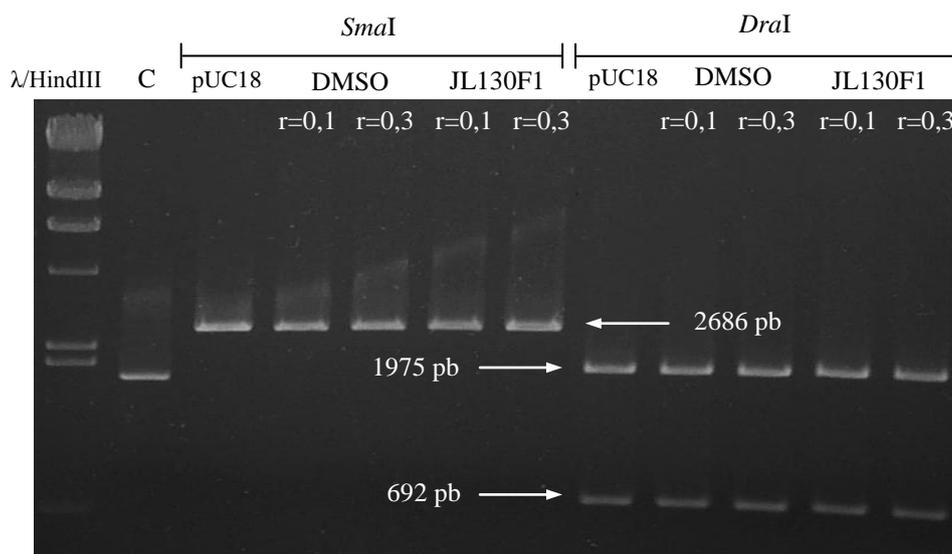


Figura 3.15 – Electroforese em gel de agarose a 0,8 % (p/v) dos produtos da digestão de pUC18 com as enzimas de restrição *SmaI* (um fragmento de 2686 pb) e *DraI* (três fragmentos de 1975, 692 e 19 pb, sendo o último não visível), após tratamento com o complexo JL130F1 nas razões [complexo]/[DNA] (r) de 0,1 e 0,3. λ HindIII – marcador de pesos moleculares; C – DNA plasmídico pUC18; DMSO – solvente do complexo (controle); *SmaI* e *DraI* – enzimas de restrição.

Gümüş e colaboradores (2009) observaram a afinidade da cisplatina para sítios GG ou AA no DNA, recorrendo a um ensaio semelhante em DNA plasmídico pBR322 na presença das endonucleases *BamHI* (5' G|GATCC 3') e *HindIII* (5' A|AGCTT 3') (<http://www.neb.com/nebecomm/products.asp>, acessado em Agosto de 2012). Observaram que a incubação prévia de pBR322 com cisplatina previne a actividade de endonuclease de *BamHI*, de forma dependente da concentração. Este facto deve-se à sua grande afinidade para sítios GG, e desta forma a enzima de restrição já não tem a capacidade de linearizar o DNA plasmídico. Contudo, para *HindIII* observaram que apenas a concentrações elevadas de cisplatina (25 e 50 μ M) ocorria o bloqueio da linearização do DNA plasmídico. Tal vai de encontro ao esperado, uma vez que a cisplatina apresenta preferência para a formação de aductos d(GpG) relativamente a d(ApG).

Assim, uma vez que foi observado que JL130F1, às concentrações testadas, não previne a acção de restrição de *SmaI* e *DraI*, pode ser inferido que o complexo não tem afinidade para os locais de reconhecimento destas duas enzimas, e assim, não sendo possível determinar uma maior afinidade para regiões GC's ou AT's. No entanto, razões superiores de [complexo]/[DNA] deverão ser testadas.

3.3.4. Capacidade de Indução de Aberrações Cromossómicas (Genotoxicidade)

A indução de genotoxicidade por agentes quimioterapêuticos é conhecida como um mecanismo pelo qual estes exibem a sua actividade anti-tumoral, ao inibirem a replicação do DNA e consequentemente o crescimento celular (Aly *et al.*, 2003). A indução de aberrações cromossómicas

por compostos anti-tumorais indica a capacidade destes em promover genotoxicidade (Aly *et al.*, 2003).

Desta forma, a aplicação deste ensaio baseia-se no conhecimento adquirido anteriormente, a partir dos ensaios de espectroscopia de absorção e EMSA (pontos 3.3.1 e 3.3.2, respectivamente), de que o complexo JL130F1 tem capacidade de interagir com o DNA, pelo que este poderá ser um importante alvo celular do complexo. Este ensaio permite então analisar se de facto o complexo interage com o DNA num ambiente celular. Para tal, foi estudada a possível existência de aberrações cromossómicas em células da linha V79 induzidas pelo complexo JL130F1, as quais são correntemente utilizadas nos estudos *in vitro* de avaliação da genotoxicidade (Valentin-Severin *et al.*, 2003). Este estudo foi realizado contra um controlo positivo de Mitomicina C (MMC), um antibiótico com propriedades anti-tumorais, com aplicação clínica em vários tipos de cancro (Sontakke e Fulzele, 2009). A sua actividade anti-tumoral advém da acção sobre a molécula de DNA que, ao formar ligações cruzadas com ambas as cadeias da dupla hélice, induz aberrações cromossómicas (Sontakke e Fulzele, 2009).

Na Figura 3.16, encontram-se representados os diferentes tipos de aberrações cromossómicas analisadas, como resultado do tratamento das células V79 com o complexo JL130F1 nas concentrações de 5, 10 e 20 μM , juntamente com os resultados obtidos para o controlo negativo (DMSO) e o controlo positivo (MMC).

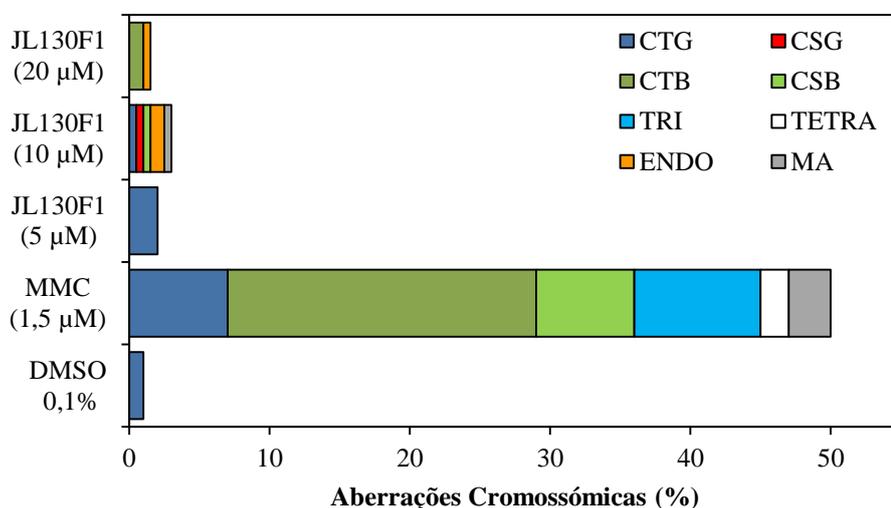


Figura 3.16 – Distribuição percentual dos diferentes tipos de aberrações cromossómicas em células metafásicas de fibroblastos pulmonares de hamster chinês (V79) após tratamento com o complexo JL130F1 nas concentrações de 5, 10 e 20 μM , 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo negativo) e MMC a 1,5 μM (controlo positivo). CTG – *gap* cromatídico; CTB – quebra cromatídica; TRI – rearranjo tri-radial; ENDO – endoreduplicação; CSG – *gap* cromossómico; CSB – quebra cromossómica; TETRA – rearranjo tetra-radial; MA – células multi-aberrantes.

Pela observação da Figura 3.16, pode então ser visualizada a existência de aberrações cromossômicas nas três concentrações de complexo testadas: a 5 μM apresenta CTG (4 %), a 10 μM contém CSB (1 %), MA (1 %), CTG (1 %), CSG (1 %) e ENDO (2 %), e a 20 μM observaram-se ENDO (1 %) e CTB (2 %). Comparativamente aos resultados obtidos para MMC que apresentou valores significativamente superiores de aberrações cromossômicas (CTG (7 %), CTB (22 %), CSB (7 %), TRI (9 %), TETRA (2 %) e MA (3 %)), considerou-se que o complexo JL130F1 não é genotóxico. Adicionalmente, é possível inferir que o controlo com DMSO, apresentando apenas 2 % de CTG, parece também não ter efeito genotóxico sobre as células V79.

Foi ainda avaliada a acção do complexo JL130F1 quanto à sua interferência na proliferação celular, através do Índice Mitótico (IM), ou seja, do número de células em mitose relativamente ao número total de células. Os resultados obtidos, apresentados na Figura 3.17, mostram uma diminuição do IM com o aumento da concentração de complexo. Esta redução pode indicar que o complexo apresenta capacidade de interferir na proliferação celular, como já havia sido discutido no ponto 3.2.2.

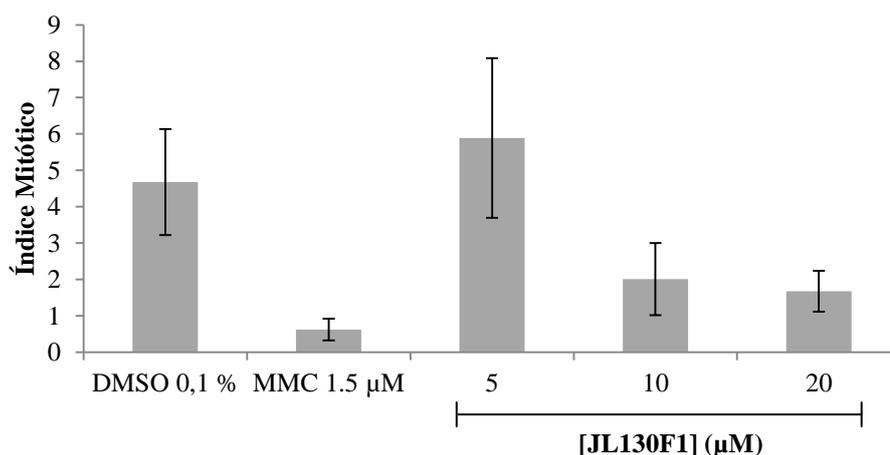


Figura 3.17 – Variação do Índice Mitótico (IM) em células V79 após tratamento com o complexo JL130F1 nas concentrações de 5, 10 e 20 μM , 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo negativo) e MMC a 1,5 μM (controlo positivo).

A redução do IM na presença de MMC é bastante significativa, o que mais uma vez revela a grande genotoxicidade de MMC. Contudo, apesar de ser observada uma redução do IM para as concentrações testadas do complexo, esta não é tão acentuada como a obtida para MMC, confirmando mais uma vez a baixa capacidade genotóxica do complexo JL130F1. Adicionalmente, o DMSO a 0,1 % não se mostra eficaz na redução do IM, indicando que a capacidade do complexo em reduzir o IM é inerente ao próprio e não ao seu solvente.

Uma terapia eficiente baseada em complexos de platina parte do princípio que estes ocupem uma posição intracelular, onde se tornam activos e, desta forma, são posteriormente localizados no núcleo para que por último actuem sobre a molécula de DNA (Jung e Lippard, 2007). Caso este percurso seja de alguma forma impedido, os complexos deixam de conseguir actuar de forma eficaz

(Jung e Lippard, 2007). Por exemplo, o átomo de Pt(II) apresenta ligação preferencial para ligandos contendo enxofre, como a glutatona, metionina, cisteína e histidina (Li *et al.*, 2011; Kostova, 2006; Kostova, 2010). Desta forma, os compostos de Pt(II) podem nunca chegar a alcançar o DNA dada a existência de muitos destes ligandos ao nível celular, que competem pela ligação à platina (Kostova, 2006; Kostova, 2010). De facto, a cisplatina apresenta maior capacidade para interagir com proteínas após a sua internalização nas células (75 a 85 %), enquanto os restantes 5 a 10 %, se ligam à molécula de DNA (Fuertes *et al.*, 2003). O sequestro dos complexos no citoplasma pode justificar a menor capacidade do complexo JL130F1 em interagir com o DNA no núcleo, reduzindo a sua genotoxicidade.

A capacidade de ligação por parte da cisplatina a proteínas está por seu lado envolvida nos problemas de toxicidade associados à utilização deste complexo (Li *et al.*, 2011). Um dos mecanismos de resistência de células tumorais à cisplatina passa pelo aumento dos níveis de glutatona, um tri-peptídeo envolvido em processos de destoxificação, cujo grupo tiol presente no resíduo de cisteína está envolvido na ligação ao complexo (Kartalou e Essigmann, 2001). Assim, esta falta de genotoxicidade por parte do complexo pode então estar associada à capacidade do complexo em interagir com proteínas de uma forma superior relativamente ao DNA.

Mais ainda, conclui-se assim que a forte afinidade de um complexo para o DNA, como determinada através da constante de afinidade (K_b), não é indicador absoluto da citotoxicidade do complexo, sendo sempre essencial a determinação do modo de interacção entre o complexo e a molécula de DNA (Bartel *et al.*, 2012).

3.3.5. Ensaio de Inibição da Actividade de Decatenação da Topoisomerase II

As alterações topológicas na dupla cadeia do DNA, necessárias para processos celulares como a replicação e a transcrição, requerem a introdução de quebras na molécula de DNA, sendo as topoisomerases essenciais para a promoção destas quebras (Nitiss, 2009). A enzima nuclear topoisomerase II apresenta-se de grande importância em células viáveis ao estar envolvida em processos como a replicação, transcrição, recombinação de DNA, condensação e descondensação e segregação dos cromossomas (Thakur, 2011; Nitiss, 2009). A topoisomerase II permite o relaxamento da molécula de DNA, ao induzir uma quebra transiente na dupla cadeia da molécula (Nitiss, 2009; Cantero *et al.*, 2006). Esta actividade pode ser estudada *in vitro* através da sua capacidade de decatenação de moléculas catenadas de DNA plasmídico (Figura 3.18) (Thakur, 2011; Nitiss, 2009; Cantero *et al.*, 2006; Hengstler *et al.*, 2002).

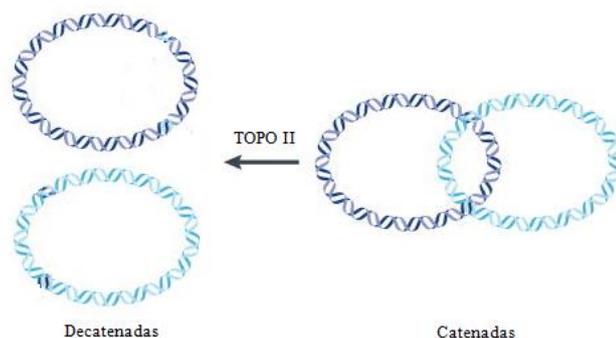


Figura 3.18 – Processo de decatenação de duas moléculas de DNA plasmídico, induzido pela topoisomerase II, através da formação de uma quebra em cadeia dupla numa molécula de DNA, com conseqüente separação das duas moléculas (Adaptada de Nitiss, 2009).

São conhecidos actualmente vários agentes quimioterapêuticos aplicados na prática clínica que interferem na actividade de topoisomerasas, como a DOX e a cisplatina (Thakur, 2011; Cantero *et al.*, 2006).

A maioria dos agentes quimioterapêuticos que têm como alvo a topoisomerase II, incluindo a DOX, origina quebras permanentes no DNA, estabilizando as ligações covalentes do complexo de clivagem DNA-topoisomerase II e impedindo a actividade de ligase da enzima, não ocorrendo uma inibição directa da sua actividade (Thakur, 2011; Nitiss, 2009; McClendon e Osheroff, 2007). Por outro lado, a cisplatina apresenta-se como um inibidor da topoisomerase II, através de dois mecanismos diferentes baseados (i) na sua capacidade de formar vários tipos de aductos na molécula de DNA que impedem a ligação da enzima ao DNA, e (ii) através da reacção com grupos tiol livres dos resíduos de cisteína da topoisomerase II (Cantero *et al.*, 2006; Hasinoff *et al.*, 2005). A cisplatina tem, portanto, a capacidade de inibir a actividade da topoisomerase II de uma forma distinta da DOX, uma vez que não promove a formação de um complexo de clivagem estável DNA-topoisomerase II (Hasinoff *et al.*, 2005).

Tendo em conta a capacidade da cisplatina de inibir a actividade desta enzima, pretendeu-se verificar se o complexo em estudo tem a capacidade de promover tal inibição. O complexo JL130F1, comparativamente ao demonstrado para a DOX (controlo positivo), parece não ter capacidade de inibir a acção de decatenação da enzima topoisomerase II. Tendo em conta o perfil electroforético visualizado na Figura 3.19, o kDNA incubado com o complexo apresenta duas bandas correspondentes a duas moléculas de DNA circular em dupla cadeia após decatenação pela topoisomerase II, indicando que o complexo não interfere na actividade da enzima. É ainda perceptível que o DMSO não tem qualquer acção de inibição da actividade de decatenação da topoisomerase II.

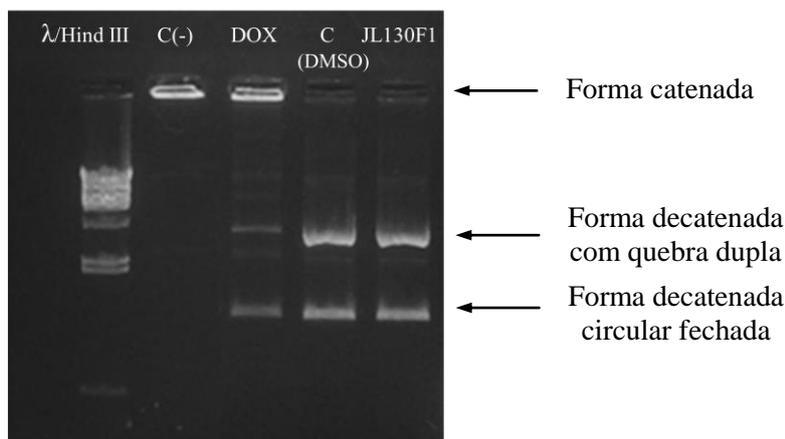


Figura 3.19 – Gel de electrophorese a 1 % (p/v) de agarose demonstrando a capacidade inibitória da actividade de decatenação da topoisomerase II por JL130F1 e DOX. λ /HindIII – marcador de pesos moleculares; C(-) – ausência da topoisomerase II; DOX – DOX na concentração de 1 μ M; C (DMSO) – presença do solvente de JL130F1, DMSO, a 0,5 % (v/v); JL130F1 – complexo em estudo na concentração de 75 μ M.

A implicação da topoisomerase II na segregação dos cromossomas indica que, aquando da inibição da sua actividade, pode ocorrer endoreduplicação (Cantero *et al.*, 2006). A endoreduplicação é identificada pela presença de cromossomas constituídos por quatro cromátídeos (diplocromossomas) em células metafásicas, contrariamente aos dois cromátídeos encontrados numa metáfase normal, alcançados após duas etapas sucessivas de replicação de DNA sem segregação (Cantero *et al.*, 2006). Uma vez que a cisplatina é um inibidor da actividade catalítica da topoisomerase II, este agente apresenta capacidade de promover endoreduplicação (Cantero *et al.*, 2006; Hasinoff *et al.*, 2005).

A identificação da incapacidade do complexo em inibir a actividade de decatenação da topoisomerase II, revela então que os casos de endoreduplicação visualizados no ponto 3.3.4 não se devem a esta inibição.

3.4. Progressão do Ciclo Celular

A possível interferência do complexo JL130F1 na progressão do ciclo celular foi analisada por citometria de fluxo. Esta técnica foi realizada no sentido de esclarecer as diferenças observadas entre os resultados de viabilidade celular (ponto 3.1), a percentagem de morte celular (32,52 % de células em apoptose) obtida através de dupla marcação com anexina V-FITC e IP após exposição das células a 35 μ M do complexo (ponto 3.2.2), e a actividade das caspases efectoras-3 e -7 (ponto 3.2.3), onde foi observada uma reduzida taxa de apoptose induzida pelo complexo. Também a cisplatina demonstrou ser pouco efectiva na indução do processo apoptótico na linha tumoral HCT116, como determinado por Tseng e colaboradores (2012) e Zhang e colaboradores (2011) e discutido anteriormente. Além disso, Zhang e colaboradores (2011) determinaram para a cisplatina a capacidade de induzir a paragem da progressão do ciclo celular em G2/M em células HCT116. Assim, a regulação da progressão do

ciclo celular pode ser um potencial mecanismo pelo qual o complexo JL130F1 promove a sua citotoxicidade.

De modo a testar esta hipótese, foram realizados ensaios de citometria de fluxo em células da linha HCT116 marcadas com IP, após incubação na presença do complexo em estudo ou na presença de DMSO (controlo). Contudo, não houve coerência nos resultados obtidos após a realização de dois ensaios independentes, não sendo possível retirar conclusões pertinentes sobre a capacidade do complexo interferir na paragem da progressão do ciclo celular. Desta forma, a optimização da técnica deve ser prosseguida para posterior aplicação.

4. Conclusão e Perspectivas Futuras

A descoberta do potencial anti-tumoral da cisplatina e a sua aplicação na clínica promoveu a síntese exaustiva de uma série de compostos análogos desta. Contudo, estão associados à cisplatina, assim como aos seus derivados utilizados na prática clínica (carboplatina, oxaliplatina e nedaplatina), problemas de desenvolvimento não só de efeitos secundários severos como também de resistência intrínseca ou adquirida por parte das células tumorais. Desta forma, é de extrema importância a síntese de novos complexos com capacidades melhoradas, isto é, desencadeando menos efeitos tóxicos nas células saudáveis e mantendo um mesmo potencial citotóxico comparativamente à cisplatina. Neste sentido, desenvolveu-se o estudo de compostos de configuração *trans*, tendo sido demonstrado que a actividade anti-tumoral não era exclusiva de compostos de platina de configuração *cis*.

O complexo JL130F1, contendo um átomo de platina e na sua coordenação dois ligandos de oxadiazol e dois cloros em configuração *trans*, revela-se citotóxico para ambas as linhas celulares tumorais testadas HCT116 e HepG2, apresentando valores de IC₅₀ de 22,74 e 22,08 µM, respectivamente, superiores aos determinados para os agentes quimioterapêuticos cisplatina e DOX. Contudo, contrariamente a estes dois agentes anti-tumorais, JL130F1 demonstra-se selectivo, com maior especificidade para as células das linhas tumorais do que para células de duas linhas não-tumorais de fibroblastos e MCF-10A, não revelando uma inibição da proliferação celular em 50 % da população de células para as concentrações testadas. Tal indica que o complexo possui uma actividade dirigida, reduzindo potencialmente a produção de efeitos secundários. A apoptose parece ser um dos mecanismos associados à capacidade antiproliferativa do complexo, tendo-se observado um aumento do número de células apoptóticas de forma dependente da concentração. Não se verificou, no entanto, um aumento de células em necrose. Contudo, a indução de apoptose não foi muito elevada, o que por sua vez foi corroborado por estudos de actividade de caspases efectoras-3 e -7. Estudos de expressão de genes envolvidos no processo apoptótico apresentaram contudo resultados discrepantes aos obtidos para o potencial apoptótico do complexo, impulsionando futuras análises por PCR em tempo real dos genes *BAX*, *BCL2*, *CASP3* e *CDKN1A* ou *Western Blot* para avaliação da expressão das proteínas Bax, Bcl-2, caspase-3 e p21 codificadas por estes genes. Além disso, a marcação dupla permitiu verificar a existência de uma proporção de células viáveis demasiado elevada comparativamente aos resultados obtidos para as mesmas concentrações de complexo através do ensaio de MTS. Esta discrepância sugeriu uma possível interferência do complexo sobre a progressão do ciclo celular. De facto, verificou-se uma diminuição do índice mitótico, em células V79, com o aumento da concentração do complexo. Estes resultados serão posteriormente validados através de uma análise da distribuição das células pelas várias fases do ciclo celular, por citometria de fluxo com marcação com iodeto de propídio.

Estudos *in vitro*, nomeadamente titulações UV e de mobilidade electroforética, revelaram a existência de interacção entre o complexo JL130F1 e o DNA. Verificou-se a presença de

hipocromismo e ausência de batocromismo no espectro de absorção do complexo, com aumento da concentração de CT-DNA em solução. Este resultado é consistente com uma possível acção sobre o DNA por interacção com o sulco. As titulações UV permitiram ainda determinar a constante de afinidade para o DNA, revelando uma elevada capacidade de interacção com o mesmo por parte do complexo. Os ensaios de variação da mobilidade electroforética mostraram um retardamento da migração da forma superenrolada de DNA plasmídico perante concentrações crescentes de JL130F1. Esta variação pode advir da formação de aductos, pelo que o complexo pode ter um mecanismo de acção semelhante ao da cisplatina. Contudo, a ausência de afinidade de JL130F1 para regiões GC's ou AT's, como evidenciado pelo ensaio de restrição com as enzimas *SmaI* e *DraI*, não permite inferir quais as regiões preferenciais para a formação de aductos pelo complexo. Assim, é necessária a aplicação de métodos de detecção de aductos, como o ensaio *Comet* (Bartel *et al.*, 2012), espectrometria de massa (Singh e Farmer, 2006), ou a posterior marcação com ³²P (Stiborová *et al.*, 2011).

Apesar de se ter observado a interacção do complexo com o DNA por exposição directa em solução, ensaios de genotoxicidade em células V79 indicaram que JL130F1 não induz aberrações cromossómicas de forma significativa. Desta forma, o complexo pode actuar sobre outras biomoléculas. A indicação de uma elevada afinidade por parte do átomo de platina para ligandos contendo enxofre (Kostova, 2006; Kostova, 2010), vai ao encontro com uma possível ligação a proteínas pelo complexo JL130F1, nomeadamente a glutatona, que se sabe estar envolvida na resistência de tumores à cisplatina (Kartalou e Essigmann, 2001). Desta forma, a fim de ser confirmada esta hipótese, serão posteriormente realizados estudos de interacção com proteínas para avaliação, por *Western Blot*, dos níveis de glutatona reductase. Serão ainda efectuados ensaios de proteómica, para caracterização de variações na expressão proteica em linhas tumorais expostas ao complexo JL130F1.

5. Referências Bibliográficas

- Ahmad**, S. 2010. Platinum-DNA Interactions and Subsequent Cellular Processes Controlling Sensitivity to Anticancer Platinum Complexes. *Chemistry & Biodiversity* 7: 543-566.
- Alarcon-Vargas**, D. e Ronai, Z. 2002. p53-Mdm2-the affair that never ends. *Carcinogenesis* 23: 541-547.
- Alberto**, M.E., Butera, V. e Russo, N. 2011. Which One among the Pt-Containing Anticancer Drugs More Easily Forms Monoadducts with G and A DNA Bases? A Comparative Study among Oxaliplatin, Nedaplatin, and Carboplatin. *Inorganic Chemistry* 50: 6965-6971.
- Albini**, A. e Sporn, M.B. 2007. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nature Reviews Cancer* 7: 139-147.
- Alonso**, A., Almendral, M.J., Curto, Y., Criado, J.J., Rodríguez, E. e Manzano, J.L. 2006. Determination of the DNA-binding characteristics of ethidium bromide, proflavine, and cisplatin by flow injection analysis: Usefulness in studies on antitumor drugs. *Analytical Biochemistry* 355: 157-164.
- Aly**, M.S., Ashour, M.B., El Nahas, S.M. e Abo Zeid, M.A.F 2003. Genotoxicity and Cytotoxicity of the Anticancer Drugs Gemcitabine and Cisplatin, Separately and in Combination: *in vivo* Studies. *Journal of Biological Sciences* 3: 961-972.
- Amaral**, J.D., Xavier, J.M., Steer, C.J. e Rodrigues C.M. 2010. The Role of p53 in Apoptosis. *Discovery Medicine* 9: 145-152.
- Amaravadi**, R.K. e Thompson, C.B. 2007. The Roles of Therapy-Induced Autophagy and Necrosis in Cancer Treatment. *Clinical Cancer Research* 13: 7271-7279.
- American** Cancer Society 2011. Doxorubicin. Why would this drug be used?. Version 7 November 2011. <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/guidetocancerdrugs/doxorubicin> (Acedido em Janeiro de 2013)
- American** Cancer Society 2012. What are the different types of cancer treatment?. Version 21 May 2012. <http://www.cancer.org/treatment/understandingyourdiagnosis/talkingaboutcancer/whensomeoneyouknowhascancer/when-somebody-you-know-has-cancer-cancer-treatment-questions> (Acedido em Janeiro de 2013)
- Anand**, P., Kunnumakara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B. e Aggarwal, B.B. 2008. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research* 25: 2097-2116.
- Apo-One**® Homogeneous Caspase-3/7 Assay, TB295, Promega 2009.
- Arango**, D., Wilson, A.J., Shi, Q., Corner, G.A., Arañes, M.J., Nicholas, C., Lesser, M., Mariadason, J.M. e Augenlicht, L.H. 2004. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *British Journal of Cancer* 91: 1931-1946.

- Armitage**, B.A. 2005. Cyanine Dye-DNA Interactions: Intercalation, Groove Binding, and Aggregation. *Topics in Current Chemistry* 253: 55-76.
- Arnesano**, F. e Natile, G. 2009. Mechanistic insight into the cellular uptake and processing of cisplatin 30 years after its approval by FDA. *Coordination Chemistry Reviews* 253: 2070-2081.
- ATCC**: The Global Bioresource Center 2012. <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-247&Template=cellBiology> (Acedido em Maio de 2012)
- ATCC**: The Global Bioresource Center 2012. <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HB-8065&Template=cellBiology> (Acedido em Maio de 2012)
- ATCC**: The Global Bioresource Center 2012. <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-10317&Template=cellBiology> (Acedido em Junho de 2012)
- Atkinson**, D. e Akey, C.W. 2010. Apoptosomes and programmed cell death. Version 18 May 2010. <http://www.bumc.bu.edu/phys-biophys/people/faculty/akey/akey-laboratory/projects/apoptosomes/> (Acedido em Agosto de 2012)
- Bartel**, C., Bytzek, A.K., Scaffidi-Domianello, Y.Y., Grabmann, G., Jakupiec, M.A., Hartinger, C.G., Galanski, M. e Keppler, B.K. 2012. Cellular accumulation and DNA interaction studies of cytotoxic *trans*-platinum anticancer compounds. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 17: 465-474.
- Beil**, D.R. e Wein, L.M. 2002. Sequencing surgery, radiotherapy and chemotherapy: insights from a mathematical analysis. *Breast Cancer Research and Treatment* 74: 279-286.
- Bertram**, J.S. 2001. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine* 21: 167-223.
- Berx**, G. e van Roy, F. 2009. Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1: a003129. DOI: 10.1101/cshperspect.a003129
- Borrhalho**, P.M., Kren, B.T., Castro, R.E., Silva, I.B.M., Steer, C.J. e Rodrigues, C.M.P. 2009. MicroRNA-143 reduces viability and increases sensitivity to 5-fluorouracil in HCT116 human colorectal cancer cells. *FEBS Journal* 276: 6689-6700.
- Bouchal**, P., Jarkovsky, J., Hrazdilova, K., Dvorakova, M., Struharova, I., Hernychova, L., Damborsky, J., Sova, P. e Vojtesek, B. 2011. The new platinum-based anticancer agent LA-12 induces retinol binding protein 4 *in vivo*. *Proteome Science* 9:1-9. DOI: 10.1186/1477-5956-9-68
- Boulikas**, T., Pantos, A., Bellis, E. e Christofis, P. 2007. Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. *Cancer Therapy* 5: 537-583.
- Bragado**, P., Armesilla, A., Silva, A. e Porras, A. 2007. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38 α MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis* 12: 1733-1742.
- Brumatti**, G., Sheridan, C. e Martin, S.J. 2008. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods* 44: 235-240.

- Brun, P., Zavan, B., Vindigni, V., Schiavinato, A., Pozzuoli, A., Iacobellis, C. e Abatangelo, G.** 2012. *In vitro* response of osteoarthritic chondrocytes and fibroblast-like synoviocytes to a 500-730 kDa hyaluronan amide derivative. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 00B: 1-9. DOI: 10.1002/jbm.b.32771
- Candelaria, M., Garcia-Arias, A., Cetina, L. e Dueñas-Gonzalez, A.** 2006. Radiosensitizers in cervical cancer. Cisplatin and beyond. *Radiation Oncology* 1: 1-17. DOI: 10.1186/1748-717X-1-15
- Cantero, G., Pastor, N., Mateos, S., Campanella, C. e Cortés, F.** 2006. Cisplatin-induced endoreduplication in CHO cells: DNA damage and inhibition of topoisomerase II. *Mutation Research* 599: 160-166.
- Cao, P., Cai, X., Lu, W., Zhou, F. e Huo, J.** 2011. Growth Inhibition and Induction of Apoptosis in SHG-44 Glioma Cells by Chinese Medicine Formula “Pingliu Keli”. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011: 1-9. DOI: 10.1155/2011/958243
- Cashman, D.J. e Kellogg, G.E.** 2004. A Computational Model for Anthracycline Binding to DNA: Tuning Groove-Binding Intercalators for Specific Sequences. *Journal of Medicinal Chemistry* 47: 1360-1374.
- CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, TB169, Promega** 2009.
- Chabner, B.A. e Roberts, T.G.** 2005. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer* 5: 65-72.
- Chaney, S.G., Campbell, S.L., Bassett, E. e Wu, Y.** 2005. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 53: 3-11.
- Charmier, M.A.J., Haukka, M. e Pombeiro, A.J.L.** 2004. Unprecedented single-pot synthesis of nitrile-derived ketoimino platinum(II) complexes by ring opening of Δ^4 -1,2,4-oxadiazolines. *Dalton Transactions* 17: 2741-2745.
- Chipuk, J.E. e Green, D.R.** 2008. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?. *Trends in Cell Biology* 18: 157-164.
- Choudhury, J.R. e Bierbach, U.** 2005. Characterization of the bisintercalative DNA binding mode of a bifunctional platinum-acridine agent. *Nucleic Acids Research* 33: 5622-5632.
- Coley, H.M., Sarju, J. e Wagner, G.** 2008. Synthesis and Characterization of Platinum(II) Oxadiazoline Complexes and their *In Vitro* Antitumor Activity in Platinum-Sensitive and -Resistant Cancer Cell Lines. *Journal of Medicinal Chemistry* 51: 135-141.
- Coluccia, M. e Natile, G.** 2007. *Trans*-Platinum Complexes in Cancer Therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 7: 111-123.
- Croce, C.M.** 2008. Oncogenes and Cancer. *The New England Journal of Medicine* 358: 502-511.
- Debnath, J., Baehrecke, E.H. e Kroemer, G.** 2005. Does Autophagy Contribute to Cell Death?. *Autophagy* 1: 66-74.
- Denecker, G., Vercaemmen, D., Declercq, W. e Vandenabeele, P.** 2001. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 356-370.

- Desoize, B.** 2004. Metals and Metal Compounds in Cancer Treatment. *Anticancer Research* 24: 1529-1544.
- Desoize, B. e Madoulet, C.** 2002. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42: 317-325.
- Dhar, S. e Lippard, S.J.** 2009. Mitaplatin, a potent fusion of cisplatin and the orphan drug dichloroacetate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 22199-22204.
- Dyson, P.J. e Sava, G.** 2006. Metal-based antitumour drugs in the post genomic era. *Dalton Transactions* 16: 1929-1933.
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N. e Youle, R.J.** 2011. Bcl-x_L Retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145: 104-116.
- Efthimiadou, E.K., Karaliota, A. e Psomas, G.** 2010. Metal complexes of the third-generation quinolone antimicrobial drug sparfloxacin: Structure and biological evaluation. *Journal of Inorganic Biochemistry* 104: 455-466.
- El-Deiry, W.S.** 2003. The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene* 22: 7486-7495.
- Elmore, S.** 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 35: 495-516.
- Fei, P., Bernhard, E.J. e El-Deiry, W.S.** 2002. Tissue-specific Induction of p53 Targets *in Vivo*. *Cancer Research* 62: 7316-7327.
- Fernandes, A.F.R.** 2010. Estudo da Actividade Anti-tumoral de Complexos Organometálicos de Ferro. Relatório de projecto no âmbito de Bolsa Universidade de Lisboa/Fundação Amadeu Dias. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. (http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/3454/1/ulsd_re_Andreia_Fernandes_2009_2010.pdf)
- Ferrándiz, N., Caraballo, J.M., García-Gutierrez, L., Devgan, V., Rodriguez-Paredes, M., Lafita, M.C., Bretones, G., Quintanilla, A., Muñoz-Alonso, M.J., Blanco, R., Reyes, J.C., Agell, N., Delgado, M.D., Dotto, G.P. e León, J.** 2012. p21 as a Transcriptional Co-Repressor of S-phase and Mitotic Control Genes. *PLoS ONE* 7: e37759. DOI: 10.1371/journal.pone.0037759
- Festjens, N., Berghe, T.V. e Vandenabeele, P.** 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757: 1371-1387.
- Fuertes, M.A., Alonso, C. e Pérez, J.M.** 2003. Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance. *Chemical Reviews* 103: 645-662.
- Fulda, S. e Debatin, K.-M.** 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25: 4798-4811.

- Gabano**, E., Colangelo, D., Ghezzi, A.R. e Osella, D. 2008. The influence of temperature on antiproliferative effects, cellular uptake and DNA platination of the clinically employed Pt(II)-drugs. *Journal of Inorganic Biochemistry* 102: 629-635.
- Gallego**, B., Kaluderović, M.R., Kommera, H., Paschke, R., Hey-Hawkins, E., Remmerbach, T.W., Kaluderović, G.N. e Gómez-Ruiz, S. 2011. Cytotoxicity, apoptosis and study of the DNA-binding properties of bi- and tetranuclear gallium(III) complexes with heterocyclic thiolato ligands. *Investigational New Drugs* 29: 932-944.
- Garrett**, M.D. 2001. Cell cycle control and cancer. *Current Science* 81: 515-522.
- Gasser**, G., Ott, I. e Metzler-Nolte, N. 2011. Organometallic Anticancer Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* 54: 3-25.
- Geierstanger**, B.H. e Wemmer, D.E. 1995. Complexes of the Minor Groove of DNA. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 24: 463-493.
- Ghobrial**, I.M., Witzig, T.E. e Adjei A.A. 2005. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 55:178-194.
- GLOBOCAN**: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 2008. <http://globocan.iarc.fr> (Acedido em Junho de 2012).
- Golstein**, P. e Kroemer, G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *TRENDS in Biochemical Sciences* 32: 37-43.
- Gómez-Ruiz**, S., Maksimović-Ivanić, D., Mijatović, S. e Kaluderović, G.N. 2012. On the Discovery, Biological Effects, and Use of Cisplatin and Metallocenes in Anticancer Chemotherapy. *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2012: 1-14. DOI: 10.1155/2012/140284
- Gonzalez**, V.M., Fuertes, M.A., Alonso, C. e Perez, J.M. 2001. Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis?. *Molecular Pharmacology* 59: 657-663.
- Gordon**, R.R. e Nelson, P.S. 2012. Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance. *Drug Resistance Updates* 15: 123-131.
- Grivennikov**, S.I., Greten, F.R. e Karin, M. 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 140: 883-899.
- Gümüş**, F., Eren, G., Açık, L., Çelebi, A., Öztürk, F., Yılmaz, S., Sağkan, R.I., Gür, S., Özkul, A., Elmali, A. e Elerman, Y. 2009. Synthesis, Cytotoxicity, and DNA Interactions of New Cisplatin Analogues Containing Substituted Benzimidazole Ligands. *Journal of Medicinal Chemistry* 52: 1345-1357.
- Hanahan**, D. e Weinberg, R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hanahan**, D. e Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144: 646-674.
- Hannon**, M.J. 2007. Metal-based anticancer drugs: From a past anchored in platinum chemistry to a post-genomic future of diverse chemistry and biology. *Pure and Applied Chemistry* 79: 2243-2261.
- Hasinoff**, B.B., Wu, X., Krokhnin, O.V., Ens, W., Standing, K.G., Nitiss J.L., Sivaram, T., Giorgianni, A., Yang, S., Jiang, Y. e Yalowich, J.C. 2005. Biochemical and Proteomics Approaches to

Characterize Topoisomerase II α Cysteines and DNA as Targets Responsible for Cisplatin-Induced Inhibition of Topoisomerase II α . *Molecular Pharmacology* 67: 937-947.

Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B. e Sharma, R.A. 2008. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 8: 193-204.

Hengstler, J.G., Heimerdinger, C.K., Schiffer, I.B., Gebhard, S., Sagemüller, J., Tanner, B., Bolt, H.M. e Oesch, F. 2002. Dietary topoisomerase II-poisons: contribution of soy products to infant leukemia?. *EXCLI Journal* 1: 8-14.

Ho, T.-F., Ma, C.-J., Lu, C.-H., Tsai, Y.-T., Wei, Y.-H., Chang, J.-S., Lai, J.-K., Cheuh, P.-J., Yeh, C.-T., Tang, P.-C., Chang, J.T., Ko, J.-L., Liu, F.-S., Yen, H.E. e Chang, C.-C. 2007. Undecylprodigiosin selectively induces apoptosis in human breast carcinoma cells independent of p53. *Toxicology and Applied Pharmacology* 225: 318-328.

Hochster, H., Chachoua, A., Speyer, J., Escalon, J., Zeleniuch-Jacquotte, A. e Muggia, F. 2003. Oxaliplatin With Weekly Bolus Fluorouracil and Low-Dose Leucovorin as First-Line Therapy for Patients With Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 21: 2703-2707.

Hoechst Stains, MP21486, Invitrogen 2005.

Horn, A., Vencato, I., Bortoluzzi, A.J., Hörner, R., Silva, R.A.N., Spoganicz, B., Drago, V., Terenzi, H., Oliveira, M.C.B., Werner, R., Haase, W. e Neves, A. 2005. Synthesis, crystal structure and properties of dinuclear iron(III) complexes containing terminally coordinated phenolate/H₂O/OH⁻ groups as models for purple acid phosphatases: efficient hydrolytic DNA cleavage. *Inorganica Chimica Acta* 358: 339-351.

Hua, F., Cornejo, M.G., Cardone, M.H., Stokes, C.L. e Lauffenburger, D.A. 2005. Effects of Bcl-2 Levels of Fas Signaling-Induced Caspase-3 Activation: Molecular Genetic Tests of Computational Model Predictions. *The Journal of Immunology* 175: 985-995.

Ikeguchi, M., Nakamura, S. e Kaibara, N. 2002. Quantitative analysis of expression levels of bax, bcl-2, and survivin in cancer cells during cisplatin treatment. *Oncology Reports* 9: 1121-1126.

Jakupec, M.A., Galanski, M., Arion, V.B., Hartinger, C.G. e Keppler, B.K. 2008. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Transactions* 2:183-194.

Jamieson, E.R. e Lippard, S.J. 1999. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chemical Reviews* 99: 2467-2498.

Janar, J., Nugroho, A.E., Wong, C.P., Hirasawa, Y., Kaneda, T., Shirora, O. e Morita, H. 2012. Sabiperones A-F, New Diterpenoids from *Juniperus sabina*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 60: 154-159.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E. e Forman, D. 2011. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61: 69-90.

Jiang, M., Wang, C.-Y., Huang, S., Yang, T. e Doug, Z. 2009. Cisplatin-induced apoptosis in p53-deficient renal cells via the intrinsic mitochondrial pathway. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 296: 983-993.

- Johnstone**, R.W., Ruefli, A.A. e Lowe, S.W. 2002. Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. *Cell* 108: 153-164.
- Jung**, Y. e Lippard, J. 2007. Direct Cellular Responses to Platinum-Induced DNA Damage. *Chemical Reviews* 107: 1387-1407.
- Kartalou**, M. e Essigmann, J.M. 2001. Mechanism of resistance to cisplatin. *Mutation Research* 478: 23-43.
- Keck**, M.V. e Lippard, S.J. 1992. Unwinding of Supercoiled DNA by Platinum-Ethidium and Related Complexes. *Journal of the American Chemical Society* 114: 3386-3390.
- Kelland**, L. 2007. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* 7: 573-584.
- Kelsen**, D.P., Ginsberg, R., Pajak, T.F., Sheahan, D.G., Gunderson, L., Mortimer, J., Estes, N., Haller, D.G., Ajani, J., Kocha, W., Minsky, B.D. e Roth, J.A. 1998. Chemotherapy Followed by Surgery Compared with Surgery Alone for Localized Esophageal Cancer. *The New England Journal of Medicine* 339: 1979-1984.
- Kim**, J.-S., He, L. e Lemasters, J.J. 2003. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304: 463-470.
- Kizek**, R., Adam, V., Hrabeta, J., Eckschlager, T., Smutny, S., Burda, J.V., Frei, E. e Stiborova, M. 2012. Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: Recent advances. *Pharmacology & Therapeutics* 133: 26-39.
- Koshiyama**, M., Kinezaki, M., Uchida, T. e Sumitomo, M. 2005. Chemosensitivity Testing of a Novel Platinum Analog, Nedaplatin (254-S), in Human Gynecological Carcinomas: a Comparison with Cisplatin. *Anticancer Research* 25: 4499-4502.
- Kostova**, I. 2006. Platinum Complexes as Anticancer Agents. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 1: 1-22.
- Kostova**, I. 2010. Platinum-Based Anticancer Agents. *In* *Frontiers in Anti-Cancer Drug Discovery* (Atta-ur-Rahman e M.I. Choudhary eds), 1^a ed., pp 298-339, Benthan Science, USA.
- Kovvali**, G. 2002. Carcinogenesis and cancer prevention: the process and the disease deserve a better understanding. *Journal of Carcinogenesis* 1: 1-2. DOI: 10.1186/1477-3163-1-1
- Kroemer**, G., Galluzzi, L. e Brenner, C. 2007. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Reviews* 87: 99-163.
- Kroemer**, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B. e Melino, G. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation* 16: 3-11.
- Kundu**, J.K. e Surh, Y.-J. 2004. Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF- κ B and AP-1 as potential targets. *Mutation Research* 555: 65-80.

- Lacour, S.,** Hammann, A., Grazide, S., Lagadic-Gossmann, D., Athias, A., Sergent, O., Laurent, G., Gambert, P., Solary, E. e Dimanche-Boitrel, M.-T. 2004. Cisplatin-Induced CD95 Redistribution into Membrane Lipid Rafts of HT29 Human Colon Cancer Cells. *Cancer Research* 64: 3593-3598.
- Lawen, A.** 2003. Apoptosis-an introduction. *BioEssays* 25: 888-896.
- Lenglet, G.** e David-Cordonnier, M.H. 2010. DNA-Destabilizing Agents as an Alternative Approach for Targeting DNA: Mechanisms of Action and Cellular Consequences. *Journal of Nucleic Acids* 2010: 1-17. DOI:10.4061/2010/290935
- Lewin, B.** 2004. *Oncogenes and Cancer. In Genes* (B. Lewin ed), 8^a ed., pp 889-937, Pearson Prentice Hall, Saddle River.
- Li, H.,** Zhao, Y., Phillips, H.I.A., Qi, Y., Lin, T.-Y., Sadler, P.J. e O'Connor, P.B. 2011. Mass Spectrometry Evidence for Cisplatin As a Protein Cross-Linking Reagent. *Analytical Chemistry* 83: 5369-5376.
- Li, J.,** Wood III, W.H., Becker, K.G., Weeraratna, A.T. e Morin, P.J. 2007. Gene expression response to cisplatin treatment in drug-sensitive and drug-resistant ovarian cancer cells. *Oncogene* 26: 2860-2872.
- Li, Y.,** Liu, J. e Li, Q. 2010. Mechanisms by Which the Antitumor Compound Di-*n*-Butyl-Di-(4-Chlorobenzohydroxamato)Tin(IV) Induces Apoptosis and the Mitochondrial-Mediated Signaling Pathway in Human Cancer SGC-7901 Cells. *Molecular Carcinogenesis* 49: 566-581.
- Liao, L.B.,** Zhou, H.Y. e Xiao, X.M. 2005. Spectroscopic and viscosity study of doxorubicin interaction with DNA. *Journal of Molecular Structure* 749: 108-113.
- Lin, Z.P.,** Lee, Y., Lin, F., Belcourt, M.F., Li, P., Cory, J.G., Glazer, P.M. e Sartorelli, A.C. 2011. Reduced Level of Ribonucleotide Reductase R2 Subunits Increases Dependence on Homologous Recombination Repair of Cisplatin-Induced DNA Damage. *Molecular Pharmacology* 80: 1000-1012.
- Liu, J.,** Zhang, H., Chen, C., Deng, H., Lu, T. e Ji, L. 2003. Interaction of macrocyclic copper(II) complexes with calf thymus DNA: effects of the side chains of the ligands on the DNA-binding behaviors. *Dalton Transactions* 1: 114-119.
- Longley, D.B.** e Johnston, P.G. 2005. Molecular mechanisms of drug resistance. *Journal of Pathology* 205: 275-292.
- Lu, Q.-B.,** Kalantari, S. e Wang, C.-R. 2007. Electron Transfer Reaction Mechanism of Cisplatin with DNA at the Molecular Level. *Molecular Pharmaceutics* 4:624-628.
- Luís, D.V.A.** 2011. Caracterização do efeito anti-tumoral de complexos organometálicos contendo 1,10-fenantrolina-5,6-diona. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. (http://run.unl.pt/bitstream/10362/6265/1/Luis_2011.pdf)
- Luo, H.,** Daddysman, M.K., Rankin, G.O., Jiang, B.-H. e Chen, Y.C. 2010. Kaempferol enhances cisplatin's effect on ovarian cancer cells through promoting apoptosis caused by down regulation of cMyc. *Cancer Cell International* 10: 1-9. DOI: 10.1186/1475-2867-10-16

- Luo, J., Solimini, N.L. e Elledge, S.J.** 2009. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell* 136: 823-837.
- Martin, R.M., Leonhardt, H. e Cardoso, M.C.** 2005. DNA Labeling in Living Cells. *Cytometry Part A* 67: 45-52.
- Masters, J.R.W. e Köberle, B.** 2003. Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nature Reviews Cancer* 3: 517-525.
- Matos, M.R.P.N.** 2001. Complexos Metálicos na terapêutica do Cancro. *Sociedade Portuguesa de Química* 85: 61-68.
- McClendon, A.K. e Osheroff, N.** 2007. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutation Research* 623: 83-97.
- McGowan, E.M., Alling, N., Jackson, E.A., Yagoub, D., Haass, N.K., Allen, J.D. e Martinello-Wilks, R.** 2011. Evaluation of Cell Cycle Arrest in Estrogen Responsive MCF-7 Breast Cancer Cells: Pitfalls of the MTS Assay. *PLoS ONE* 6: e20623. DOI: 10.1371/journal.pone.0020623
- Meyers, M., Hwang, A., Wagner, M.W. e Boothman, D.A.** 2004. Role of DNA Mismatch Repair in Apoptotic Responses to Therapeutic Agents. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 44: 249-264.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. e Gianni L.** 2004. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews* 56: 185-229.
- Mondal., S., Bhattacharya, K., Mallick, A., Sangwan, R. e Mandal, C.** 2012. Bak Compensated for Bax in p53-null Cells to Release Cytochrome c for the Initiation of Mitochondrial Signaling during Withanolide D-Induced Apoptosis. *PLoS ONE* 7: e34277. DOI: 10.1371/journal.pone.0034277
- Montero, E.I., Díaz, S., González-Vadillo, A.M., Pérez, J.M., Alonso, C. e Navarro-Ranninger, C.** 1999. Preparation and Characterization of Novel *trans*-[PtCl₂(amine)(isopropylamine)] Compounds: Cytotoxic Activity and Apoptosis Induction in *ras*-Transformed Cells. *Journal of Medicinal Chemistry* 42: 4264-4268.
- Nakano, K. e Vousden, K.H.** 2001. *PUMA*, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Molecular Cell* 7: 683-694.
- NanoDrop** Technical Support Bulletin, T009, NanoDrop Technologies Inc. 2007
- Natile, G. e Cannito, F.** 2009. Platinum Drugs, Nucleotides and DNA: The Role of Interligand Interactions. *In Metal Complex-DNA Interactions* (N. Hadjilias e E. Sletten eds), 1^a ed., pp 135-173, Wiley, Chichester.
- Natile, G. e Coluccia, M.** 2001. Current status of *trans*-platinum compounds in cancer therapy. *Coordination Chemistry Reviews* 216: 383-410.
- New England BioLabs.** <http://www.neb.com/nebecomm/products.asp> (Acedido em Agosto de 2012)
- New England BioLabs.** <http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0129.asp> (Acedido em Agosto de 2012)

- New England BioLabs.** <http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0141.asp> (Acedido em Agosto de 2012)
- NIH,** National Cancer Institute 2012. Cancer Chemotherapy. Version 10 August 2012. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/cancerchemotherapy.html> (Acedido em Julho de 2012).
- Nitiss, J.L.** 2009. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Reviews Cancer* 9: 327-337.
- O'Toole, S.A., Sheppard, B.L., McGuinness, E.P.J., Gleeson, N.C., Yoneda, M. e Bonnar, J.** 2003. The MTS assay as an indicator of chemosensitivity/resistance in malignant gynaecological tumours. *Cancer Detection and Prevention* 27: 47-54.
- Onoa, G.B. e Moreno, V.** 2002. Study of the modifications caused by cisplatin, transplatin, and Pd(II) and Pt(II) mepirizole derivatives on pBR322 DNA by atomic force microscopy. *International Journal of Pharmaceutics* 245: 55-65.
- Orvig, C. e Abrams, M.J.** 1999. Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction. *Chemical Reviews* 99: 2201-2203.
- Palchaudhuri, R. e Hergenrother** 2007. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 497-503.
- Pec, M.K., Aguirre, A., Moser-Thier, K., Fernández, J.J., Souto, M.L., Dorta, J., Díaz-González, F. e Villar, J.** 2003. Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothysiferol. *Biochemical Pharmacology* 65: 1451-1461.
- Pietsch, E.C., Perchiniak, E., Canutescu, A.A., Wang, G., Dunbrack, R.L. e Murphy, M.E.** 2008. Oligomerization of BAK by p53 Utilizes Conserved Residues of the p53 DNA Binding Domain. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 21294-21304.
- Pratviel, G., Bernadou, J. e Meunier, B.** 1998. DNA and RNA Cleavage by Metal Complexes. *Advances in Inorganic Chemistry* 45: 251-262.
- Rafique, S., Idrees, M., Nasim, A., Akbar, H. e Athar, A.** 2010. Transition metal complexes as potential therapeutic agents. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews.* 5: 38-45.
- Ramachandran, E., Raja, D.S., Bhuvanesh, N.S.P. e Natarajan, K.** 2012. Mixed ligand palladium(II) complexes of 6-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde 4*N*-substituted thiosemicarbazones with triphenylphosphine co-ligand: Synthesis, crystal structure and biological properties. *Dalton Transactions.* DOI: 10.1039/c2dt31079a
- Ray, S., Bucur, O. e Almasan, A.** 2005. Sensitization of prostate carcinoma cells to Apo2L/TRAIL by a Bcl-2 family protein inhibitor. *Apoptosis* 10:1411-1418.
- Robbins, S.L., Kumar, V. e Cotran, R.S.** 2003. Robbins Basic Pathology (SL. Robbins, V. Kumar e R.S. Cotran eds), 7^a ed., pp 165-210, Saunders, Philadelphia.
- Rosenberg, B., Van Camp, L. e Krigas, T.** 1965. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* 205: 698-699.

Sabbadini, P.S., Assis, M.C., Trost, E., Gomes, D.L.R., Moreira, L.O., Santos, C.S., Pereira, G.A., Nagao, P.E., Azevedo, V.A.C., Júnior, R.H., Santos, A.L.S., Tauch, A. e Mattos-Guaraldi, A.L. 2012. *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in HEp-2 cells. *Microbial Pathogenesis* 52: 165-176.

Saelens, X., Festjens, N., Walle, L.V., van Gurp, M., van Loo, G. e Vandenabeele, P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23: 2861-2874.

Sagar, J., Sales, K., Dijk, S., Taanman, J., Seifalian, A. e Winslet, M. 2009. Does Doxycycline work in synergy with cisplatin and oxaliplatin in colorectal cancer?. *World Journal of Surgical Oncology* 7: 1-8. DOI: 10.1186/1477-7819-7-2

Sawai, H. e Domae, N. 2011. Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 411: 569-573.

Schmitz, I., Kirchhoff, S. e Krammer, P.H. 2000. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32: 1123-1136.

Schonn, I., Hennesen, J. e Dartsch, D.C. 2011. Ku70 and Rad51 vary in their importance for the repair of doxorubicin-versus etoposide-induced DNA damage. *Apoptosis* 16: 359-369.

Schweyer, S., Soruri, A., Meschter, O., Heintze, A., Zschunke, F., Miosge, N., Thelen, P., Schlott, T., Radzun, H.J. e Fayyazi, A. 2004. Cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines depends on MEK/ERK activation. *British Journal of Cancer* 91: 589-598.

Shahabadi, N., Mohammadi, S. e Alizadeh, R. 2011. DNA Interaction Studies of a New Platinum(II) Complex Containing Different Aromatic Dinitrogen Ligands. *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2011: 1-8. DOI:10.1155/2011/429241

Shi, Y. 2002. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Molecular Cell* 9: 459-470.

Siddik, Z.H. 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22: 7265-7279.

Singh, R. e Farmer, P.B. 2006. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection. *Carcinogenesis* 27: 178-196.

Slee, E.A., O'Connor, D.J. e Lu, X. 2004. To die or not to die: how does p53 decide?. *Oncogene* 23: 2809-2818.

Smith, P.J., Wiltshire, M., Davies, S., Patterson, L.H. e Hoy, T. 1999. A novel cell permeant and far red-fluorescing DNA probe, DRAQ5, for blood cell discrimination by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 229: 131-139.

Sohn, W.J., Lee, J.W. e Park, D.-G. 2010. Change in Expression of Survivin Caused by Using Oxaliplatin in HCT116 Colon Cancer Cells. *Journal of the Korean Society of Coloproctology* 26: 246-253.

- Sontakke**, Y.A. e Fulzele, R.R. 2009. Cytogenetic study on genotoxicity of antitumor-antibiotic Mitomycin C. *Biomedical Research* 20: 40-44.
- Sousa**, F.G. 2012. Efeito citotóxico do Olaparib em células de câncer colorretal: Estudo da influência de defeitos genéticos. Tese de Doutorado. Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/49268/000827943.pdf?sequence=1>)
- Speidel**, D. 2010. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends in Cell Biology* 20: 14-24.
- Stehlikova**, K., Kostrhunova, H., Kasparikova, J. e Brabec, V. 2002. DNA bending and unwinding due to the major 1,2-GG intrastrand cross-link formed by antitumor *cis*-diamminedichloroplatinum(II) are flanking-base independent. *Nucleic Acids Research* 30: 2894-2898.
- Stiborova**, M., Poljakova, J., Eckschlager, T., Kizek, R. e Frei E. 2012. Analysis of covalent ellipticine- and doxorubicin-derived adducts in DNA of neuroblastoma cells by the ³²P-postlabeling technique. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký Olomouc Czechoslovakia Republic* 156: 115-121.
- Stiborová**, M., Poljaková, J., Martínková, E., Bořek-Dohalská, L., Eckschlager, T., Kizek, R. e Frei, E. 2011. Ellipticine cytotoxicity to cancer cell lines – a comparative study. *Interdisciplinary Toxicology* 4: 98-105.
- SV Total RNA Isolation System Kit**, TM048, Promega 2009.
- Swift**, L.P., Rephaeli, A., Nudelman, A., Phillips, D.R. e Cutts, S.M. 2006. Doxorubicin-DNA Adducts Induce a Non-Topoisomerase II-Mediated Form of Cell Death. *Cancer Research* 66: 4863-4871.
- Tapia**, M.A., González-Navarrete, I., Dalmases, A., Bosch, M., Rodríguez-Fanjul, V., Rolfe, M., Ross, J.S., Mezquita, J., Mezquita, C., Bachs, O., Gascón, P., Rojo, F., Perona, R., Rovira, A. e Albanell, J. 2007. Inhibition of the Canonical IKK/NFκB Pathway Sensitizes Human Cancer Cells to Doxorubicin. *Cell Cycle* 6: 2284-2292.
- Taylor**, R.C., Cullen, S.P. e Martin, S.J. 2007. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 231-241.
- Teixeira**, A.L.P. 2008. Epidemiologia Molecular e Farmacogenómica do Cancro da Próstata: Estudo de Polimorfismos Funcionais nos Genes *EGF* e *TGFBI* na Susceptibilidade, Agressividade e Desenvolvimento de Androgénio-Independência. Tese de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto. (<http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/9157/2/DissertaoMestradoOncologiaAnaLusaPereiraTeixeiraPorto2008.pdf>)
- Thakur**, D.S. 2011. Topoisomerase II Inhibitors in Cancer Treatment. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* 3: 1173-1181.

- Tseng, H.-H., Chuah, Q.-Y., Yang, P.-M., Chen, C.-T., Chao, J.-C., Lin, M.-D. e Chiu, S.-J.** 2012. Securin Enhances the Anti-Cancer Effects of 6-Methoxy-3-(3',4',5'-Trimethoxy-Benzoyl)-1H-Indole (BPR0L075) in Human Colorectal Cancer Cells. *PLoS ONE* 7: e36006. DOI: 10.1371/journal.pone.0036006
- Valentin-Severin, I., Hegarat, L.L., Lhuguenot, J.-C., Le Bon, A.-M. e Chagnon, M.-C.** 2003. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutation Research* 536: 79-90.
- Vousden, K.H. e Lu, X.** 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer* 2: 594-604.
- Vousden, K.H. e Prives, C.** 2009. Blinded by the light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137: 413-431.
- Walsh, J.S. e Miwa, G.T.** 2011. Bioactivation of Drugs: Risk and Drug Design. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 51: 145-167.
- Wang, D.-L., Qi, F.-H., Xu, H.-L., Inagaki, Y., Orihara, Y., Sekimizu, K., Kokudo, N., Wang, F.-S. e Tang, W.** 2010. Apoptosis-induced activity of compounds screened and characterized from cinobufacini by bioassay-guided isolation. *Molecular Medicine Reports* 3: 717-722.
- Wang, P., Henning, S.M. e Heber, D.** 2010. Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. *PLoS ONE* 5: e10202. DOI: 10.1371/journal.pone.0010202
- WHO, World Health Organization** 2012. Global Health Observatory. Cancer mortality and morbidity. WHO 2012. http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer_text/en/index.html (Acedido em Junho de 2012).
- Wong, E. e Giandomenico, C.M.** 1999. Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs. *Chemical Reviews* 99: 2451-2466.
- Wu, G.S. e Ding, Z.** 2002. Caspase 9 is required for p53-dependent apoptosis and chemosensitivity in a human ovarian cancer cell line. *Oncogene* 21: 1-8.
- Yan, Y., Chun, B.J., Zhong, L.X., Ying, Z., Ya, S. e Ping, L.Z.** 2012. Oxidative Stress and Apoptotic Changes of Rat Cerebral Cortical Neurons Exposed to Cadmium *in Vitro*. *Biomedical and Environmental Sciences* 25: 172-181.
- Yu, S.-B., Geng, J., Zhou, P., Feng, A.-R., Chen, X.-D. e Hu, J.-M.** 2007. Analysis of plasmid DNA damage induced by melanin with capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43: 816-821.
- Zeiss, C.J.** 2003. The Apoptosis-Necrosis Continuum: Insights from Genetically Altered Mice. *Veterinary Pathology* 40: 481-495.
- Zhang, H., Zhang, S., He, H., Zhao, W., Ren, K., Chen, J. e Shao, R.** 2011. RasGAP-derived peptide 38GAP potentiates the cytotoxicity of cisplatin through inhibitions of Akt, ERK and NF- κ B in colon carcinoma HCT116 cells. *Cancer Letters* 308: 62-70.

Zhang, L.-J., Li, Z.-Q., Yang, Y.-P., Li, X.-W. e Ji, J.-F. 2009. Tunicamycin suppresses cisplatin-induced HepG2 cell apoptosis via enhancing p53 protein nuclear export. *Molecular and Cellular Biochemistry* 327: 171-182.

Ziegler, U. e Groscurth, P. 2004. Morphological Features of Cell Death. *Physiology* 19: 124-128.

Anexo

Anexo I – Poster intitulado de *Characterization of the Antiproliferative Potential and Biological Targets of a New Platinum Complex.*

