



**Ana Rita Martins Lourenço de Oliveira**

Licenciada em Bioquímica

**Complexos Organometálicos: caracterização preliminar  
de compostos de vanádio e de moléculas libertadoras de  
CO como potenciais fármacos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Professora Doutora Teresa Sacadura  
Santos-Silva,

Investigadora Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Professor Doutor Pedro Miguel Ribeiro  
Viana Baptista, Professor associado com  
agregação, FCT/UNL

**Júri:**

**Presidente:** Prof. Doutor Pedro Miguel Calado Simões

**Arguentes:** Prof. Doutor Eurico José da Silva Cabrita



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2015





**Ana Rita Martins Lourenço de Oliveira**

Licenciada em Bioquímica

**Complexos Organometálicos: caracterização preliminar  
de compostos de vanádio e de moléculas libertadoras de  
CO como potenciais fármacos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Professora Doutora Teresa Sacadura  
Santos-Silva,

Investigadora Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Professor Doutor Pedro Miguel Ribeiro  
Viana Baptista, Professor associado com  
agregação, FCT/UNL

**Júri:**

**Presidente:** Prof. Doutor Pedro Miguel Calado Simões

**Arguentes:** Prof. Doutor Eurico José da Silva Cabrita



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2015

iii



**Complexos Organometálicos: caracterização preliminar de compostos de vanádio e de moléculas libertadoras de CO como potenciais fármacos**

Copyright Ana Rita Martins Lourenço de Oliveira, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

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 objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Agradecimentos

O período de tempo que embarcou toda a realização desta dissertação foi desgastante e emocionante... Apesar de ter envolvido momentos difíceis, também me fez crescer!

Primeiro que tudo, um obrigado com muito carinho à FCT, pela oportunidade que me deu de crescer como pessoa e profissional... Foram 6 anos de companheirismo.

Queria começar por agradecer à Professora Doutora Maria João Romão, pela oportunidade maravilhosa, que mais uma vez me concedeu, de realizar a minha tese no seu fantástico laboratório, e poder partilhar da alegria com que nele se vive, e de toda a sabedoria que tem para dar.

À minha orientadora, Doutora Teresa Santos-Silva, a quem mil obrigados não chegariam para agradecer todo o apoio, toda a compreensão e carinho que me deu quando eu mais precisei! Obrigada pela honestidade, pela preocupação e pela dedicação professora... É a melhor orientadora do mundo!

Ao meu co-orientador Professor Doutor Pedro Viana Baptista, e à Professora Doutora Alexandra Fernandes, com quem apesar de ter trabalhado tão pouco, foram o mais compreensíveis e atenciosos que um aluno pode desejar de uma parceria, sempre puxando por mim e incentivando-me a ser o melhor possível em tudo o que faço: muito obrigado, foi um prazer trabalhar convosco!

A todas a pessoas que integram o XTAL, obrigadas pelos bons momentos e pelo apoio, não podendo deixar de mencionar um especial agradecimento ao Hugo e Marino, com quem trabalhei afincadamente... Um gigante obrigado por todo o apoio e paciência! Desejo-vos um futuro brilhante, vocês merecem.

À minha querida Catarina Fernandes, Cátia Silva e Nelly pelo companheirismo infinito, pelo apoio, gargalhadas e momentos passados ao longo deste ano. Obrigada por me terem ajudado a atravessar os momentos difíceis com os quais me fui deparando, e por ouvirem os meus desabafos... Sem vocês, nada disto teria sido o mesmo. Estamos aqui umas para as outras!

Ao João Jesus, um autêntico companheiro de crime, estou-te eternamente agradecida por todo o apoio, paciência, amizade e profissionalismo, foi uma oportunidade fantástica aquela que tive de trabalhar contigo, e partilhar da tua imensa sabedoria. Obrigada por tudo Jonhy!

Não posso deixar de dar ênfase às pessoas mais importantes da minha vida, os meus pais, a minha irmã, e o meu namorado.

Aos meus pais, Cecília e José António, espero que saibam que são os melhores, não há palavras que cheguem para vos descrever. Obrigada por sempre estarem lá, por sempre me apoiarem, mesmo quando não fazem ideia do que estamos a falar, vocês acham que eu sou a melhor e que sempre irei conseguir. Obrigada por mesmo quando vacilo, vocês estarem lá para me amar, perdoar e estender a mão em meu auxílio. Sem vocês, eu nunca teria chegado onde cheguei, nunca seria quem sou, e esta tese não seria de certeza possível.

À minha irmã Fox, que é o meu bem precioso, e sem a qual nada disto valeria sequer a pena. És e vais sempre ser a minha pequena! Preciso e precisarei sempre de ti mana, obrigada por tudo.

Ao meu mais que tudo, Fernando Silva, que mesmo estando tão longe durante este ano letivo inteiro, esteve tão, mas tão perto, que pedir mais era impossível. És o meu porto de abrigo e a minha inspiração, sem ti ia-me abaixo, sem ti nada disto teria sido o foi. Obrigada por seres o meu melhor dos melhores, este nosso esforço irá compensar-nos no futuro!

À minha família em geral, por estar sempre presente e me apoiar tanto, mesmo quando não entendem toda esta ciência! Um especial obrigado à minha prima Inês, a minha referência desde pequena: obrigada por me ajudares a crescer e tornar numa melhor pessoa, és e vais ser sempre o meu "ídolo".

Aos meus grandes amigos, os melhores que alguém podia desejar: Sónia Gonçalves e Inês Diogo, com vocês tudo é tão simples, tudo é tão mais fácil... Não existem palavras para agradecer o suficiente por esta amizade tão maravilhosa que criamos. Obrigada meninas, e que nós sejamos sempre "nós". Alix Young, minha "amora", és a minha alma gémea tosca. Obrigada por seres quem és, e por me fazeres sentir normal! Joana Freitas, Rafaela Canto, Cláudia Correia e Rita Gomes, obrigada por todo o apoio e momentos maravilhosos que passamos ao longo destes últimos anos, vocês são maravilhosas!

Às minhas queridas colegas de casa Mariana Antunes e Rute Pinto, obrigada por estarem sempre lá, e fazerem o meu dia-a-dia um pouco mais feliz!

Aos meus amigos Luís Silva, Hugo Monteiro, João Matos, Rui Horta, Manolo, Marisa Fortuna, Bárbara Carreira, Lucie, Bárbara Rebelo e Marta Faria, por todo o apoio e amizade prestada ao longo do ano. É um prazer ter-vos comigo!

Por fim, um obrigado especial ao meu Plusco! Quer tudo corra bem, quer tudo corra mal, o amor dele é uma constante. Não há melhor companheiro no mundo, que desperte um sorriso maior que aquele que ele sempre desperta em mim.

Um obrigado muito sincero, e muito doce, a todos.



## Resumo

Vários complexos metálicos têm sido explorados visando uma melhoria de atuais tratamentos das mais variadas doenças. Os compostos de vanádio apresentam uma capacidade de mimetizar a ação da insulina, insurgindo-se assim como uma aposta no tratamento da doença *Diabetes mellitus*. O monóxido de carbono (CO), outrora visto como apenas um agente tóxico, atualmente é explorado pelas suas capacidades anti-inflamatórias, tendo-se desenvolvido moléculas libertadoras de CO, os CORMs, de modo a tirar partido dos seus efeitos biológicos.

Com vista a determinar a formação de aductos entre os complexos organometálicos de vanádio e diferentes proteínas e caracterizar o tipo de interação estabelecida recorreu-se à Cristalografia de raios-X. A estrutura cristalográfica do aducto  $VO^{IV}(\text{picolinato})_2$ -tripsina bovina foi obtida a 1,09 Å de resolução, mostrando o complexo  $VO^{IV}(\text{pic})_2$  no centro ativo da enzima, coordenado à cadeia lateral da serina catalítica (Ser195), numa geometria octaédrica. Ensaio cinéticos preliminares realizados com o complexo  $VO(\text{pic})_2$  foram efetuados para determinar potenciais efeitos inibitórios na atividade das enzimas lisozima da clara do ovo (HEWL) e tripsina.

O potencial terapêutico dos CORMs associado à Nanotecnologia foi explorado para o  $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glicinato})]$  (CORM-3), visando desenvolver nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizadas com o composto e diferentes proteínas. A toxicidade celular direta do CORM-3, bem como alguns potenciais efeitos biológicos de CORM-3-albumina de soro humano (BSA) e CORM-3-HEWL foram também avaliados, recorrendo a ensaios de viabilidade celular, riscados celulares, e RT-qPCR em várias linhas celulares tumorais e linha primária de fibroblastos humanos.

Foi possível iniciar o desenvolvimento de nanosistemas de AuNPs@PEG@BSA e AuNPs@PEG@HEWL, seguindo-se futuramente a conjugação com o CORM-3. Não foi possível determinar o efeito anti-inflamatório do CORM-3 e seus conjugados através da análise dos genes de resposta por RT-qPCR em tempo real, no entanto determinou-se que o composto CORM-3 não possui toxicidade em linhas celulares tumorais, e que aparenta fomentar a regeneração celular em fibroblastos e células tumorais NINA, sendo este efeito potenciado aquando conjugação com BSA.

Palavras-chave: Complexos organometálicos de vanádio, Monóxido de carbono, CORMs, desenvolvimento de fármacos, Cristalografia de raios-X, AuNPs/Nanotecnologia.



## Abstract

Several metallic complexes have been studied over the past years, in order to improve the current treatment of multiple diseases. Among them, vanadium compounds are known for their insulin mimetic ability, becoming a reliable alternative for *Diabetes mellitus* treatment. Carbon monoxide (CO), commonly known as a toxic agent, is nowadays exploited as a potential therapeutic agent due to its anti-inflammatory effects, which lead to the development of CO releasing molecules, CORMs, in order to take advantage of CO's biological effects.

X-Ray Crystallography was used to determine the formation of different vanadium–protein adducts and characterize the interaction between them. A  $\text{VO}^{\text{IV}}(\text{ligand})_2$ –trypsin structure was obtained with 1,09 Å resolution using picolinate (pic) as a ligand, where the  $\text{VO}^{\text{IV}}(\text{pic})_2$  complex was shown to be at the active site of the protein, coordinated with the catalytic serine residue (Ser195) of the protein structure, with an octahedral geometry.

Kinetic assays of  $\text{VO}(\text{pic})_2$  were conducted to determine its potential inhibitory effects on Hen Egg with lysozyme (HEWL) and bovine trypsin proteins.

The therapeutic potential of CORMs associated with nanotechnology was explored for  $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})]$  (CORM-3) in order to develop gold nanoparticles (AuNPs) carrying CO and proteins. Cell toxicity of CORM-3, and some of its biological effects in complex with human serum albumin (BSA) and HEWL were studied through cytotoxic assays, scratch assays and RT-qPCR technique, using several cancer cell lines and human fibroblasts cell lines.

Nanovectorisation of  $\text{AuNPs}@ \text{PEG}@ \text{BSA}$  and  $\text{AuNPs}@ \text{PEG}@ \text{HEWL}$  systems were initiated, and vectorization with CORM-3 will follow in the future. Although the anti-inflammatory effects of CORM-3 and CORM-3 complexes with proteins through responsive genes analysis using real time RT-qPCR, were not determined, it was possible to observe the absence of CORM-3's toxicity in cancer cell lines. Furthermore, it appears that CORM-3 provides cell regenerative effects in cancer cell lines NINA and fibroblasts, and its functionalization with BSA improved those effects.

Keywords: Vanadium organometallic complexes, Carbon Monoxide, CORMs, drug design, X-ray Crystallography, AuNPs/Nanotechnology.



## Índice

Agradecimentos.....	vii
Resumo .....	ix
Abstract.....	xi
Índice de Figuras .....	xvii
Índice de Tabelas .....	xxi
Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos.....	xxiii
1 – Introdução.....	1
1.1 – Compostos de vanádio.....	1
1.1.1 – Transporte e absorção intracelular do vanádio.....	2
1.1.2 – A importância biológica do vanádio.....	4
1.1.2.1 – Efeito anti-tumoral.....	4
1.1.2.1.1 – Mecanismos celulares dos efeitos anti-tumorais dos compostos de vanádio.....	5
1.1.2.2 – Efeito anti-parasítico.....	8
1.1.2.3 – Efeito anti-diabético.....	10
1.1.2.3.1 – Diabetes <i>mellitus</i> , a doença.....	10
1.1.2.3.2 – Vanádio vs fosfato: a analogia entre ambos.....	11
1.1.2.3.3 – Mimetização da ação da insulina por parte do vanádio.....	12
1.1.2.3.4 – Estudos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	13
1.1.3 – Compostos de vanádio: ligandos e proteínas em estudo.....	16
1.1.4 – Cristalografia de raios-X.....	18
1.2 – Monóxido de carbono e moléculas libertadoras de monóxido de carbono.....	20
1.2.1 – Monóxido de carbono.....	20
1.2.1.1 – Produção endógena do CO.....	21
1.2.1.2 – Importância biológica e mecanismos de ação do CO.....	22
1.2.1.2.1 – Efeitos anti-bacterianos do CO.....	24
1.2.1.2.2 – Efeitos anti-proliferativos e anti-apoptóticos do CO.....	25

1.2.1.2.3 – Efeitos anti-inflamatórios do CO .....	27
1.2.2 – CORMs: moléculas libertadoras de CO como agentes terapêuticos .....	27
1.2.3 – Nanopartículas como veículos transportadores de CORMs .....	32
1.2.3.1 – Nanomedicina.....	33
1.2.3.2 – Nanopartículas de ouro (AuNPs).....	34
2 – Objetivos.....	39
3 – Materiais e Métodos .....	41
3.1 – Compostos de vanádio.....	41
3.1.1 – Ensaio de cristalização .....	41
3.1.1.1 – Compostos de vanádio com a proteína HEWL .....	41
3.1.1.2 – Compostos de vanádio com a proteína tripsina .....	42
3.1.2 – Ensaio Cinético por Espectroscopia de UV/visível.....	43
3.1.2.1 – Compostos de vanádio com a proteína HEWL .....	43
3.1.2.2 – Compostos de vanádio com a proteína tripsina .....	44
3.2 – CORM-3.....	45
3.2.1 – Síntese, funcionalização e caracterização das AuNPs .....	45
3.2.1.1 – Síntese de AuNPs .....	45
3.2.1.2 – Funcionalização das AuNPs.....	46
3.2.1.2.1 – Funcionalização com PEG: AuNPs@PEG .....	46
3.2.1.2.2 – Funcionalização com proteínas: AuNPs@PEG@BSA e AuNPs@PEG@HEWL.....	47
3.2.1.3 – Caracterização por DLS .....	48
3.2.2 – Culturas das linhas celulares.....	48
3.2.3 – Ensaio de citotoxicidade do CORM-3.....	49
3.2.3.1 – <i>Seeding</i> celular e incubação com CORM-3 .....	49
3.2.3.2 – Ensaio de viabilidade celular por MTS .....	50
3.2.3.3 – Contagem de células pelo método de <i>Trypan Blue</i> .....	50
3.2.4 – Ensaio de regeneração celular: Riscados celulares.....	51

3.2.4.1 –	<i>Seeding</i> celular .....	51
3.2.4.2 –	Riscados celulares.....	51
3.2.5 –	Análise dos níveis de expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias derivadas do efeito do CORM-3, por RT-qPCR em tempo real. ....	52
3.2.5.1 –	<i>Seeding</i> celular e incubação com o CORM-3, proteínas, e conjugados do CORM-3 52	
3.2.5.2 –	Extração de RNA .....	52
3.2.5.3 –	Síntese de cDNA .....	53
3.2.5.4 –	RT-qPCR em tempo real .....	53
3.2.5.5 –	Eletroforese em gel de agarose .....	54
4 –	Resultados e Discussão .....	55
4.1 –	Compostos de vanádio.....	55
4.1.1 –	Ensaio de Cristalização .....	55
4.1.1.1 –	Compostos de vanádio com a proteína HEWL .....	55
4.1.1.2 –	Compostos de vanádio com a proteína tripsina .....	56
4.1.1.3 –	Experiência de difração, resolução e refinamento da estrutura .....	59
4.1.1.3.1 –	V <sup>IV</sup> O(pic) <sub>2</sub> –tripsina.....	59
4.1.2 –	Ensaio Cinéticos .....	65
4.1.2.1 –	Compostos de vanádio com a proteína HEWL .....	65
4.1.2.2 –	Compostos de vanádio com a proteína tripsina. ....	70
4.2 –	CORM-3.....	71
4.2.1 –	Síntese, funcionalização e caracterização das AuNPs .....	72
4.2.2 –	Estudos de citotoxicidade do CORM-3: ensaios de viabilidade celular por MTS .....	77
4.2.3 –	Riscados celulares: ensaios de regeneração celular usando CORM-3 e as proteínas HEWL e BSA.....	81
4.2.4 –	Análise dos níveis de expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias derivadas do efeito do CORM-3 e conjugados, por RT-qPCR em tempo real.....	83
5 –	Conclusões e perspectivas futuras .....	87
6 –	Bibliografia .....	93

7 – Anexos.....	107
Anexo 1.....	107
Anexo 2.....	111
Anexo 3.....	113
Anexo 4.....	117
Anexo 5.....	124



**Índice de Figuras**

Figura 1.1..... 4

Figura 1.2..... 6

Figura 1.3..... 11

Figura 1.4..... 12

Figura 1.5..... 13

Figura 1.6..... 17

Figura 1.7..... 20

Figura 1.8..... 22

Figura 1.9..... 23

Figura 1.10. .... 28

Figura 1.11 ..... 29

Figura 1.1..... 31

Figura 1.13 ..... 36

Figura 4.1..... 55

Figura 4.2..... 57

Figura 4.3..... 64

Figura 4.4..... 65

Figura 4.5..... 67

Figura 4.6..... 68

Figura 4.7..... 69

Figura 4.8..... 70

Figura 4.9..... 70

Figura 4.10 ..... 72

Figura 4.11 ..... 74

Figura 4.12 ..... 74

Figura 4.13 ..... 78

Figura 4.14 .....	80
Figura 4.15 .....	82
Figura 4.16 .....	86
Figura 7.1.....	107
Figura 7.2.....	108
Figura 7.3.....	108
Figura 7.4.....	109
Figura 7.5.....	109
Figura 7.6.....	110
Figura 7.7.....	111
Figura 7.8.....	112
Figura 7.9.....	112
Figura 7.10 .....	113
Figura 7.11 .....	116
Figura 7.12 .....	117
Figura 7.13 .....	118
Figura 7.14 .....	118
Figura 7.15 .....	119
Figura 7.16 .....	119
Figura 7.17 .....	120
Figura 7.18 .....	120
Figura 7.19 .....	121
Figura 7.20 .....	121
Figura 7.21 .....	122
Figura 7.22 .....	122
Figura 7.23 .....	123
Figura 7.24 .....	124

Figura 7.25 .....	125
Figura 7.26 .....	125
Figura 7.27 .....	126
Figura 7.28 .....	127
Figura 7.29 .....	128
Figura 7.30 .....	128



## Índice de Tabelas

Tabela 3.1.....	42
Tabela 3.2.....	53
Tabela 4.1.....	56
Tabela 4.2.....	58
Tabela 4.3.....	59
Tabela 4.4.....	60
Tabela 4.5.....	63
Tabela 4.6.....	75
Tabela 4.7.....	76
Tabela 4.8.....	79
Tabela 4.9.....	85
Tabela 7.1.....	114
Tabela 7.2.....	114
Tabela 7.3.....	124
Tabela 7.4.....	126



## Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

**% (m/V)** – Percentagem massa/volume

**% (V/V)** – Percentagem volume/volume

**3D** – Tridimensional

**AA** – Ácido Ascórbico

**ADME** – Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

**AuNP** – Nanopartícula de ouro

***B.subtilis*** – *Bacillus subtilis*

**BAPNA** – N-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (do inglês *N-Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide*)

**BSA** – Albumina de soro bovino (do inglês *Bovine serum albumin*)

**cAMP** – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (do inglês *Cyclic adenosine monophosphate*)

**CaCl<sub>2</sub>** – Cloreto de cálcio

**CCL3** – Quimiocina motivo C-C ligando 3 (do inglês *Chemokine (C-C motif) ligand 3*)

**CCP4** – *Collaborative Computational Project Number 4*

**cGMP** – Guanosina monofosfato cíclica (do inglês *Cyclic guanosine monophosphate*)

**citB** – Citocalasina B (do inglês *Cytochalasin B*)

**CO** – Monóxido de carbono

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono

**COHb** – Carboxihemoglobina

**COMb** – Carboximioglobina

**Coot** – *Crystallographic Object-Oriented Toolkit*

**CORMs** – Moléculas libertadoras de monóxido de carbono (do inglês *Carbon monoxide releasing molecules*)

**CORM-3** – Cloro tricarbonilo (glicinato) de rutênio (II)

**D.O.** – Densidade ótica

**Da** – Daltons

**DLS** – Dispersão Dinâmica de Luz (do inglês *Dynamic Light Scattering*)

**DM** – *Density Modification*

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)

**DTNB** – Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (do inglês *5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)*)

**EDC** – Carbodimina hidrocloreídrica 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) (do inglês *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride*)

**EPR** – Aumento da permeabilidade e retenção (do inglês *Enhanced permeability and retention*)

**ERK** – Proteína cinase regulada por sinal extracelular (do inglês *Extracellular signal-regulated protein kinase*)

**ESRF** – *European Synchrotron Radiation Facility*

**EtOH** – Etanol

**F<sub>c</sub>** – Fator de Estrutura calculado

**F<sub>o</sub>** – Fator de Estrutura observado

**F<sub>hkl</sub>** – Factor de Estrutura

**Fe<sup>2+</sup>** – Ferro ferroso

**Fe<sup>3+</sup>** – Ferro férrico

**CG** – Cromatografia gasosa

**GSH** – Glutathiona

**H<sub>2</sub>dipic** – Ácido dipicolínico

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogénio

**H<sub>2</sub>S** – Sulfeto de hidrogénio

**HAuCl<sub>4</sub>** – Ácido cloroáurico

**Hb** – Hemoglobina (do inglês *Hemoglobin*)

**HCl** – Ácido clorídrico

**Hdhp** – (1,2-dimetil-3-hidroxi-4-piridinolina)

**HEPES** – (4- (2-hidroxietil) - ácido 1-piperazinoetanosulfónico)

**HEWL** – Lisozima de clara de ovo (do inglês *Hen egg-white lysozyme*)

**HIF1 $\alpha$**  – Fator induzido por hipoxia (do inglês *Hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$* )

**HIV** – Vírus de imunodeficiência humana (do inglês *Human immunodeficiency vírus*)

**HSA** – Albumina de Soro Humano (do inglês *Human serum albumin*)

**HMaltol** – Ácido maltol

**HNO<sub>3</sub>** – Ácido nítrico

**HO** – Oxigenase do Hemo (do inglês *Heme oxygenase*)

**HO-1** – Oxigenase do Hemo-1 (do inglês *Heme oxygenase 1*)

**HO-2** – Oxigenase do Hemo-2 (do inglês *Heme oxygenase 2*)

**HO-3** – Oxigenase do Hemo-3 (do inglês *Heme oxygenase 3*)

**Hpilc** – Ácido picolínico

**I/R** – Isquemia/reperfusão

**IC<sub>50</sub>** – Concentração necessária a administrar de um composto para provocar a diminuição de 50% da viabilidade celular.

**IKB $\alpha$**  – Inibidor do fator nuclear KB (do inglês *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-alpha*)

**IgG** – Imunoglobulina G



**IL** – Interleucina

**IL-1** – Interleucina-1

**IL-1 $\beta$**  – Interleucina-1 $\beta$

**IL-2** – Interleucina-2

**IL-6** – Interleucina-6

**IL-10** – Interleucina-10

**IR** – Recetor de insulina (do inglês *Insulin receptor*)

**IRK** – Cinasas recetoras de insulina (do inglês *Insulin receptor kinase*)

**IRS** – Substrato do recetor de insulina (do inglês *Insulin receptor substrate*)

**JNK** – Proteína cinase NH<sub>2</sub>-terminal c-Jun (do inglês *c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal protein kinase*)

**LLG** – *Log Likelihood Gain*

**LPS** – Lipossacáridos

**LSPR** – Ressonância da plasmónica de superfície localizada (do inglês *Localized surface plasmon resonance*)

**M. tuberculosis** – *Mycobacterium tuberculosis*

**MAD** – Dispersão Anómala Múltipla (do inglês *Multiple Wavelength Anomalous Dispersion*)

**MAPK** – Proteína cinase activada por mitogénios (do inglês *Mitogen-activated protein kinase*)

**MCCs** – Complexos metal carbonilo (do inglês *Metal carbonyl complexes*)

**MES** – Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico

**MgCl<sub>2</sub>** – Cloreto de magnésio

**MIR** – Substituição Isomórfica Múltipla (do inglês *Multiple Isomorphous Replacement*)

**MR** – Substituição Molecular (do inglês *Molecular Replacement*)

**MTS** – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboxi-metoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (do inglês *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium*)

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** – Fosfato de sódio dibásico

**Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>** – Ortovanadato de sódio

**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** – Fosfato de sódio monobásico

**NaCH<sub>3</sub>COO** – Acetato de sódio

**NaCl** – Cloreto de sódio

**NADH** – Dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide*)

**NADPH** – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

**NaVO<sub>3</sub>** – Metavanadato de sódio

**NFKB** – Fator de transcrição nuclear KB (do inglês *Transcription factor nuclear kappa B*)

**NHS** – N-hidroxisulfosuccinimida (do inglês *N-hydroxysulfosuccinimide*)

**NO** – Óxido nítrico

**NP** – Nanopartícula

**O<sub>2</sub>Hb** – Oxihemoglobina

**OH<sup>•</sup>** – Radical hidroxilo

**p38** – p38 MAPK

**PBS** – Tampão fosfato salino

**PDB** – *Protein Data Bank*

**PEG** – Polietilenoglicol

**Pi** – Índice de polidispersão

**PI3K/Atk** – Fosfatidilinositol-3-cinase/proteína cinase B (do inglês *phosphoinositide 3-kinase/ protein kinase B*)

**PKG** – Proteína cinase dependente de cGMP (do inglês *Protein kinase G* ou *cGMP-dependent protein kinase*)

**PMS** – Metassulfato de fenazina (do inglês *Phenazine methosulfate*)

**ppm** – Partes por milhão

**PTK** – Proteína cinase de tirosina (do inglês *Protein tyrosine kinase*)

**PTPases** – Proteínas fosfatases de tirosina (do inglês *Protein-tyrosine phosphatases*)

**RANKL** – Recetor ativador de NFκB (do inglês *Receptor activator of NFκB*)

**RES** – Sistema retículoendotelial (do inglês *Reticulo-endothelial system*)

**RNA** – Ácido ribonucleico (do inglês *Ribonucleic acid*)

**RMSD** – Raiz Quadrada da Variância ou Desvio Padrão (do inglês *Root Mean Square Deviation*)

**ROS** – Espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive oxygen species*)

**RT-qPCR** – Transcrição reversa quantitativa da reação em cadeia de polimerização (do inglês *Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*)

**SAD** – Dispersão Anômala Simples (do inglês *Single Wavelength Anomalous Dispersion*)

**SARS** – Síndrome respiratória aguda grave (do inglês *Severe acute respiratory syndrome*)

**SDS** – Dodecil sulfato de sódio

**sGC** – Guanilato ciclase solúvel (do inglês *Soluble guanylyl cyclase*)

**SOD** – Anião superóxido dismutase (do inglês *Superoxide dismutase*)

**STAT3** – Fator transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (do inglês *Signal transducer and activator of transcription 3*)

**STZ** – Estreptozotocina

**TAE** – Tris-Acetato-EDTA

**TAT** – Tumor-associado a tripsinogénios (do inglês *Tumor-associated trypsinogen*)

**TF** – Transferrina humana (do inglês *human transferrin*)

**TNF- $\alpha$**  – Factor de Necrose Tumoral  $\alpha$  (do inglês *Tumor necrosis factor  $\alpha$* )

**TPP** – Proteínas de tirosina fosforiladas (do inglês *Tyrosine phosphorylated proteins*)

**Tris** – Tris(hidroximetil)aminometano

**V** – Vanádio

**V (III)** – Vanadico (Vanádio no estado de oxidação +3)

**V (IV)** – Vanadilo (Vanádio no estado de oxidação +4)

**V (V)** – Vanadato (Vanádio no estado de oxidação +5)

**V(C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>** – Vanadoceno

**VM** – Coeficiente de Matthews

**VO<sub>2</sub>** – Sulfato de vanadilo

**UV/visível** – Ultra-violeta/Visível



# 1 – Introdução

## 1.1 – Compostos de vanádio

O vanádio (V) é um metal de transição, com número atômico 23 e massa atômica 50,94, naturalmente presente em células de alguns animais e plantas, embora em baixas concentrações. A sua existência remota aos mais simples organismos marinhos, que usam o vanádio para atividade ou função proteica, possuindo sistemas extremamente eficientes e seletivos que dependem de proteínas específicas (como os vanabinos, as haloperoxidasas dependentes de vanádio, e as nitrogenases) para a absorção e transporte intracelular de vanádio, sendo capazes de acumular níveis elevados deste a partir de água do mar. (Orvig et al. 1999; Rehder 2012)

Este metal pode também integrar o organismo humano, uma vez que lhe somos involuntariamente expostos devido ao facto de este se encontrar nos solos, petróleo, água, alguns alimentos, poeiras geradas a partir da atividade metalúrgica, e até na forma gasosa, dissolvido na atmosfera. Deste modo, o vanádio pode integrar o organismo humano quer por inalação, quer pelo trato gastrointestinal, quer através da pele, sendo geralmente armazenado em órgãos específicos, tais como fígado, rins e estrutura óssea. (Evangelou 2002; Costa Pessoa et al. 2015).

O vanádio pode ser encontrado em vários estados de oxidação, que vão desde -3 a +5, característica esta que lhe confere uma grande versatilidade biológica. No entanto, em condições fisiológicas consideradas padrão (tais como uma gama de pH 3-7, atmosfera aeróbica, solução aquosa e temperatura ambiente) os estados redox termicamente e cineticamente mais estáveis são +3 (vanadico, V(III)), +4 (vanadilo, V(IV)) e +5 (vanadato, V(V)), fazendo com que sejam os mais comuns e estudados (Erdmann & Werdan 2000). Ainda assim, devido a uma menor toxicidade, e a uma redução quase imediata do V(V) a V(IV) a pH's fisiológicos, o V (IV) é o mais caracterizado e usado para estudos biológicos e estruturais. (Sakurai et al. 2002)

Esta diversidade de estados de oxidação que o vanádio pode assumir, permite-lhe formar ligações V-O, tal como V-S e V-N, relativamente estáveis, que originam complexos coordenados (considerados quimicamente robustos), e dado que este metal por si só é um composto conformacionalmente muito flexível, vários tipos de coordenações geométricas como tetraédrica, octaédrica, piramidal trigonal, e bipiramidal pentagonal, tornam-se termodinamicamente plausíveis. (Orvig et al. 1999)

Apesar do vanádio não ser um componente comum em enzimas, este é considerado um potencial agente terapêutico, devido ao papel fisiológico que desempenha nas ações anti-tumorais (Evangelou 2002; Papaioannou et al. 2004; Benítez, Guggeri, Tomaz, Pessoa, et al. 2009; Mehtab et al. 2013), anti-parasíticas (Maurya et al. 2010; Gambino 2011; Fernández et al. 2013; Mehtab et al. 2013), anti-diabéticas (dado que mimetiza a ação biológica da insulina) (Thompson & Orvig 2001; Mehtab et al. 2013), e na eficiência da redução de hiperlipidemia e de hipertensão. (Evangelou 2002; Mehtab et al. 2013)

Por outro lado, o vanádio aparenta ser essencial: este encontra-se relacionado com mecanismos dependentes de fosfatases, tais como vias metabólicas associadas às fosfatases e às cinases, bem como ao metabolismo do fosfato no geral, incluindo processos de osteogénese. Deste modo, o papel biológico do vanádio baseia-se essencialmente na semelhança estrutural e química entre o fosfato e o vanádio, bem como na habilidade do V(IV) e V(V) interferirem quer na formação, quer na eliminação, de ROS. (Rehder 2012)

Contudo, foi relatado que, em elevadas concentrações, o vanádio pode apresentar efeitos tóxicos – todavia, estes parecem ser relativamente inócuos quando comparados com a toxicidade de outros metais (Gambino 2011), tornando-o mais apelativo. Devido a estas propriedades, o vanádio tem vindo a ser alvo de estudos ao longo do tempo com vista numa eventual utilização na indústria farmacêutica, nomeadamente aos aspetos estruturais e funcionais das interações entre vanádio–proteínas, de modo a clarificar o papel desempenhado pelo centro metálico nos mecanismos de reação em diversos sistemas biológicos, inibindo ou alterando o comportamento de proteínas.

### **1.1.1 – Transporte e absorção intracelular do vanádio**

De modo a poder desempenhar o seu papel fisiológico, o vanádio (ou os complexos de vanádio), precisam de ser inicialmente transportados e absorvidos para o interior das células.

Nos organismos marinhos como a *Ascidia nigra*, o vanádio (sob a forma de vanadato) absorvido pelas células é armazenado em vacúolos celulares, e depois reduzido a vanadilo, não permitindo que este escape das mesmas. (Kustlin & McLeod 1983; Nechay 1984)

No ser humano, o processo é essencialmente conduzido por proteínas presentes no plasma, nomeadamente pela transferrina de soro humano (TF), a albumina de soro humano (HSA) e imunoglobinas G (IgG) – proteínas contendo ferro, ao qual o vanádio se liga seletivamente (Sabbioni & Marafante 1981; Sabbioni et al. 1996). De vários estudos com o objetivo de compreender o modo como o vanádio é transportado na corrente sanguínea, chegou-se à conclusão que a TF é a principal responsável pelo seu transporte, podendo coordenar-se ao vanádio tanto no seu estado de oxidação V(III), V(IV), como V(V) (Mehtab et al. 2013; Costa Pessoa et al. 2013). Antes de o vanádio ser absorvido pelas células, este pode ser reduzido de vanadato a vanadilo pela glutatona, ou pelo ácido ascórbico (AA) e pelos dinucleótidos de nicotinamida e adenina (NADH), entre outras substâncias redutoras presentes no plasma; ou oxidado de vanadilo a vanadato de novo, por espécies oxidantes tais como  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$  e  $\text{O}_2^{2-}$ . Contudo, geralmente, a absorção do vanádio pelas células ocorre na sua forma solubilizada  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ , uma vez que o vanadilo aquando presente no organismo humano é convertido na sua forma insolúvel  $\text{VO}(\text{OH})_2$ , acabando por ser excretado (Figura 1.1). (Evangelou 2002; Rehder 2012)

Aquando a absorção do vanádio para o interior das células, nomeadamente na administração de compostos de vanádio na forma  $\text{VO}(\text{ligando})_n$ , esta pode ser conduzida de várias maneiras: os ligandos podem dissociar-se do complexo, seguido da oxidação do metal a vanadato na forma solúvel  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ , ocorrendo então a absorção do composto para o interior das células por via de canais de fosfato; outro

possível cenário é a formação de um complexo muito estável que permanece intato, e devido ao facto de ser bastante lipofílico, vai atravessando lentamente a membrana celular por difusão, tal como demonstrado em estudos utilizando eritrócitos (Rehder 2012). Por outro lado, estipula-se ainda que devido à ocorrência de reações de trans-metilação, e de compartimentação celular, seja provável que outros ligandos (para além das proteínas de soro humano), como por exemplo proteínas membranares ou citosólicas (Santos et al. 2014), estejam envolvidos nos efeitos biológicos inerentes aos compostos de vanádio, formando aductos com o mesmo, e promovendo a absorção e o transporte do metal para o interior das células. Para melhor interpretar estes dados, estudos *in vivo* e *in vitro* têm sido levados a cabo. (Fukui et al. 1999; Melchior et al. 1999; Willsky et al. 2011; Mehtab et al. 2013)

Relativamente às proteínas do soro, que transportam o vanádio ao longo da corrente sanguínea, pensa-se que o vanádio ao ser introduzido sob a forma de  $V^{IV}O(\text{ligando})_2$  se possa dissociar do ligando, de modo a que o  $V^{IV}O^{2+}$  se ligue à holo-TF, resultando no complexo  $(V^{IV}O)_2TF$ . Este complexo provavelmente adota a conformação fechada da TF (sendo bastante estável), conformação esta que é necessária para o reconhecimento por parte do recetor de transferrina e conseqüente transporte dos metais até às células, onde será absorvido por endocitose. (Bordbar et al. 2009; Sanna 2010; Jakusch et al. 2011; Willsky et al. 2011; Mehtab et al. 2013; Costa Pessoa et al. 2013)

Dado que proteínas tais como a transferrina desempenham papéis importantes na distribuição e transporte de diversos compostos na corrente sanguínea, estas devem ser tidas em conta aquando a avaliação de interações e/ou especificidades de qualquer tipo de metal estudado como fármaco (Mehtab et al. 2013). Também a coordenação do vanádio com outros tipos de ligandos têm sido testadas, de modo a potenciar a sua ação terapêutica, uma vez confirmado que após a administração de complexos de vanádio com outros ligandos, estes tendem a separar-se do ião metálico, não sendo impedimento para que as proteínas do plasma exerçam a sua função. (Thompson et al. 2009; Jakusch et al. 2010; Sanna et al. 2012)

Torna-se então importante caracterizar e explorar este tipo de interações entre complexos de vanádio coordenados a diferentes ligandos e proteínas, de modo a poder tomar partidos dos seus efeitos terapêuticos.

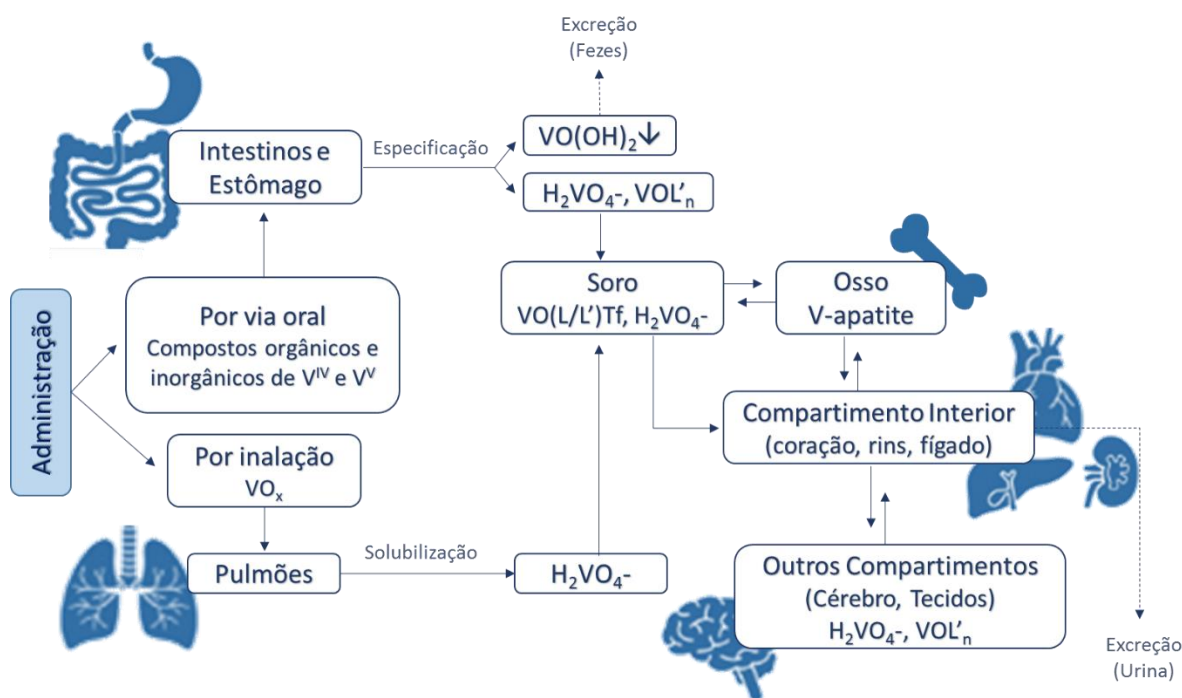


Figura 1.1 – Esquematização das vias e mecanismos de distribuição possíveis para os compostos de vanádio, nomeadamente V(IV) e V(V). As setas representam a administração e o transporte de vanádio, enquanto as setas a tracejado representam a sua excreção; L: qualquer ligando proveniente do organismo que se coordena com o metal, após administração do composto; Tf: proteína transferrina. (Adaptado de (Rehder 2012))

## 1.1.2 – A importância biológica do vanádio

### 1.1.2.1 – Efeito anti-tumoral

Vários complexos de vanádio têm vindo a ser sintetizados, na tentativa de obter novos compostos mais potentes, mais seletivos, e menos tóxicos, para o tratamento de cancro. Para tal, o estado de oxidação do vanádio parece determinar diferenças nos efeitos biológicos a que nos queremos dirigir. Tanto o vanádio sob a forma de vanadato, como de vanadilo, atua como inibidor de proteínas fosfatases de tirosina (PTPs ou PTPases) em muitas células, no entanto, com diferentes mecanismos. (Evangelou 2002)

As propriedades anti-tumorais dos compostos de vanádio, apesar de baseadas em vários efeitos celulares, resultam essencialmente da inibição do ciclo celular, ou da indução da morte de células tumorais mediada pela inibição de PTPases, bem como pela produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), causando danos e provocando efeitos citotóxicos em componentes celulares (Evangelou 2002; Rehder 2012). De acordo com a literatura, o vanádio consegue ainda exercer efeitos inibitórios no potencial metastático das células cancerígenas. Alguns compostos de vanádio interferem com mecanismos de ativação em cascatas de sinalização, levando à apoptose e/ou à ativação de genes supressores tumorais (Djordjevic et al. 1995). Estes fenómenos são possíveis devido à identidade do núcleo de vanádio, natureza dos ligados, e natureza do complexo formado como um todo. (Barrio & Etcheverry 2010)



De um modo mais detalhado, estes compostos exercem efeitos preventivos contra carcinogénese química em animais, maioritariamente através da modificação de várias enzimas xenobióticas (inibindo assim metabolitos derivados de carcinogénese), agindo principalmente na fase I (iniciação), e ligeiramente na fase II (promoção) da carcinogénese. (Evangelou 2002; Mukherjee et al. 2004)

Também os processos de redução do vanadato a vanadilo pela glutatona (Sabbioni et al. 1993), bem como por flavoenzimas dependentes de NADH (NADPH) (Liochev & Fridovich 1990; Shi 1993), parecem induzir a uma grande parte dos efeitos citotóxicos e morfológicos celulares descritos como induzidos pelo vanádio, através da produção de ROS. (Capella et al. 2007; Rehder 2012)

Dentro dos efeitos anti-tumorais exercidos pelo vanádio, grande foco é direcionado aos complexos que este forma com peróxidos. Na presença de peróxidos, o vanádio forma complexos de peróxovanádios, ocorrendo uma alteração do estado oxidativo do V(IV) ou V(V), que culmina na produção de iões superóxidos (Djordjevic et al. 1995). Assim sendo, existe uma relação entre a composição química, o efeito anti-tumoral e a toxicidade dos compostos de peróxovanádios: esta relação encontra-se dependente do tipo de heteroligandos complexados com o vanádio, que pode desempenhar um papel importante na paragem do ciclo celular exercida nas linhas celulares tumorais. (Djordjevic et al. 1995; Morinville et al. 1998)

Ensaio *in vitro*, recorrendo ao vanadato e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) demonstraram um aumento dos efeitos biológicos do metal, em várias linhas celulares, resultados esses atribuídos à formação de peróxovanadatos, onde se verifica uma inibição seletiva e irreversível da atividade das PTPases. (Bevan et al. 1995; Evangelou 2002; Capella et al. 2007)

#### **1.1.2.1.1 – Mecanismos celulares dos efeitos anti-tumorais dos compostos de vanádio**

No geral, um fármaco antineoplásico ideal deve exercer os seguintes efeitos sobre células tumorais: (a) redução da taxa de crescimento celular (efeito anti-proliferativo); (b) efeito citotóxico e/ou ação citostática (expressa sob a forma de necrose ou morte celular programada (apoptose)); (c) redução e/ou inibição do potencial invasivo ou metastático das células, e (d) a potência que induz resistência celular deve ser reduzida ou aniquilada. (Evangelou 2002)

Através de diferentes mecanismos celulares, os compostos de vanádio conseguem preencher todos estes requisitos (Figura 1.2).

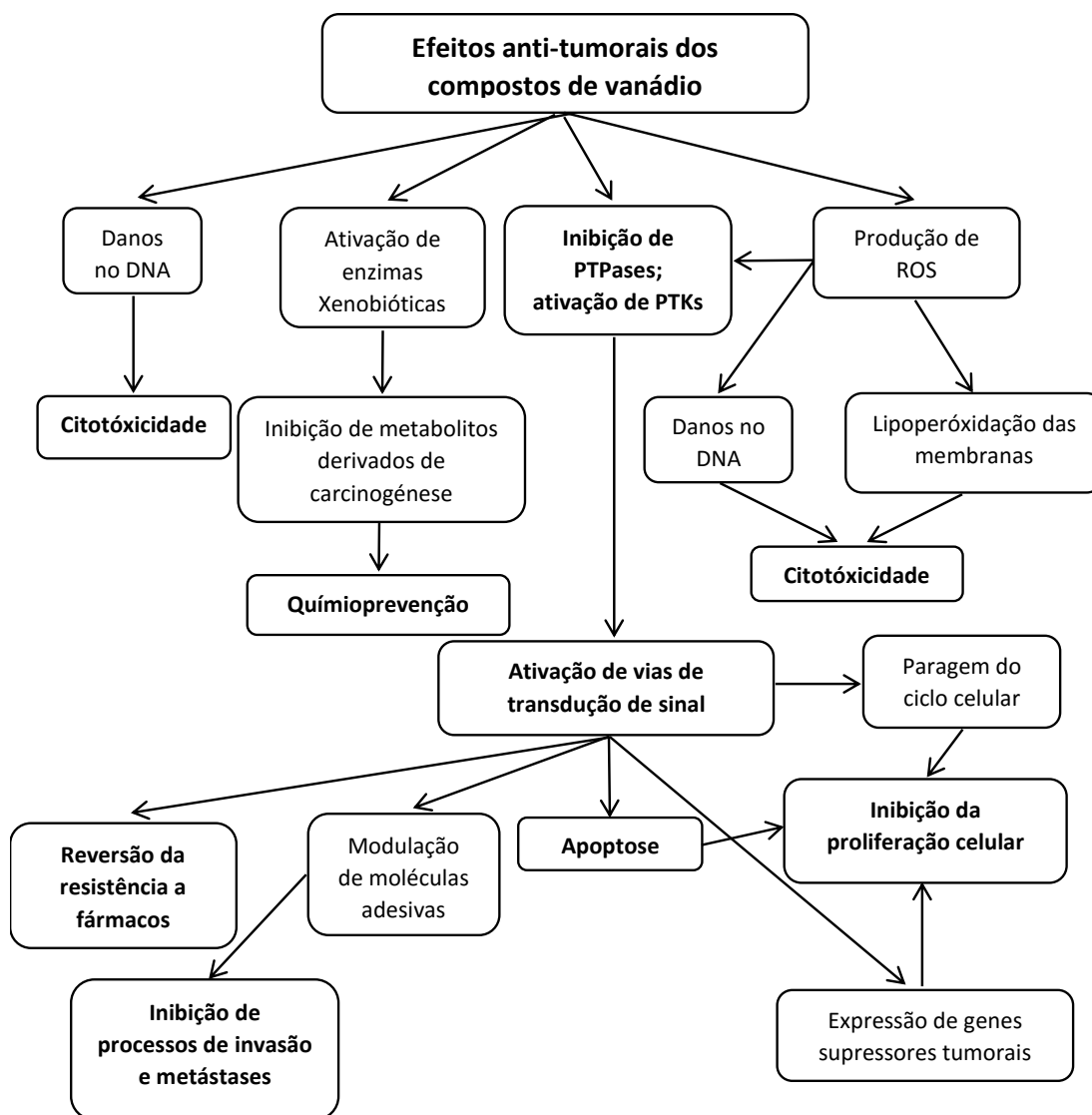


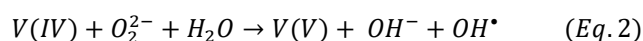
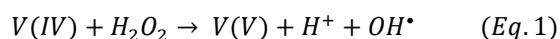
Figura 1.2 – Esquematização das ações e mecanismos através dos quais os compostos de vanádio exercem os seus efeitos anti-tumorais. (Adaptado de (Evangelou 2002))

- *Stress* oxidativo celular induzido pelo vanádio

O *stress* oxidativo celular pode ser induzido pelo vanádio por meio da produção de ROS. Estudos foram feitos de modo a compreender melhor os efeitos das ROS nos sistemas biológicos. (Valko et al. 2006)

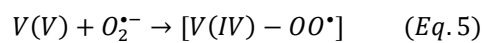
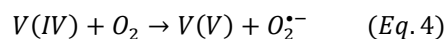
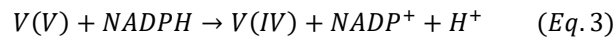
Tendo em conta que as células tumorais divergem das células saudáveis em inúmeros aspetos, o seu meio fisiológico proporciona a que estas estejam mais facilmente sujeitas à formação de radicais livres, por intermédio do vanádio.

A formação de radicais livres na presença de V(IV)/V(V), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e oxigénio, ocorre de acordo com as seguintes reações:

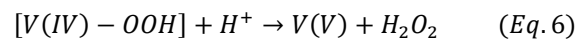


A formação destes radicais hidroxilo (OH<sup>\*</sup>), altamente tóxicos, pode por sua vez desencadear outras reações que levam à formação de radicais aniônicos superóxidos, que podem ser convertidos em oxigênio e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela superóxido dismutase (SOD), e consecutivamente, reagir com vanádio, perpetuando assim a produção de radicais hidroxilo. (Liochev & Fridovich 1990; Evangelou 2002), de acordo com a Equação 1 e 2. (Valko et al. 2006)

Por outro lado, os radicais de peroxovanádios e de hidroperóxido vanádios podem também ser formados em células, através do superóxido gerado pela NADPH-oxidase, de acordo com as seguintes reações (Valko et al. 2005):



O peróxovanadilo  $[V(IV) - OO^*]$  consegue remover um hidrogênio a partir de NADPH, produzindo hidroperóxido vanadilo  $[V(IV) - OOH]$ , que na presença de H<sup>+</sup> se pode decompor, gerando novamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e regenerando o vanadato (Valko et al. 2005):



Estes peróxidos promovem a inibição das PTPases, resultando na acumulação de proteínas de tirosina fosforiladas (TPPs), cuja acumulação desencadeia uma produção abundante de superóxidos. Tal como referido anteriormente, estes superóxidos catalisam a formação de mais peróxidos de vanádio, levando ao referido ciclo vicioso, que culmina na origem de *stress* oxidativo nas células. (Evangelou 2002)

Os compostos de vanádio podem também modificar indiretamente o *stress* oxidativo em células e animais, por outro tipo de mecanismos, como por exemplo libertando metais que originam radicais livres a partir de tecidos, ou modificando as suas defesas enzimáticas e antioxidantes. (Evangelou 2002)

- Efeitos do vanádio na proliferação celular:

O vanádio pode exercer efeitos na proliferação celular principalmente através da paragem do ciclo celular. Estudos revelam que as ROS geradas por complexos de vanádio com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bloqueiam a transição da fase pré-mitótica (G2) para a fase de mitose no ciclo celular em células cancerígenas, o que leva a uma redução significativa da taxa de crescimento do tumor (Zhang et al. 2001). Esta paragem do ciclo celular parece ser mediada através da ocorrência de uma inibição das PTPases, que por sua vez irão desfosforilar subunidades do complexo ciclina-B. (Evangelou 2002) Esta paragem pode também ser exercida por meio da ativação da cascata de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs). O vanadilo, por meio da ativação de p38 MAPK, induz a transcrição do fator de transcrição nuclear KB (NF-κB), um fator importante que se encontra envolvido na progressão do ciclo celular, na apoptose, e sendo ainda um agente de respostas inflamatórias (mais detalhes sobre esta via serão abordados na secção seguinte). (Bours et al. 2000; Mukherjee et al. 2004)

Outros compostos de vanádio, como o vanadoceno ( $V(C_5H_5)_2$ ), também podem exercer efeitos anti-proliferativos e citotóxicos através de interações com os grupos fosfato dos nucleótidos de DNA (ácido desoxirribonucleico). (Evangelou 2002)

- Efeitos biológicos que levam à ativação da apoptose, por parte do do vanádio:

Os efeitos biológicos do vanádio capazes de ativar a apoptose são mediados através de cascatas de sinalização intracelulares.

A regulação de certas vias de sinalização intracelulares por parte do vanádio pode influenciar várias funções celulares, nomeadamente a taxa de crescimento celular e diferenciação, bem como uma diminuição dos processos de adesão celular, e por fim, culminar em apoptose.

A ativação de cascatas de sinalização celular é mediada através da atividade de PTPases e das proteínas cinases de tirosina (PTKs), que regulam a desfosforilação e fosforilação de proteínas essenciais para a transdução de sinal. (Evangelou 2002)

Como consequência da inativação de PTPases e/ou a ativação de PTKs, ocorre uma acumulação de resíduos de tirosina fosforilados nas células, levando à ativação de vários fatores, nomeadamente, a translocação do fator NF- $\kappa$ B (Mercurio & Manning 1999; Bours et al. 2000). Também as cascatas de sinalização ativadas por vanádio através da produção de ROS, quer no citosol, quer em mitocôndrias, resultam em danos mitocondriais e na libertação de citocromo C (que por sua vez ativa caspases, proteases constituídas essencialmente por cisteínas), que levam à apoptose (Kuida et al. 1998; Evangelou 2002). Outro resultado possível é a transcrição quer de genes apoptóticos (como o gene supressor tumoral p53, ativado por peróxidos) e letais, quer anti-apoptóticos. (Scior et al. 2005; Korbecki et al. 2012)

- Potenciais efeitos anti-metastáticos do vanádio:

A fosforilação das PTPases induzida pelos compostos de vanádio pode também influenciar o potencial invasivo e metastático das células tumorais, regulando proteínas adesivas (célula-célula), envolvidas nos processos de metástase e invasão de tumores. (Zhou et al. 2000)

Os compostos de vanádio podem ainda impedir a disseminação hematogénica de cancro, ativando a fibrinólise endógena induzida por tumor, e inibindo a agregação plaquetária, ambas ações envolvidas na atividade de metástase hematogénica. (Biggerstaff et al. 1999)

Os efeitos anti-tumorais do vanádio, em combinação com a sua baixa toxicidade, sugerem o vanádio como um potencial agente anti-tumoral, requisitando assim a urgência de sintetizar novos complexos, mais potentes e menos tóxicos, de modo a se poder estabelecer o vanádio como um eficaz agente anti-tumoral de centro metálico não-platinado.

### **1.1.2.2 – Efeito anti-parasítico**

De todos os efeitos terapêuticos do vanádio, o seu efeito anti-parasítico é o menos explorado. Apesar da Organização Mundial de Saúde (WHO) indicar que as doenças provocadas por parasitas se

encontram entre as de maior prevalência a nível mundial, estudos para o potencial tratamento de algumas destas doenças usando vanádio só recentemente começaram a ser investigadas. (Fernández et al. 2013)

A procura recai essencialmente na tentativa de desenvolver potenciais agentes contra os parasitas responsáveis por doenças como a tripanossomíase americana (Doença de Chagas), leishmaniose, malária e amebíase. (Gambino 2011)

Dado que este tipo de doenças afeta cerca de um terço da população mundial, principalmente nas áreas mais pobres do planeta, e que os poucos fármacos disponíveis apresentam elevada toxicidade e baixa eficiência (aos quais o parasita acaba por criar resistência), torna-se necessário e urgente, o desenvolvimento de novos medicamentos úteis para o tratamento destas doenças tropicais. (Navarro et al. 2010)

Com base nos mecanismos anteriormente descritos, o vanádio oferece propriedades bioquímicas e químicas relevantes para o desenvolvimento deste tipo de medicamentos anti-parasíticos. A inibição de PTPases, interação com biomoléculas e produção de ROS (mecanismo facilitado, devido à suscetibilidade dos parasitas ao *stress* oxidativo (Krauth-Siegel et al. 2005)), por parte dos compostos de vanádio, conseguem exercer efeitos biológicos em determinados parasitas. (Benítez, Guggeri, Tomaz, Arrambide, et al. 2009; Benítez et al. 2011)

Um ponto importante, e que favorece o avanço deste tipo de estudos usando vanádio, reside no facto das células proliferativas dos parasitas protozoários, e as células tumorais, possuírem ambas semelhanças metabólicas, o que leva a uma correlação de ambos os efeitos anti-tumorais e anti-parasíticos. (Gambino 2011)

Existem algumas técnicas a serem postas em prática para desenvolver este tipo de fármacos com base em metais, como por exemplo: a síntese de análogos organometálicos, onde o objetivo é incluir um centro metálico no fármaco anti-parasítico de modo a aumentar as suas propriedades farmacológicas (Dubar et al. 2008); a coordenação de metais com compostos anti-parasíticos, visando modular a sua atividade e contornar os mecanismos de resistência (Cabrera et al. 2004; Rajapakse et al. 2009); a formação de complexos metálicos com ligandos que possuam a capacidade de intercalar com o DNA, com o intuito de que esta biomolécula se torne um alvo no parasita (Benítez et al. 2011; Demoro et al. 2012); e por fim, a formação de complexos metálicos com ligandos não bioativos, de modo a que estes possam agir como inibidores de enzimas específicas dos parasitas, afetando as suas estruturas, ou bloqueando a interação destas com os seus substratos. (Fricker et al. 2008)

O uso destas técnicas oferece a possibilidade de construir novos fármacos usando complexos metálicos e organometálicos, uma vez que provaram afetar determinados parasitas (levando à sua morte ou à inibição do seu crescimento), com relativo sucesso. Podemos então assumir que, conjugando estas técnicas, com o avanço do conhecimento acerca da biologia e genómica de alvos enzimáticos e as vias metabólicas dos parasitas, tudo leva a crer que os compostos de vanádio

merecem mais atenção por parte da investigação, no âmbito do tratamento destas doenças um tanto ou quanto negligenciadas. (Gambino 2011)

Não obstante, prevê-se que os compostos de vanádio possam ainda um dia vir a ser explorados como potenciais fármacos para doenças e infeções virais tais como a gripe, SARS (Síndrome respiratória aguda grave), febre do Dengue e até HIV (Vírus de imunodeficiência humana). (Rehder 2012)

### **1.1.2.3 – Efeito anti-diabético**

Como referenciado anteriormente, estudos bioquímicos demonstram que os compostos de vanádio exercem a sua ação essencialmente por meio de mecanismos que envolvem a produção de ROS, a inibição de enzimas (especialmente PTPases), bem como por mecanismos associados à similaridade entre o vanádio e o fosfato. Como tal, tais mecanismos são também considerados a base dos efeitos anti-diabéticos propostos do vanádio, tendo destaque a analogia entre o vanádio e o fosfato, influenciados pelos diferentes estados de oxidação do metal. (Crans et al. 2004; Tracey et al. 2007; Roess et al. 2008)

#### **1.1.2.3.1 – Diabetes *mellitus*, a doença**

A Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença heterogénica metabólica, caracterizado pela falta relativa, ou absoluta, de insulina que é produzida pelas células  $\beta$  do pâncreas, resultando numa má regulação do metabolismo energético dos ácidos gordos (Thompson 1999), e numa má absorção de glucose por parte dos tecidos periféricos, tais como o músculo esquelético e o tecido adiposo. (Gustav E. Lienhard 1992; Rehder 2012)

Os pacientes diabéticos são geralmente categorizados como sendo do tipo I (insulino-dependentes, “IDDM”), em que a produção de insulina é deficiente (resultado de danos acidentais no pâncreas, ou de uma reação autoimune, onde há uma destruição das células  $\beta$ ), ou do tipo II (não dependentes de insulina, “NIDDM”), onde apesar de haver uma produção normal de insulina, os recetores de insulina (IRs) trans-membranares existentes nos tecidos, que regulam os níveis de glucose, não conseguem responder de acordo com a sua função. (Melchior et al. 1999; Sakurai et al. 2002)

Em 2012 verificou-se que em países desenvolvidos, onde a comida é abundante, cerca de 10% da população tende a tornar-se diabética ao longo de sua vida (National Diabetes Statistics Report, 2014). Apesar da Diabetes ser essencialmente uma desordem metabólica, e de existirem vários medicamentos à base de insulina para DM do tipo I, e fármacos sintéticos para DM do tipo II, estes envolvem lidar com a dor física e a rotina das injeções, bem como com os efeitos colaterais que advém destes fármacos, tornando a Diabetes de qualquer tipo, um desafio para quem tem de aprender a viver com ela. Mesmo com uma monitorização regular dos níveis de glucose no sangue, o controlo rigoroso e eficaz da Diabetes continua a ser um objetivo por alcançar, uma vez que as injeções periódicas de insulina provocam amplas oscilações dos níveis de glucose no organismo.

Complicações secundárias tais como aterosclerose, microangiopatia, disfunção e falha renal, problemas cardíacos, retinopatia diabética e desordens oculares, que resultam em níveis excessivos

de glucose no sangue e glicosilação de várias proteínas, são as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com Diabetes, mesmo quando se encontram sob um controlo rigoroso e bem monitorizado da doença. (Whittingham et al. 1971)

É então necessário desenvolver novos métodos que possam não só tratar, mas também prevenir, a Diabetes. Com esse objetivo, vários compostos de vanádio estão a ser desenvolvidos, e aplicados em estudos quer *in vitro*, quer *in vivo*, provando que estes compostos exercem um efeito preventivo sobre a Diabetes. (Sakurai et al. 2002)

### 1.1.2.3.2 – Vanádio vs fosfato: a analogia entre ambos

O fosfato desempenha um papel importante nos sistemas biológicos, e está envolvido em vários mecanismos de reconhecimento biológico e sistemas de biocatálise. Por outro lado, o vanádio é capaz de regular muitas das enzimas envolvidas neste tipo processos, tais como ATPases, fosfatases, fosfodiesterases, ribonucleases, fosfoglucomutase e glucose-6-fosfatase (Crans et al. 2004; McLauchlan et al. 2010). Tal deve-se às propriedades físico-químicas análogas que existem entre o vanádio e o fosfato, e ao facto de ambos participarem em reações semelhantes.

O modo como o vanádio, nomeadamente no estado de oxidação V(V), parece atuar sob a forma de análogo do fosfato dá-se através da mimetização da sua conformação (Figura 1.3) (Bevan et al. 1995), demonstrando no entanto, uma maior flexibilidade nas suas geometrias de coordenação. (Evangelou 2002)

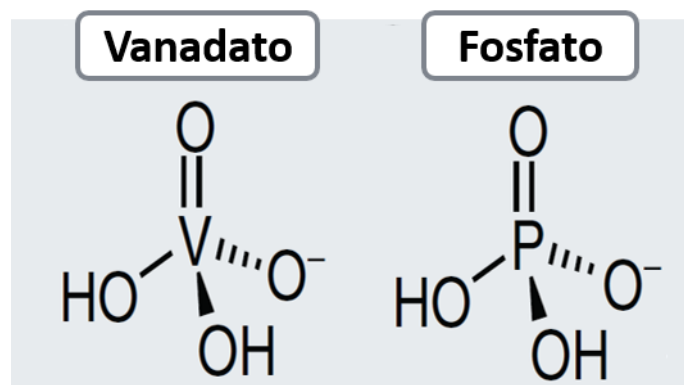


Figura 1.3 – Ilustração da analogia entre a estrutura do vanadato e o fosfato.

A origem de um estado de transição estável entre o vanadato e a enzima em questão foi considerada a razão pela qual este exerce um efeito inibidor na atividade catalítica, e experiências de difração de raios-X provaram que o vanadato muitas vezes se liga ao centro ativo da maioria das hidrolases de fosfato, com uma geometria bipiramidal trigonal. No entanto, podem existir outras geometrias, tais como a tetraédrica (Brandão et al. 2010; Madan & Gopal 2011), principalmente, quando nos complexos fosfatase-vanádio, o vanadato age como inibidor do produto. (Costa Pessoa et al. 2015)

Na maioria dos casos, a ativação de enzimas efetuada pelo vanádio dá-se através de mecanismos indiretos – este pode estimular a atividade da enzima em questão, através da formação de complexos

com determinados ligandos, que se assemelham à estrutura dos seus substratos fisiológicos. (Santos et al. 2014)

### 1.1.2.3.3 – Mimetização da ação da insulina por parte do vanádio

A absorção normal e o metabolismo da glucose em indivíduos não-diabéticos é iniciada por uma série de reações intracelulares, conhecidas como a cascata de sinalização da insulina (Kahn & White 1988; Thompson 1999). A insulina é uma hormona de sinalização com várias funções reguladoras, nomeadamente a absorção de glucose, aminoácidos, ácidos gordos, e o armazenamento de glicogénio no músculo e no fígado, bem como de proteínas no músculo, e triglicéridos no tecido adiposo, sob a forma de energia (Figura 1.4) (Shechter 1980). Esta hormona é segregada pelo pâncreas em resposta a níveis elevados de glucose no sangue – níveis estes que ocorrem naturalmente a seguir à ingestão de uma refeição. A insulina também serve para neutralizar hormonas catabólicas tais como o glucagão (cuja função é a mobilização destas formas moleculares de energia armazenada), e para suprimir a produção de glucose no fígado. (Thompson 1999)

#### Equilíbrio de Glucose A

- Estimulação da absorção da glucose, seguido da glicogénese e/ou da degradação de glucose
- Inibição da glicogénese
- Inibição da gliconeogénese

⇒ Hiperglicemia

⇒ Neuropatia Diabética

#### Metabolismo dos Ácidos Gordos B

- Inibição da lipólise
- Estimulação da lipogénese

⇒ Acumulação de Corpos Cetónicos

⇒ Danos nos tecidos, retinopatia

Figura 1.4 – Esquema das principais funções metabólicas da insulina (e eventualmente, dos compostos de vanádio), sendo que as duas setas indicam possíveis disfunções derivadas da insuficiência ou ausência de insulina. (Adaptado de (Rehder 2012)).

No início da cascata de sinalização da insulina, esta liga-se no lado extracelular das membranas, o que por sua vez ativa a fosforilação das proteínas de tirosina intracelulares dos recetores de insulina (IR, constituídos por PTKs), ativando-os. (Rehder 2012)

Os compostos de vanádio não se ligam aos recetores de insulina, no entanto, conseguem exercer efeitos que potenciam a ação da insulina, atuando nos seus recetores. (Roess et al. 2008)

Assim o principal mecanismo pelo qual os compostos de vanádio imitam a ação da insulina é levado a cabo pela ativação do domínio cinase de tirosina (domínio  $\beta$ ) do IR, causando assim a fosforilação do



recetor, e conseqüentemente do substrato do recetor de insulina (IRS). Por sua vez, a fosforilação do IRS irá ativar o transportador de glucose GLUT4, que irá ser transportado para a superfície das células, e promover a absorção de glucose. A ativação do IR por parte do vanádio ocorre através da inibição das PTPases (e não por ligação ao recetor), de modo a evitar que estas desfosforilem tanto IR, como IRS. Estes por sua vez, encontrando-se fosforilados, conseguem restaurar as vias de sinalização da cascata da insulina (Figura 1.5). (Nankar & Doble 2013)

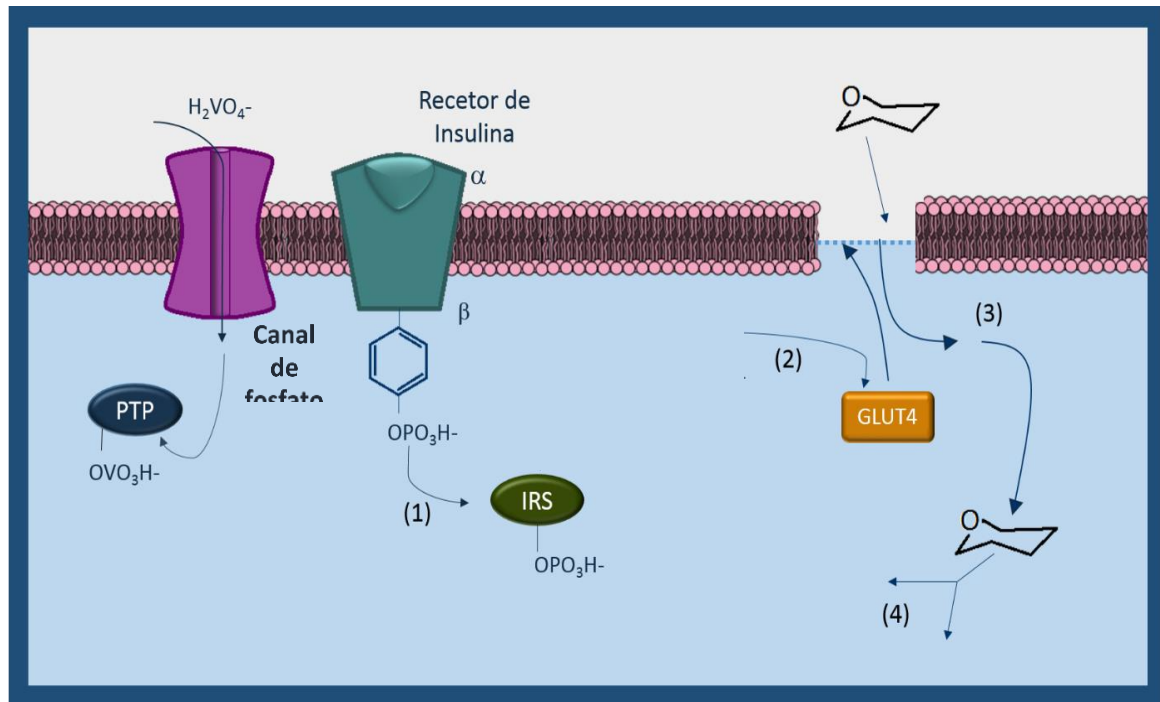


Figura 1.5 – Possível mecanismo de estimulação da absorção de glucose pelo vanádio. 1) Ativação de IRS por fosforilação; 2) ativação do transportador de glucose; 3) absorção de glucose pelas células através de GLUT4; 4) metabolização da glucose.  $\alpha$  e  $\beta$ : subunidades do recetor de insulina; GLUT4: transportador de glucose; IRS: substrato do recetor de insulina; PTP: proteína de tirosina fosfatase. (Adaptado de (Rehder 2012)).

Apesar de o vanádio produzir efeitos semelhantes aos da insulina em células, devido ao seu efeito inibitório sobre as PTPases (Huyer et al. 1997), os mecanismos pelos quais atuam são diferentes. Estes compostos inibem de forma não-seletiva as PTPases, e por conseguinte, potenciando a fosforilação dos recetores em questão nas membranas, bem como cinases citosólicas envolvidas na ação metabólica da insulina (Shechter et al. 2003). Já a insulina, liga-se predominantemente seu recetor IR, causando a sua fosforilação. Além do mais, o vanádio promove a lipogénese e a oxidação da glucose através da ativação das PTK citosólicas (Shisheva & Shechter 1993), enquanto a absorção de glucose se dá através da ativação das PTK membranares. (Elberg et al. 1997; Nankar & Doble 2013)

#### 1.1.2.3.4 – Estudos *in vivo* e *in vitro*

Apesar do comportamento competitivo do vanádio relativamente ao fosfato ser considerado o componente chave para o seu efeito de mimetização da insulina (Costa Pessoa et al. 2015), os compostos de vanádio não substituem completamente a insulina. Assim sendo, uma ampla variedade de modelos diabéticos têm sido utilizados para melhor explorar este efeito, inicialmente *in vitro* e,

subsequentemente, *in vivo*, destacando-se três classes de compostos de vanádio com maior interesse: compostos inorgânicos e orgânicos de vanádio, complexos derivados da combinação de vanádio com outros ligandos, e complexos derivados da combinação de vanádio com peróxido de hidrogénio. (Thompson & Orvig 2000; Rehder 2012; Fedorova et al. 2013)

De um modo geral, o vasto conjunto de compostos com o metal essencialmente no estado de oxidação IV e V, tem sido testados, demonstrando tanto *in vivo* como *in vitro* a sua capacidade de levar a uma diminuição dos níveis de glucose no sangue, e de suprimir o processo de lipólise. (Rehder 2012)

Apesar de tudo, os impactos dos compostos de vanádio não estão ainda completamente caracterizados. (Korbecki et al. 2012)

De acordo com a literatura, os efeitos anti-diabéticos do vanádio avaliados em adipócitos isolados de ratos Wistar, tratados com epinefrina (Tsuchiya et al. 1990; Fedorova et al. 2013), permitiram chegar à conclusão de que o vanadilo aumenta a absorção de glucose, e diminui a libertação de ácidos gordos livres (FFA) na ausência de glucose, mas inibe a sua libertação na presença da mesma – no entanto, esta inibição é suprimida pela citocalasina B (citB), um inibidor do transporte de glucose. Por outro lado, no que respeita à comparação dos diferentes estados de oxidação do vanádio, o vanadilo é absorvido pelos adipócitos, o que não acontece com o vanadato, que para poder ser absorvido, tem que primeiro ser reduzido a vanadilo, na presença de glucose. Tal permite concluir que o vanadilo é a forma ativa ideal do vanádio para mimetizar e potenciar a ação da insulina, através da sua interação no mecanismo de transporte da glucose. (Sakurai et al. 2002)

Em ensaios *in vivo*, tanto o vanadato, como o vanadilo, verificaram-se capazes de estimular eficazmente o metabolismo da glucose em adipócitos de ratos (Shechter 1980; Dubyak & Kleinzeller 1980). Devido ao facto do vanádio pode ser administrado por via oral, com efeitos de longa duração, semelhantes aos da insulina (Heyliger 1983), estudos *in vivo* foram levados a cabo para compreender melhor este potencial, demonstrando que a administração de vanadato por via oral no tratamento de animais diabéticos, leva à restauração parcial, ou até completa, da atividade de enzimas do fígado e do músculo, envolvidos na lipólise, e glicogénese (Brichardt & Jeanrenaud 1992), sem no entanto, estimular o aumento da síntese de insulina (McNeill et al. 1990; Orvig et al. 1999; Rehder 2012). Também em adipócitos de ratos, tanto saudáveis, como diabéticos, se verifica um aumento da sensibilidade à insulina no metabolismo da glucose aquando a administração de vanadato (Miyabayashp & Miyabayashp 1992), que melhora a capacidade de ligação da insulina. (Thompson 1999)

O ortovanadato de sódio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) é um dos compostos de vanádio (no estado de oxidação V(V)) frequentemente utilizado em estudos no que toca ao efeito anti-diabético do metal em questão. Este composto consegue estimular a absorção e a oxidação de glucose em adipócitos de ratos, a síntese de glicogénio no diafragma e hepatócitos, e ainda inibir a gliconeogénese hepática, geralmente em concentrações milimolar quer de vanadato, quer de vanadilo (Shechter 1980; Dubyak & Kleinzeller

1980), sendo que na maioria dos casos as vias lipídicas e glicolíticas são afetadas em tecidos específicos, tal e qual como nos mecanismos levados a cabo pela insulina. (Srivastava & Mehdi 2005)

Em ensaios *in vivo*, um modelo de diabetes muito comum, é a estreptozotocina (STZ)-diabetes induzida em ratos (McNeill et al. 1990). Foi já demonstrada a capacidade do vanadato (administrado a longo prazo) de exercer efeitos hipoglicémicos, sem no entanto se manifestarem efeitos tóxicos secundários. O mesmo acontece em ratos modelo de Diabetes tipo II, ratos Zucker, demonstrando efeitos de diminuição dos níveis de glucose no sangue, e inibição da lipólise. (Rehder 2012; Fedorova et al. 2013; Clark et al. 2014)

Fazendo uso do mesmo modelo de ratos STZ, outros estudos *in vivo* relatam ainda que o vanadato quando reduzido a vanadilo restaura a expressão dos transportadores de glucose dependentes de insulina no músculo esquelético (Barrio & Etcheverry 2010), e induz o recrutamento do GLUT4 para a membrana plasmática dos adipócitos, aumentando assim a absorção de glucose – mecanismo que ocorre através da ativação da via PI3K-Akt, tal como descrito anteriormente. Esta via também é usada para inativar a cinase-3, que sintetiza glicogénio. (Brichardt & Jeanrenaud 1992; Korbecki et al. 2012; Rehder 2012)

Além disto, o efeito do vanádio sobre o metabolismo dos lípidos foi também examinado: a cascata de fosforilação da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) em adipócitos, é ativada aquando a existência da doença de Diabetes (*in vivo*) ou na presença de epinefrina (*in vitro*), e após administração de vanadilo, tanto a glucose como o vanadilo são absorvidos pelos adipócitos, levando à inatividade desta cascata nas células periféricas. (Sakurai et al. 2002)

Verifica-se também a diminuição da libertação de FFA pelos adipócitos, como consequência da absorção de glucose pelos mesmos – absorção esta, estimulada pela administração de vanadilo, o que leva a crer, que o vanadilo consegue estabilizar ambos os níveis de glucose, e de FFA, em ratos STZ-diabéticos. (Sakurai et al. 2002; Gruzewska 2014)

De um modo geral, a administração de vanádio origina efeitos consistentes e reprodutíveis, resultando numa maior e melhor sensibilidade periférica à insulina, sem necessitar no entanto, de aumentar a sua síntese. (Pepato et al. 2008)

De um ponto de vista bioquímico, para que um complexo metálico seja útil no tratamento de Diabetes do tipo II, este não deve induzir um aumento da secreção de insulina, mas sim servir como um substituto parcial da hormona, ou como um agente que potencia a sua função.

Muitos estudos acerca dos compostos de vanádio têm-se centrado no desenvolvimento de novos complexos, com a maior eficácia possível. Porém, atualmente, as necessidades mais urgentes que rodeiam esta tentativa de melhorar as suas utilidades farmacológicas focam-se em esclarecer melhor os problemas na área de absorção (tecido alvo), distribuição e excreção dos compostos em si, a definição mais concisa do destino metabólico dos mesmos, bem como na compreensão exata dos seus mecanismos de ação. (Orvig et al. 1999)

Até agora, os compostos de vanádio que apresentaram melhores resultados no mecanismo de mimetização da insulina foram os compostos inorgânicos de vanadato, peróxovanadatos, e os compostos inorgânicos de vanadilo, tais como o sulfato de vanadilo (VOSO<sub>4</sub>). O uso de ligandos orgânicos tem vindo a ser bastante explorada, demonstrando bons resultados, que se devem muito provavelmente, ao facto de estes complexos possuírem uma maior biodisponibilidade, aumentarem a estabilidade, transporte, taxa de absorção pelo trato gastrointestinal (quando administrados oralmente), *targeting*, e internalização dos complexos pelas células, exibindo ainda uma menor toxicidade. (Rehder 2012; Fedorova et al. 2013)

Uma mais-valia importante a favor deste tipo de compostos, reside no facto de estes poderem ser administrados por via oral, o que se traduz na potencialidade de eliminar ou reduzir significativamente a necessidade de injeções diárias de insulina em indivíduos diabéticos, dado que a ingestão oral de insulina exógena não produz uma hormona biologicamente ativa (Gustav E. Lienhard 1992; Nankar & Doble 2013). Tal não acontece com os complexos de peróxovanádios (IV) e (V), que apesar de estudos indicarem a sua extraordinária potência *in vitro* para inibir as PTPases (levando com sucesso à ativação da β-subunidade de IR), a sua utilidade *in vivo* pode ser comprometida devido ao facto de não poderem ser administrados por via oral. (Bevan et al. 1995; Nankar & Doble 2013)

### **1.1.3 – Compostos de vanádio: ligandos e proteínas em estudo**

A extrema importância do papel dos ligandos coordenados com o vanádio leva a que estes sejam alvos recorrentes de investigação: a formação destes complexos deve ser capaz de melhorar não só a absorção (reduzindo a dose necessária para produzir um efeito considerável), como também o transporte e a difusão do vanádio para o interior das células (Kiss et al. 2008; Willsky et al. 2011). Neste sentido, o papel do ligando no complexo de vanádio é visto como sendo um “transportador do ião metálico”. (Mehtab et al. 2013)

Como referido anteriormente, o mecanismo pelo qual o vanádio mimetiza a ação da insulina, não se encontra ainda completamente descrito, tendo a agravante de que estes compostos são complexos metálicos, que por conseguinte, são suscetíveis a reações de hidrólise e de troca de ligandos. Uma vez que o complexo original é então suscetível de ser transformado em meios biológicos, a completa caracterização das espécies ativas permanece incompleta, e um extenso trabalho tem vindo a ser feito com vista a determinar as espécies ativas e o mecanismo de ação pelo qual todo o processo ocorre. (Mehtab et al. 2013; Jakusch et al. 2011; Costa Pessoa et al. 2013; Maurya et al. 2010)

Devido ao facto de o vanadilo ser considerado menos tóxico do que o vanadato, e mais ativo no interior das células (Sakurai 1995), estudos tem incidido sobre a síntese de novos complexos de vanadilo e sobre a avaliação da sua ação de mimetização de insulina. (Pepato et al. 2008)

Para além disso, existe uma atual preferência para recorrer ao desenvolvimento e caracterização de complexos de vanádio com ligandos orgânicos, comparativamente aos inorgânicos, pois, tal como referido anteriormente, uma maior biodisponibilidade irá inevitavelmente resultar numa maior eficácia (Melchior et al. 2001; Thompson & Orvig 2006; Pepato et al. 2008; Fedorova et al. 2013). Para tal, têm-

se como critérios a síntese de complexos metálicos de baixo peso molecular, recorrendo a ligandos biológicos e seus derivados, que culminem num aumento da lipofilicidade, transporte e biodisponibilidade, bem como uma baixa toxicidade (Sakurai et al. 2002)

Neste trabalho propõe-se o estudo da interação entre o vanádio no estado de oxidação V(IV) – com ligandos como o ácido picolínico (Hpic), ácido dipicolínico (H<sub>2</sub>dipic), ácido maltol (HMaltol) e 1,2-dimetil-3-hidroxi-4-piridinolina (Hdhp), e ainda aminoácidos naturais tais como a arginina e a prolina (Figura 1.6), sob a forma de VO(ligando)<sub>2</sub>; e do vanádio no estado de oxidação V(V), bem como a formação de aductos destes compostos com diferentes proteínas.

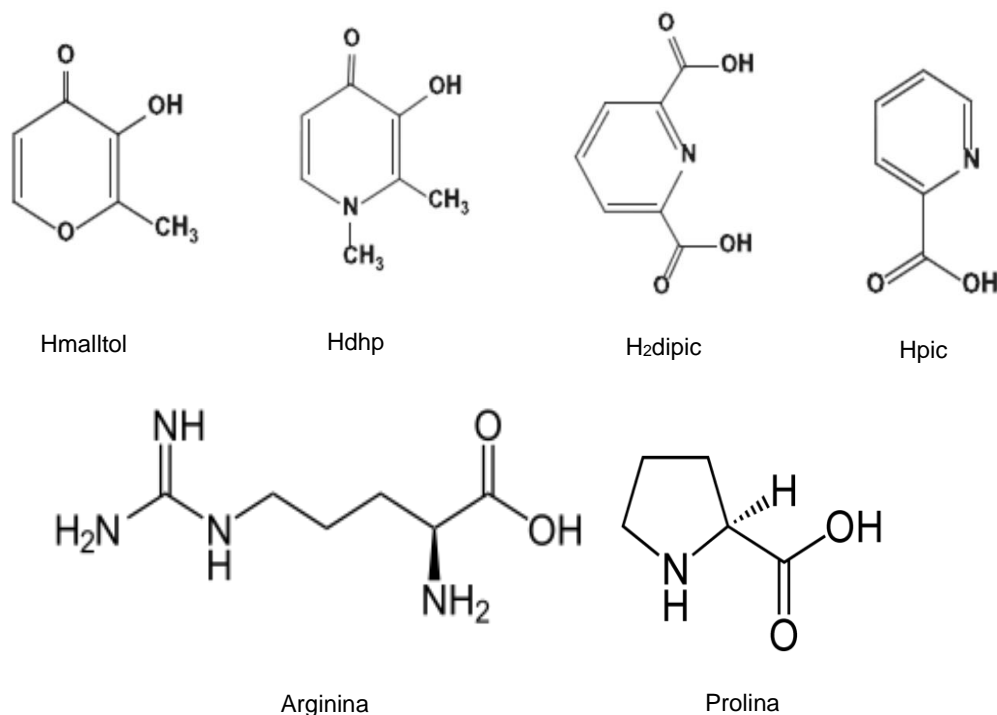


Figura 1.6 – Representação das estruturas moleculares dos ligandos Hmaltol, Hdhp, H<sub>2</sub>dipic e Hpic, e dos aminoácidos arginina e prolina. Os ligandos encontram-se na forma protonada, e foram já testados em estudos *in vivo* como ligandos de complexos na forma V<sup>IV</sup>O(ligando)<sub>2</sub> ou V<sup>V</sup>O<sub>2</sub>(ligando) com o vanádio, visando determinar a sua eficácia na ação de mimetização da insulina. (Adaptado de (Mehtab et al. 2013)).

Como a TF é considerada o veículo predominante para o transporte de vanádio no soro humano, e dado que apenas cerca de 30% do total dos seus sítios de ligação estão ocupados por ferro (Fe<sup>3+</sup>, neste caso) (Evans et al. 2012), existem sítios disponíveis para a ligação de outros iões metálicos, sem a necessidade de substituir Fe<sup>3+</sup>. (Kiss et al. 2008; Sanna et al. 2010)

A interação destes complexos com o soro humano, membranas ou proteínas citosólicas, é um aspeto importante a ter em conta, uma vez que controlam as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção, bem como a eficácia do metal. (Santos et al. 2014)

Uma vez sabido que o vanádio forma complexos com proteínas do soro a fim de ser transportado na corrente sanguínea propomos o estudo da interação entre o mesmo e outras categorias de proteínas.

Com o objetivo de caracterizar estruturalmente a interação de complexos de vanádio com proteínas, em 2014 foi obtida a estrutura cristalina do complexo de vanádio–picolinato ( $\text{VO}(\text{pic})_2$ ) com lisozima de clara de ovo (HEWL), onde o aducto  $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{pic})_2$  coordenado numa geometria octaédrica, se encontrava ligado no centro ativo da enzima – mostrando uma interação com o grupo COO- do resíduo Asp52. Dada a localização do metal, torna-se lógico pensar que este complexo possa agir como um inibidor desta proteína. (Santos et al. 2014)

Deste modo, torna-se interessante conhecer e caracterizar, tanto estruturalmente como cineticamente, a interação entre estes compostos de vanádio e algumas enzimas. Para tal foram usadas HEWL, de modo a continuar os estudos já existentes, e a tripsina de pâncreas bovino (*Bos taurus*), de modo a verificar também se estes podem ou não agir como seus inibidores.

A HEWL é uma enzima, abundante em várias secreções biológicas, como a saliva, o muco e as lágrimas, caracterizada por conseguir quebrar a parede do peptidoglicano em bactérias Gram-positivas, através da hidrólise das ligações glicosídicas. (Callewaert et al. 2008; Callewaert & Michiels 2010)

A tripsina é uma proteína da família das protéases de serina, produzida no pâncreas, e classificada como sendo uma enzima digestiva. Este tipo de proteínas encontram-se envolvidas em diversos processos biológicos, como a digestão, transdução do sinal, reprodução, apoptose, e sistema imunitário, e a sua desregulação encontra-se associada a diversas doenças, tais como cancro e pancreatite aguda. (Hirota et al. 2006; Di Cera 2009)

As duas proteínas são bons modelos cristalográficos, uma vez que os cristais produzidos permitem obter dados de difração de elevada resolução e analisar, com grande detalhe e precisão, a formação de aductos complexos metálicos–proteína.

#### **1.1.4 – Cristalografia de raios-X**

A Cristalografia de raios-X é um método constituído por várias etapas (Figura 1.7) que permite determinar com uma resolução a nível atómico, estruturas tridimensionais de macromoléculas biológicas, e como tal, foi utilizada para obter e caracterizar as estruturas formadas entre os complexos de vanádio e as respetivas proteínas em estudo.

Esta metodologia desempenha um papel importante no *design* e obtenção de novos fármacos, uma vez que contribui para o conhecimento do tipo de interações que estes podem ter com as proteínas existentes no organismo humano. Relativamente a outras técnicas, apresenta a vantagem de não haver um limite de tamanho para as macromoléculas a cristalizar, e poder fornecer informações detalhadas acerca das coordenadas atómicas das estruturas analisadas. Assim, a Cristalografia de raios-X baseia-se na interação de raios-X com os eletrões dos átomos existentes nos cristais, dado que o comprimento de onda da radiação (0,1 a 100 Å) é da mesma ordem de grandeza que as distâncias interatómicas. Esta interação leva a que se forme um padrão de difração que permite caracterizar o conteúdo do cristal sujeito à experiência de difração. (Romão 1996; Rhodes 2006)

Para que se possa recorrer à aplicação desta técnica é necessário começar pela obtenção de cristais das proteínas a estudar, sendo a qualidade do cristal um fator decisivo para o sucesso de todo o procedimento. O método mais frequentemente utilizado para a obtenção de cristais é o método de difusão de vapor (podendo este ser feito quer por gota assente, quer por gota suspensa), onde uma gota contendo uma porção da proteína e da solução precipitante é colocada num reservatório fechado, onde se encontra a solução precipitante – irão assim ocorrer trocas de vapor de água entre a gota e a solução precipitante do reservatório até que se estabeleça um equilíbrio na concentração do agente precipitante, o que leva a que a proteína concentre e, eventualmente, cristalize. (Rhodes 2006)

Um cristal é uma estrutura sólida periódica e ordenada no espaço tridimensional, constituído por pequenas unidades que se repetem infinitamente em toda a sua estrutura, formando assim a rede cristalina. Cada unidade denomina-se por célula unitária, e é caracterizada pelos seus ângulos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  e vetores  $a$ ,  $b$  e  $c$ , que definem a organização interna e as coordenadas atómicas das moléculas no cristal. (Romão 1996)

Após a obtenção dos cristais estes são sujeitos à experiência de difração, onde um feixe de raios-X a alta velocidade incide sob o cristal, originando um padrão de difração característico da organização estrutural interna dos átomos de todas as moléculas do cristal, onde as ondas difratadas pelos átomos são designadas como reflexões. De modo a evitar danos nos cristais devido à intensidade da radiação, estes são congelados em azoto líquido, recorrendo a uma solução crio-protetora que previne a formação de gelo. (Rhodes 2006)

As reflexões podem ser descritas sob a forma de Fatores de Estrutura ( $F_{hkl}$ ), caracterizadas pelo comprimento de onda, amplitude e ângulo da fase. A determinação dos Fatores de Estrutura irá permitir, através de métodos computacionais, descrever a posição média de todos os eletrões do cristal sob a forma de densidade eletrónica (Romão 1996; Carvalho et al. 2009). Contudo, para que se obtenham os Fatores de Estrutura, torna-se necessário resolver o chamado Problema da Fase, que se consiste no cálculo estimativo dos ângulos da fase de cada reflexão medida. (Wlodawer et al. 2008)

A resolução do problema da fase é feita em função da existência ou não de estruturas homólogas à estrutura em estudo: caso não existam, recorre-se à inserção de átomos pesados na estrutura cristalina (Substituição Isomórfica Múltipla, MIR) ou à dispersão anómala que deriva das diferentes intensidades com que alguns átomos difratam os raios-X incidentes (podendo isto ser feito por Dispersão Anómala Simples (SAD), onde se utiliza radiação a um único comprimento de onda; ou por Dispersão Anómala Múltipla (MAD), onde são recolhidos conjuntos de dados a diferentes comprimentos de onda). No caso da existência de estruturas homólogas, recorre-se ao método de Substituição Molecular (MR), onde são utilizados os valores dos ângulos da fase da estrutura homóloga já conhecida, no lugar das fases da estrutura em estudo. (Romão 1996)

Deste modo obtêm-se um mapa de densidade eletrônica que pode ser utilizado para construir o modelo 3D da proteína em estudo, que por sucessivos refinamentos irá levar à melhoria das fases estimadas e, conseqüentemente, da densidade eletrônica, culminando assim no modelo final. Ao longo de todo o processo de refinamento vão sendo feitos ajustes do modelo construído à densidade eletrônica, e vários parâmetros podem ser analisados visando validar a estrutura, avaliar a sua qualidade e eliminar possíveis erros, até tornar o modelo o mais próximo da realidade possível, para que este explique corretamente os dados experimentais obtidos, e possa ser depositado na base de dados do *Protein Data Bank* (PDB). (Romão 1996; Wlodawer et al. 2008; Carvalho et al. 2009)



Figura 1.7 – Principais etapas envolvidas no método de Cristalografia de raios-X para determinação de estruturas tridimensionais de macromoléculas. (Adaptado de (Carvalho et al. 2009)).

## 1.2 – Monóxido de carbono e moléculas libertadoras de monóxido de carbono

### 1.2.1 – Monóxido de carbono

O monóxido de carbono (CO) é um gás inodoro e incolor, rotulado negativamente pela sociedade durante décadas como sendo uma molécula tóxica para o ser humano, e poluente para atmosfera, sem qualquer interesse biológico e fisiológico. (Foresti et al. 2008)

A origem do CO deriva de diversos materiais biológicos, nomeadamente aquando uma combustão incompleta daqueles que contêm carbono na sua constituição ocorre, tal como a oxidação do metano e hidrocarbonetos, tanto por radicais hidroxilo, como por ozono. Também a produção de CO pode derivar de atividades diárias da sociedade, tais como o uso de motores de combustão interna, de aparelhos alimentados a gás, óleo, madeira, carvão, e ainda o consumo de tabaco, ou uso de fogões inadequadamente ventilados. (Wu & Wang 2005)



A razão pela qual o CO se encontra negativamente categorizado deve-se, essencialmente, à sua capacidade de se ligar fortemente à hemoglobina (Hb), podendo culminar em asfixia. (Wu & Wang 2005; Foresti et al. 2008)

Tanto o oxigénio ( $O_2$ ) como o CO competem pela ligação ao ferro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) do grupo hemo da hemoglobina (Hb), e dado que esta proteína possui maior afinidade para o CO do que para o oxigénio, este liga-se preferencialmente à Hb originando o complexo carboxihemoglobina (COHb). Tal resulta na diminuição da oxigenação do sangue, e conseqüentemente na hipoxia nos tecidos, que por sua vez, pode levar a graves sintomas, e dependendo dos tecidos onde ocorra a privação de oxigénio, pode inclusive levar à morte. (Foresti et al. 2008; Bauer & Pannen 2009)

Contudo, a ligação do monóxido de carbono à hemoglobina é reversível, e o tratamento para o envenenamento com CO pode ser levado a cabo através da administração de oxigénio, substituindo assim o CO ligado ao grupo hemo, revertendo o equilíbrio da reação para a formação da oxihemoglobina ( $O_2Hb$ ), como descrito na seguinte equação (Ryter & Otterbein 2004; Mannaioni et al. 2006):



No entanto, apesar das suas propriedades tóxicas, dado que os humanos apresentam um certo nível de tolerância ao CO, e uma vez descoberto que este gás é continuamente produzido em pequenas quantidades nos tecidos – regulando vários processos fisiológicos, e até exercendo efeitos benéficos contra condições patológicas – torna-se necessário compreender melhor o papel desempenhado pelo CO, de forma a abrir novos horizontes às suas possíveis aplicações como agente terapêutico. (Long et al. 2014)

#### **1.2.1.1 – Produção endógena do CO**

O monóxido de carbono não só é produzido exogenamente, como referido anteriormente, como também é produzido de maneira endógena em quase todos os organismos vivos. No ser humano, a maior parte do CO produzido endogenamente é levado a cabo pelas enzimas oxigenases do hemo (HO) – oxigenase do hemo-1 (HO-1), oxigenase do hemo-2 (HO-2) e oxigenase do hemo-3 (HO-3) – no entanto, apenas as duas primeiras aparentam ser enzimas ativas (Wu & Wang 2005; Romão et al. 2012). De um modo geral, as principais diferenças das três isorformas da HO recaem no facto de a HO-1 ter como principal função mecanismos de proteção celular e uma expressão indutível, enquanto a HO-2 está associada a mecanismos de regulação envolvendo o grupo hemo, sendo expressa constitutivamente, e a HO-3 está relacionada com mecanismos de reconhecimento deste mesmo grupo. (Gibbons & Farrugia 2004) A HO-1 necessita da presença de NADPH e de oxigénio para, a partir do grupo hemo, poder sintetizar CO,  $Fe^{2+}$  e de biliverdina (que é posteriormente convertida a bilirrubina) (Figura 1.9). (Dulak & Józkwicz 2003; Motterlini & Otterbein 2010; Motterlini et al. 2005)

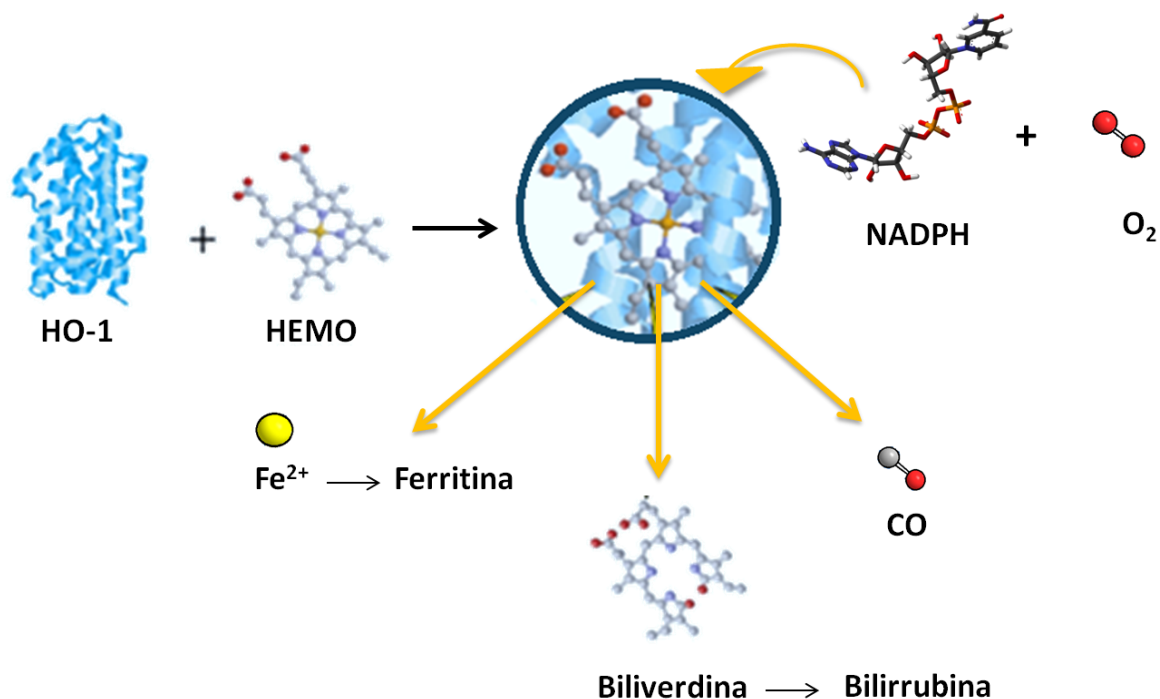


Figura 1.8 – Representação da interação entre a HO-1 com o grupo hemo que resulta na formação dos três produtos Fe<sup>2+</sup>, biliverdina e CO, na presença de NADPH e O<sub>2</sub>. Também os produtos secundários se encontram ilustrados, sendo que a biliverdina é convertida a bilirrubina, e Fe<sup>2+</sup> estimula a síntese de Ferritina. NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina. (Adaptado de (Otterbein et al. 2003)).

A HO-1 desempenha um papel fundamental no metabolismo do hemo, garantindo os seus níveis adequados, e conseqüentemente a manutenção da homeostase (Wu & Wang 2005; Marques et al. 2012). De facto, muitos dos efeitos benéficos associados à HO-1 ocorrem essencialmente devido aos seus metabolitos, principalmente o CO, havendo estudos que demonstram que aquando a presença de agentes patológicos que levem à isquemia e hipoxia nos tecidos, ou que induzam uma desregulação redox (originando situações de *stress* oxidativo nas células), há uma ativação da HO-1, que por sua vez irá exercer uma atividade citóprotetora e anti-oxidante, de modo a contrabalançar os efeitos induzidos (Motterlini et al. 2005; Vera et al. 2007). É hoje em dia sabido que a transcrição de vários fatores reguladores, por parte das suas vias sinalizadoras, ocorre por mediação da expressão de HO-1, de modo a que o a HO-1 em conjunto com CO, possa atuar em resposta a vários estímulos induzidos. (Wegiel et al. 2008)

### 1.2.1.2 – Importância biológica e mecanismos de ação do CO

O CO originado pela HO atua como uma molécula sinalizadora, estando o seu potencial terapêutico associado às propriedades anti-hipertensivas, vasodilatadoras, anti-inflamatórias, anti-proliferativas e anti-apoptóticas que confere às células – sendo as últimas três as mais abordadas e exploradas (Figura 1.9) (Motterlini et al. 2005; Bauer & Pannen 2009; Kim et al. 2011). Recentemente, foi ainda evidenciado o potencial anti-bacteriano do CO. (Singh et al. 2014; Zacharia et al. 2013)

É ainda um facto que o CO consegue evitar os efeitos nefastos de diversos agentes indutores de situações de *stress* nas células (que podem originar danos nos tecidos e órgãos), tais como hiperóxia

e endotoxemia nos tecidos, ou até doenças como aterosclerose, ao exercer uma ação citoprotetora nas células, levando à manutenção do bom funcionamento das mesmas – este efeito é conseguido através da inibição de citocinas pró-inflamatórias, prevenção da vasoconstrição, diminuição da agregação plaquetária, e inibição do processo de apoptose. (Ryter & Otterbein 2004; Nakao et al. 2006)

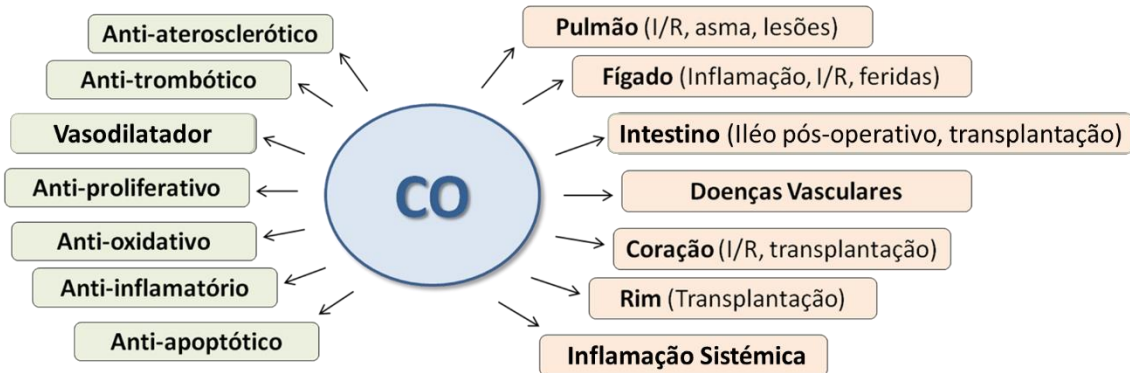


Figura 1.9 – Esquemática dos efeitos biológicos e potenciais aplicações terapêuticas do CO. (Adaptado de (Bauer & Pannen 2009)).

Outro ponto a favor do monóxido de carbono, deriva do facto de este se encontrar agrupado com outros gases como o óxido nítrico (NO) e o sulfeto de hidrogénio (H<sub>2</sub>S), designados como um conjunto de mediadores biológicos, aos quais se encontram associadas várias funções terapêuticas. Enquanto o NO promove a vasodilatação e apresenta propriedades pró e anti-inflamatórias (em função das espécies de NO que são geradas para regular a apoptose de células que se encontram sob uma resposta inflamatória), o H<sub>2</sub>S demonstra propriedades de sinalização nos sistemas nervoso e circulatório, vasodilatadoras, anti-inflamatórias, e ainda a capacidade de promover a reparação e manutenção do funcionamento de tecidos lesados. (Wallace et al. 2015)

Esta corrente de informação vem assim mudar o pensamento que perdurava na população em geral, afirmando única e exclusivamente efeitos tóxicos do CO: de acordo com a concentração administrada e o tempo de exposição, o CO pode desempenhar um papel benéfico em vez de tóxico, sendo que em doses inferiores a 10 ppm este apresenta ser assintomático, para 10-500 ppm, distribuídos por longos períodos de tempo, este é considerado ter um efeito terapêutico, e apenas a partir dos 10000 ppm, é considerado letal. (Weiss 2003; Bauer & Pannen 2009; Romão et al. 2012)

Apesar de ainda não se encontrarem completamente esclarecidos os mecanismos celulares e a complexa maneira através da qual o CO atua, é sabido que as cascatas celulares responsáveis pelos efeitos do CO envolvem diferentes e variados efetores, em diferentes células e tecidos. Entre eles, destacam-se a guanilato ciclase (GC – via sGC/cGMP), que se encontra responsável pela regulação de efeitos de vasodilatação, neurotransmissão, proliferação celular, e outras ações benéficas associadas a eventos de isquémia/reperfusão (I/R) em vários órgãos; os canais de potássio ativados por cálcio que também se encontram estabelecidos como um meio através do qual o CO exerce alguns dos seus efeitos biológicos, tais como vasodilatação; e por fim, a via de sinalização MAPK, onde o CO parece atuar através da ativação de p38, e diminuição da fosforilação da proteína cinase NH<sub>2</sub>-terminal

c-Jun (JNK) e da proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK), sendo no entanto dependente dos estímulos induzidos, e do tipo de células onde ocorrem, os efeitos que o CO exerce. (Foresti et al. 2008; Wallace et al. 2015)

A via de sinalização MAPK, encontra-se associada à regulação de vários processos celulares, que englobam a proliferação celular, diferenciação e apoptose, bem como a transdução de sinal em situações de *stress* oxidativo (induzido pelas ROS) e de inflamação nas células. Ao que tudo indica, o CO consegue modular o funcionamento das vias MAPK, conferindo-lhes uma maior ou menor atividade. Este modo de ação origina os efeitos anti-inflamatórios, anti-apoptóticos e anti-proliferativos CO. (Wu & Wang 2005; Ryter et al. 2006; Ghosh et al. 2010)

Existem ainda autores que evidenciam o uso da via de sinalização MAPK, por ativação de p38, como o principal mecanismo através do qual o CO exerce um efeito citóprotetor e anti-oxidante, bem como prevenção de eventos de I/R testados por transplantes de pulmão em ratos. (Li et al. 2013)

Relativamente à via de sinalização sGC/cGMP, a ativação da proteína sGC por parte do CO, leva ao aumento dos níveis de expressão de guanosina monofostato cíclica (cGMP), o que por sua vez afeta funções celulares, tais como o funcionamento de canais de iões, fosfodiesterases e proteínas cinases, considerando-se ainda que o uso desta via por parte do CO poderá também estar relacionada com os efeitos anti-inflamatórios do CO (Ghosh et al. 2010; Li et al. 2013). Também a ativação de proteínas cinases dependentes de cGMP (PKG), como efeito derivado do CO, provou-se levar ao aumento da vasodilatação e inibição da agregação plaquetária das células do musculo liso. (Nakao et al. 2006)

Deste modo o CO passa a tornar-se uma molécula com efeitos protetores e homeostáticos, exibindo importantes propriedades sinalizadoras em situações tanto fisiológicas, como patológicas, descredibilizando assim a sua antiga conotação negativa. (Li et al. 2013)

#### **1.2.1.2.1 – Efeitos anti-bacterianos do CO**

Recentemente, foi descoberto que o CO poder induzir um efeito anti-bacteriano, nomeadamente em *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), a bactéria responsável pela doença infecciosa tuberculose, que leva à morte de cerca de 8 milhões a 2 milhões de pessoas por ano. (Singh et al. 2014)

Contrariamente a outras bactérias, esta micobactéria apresenta resistência a CO, derivada da adaptação evolucionária da *M. tuberculosis*, de modo a garantir a sua sobrevivência. (Zacharia et al. 2013)

O facto da expressão de HO-1 ser induzida durante a infeção com *M. tuberculosis* e da micobactéria ser resistente ao CO, levou autores a sugerir que a *M. tuberculosis* poderia possuir um gene resistente a CO. (Kumar et al. 2008; Shiloh et al. 2008)

Como tal, através de estudos realizados *in vivo* em ratos, foi identificada a presença de um gene resistente a CO, o *cor*, no genoma de *M. tuberculosis*, que não só permite à *M. tuberculosis* sobreviver aquando a administração de CO, como também consegue exercer um efeito protetor na bactéria *E.*

*coli*, contra à toxicidade do CO (Silva-Gomes et al. 2013; Zacharia et al. 2013) – no entanto, o mecanismo biológico através do qual tal acontece é ainda desconhecido.

Também a HO-1 aparenta exercer um papel crucial na infecção por *M. tuberculosis*, uma vez demonstrado que ratos exibindo deficiência desta enzima se encontram mais vulneráveis a serem infectados pela doença. (Singh et al. 2014)

O efeito anti-bacteriano derivado do CO acredita-se estar relacionado com a toxicidade que este exerce, em função da concentração a que é feita a exposição da *M. tuberculosis* – a elevadas concentrações, o CO apresenta efeitos tóxicos para a micobactéria. (Zacharia et al. 2013)

Estudos adicionais sugerem que o gene funciona de modo a restaurar a homeostase da micobactéria, aquando a administração de CO: o tratamento de um mutante do gene *cor* de *M. tuberculosis* com CO levou a uma redução do metabolismo da micobactéria devido a um excessivo *stress* oxidativo induzido pelo CO, culminando na morte da micobactéria; ao passo que o *wild-type* de *M. tuberculosis* sujeito ao mesmo tratamento, apenas apresentou o mesmo comportamento durante 5 dias após administração de CO, tendo contudo, conseguido adaptar-se e recuperar. (Singh et al. 2009; Zacharia et al. 2013)

Assim sendo, uma vez que a produção de CO aquando a infecção pode levar a uma atividade inata imune, e até atuar diretamente como bactericida, o CO é atualmente considerado um potencial agente terapêutico no combate à *M. tuberculosis*, encontrando-se em progresso mais estudos de modo a se poder elucidar, e tirar partido deste efeito.

#### **1.2.1.2.2 – Efeitos anti-proliferativos e anti-apoptóticos do CO**

Ambos os efeitos anti-proliferativos e anti-apoptóticos do CO podem estar diretamente associados à expressão do fator induzido por hipoxia (HIF1 $\alpha$ ), que desempenha um papel importante na regulação de muitas funções celulares, tais como proliferação, apoptose, ciclo celular, e até processos de inflamação. O CO induz o aumento da expressão de HIF1 $\alpha$ , que por sua vez induz a expressão de HO-1 como resposta a estímulos negativos, aumentando a produção de CO, indiciando assim a existência de um ciclo de respostas celulares exercendo a manutenção da homeostase das células entre CO  $\rightarrow$  HIF1 $\alpha$   $\rightarrow$  HO-1  $\rightarrow$  CO. (Wegiel et al. 2008)

A proliferação celular é o processo responsável pela reprodução de todos os organismos. A desregulação deste processo (tais como erros durante a transcrição e síntese do DNA, ou a desregulação do ciclo celular) pode levar a uma produção descontrolada e em demasia das células. Eventos deste género podem culminar no estreitamento dos vasos sanguíneos (devido ao crescimento anormal das células do músculo liso vascular) e, em casos mais graves, no aparecimento de cancro. (Ryter et al. 2007)

Ao que tudo indica, o CO inibe a proliferação celular em diversos tipos de células, nomeadamente células tumorais e células do músculo liso vascular, através da ativação de p38 e aumento da produção de cGMP, conjugando em simultâneo ambas as vias MAPK e sGC/cGMP e a expressão da proteína p21<sup>cip1</sup> (uma proteína que inibe a progressão do ciclo celular) (Otterbein et al. 2003; Nakao et al. 2006;

Ghosh et al. 2010). Também a inibição da proliferação de linfócitos T é induzida pelo CO, conjuntamente com uma diminuição da expressão da citocina interleucina-2 (IL-2), através da inibição de ERK, ao aumentar a expressão da p21<sup>cip1</sup> e inibir a atividade das caspases. (Nakao et al. 2006; Wegiel et al. 2008)

No entanto, em estudos recorrendo a ratos como modelo de lesões endoteliais causadas por angioplastia, foi demonstrado que o CO induz uma maior rapidez na proliferação das células endoteliais, ajudando assim na recuperação da lesão. (Romão et al. 2012)

Já a apoptose é um mecanismo inato da defesa do organismo, sendo conhecida como "morte celular programada", que ocorre de forma ordenada, estando relacionada com a manutenção da homeostase e a regulação fisiológica dos tecidos, podendo também ser causada por um estímulo patológico (como uma lesão no DNA, ou em células) (Evangelou 2002; Ghosh et al. 2010). Quando a desregulação da apoptose contraria a homeostase, tornando-se perigosa para o organismo, é necessário controlá-la.

Um exemplo vivo do efeito negativo da apoptose reside na apoptose dos fibroblastos e das células dos endotélios dos vasos sanguíneos (aquando cirurgias médicas de transplantação, que culminam na rejeição dos órgãos transplantados). O CO consegue contrariar estes efeitos, atuando essencialmente através da modulação da via p38, de modo a que haja uma diminuição da expressão do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), e consequentemente, impedir a apoptose das células em questão (Nakao et al. 2006; Ryter et al. 2007; Bauer & Pannen 2009). Especificamente no caso das células dos endotélios de vasos sanguíneos, a integridade das células pode ser mantida, aquando a transplantação de órgãos, por modulação de ambas as vias p38 e PI3K/Akt (fosfatidilinositol-3-cinase/proteína cinase B), que irá ativar o fator transdutor de sinal e ativador de transcrição-3 (STAT3)) de modo a que haja também uma diminuição da atividade das caspases, levando ao sucesso dos procedimentos de transplantação. (Sato et al. 2001; Nakao et al. 2006)

Também recorrendo ao uso da via de sinalização MAPK, outros estudos revelam a existência de efeitos anti-apoptóticos do CO, tais como a inibição da ativação da ERK 1 e 2, culminando numa diminuição da ativação de caspases (Ghosh et al. 2010); a diminuição da apoptose de células que se encontram em *stress* hiperóxico (evento associado do excesso de produção de ROS), onde o CO inibiu a produção de ROS antagonizando complexos sinalizadores dependentes de ROS, nas membranas plasmáticas das células (Wang et al. 2007); e ainda um efeito semelhante em hepatócitos primários de ratos foi observado, derivado da diminuição da atividade de JNK. (Li et al. 2013)

Não obstante, o CO evidencia ainda efeitos anti-apoptóticos levados a cabo através da via de sinalização cGC/cCMP, onde ao induzir a inibição do citocromo C (essencial para indução de apoptose), este consegue levar à inibição da expressão de proteínas pró-apoptóticas. (Nakao et al. 2006)

### 1.2.1.2.3 – Efeitos anti-inflamatórios do CO

A inflamação é uma resposta do organismo a uma lesão ou infecção nos tecidos, e embora exista como mecanismo de defesa inata, a sua persistência encontra-se associado ao desenvolvimento de várias doenças designadas doenças inflamatórias crônicas, como por exemplo a aterosclerose. (Idriss et al. 2008)

Recentemente foi provado que os efeitos anti-inflamatórios derivam essencialmente da ativação de p38, apontando a via MAPK como sendo a via de sinalização crucial neste efeito benéfico do CO (Li et al. 2013). Esta molécula consegue, através da via p38, levar à diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos (tais como a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e a quimiocina motivo C-C ligando 3 (CCL3), e o mais importante, o TNF- $\alpha$ )), bem como ao aumento da produção da citocina anti-inflamatória interleucina-10 (IL-10) – contribuindo assim para a diminuição dos processos inflamatórios nas células. (Ryter et al. 2007; Bilban et al. 2008; Bauer & Pannen 2009)

Também um efeito semelhante por parte do CO, envolvendo a expressão de outras interleucinas (nomeadamente uma diminuição da expressão de IL-2 e interleucina-6 (IL-6)) foi observado em estudos *in vivo*, onde a inflamação foi causada por eventos de I/R, transplantação de órgãos e por lipossacáridos (LPS) (Nakao et al. 2006; Foresti et al. 2008).

Para além dos efeitos enumerados, outros estudos indicam ainda a dependência da inibição da ativação do fator de transcrição nuclear-KB (NFkB) e fosforilação do seu inibidor IKB- $\alpha$ , levando à diminuição de citocinas pró-inflamatórias, como um passo crucial para os efeitos anti-inflamatórios do CO. Inclusive, estudos recentes em modelos de artrite induzida por colagénio, em ratos murinos, afirmam que o CO consegue inibir o recetor ativador de NFkB, RANKL (responsável pela ativação de vias e fatores de transcrição que estimulam a osteoclastogénese), culminando assim num efeito anti-inflamatório em doenças ósseas, reduzindo a erosão dos mesmos. (Tseng et al. 2015)

## 1.2.2 – CORMs: moléculas libertadoras de CO como agentes terapêuticos

Devido à dualidade toxicidade vs ação terapêutica do CO, para o seu uso como um agente terapêutico, torna-se indispensável definir o modo correto de administração do CO, tendo sempre em conta que no caso de algum tipo de desregulação nas doses aplicadas, a ação terapêutica poderá ser rapidamente substituída por um efeito tóxico do mesmo. (Szabo 2010)

Uma opção a explorar seria estimular a HO de modo a produzir maiores quantidades de CO, quer por manipulação genética, quer através do uso de substâncias que pudessem ativar a enzima. Contudo, haveria sempre a contrapartida de que a ação da HO faz aumentar de igual forma os níveis de ferro e de bilirrubina, podendo levar a que estes atinjam valores acima do suposto, tal como o próprio CO. Como tal, torna-se mais fácil controlar a dosagem de CO administrada, quando este é administrado sob a forma de doses controladas e específicas pela mão humana, em vez de estimular a sua produção endógena. (Ryter et al. 2006)

A inalação de CO, devido ao seu comportamento fisiológico, torna-se uma fraca opção: a entrega de um modo seguro do CO é um processo complicado, uma vez que a Hb dos glóbulos vermelhos constitui ela própria uma barreira que impede o CO de alcançar os tecidos lesados a partir dos pulmões – para além de que pode culminar num efeito tóxico que vai para além da hipoxia dos tecidos. (Romão et al. 2012)

Deste modo surgem as moléculas libertadoras de monóxido de carbono (CORMs) como uma aposta promissora, capaz de ultrapassar com sucesso as limitações abordadas (Figura 1.10) (Romão et al. 2012). Os CORMs são moléculas que possuem CO na sua composição, conseguindo transportá-las ao longo da corrente sanguínea, e libertá-las nas células ou tecidos afetados em quantidades controladas, visando assim exercer efeitos farmacológicos. (Motterlini et al. 2005; Motterlini & Otterbein 2010; T Santos-Silva et al. 2011)

Tais moléculas enquadram-se na necessidade de controlar o CO administrado, controlo esse obtido através do *design* seletivo destes fármacos. Comparativamente à inalação de CO, os CORMs evitam que o CO esteja livre na circulação sanguínea, não afetando assim o transporte de oxigénio, evitando possíveis ligações à hemoglobina, e minimizando os riscos de toxicidade associados a este gás – apenas CORMs que demonstrem uma eficácia terapêutica sem no entanto exceder níveis de 10% de COHb são aceites como agentes terapêuticos seguros. (Motterlini et al. 2005; Romão et al. 2012)

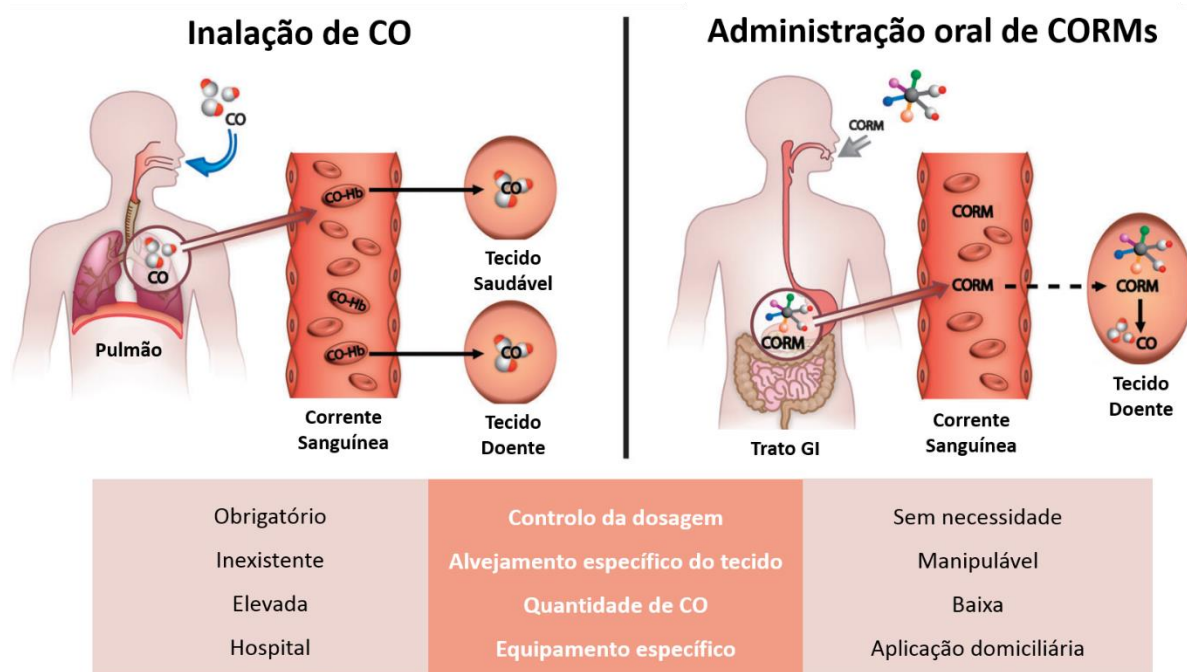


Figura 1.10 – Representação das principais diferenças entre a administração de CO por inalação e por via oral através de CORMs, bem como as vantagens e desvantagens de ambas. (Adaptado de (Romão et al. 2012)).

Aquando o *design* dos CORMs, deve ser considerada a estabilidade dos mesmos, a capacidade que estes devem possuir de responder a diferentes estímulos químicos ou enzimáticos para sua ativação, e consequente libertação do CO nas zonas alvo lesadas (T Santos-Silva et al. 2011). Deste modo, os CORMs devem ser estáveis o suficiente para permitir o transporte de CO ao longo da corrente



sanguínea, sem que no entanto esta estabilidade impossibilite ou dificulte a liberação de CO, inviabilizando assim a ação terapêutica do CORM. (Romão et al. 2012)

Para além de todos estes fatores, é necessário ter ainda em conta a reatividade química do CO (e uma vez que o seu transporte é feito essencialmente através da Hb, por ligação do CO ao ferro do grupo hemo, ao formar um complexo organometálico), é necessário encontrar compostos que possam funcionar como transportadores do CO na corrente sanguínea sob a forma de CORMs. Com este objetivo, os metais de transição foram identificados como os melhores componentes para integrar o núcleo dos CORMs, responsabilizando-se pela liberação e entrega do CO *in vivo*. Assim, desenvolveram-se os complexos metálicos de carbonilo (MCCs) compostos por um metal de transição, coordenado com grupos carbonilo (CO) e outros ligandos (Figura 1.11). (Motterlini et al. 2005; Romão et al. 2012)

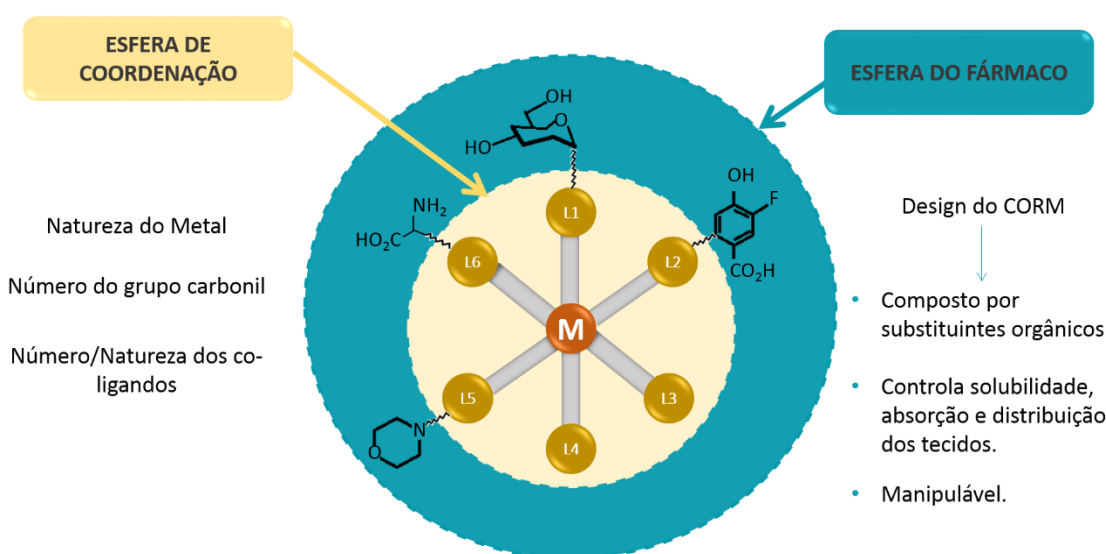


Figura 1.11 – Representação do *design* de um modelo de CORM. M: qualquer metal que integre o centro metálico; L1-L6: os vários ligandos coordenados. (Adaptado de (Romão et al. 2012)).

De modo a que os MCCs possam ser usados como CORMs, estes devem ser solúveis e estáveis em soluções aquosas (bem como estáveis o suficiente para armazenamento em condições ambientais), sobreviver à circulação na corrente sanguínea, assegurando que o CORM atinge e liberta o CO de modo eficaz nos tecidos lesados alvo, evitando ao mesmo tempo interferir com o transporte oxigénio no sangue. É também necessário garantir a ausência de toxicidade do MCC (tanto antes, como após a liberação do CO) para certificar que a sua administração não interfere com a manutenção da homeostase do ser humano, através da produção de metabolitos tóxicos. A capacidade dos MCCs de se decompor *in vivo* para libertar eficientemente o CO é um fator importante e fácil de manipular, devido às características químicas dos MCCs. A decomposição dos MCCs para liberação do CO pode ser levada a cabo por diversos estímulos, tais como ativação fotoquímica, dissociação térmica, oxidação induzida pela interação com O<sub>2</sub>, um pH do meio específico, decomposição por enzimas ou proteínas, ou até por transferência direta do CO do CORM para uma proteína contendo um grupo hemo. Os dois primeiros estímulos são atualmente os mais usados e eficientes. (Alberto & Motterlini 2007; Romão et al. 2012)

Uma vez que o desenvolvimento eficaz de um CORM é um processo complexo, englobando várias etapas, também a natureza e a estabilidade cinética dos ligandos coordenados escolhidos surge como algo importante para o *design* eficiente do CORM. Os ligandos interferem com a estabilidade química dos MCCs, influenciando a sua suscetibilidade à oxidação (que conseqüentemente pode levar à sua dissociação, libertando indesejadamente o CO), e com a estabilidade da coordenação ao centro metálico, que controla a prevenção de uma substituição do CO, ou uma libertação precoce do mesmo – deste modo é possível afirmar que farmacologicamente, os ligandos são responsáveis por grande parte do controlo da libertação do CO. (Romão et al. 2012)

Diferentes CORMs têm sido testados, tanto em ensaios *in vitro*, como em modelos *in vivo*, revelando efeitos vasodilatadores, anti-inflamatórios e anti-isquémicos – resultados positivos que se acreditam derivar da ação do CO. (Long et al. 2014)

O primeiro CORM hidrossolúvel a ser sintetizado e caracterizado foi o cloro tricarbonilo (glicinato) de ruténio (II) –  $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glicinato})]$ , designado por CORM-3, e principal foco deste trabalho no que toca ao estudo dos potenciais efeitos terapêuticos do CO.

Até há pouco tempo acreditava-se que esta molécula apresentava uma rápida libertação do CO, com um tempo de meia vida de aproximadamente 1 minuto, dada a eficaz produção de carboximioglobina em condições redutoras. Em 2012, Mclean e colaboradores vieram demonstrar que o agente redutor utilizado durante os ensaios, sulfóxido de dimetilo, promovia a libertação de CO, influenciando os resultados obtidos. (McLean et al. 2012).

Hoje em dia existem outros métodos para a deteção de libertação de CO por parte dos CORMs, recorrendo a sondas de fluorescência com biossensores ou complexos organometálicos (Heinemann et al. 2014). Baseado nestes novos métodos verificou-se que o CORM-3 liberta CO em ensaios biológicos *in vitro*, tendo um papel importante na regulação de agentes inflamatórios (Chaves-Ferreira et al 2015). Foi recentemente provado que esta molécula pode também libertar CO<sub>2</sub>: tal observação é consistente com o facto de que quando CORM-3 é dissolvido numa solução tampão aquosa, no interior de um frasco selado, o CO<sub>2</sub> pode ser detetado por cromatografia gasosa (CG). O processo responsável pela formação de CO<sub>2</sub> baseia-se na reação de transição de água-gás, onde a água ataca o CO, resultando na formação e libertação de CO<sub>2</sub> (Santos et al. 2012; Seixas et al. 2015). Para além disto, provou-se ainda que o CORM-3 se torna clinicamente inviável à medida que o tempo passa após a sua administração, o que diminui a sua eficácia como agente terapêutico. (Seixas et al. 2015)

Apesar de ainda não ser claro o mecanismo de ação do CORM-3 ou dos CORMs em geral, a sua ação é consistente com a administração de CO gasoso. Entre vários ensaios, foi já demonstrado que o CORM-3 exhibe igualmente efeitos anti-inflamatórios e de proteção cardíaca (por exemplo, a nível de lesões de I/R e de transplantação, insuficiência cardíaca e prevenção de enfartes) (Motterlini et al. 2004; Obame et al. 2007; Lo Iacono et al. 2011), bem como de vasodilatação apenas alguns momentos após a sua administração (Motterlini et al. 2005; Motterlini 2007). Estudos levados a cabo por Song et al. usando transplantes de aortas em ratos, demonstraram também que o CORM-3 exerce um efeito

protetor nas células endoteliais, limitando assim a perda da função vascular e inibindo a hiperplasia, oferecendo melhores abordagens para a preservação de órgãos (Song et al. 2008). Também foram demonstrados efeitos *in vivo* do CORM-3, aquando administrado em ratos usados como modelo de artrite induzida por colagénio do tipo II, e artrite crónica genética, resultando esta administração numa diminuição da resposta inflamatória. (Romão et al. 2012)

Dentro dos efeitos terapêuticos do CORM-3, recentes estudos apontam ainda para o facto de este conseguir acumular-se de modo eficiente na superfície das células, movendo-se de célula para célula através das proteínas que os transportam no meio intercelular – tal permite que o CORM-3 se mantenha estável, não se decompondo, e deixando o CO completamente disponível para as suas células alvo. (Seixas et al. 2015)

Outra mais-valia reside na recente descoberta de que a matriz do metal envolvido na estrutura do CORM-3 potencia também os seus efeitos terapêuticos. A matriz ao ser internalizada nas células, leva a que haja uma maior quantidade de CO entregue às mesmas, difundindo de forma mais lenta para o citosol. Consequentemente, tal permite uma entrega de CO em quantidades superiores à que geralmente é obtida por CO dissolvido, uma vez que este na forma livre se difunde muito mais rapidamente através das membranas (Figura 1.12). (Wang et al. 2012; Seixas et al. 2015)

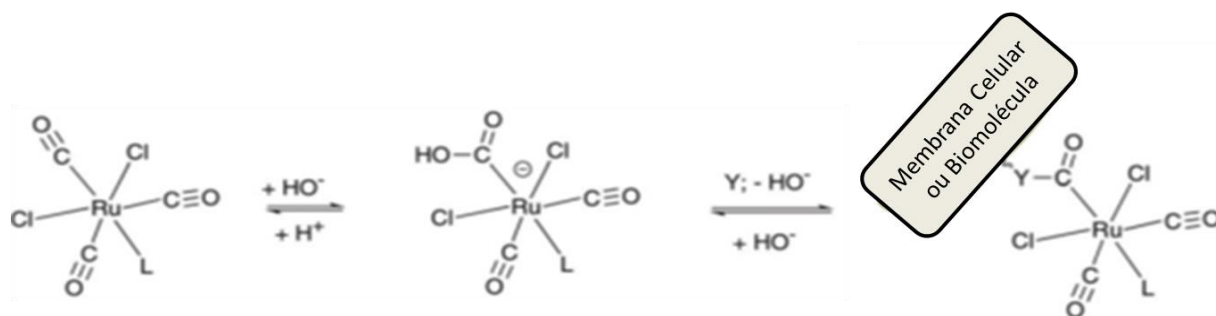


Figura 1.12 – Representação do mecanismo proposto por Seixas et al. para descrever a interação de CORM-3 com células ou biomoléculas. (Adaptado de (Seixas et al. 2015)).

De um modo geral, o CORM-3 origina resultados terapêuticos em estudos realizados *in vivo* em doenças que afetam diferentes órgãos, tais como articulações, coração e artérias. Esta falta de seletividade poderá ser compatível com o mecanismo de distribuição baseado no transporte por diferentes proteínas do plasma, ao longo da corrente sanguínea – contudo, prova que a molécula consegue libertar CO diretamente nos tecidos ou órgãos. (Seixas et al. 2015)

A caracterização estrutural da interação do CORM-3, bem como de outros CORMs, com proteínas permitiu identificar a formação de aductos de fórmula  $[\text{RuL}_m(\text{CO})_n]^{2+}$ -proteínas, que visam ser estáveis ao longo do tempo. (Teresa Santos-Silva et al. 2011; T Santos-Silva et al. 2011; Santos et al. 2012; Seixas et al. 2015; Chaves-Ferreira et al. 2015)

A caracterização dos adutos foi feita utilizando a proteína HEWL – uma proteína modelo para caracterizar a interação com eventuais proteínas plasmáticas – onde se confirmou a interação do complexo pela ligação do átomo de ruténio à superfície da proteína, sob a forma de  $\text{Ru}(\text{CO})_x$ -HEWL,

ligando-se não só aos resíduos de His15, como também aos resíduos de Asp 101, Asp18 e Asp119. Os dados sugerem ainda que esta ligação promove a libertação mais rápida de CO – de facto, nos vários complexos testados, verifica-se que a após a ligação, em todos os complexos testados, há a perda de uma ou duas moléculas de CO (permanecendo as restantes ligadas ao complexo), bem como dos restantes ligandos, que são substituídos por moléculas de água (Santos et al. 2012; Seixas et al. 2015; Chaves-Ferreira et al. 2015). Prevê-se então que estes complexos, e os seus mecanismos de ação, sejam os responsáveis pela libertação de CO tanto *in vitro*, como *in vivo*. (Chaves-Ferreira et al. 2015)

Recentemente, Chaves-Ferreira e colaboradores provaram que o CO libertado pelo complexo sintético com albumina de soro bovino (BSA), BSA–RuII(CO)<sub>2</sub>, em linhas celulares tumorais HeLA (linhagem celular de carcinoma cervical epitelial humana) e Caco-2 (linhagem celular de adenocarcinoma coloretal epitelial humana), consegue inibir os níveis de expressão de respostas pró-inflamatórias (tais como o TNF- $\alpha$ , e a citocina IL-6), bem como a citocina anti-inflamatória IL-10.

Suportando a hipótese de que as proteínas do plasma conseguem atuar como transportadoras de CO após a administração *in vivo* de CORM-3, e recorrendo novamente ao complexo sintético BSA–RuII(CO)<sub>2</sub> em ratos CT26 (linhagem celular de carcinoma do colón), os autores provam ainda que o complexo consegue libertar e acumular CO seletivamente no tumor do animal. Estes resultados vêm não só demonstrar como a administração de CORM-3 liberta CO *in vivo*, como também propõem o uso de complexos formados entre CORM-3 e proteínas como alternativas viáveis e seguras para a libertação controlada de CO como agente terapêutico. (Chaves-Ferreira et al. 2015)

Contudo, apesar das diversas eficácias terapêuticas que o CORM-3 tem vindo a demonstrar aquando aplicado a estudos *in vivo*, a sua falta de estabilidade em meios biológicos, bem como a sua falta de seletividade, culminam na ausência de um perfil farmacocinético bem delineado, impedindo assim que o composto possa ser considerado um potencial fármaco – no entanto, este torna-se um ótimo candidato para ser usado como modelo de contínuos estudos, visando a construção de novos e melhores CORMs, que possam um dia vir a ser a potentes e eficazes fármacos. (Romão et al. 2012)

### **1.2.3 – Nanopartículas como veículos transportadores de CORMs**

O sucesso farmacológico dos CORMs está dependente de numerosas características. Como já enunciado, características tais como a solubilidade em água, a sua internalização e libertação controlada do CO nos tecidos lesados, bem como a dose de CO administrada, podem ser alcançadas aquando o *design* criterioso do CORM – idealmente o CORM deverá mimetizar a ação da HO-1, libertando pequenas doses de CO nos sítios alvo, levando assim a um perfil seguro, e ausente de toxicidade do CORM. (T Santos-Silva et al. 2011; Romão et al. 2012)

Outras características encontram-se dependentes da escolha do metal de transição e dos seus ligandos, o que irá influenciar a toxicidade e a solubilidade do composto no organismo, bem como o a farmacocinética do composto, que se define como o estudo e caracterização do percurso que este faz

no organismo humano, englobando quatro etapas: a absorção, a biodistribuição, o metabolismo e a excreção (ADME) do composto. (Caldwell et al. 1995)

Uma vez que as proteínas presentes no plasma (destacando-se a albumina e a transferrina) estas estabelecem ligações com os CORMs quando presentes na circulação sanguínea, estas desempenham um papel importante na farmacocinética dos CORMs (Santos-Silva 2011). Contudo, é necessário ter em conta que se esta ligação ocorrer com elevada afinidade, tal poderá ser impeditivo de libertar o composto em concentrações desejadas, resultando numa diminuição da biodisponibilidade e eficiência do CORM. Por outro lado, as proteínas plasmáticas permitem que os CORMs se mantenham estáveis ao longo da corrente sanguínea, impedindo-os de se degradarem, e diminuindo a excreção dos mesmos, reduzindo assim a necessidade de administrar concentrações de CORM demasiado elevadas para exercer o efeito pretendido. (T Santos-Silva et al. 2011; Romão et al. 2012)

Surge então a hipótese de associar as técnicas e potencialidades da Nanotecnologia ao *design* dos CORMs, de modo a ultrapassar as barreiras ainda existentes para eficácia dos mesmos.

### **1.2.3.1 – Nanomedicina**

A nanomedicina define-se como a aplicação da bionanotecnologia à medicina, tendo como objetivo monitorizar *in vivo* e em tempo real os eventos celulares, e alcançar o *targeting* e a libertação eficiente dos fármacos nas células ou tecidos específicos. A nanotecnologia intende o desenvolvimento e aplicação de materiais e ferramentas à nanoescala (numa gama de 1 a 100 nm). A redução de um metal à nanoescala leva ao aparecimento de novas propriedades desse metal, características essas que não são partilhadas pelo metal em si no seu tamanho normal, ou pelos átomos que o formam. Também o aumento do rácio superfície:volume contribui para o aparecimento destas novas propriedades, sendo que nos metais nobres, tais como o ouro (Au), leva a um aumento da absorção na região UV/visível dos seus espetros eletromagnéticos. (Cabral & Baptista 2013)

Os sistemas desenvolvidos com base na bionanotecnologia, dando ênfase às nanopartículas (NPs) de metais nobres, funcionalizadas com outras moléculas, têm vindo a demonstrar-se uma poderosa ferramenta quer no diagnóstico, quer na terapia, providenciando ainda a possibilidade de atuarem como sistemas teranósticos (sistemas que conjugam ambos, realizados em simultâneo). Sendo uma área em constante crescimento e desenvolvimento, estes nanosistemas tiram partido das propriedades das NPs para obtenção de uma melhor penetração e libertação dos fármacos nas células ou tecidos alvo, possibilitando ainda que se siga o seu percurso ao longo da corrente sanguínea, sem no entanto serem detetados pelo sistema imunitário. Como consequência, obtêm-se uma ação terapêutica mais eficiente e controlada, com riscos associados reduzidos quando comparados com as terapias convencionais já existentes. (Conde et al. 2012; Cabral & Baptista 2013; Conde et al. 2014)

Em parte, tal fenómeno deve-se à biocompatibilidade das NPs, que tiram vantagem das condições patológicas e fisiológicas dos tecidos e órgãos danificados, como o seu metabolismo, pH, e permeabilidade, entre outras (Fakruddin et al. 2012). Por outro lado, também as características únicas associadas às NPs de metais nobres, tais como as suas propriedades óticas (sintonizáveis para o

comprimento de onda desejado, em função da sua forma, tamanho, e composição), o elevado rácio superfície:volume, bem como a facilidade de síntese e funcionalização, demonstram-se promissoras para o seu uso em terapias, especialmente, de doenças como o cancro, abrindo caminhos para o desenvolvimento de novas aplicações biomédicas. (Conde et al. 2012; Cabral & Baptista 2013)

Deste modo, a aplicação da nanomedicina parece superar as limitações das abordagens tradicionais, tais como o aumento da entrega controlada de fármacos instáveis, e o *targeting* seletivo, obtendo acesso às células danificadas através da sua capacidade de superar barreiras biológicas e fisiológicas. (Jabir et al. 2012; Conde et al. 2012)

O princípio básico por detrás do *targeting*, aquando o desenvolvimento de um fármaco, é a acumulação do mesmo no tecido danificado: os agentes terapêuticos são retidos, ancorados ou dissolvidos nos sistemas de NPs, e as estratégias específicas para a entrega do fármaco podem ser efetuados tanto por mecanismos passivos, como ativos. Nos mecanismos passivos, os nanosistemas tomam partido do aumento da permeabilidade e retenção (efeito EPR) dos tecidos, levando a uma maior penetração, e uma menor excreção das NPs em circulação no organismo – tal pode acontecer caso as NPs possuam um tamanho inferior ao limite necessário para este efeito (Parveen et al. 2012; Cabral & Baptista 2013). Nos mecanismos ativos os bioconjugados de NPs são direcionados para o local alvo, usando moléculas específicas e seletivas como anticorpos, lipoproteínas, hormonas, moléculas carregadas ou ácidos nucleicos. (Torchilin 2010)

Este tipo de sistemas utilizando NPs apresenta várias vantagens, que não só a obtenção de um *targeting* bem-sucedido, uma vez que as suas características permitem: a) a administração de substâncias tanto hidrofílicas como hidrofóbicas; b) uma diminuição da toxicidade do fármaco usado (uma vez que tanto o tamanho, como a compatibilidade química da superfície da NP desempenham um papel importante na tentativa de evitar que o sistema imunológico seja ativado); e c) a degradação mais lenta do conjugado, culminando no aumento do seu tempo de meia vida e na necessidade de administrar uma menor dose do mesmo. (Martins et al. 2014; Conde et al. 2012)

### **1.2.3.2 – Nanopartículas de ouro (AuNPs)**

As AuNPs são muito utilizadas em sistemas de nanomedicina, e as mais exploradas e desenvolvidas até a data – face a NPs de outros metais nobres, estas destacam-se ao apresentarem uma menor reatividade em sistemas biológicos. (Cabral & Baptista 2013)

Normalmente as AuNPs apresentam-se sob a forma de suspensões coloidais avermelhadas, e as suas excelentes propriedades óticas derivadas da ressonância da plasmónica de superfície localizada (LSPR), fazem com que estas possuam um pico de interação com luz na região UV/visível – propriedades estas, que consoante o tamanho e forma das AuNPs podem ser moduladas, sendo o coeficiente de dispersão de luz negligenciável para partículas de tamanhos entre 10 a 40 nm, mas a sua contribuição aumentada à medida que o tamanho da partícula aumenta também. Como descrito anteriormente, uma das vantagens do aumento do rácio superfície:volume que se observa nas partículas de metais nobres à nanoescala, é o facto de a superfície da NP desempenhar um papel

crucial nas propriedades LSPR e, uma vez que esta deriva da indução de polarização nos elétrons livres das NPs pelos campos elétricos da luz incidente na mesma, a superfície da NP contribui para a alteração das condições das suas fronteiras, possibilitando que a polarização ocorra. (Cabral & Baptista 2013)

Por norma as AuNPs esféricas e monodispersas apresentam uma banda SPR típica, localizada nos 520 nm, que pode oscilar consoante a variação do tamanho das AuNPs, ou em função do índice de refração do meio que as rodeia (Baptista et al. 2008). Também a ausência de monodispersividade das AuNPs, bem como a existência de agregados das mesmas, pode alterar o pico localizado da banda SPR, sendo importante monitorizar a homogeneidade das partículas. (Cabral & Baptista 2013)

Estas propriedades óticas, conjugadas com a sua elevada estabilidade química, a facilidade de funcionalização da sua superfície com outras biomoléculas (visando alcançar o *targeting* específico, ações terapêuticas, ou apenas estabilização das AuNPs) bem como a sua baixa toxicidade e elevada biodisponibilidade, torna as AuNPs veículos estáveis para diversos propósitos biomédicinas, tais como constituir sistemas de entrega de fármacos. (Cabral & Baptista 2013)

O método mais recorrente para sintetizar AuNPs com o tamanho referido é através de uma solução aquosa de ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ), no qual os iões  $\text{Au}^{3+}$  são reduzidos a  $\text{Au}^0$  através da adição de citrato de sódio – o rácio entre citrato:ouro é a chave para a obtenção correta das AuNPs com os tamanhos desejados, para além de que o citrato ajuda a estabilizar a solução coloidal de ouro, prevenindo que estas agreguem. (Ladj et al. 2013)

A funcionalização define-se como a adição de vários tipos de moléculas às AuNPs (tais como PEG, BSA, oligo ou polipéptidos, anticorpos, DNA, RNA, agentes quimioterapêuticos, entre outros) (Tiwari et al. 2011; Conde et al. 2012), e pode ser levada a cabo com relativa facilidade, uma vez que o rácio superfície:volume permite à AuNP ter uma eficiente e elevada capacidade de *loading* (Figura 1.13). Apesar de estas modificações prolongarem a circulação *in vivo* do bioconjugado, levam também a uma alteração na banda localizada SPR das AuNPs, que se reflete numa alteração do pico máximo de absorção para valores mais elevados de comprimento de onda. (Baptista et al. 2008; Conde et al. 2012; Cabral & Baptista 2013)

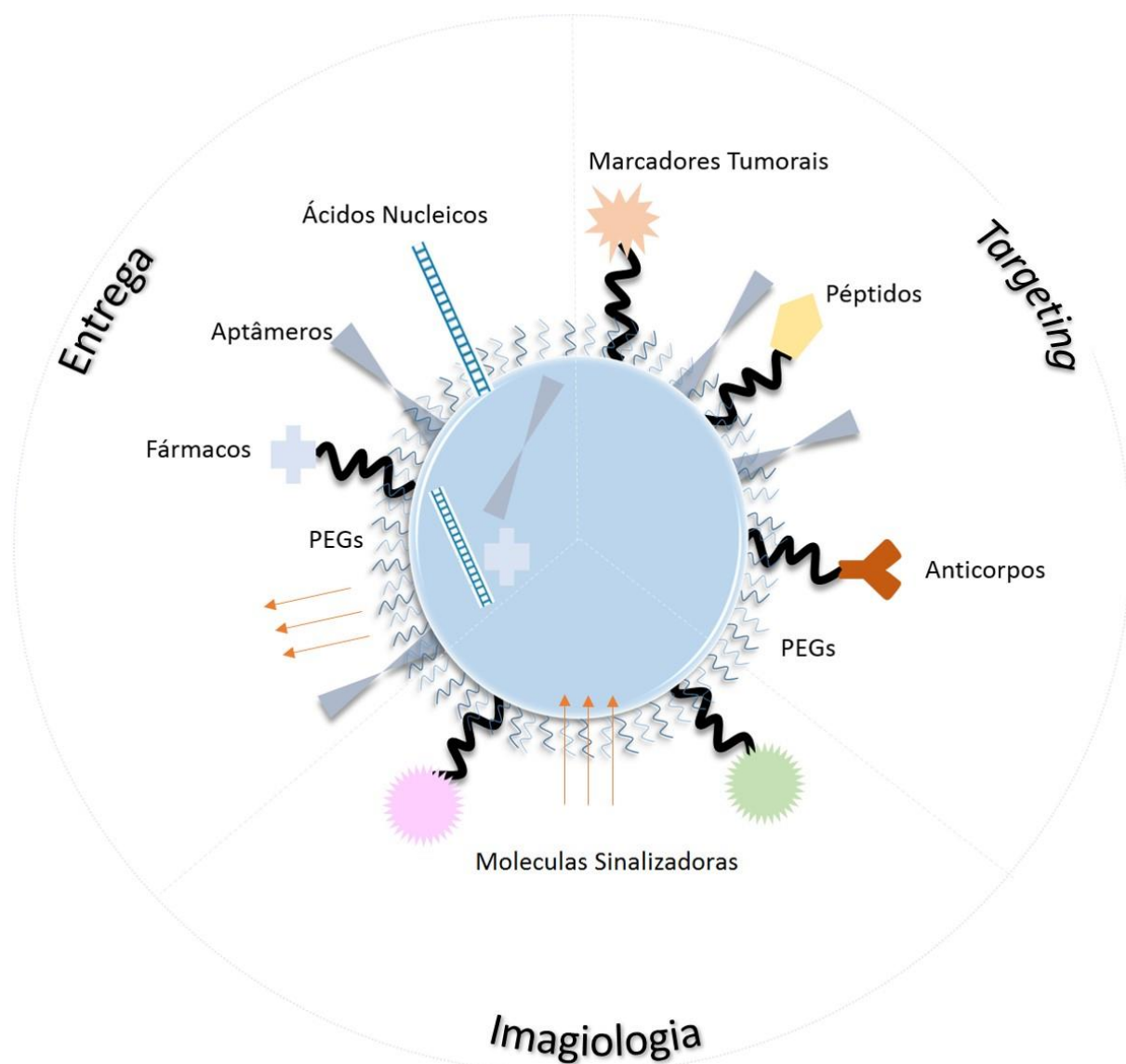


Figura 1.13 – Representação gráfica de exemplos de AuNPs conjugadas com várias biomoléculas, e possíveis aplicações terapêuticas. (Adaptado de (DeLong et al. 2010)).

Como tal, também a funcionalização das AuNPs é um passo crucial para a eficácia das mesmas, especialmente porque influencia a sua biocompatibilidade e estabilidade nos fluidos biológicos. É ainda essencial que as AuNPs preservem as suas propriedades, sendo necessário ter em conta que a adição das variadas moléculas não deve alterar as suas propriedades de reconhecimento biológico (DeLong et al. 2010). Não obstante, é também importante explorar as propriedades da superfície das NPs, tais como a sua carga, tamanho e a densidade, uma vez que estas afetam a ligação entre as NPs e proteínas, bem como o processo de biodistribuição. (Cabral & Baptista 2013)

Existem vários métodos disponíveis para a conjugação de AuNPs com moléculas biofuncionais, sendo o método químico o mais comum. Este tipo de funcionalização consiste na ligação covalente entre grupos amina das biomoléculas com grupos carboxilo ativos. Neste processo utiliza-se o EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil), que é uma carbodimida que catalisa a reação, e o NHS (N-



hidroxisulfosuccinimida) que estabiliza os grupos carboxilos, formando ésteres com os mesmos. (Bartczak & Kanaras 2011)

A molécula mais frequentemente utilizada para a funcionalização das AuNPs é o polietilenoglicol (PEG), um polímero biocompatível e hidrofílico, que apresenta várias vantagens que vão desde a estabilização das AuNPs (impedindo a sua agregação), ao prolongamento da sua circulação *in vivo* (e consequentemente, o aumento da acumulação de fármacos na zona alvo) (Dreaden et al. 2012), ao aumento da sua solubilidade em água, à redução da resposta imunológica, até à prevenção da adsorção não-específica de outras proteínas e biomoléculas. No que toca especificamente aos sistemas de entrega de fármacos, a peguilação das AuNPs leva ainda a que haja uma diminuição da degradação do agente quimioterapêutico, e consequentemente, um maior tempo de meia vida e uma menor dosagem necessária do mesmo. (Naahidi et al. 2013; Cabral & Baptista 2013)

Face às AuNPs funcionalizadas com proteínas plasmáticas, as AuNPs funcionalizadas com BSA (AUNPs@BSA) têm sido declaradas como um dos melhores veículos de entrega de fármacos: recentes resultados de estudos de citotoxicidade *in vivo* levados a cabo em ratos saudáveis, utilizando AuNPs funcionalizadas quer com PEG, quer com BSA, revelaram ambos como potenciais veículos não-tóxicos para a entrega de fármacos, observando não existir uma alteração significativa na saúde dos ratos administrados com elevadas doses de AuNPs funcionalizadas tanto com BSA como com PEG, face aos ratos onde não houve qualquer administração. (Lien Nghiem et al. 2012)

A entrega de fármacos pelas AuNPs nas células requer primeiramente que estas sejam adsorvidas nas células, e de seguida internalizadas. A internalização celular encontra-se dependente do tamanho, forma, carga da superfície e lipofilicidade dos conjugados de AuNPs, bem como da temperatura, tipo de célula, entre outros possíveis fatores. A endocitose é o mecanismo que prevalece neste tipo de processos (Cabral & Baptista 2013). Porém, a carga da superfície das NPs contribui também para a absorção celular das mesmas, sendo que AuNPs catiónicas tendem a ligar-se a grupos existentes nas membranas celulares que se encontram carregados negativamente, atravessando assim a membrana. Já as AuNPs aniónicas funcionalizadas com proteínas plasmáticas podem ser internalizadas ao formar uma interface com a membrana celular, sendo as proteínas plasmáticas em questão adsorvidas por interações electrostáticas ou hidrofóbicas – contudo, estas demonstram uma penetração celular menos eficiente que as AuNPs catiónicas (devido a repulsões electrostáticas com o ambiente celular). (Voliani et al. 2012; Cabral & Baptista 2013)

Também a toxicidade das AuNPs é um parâmetro importante, dado a influencia que o sistema imunitário exerce no sucesso do *targeting* específico, bem como o efeito toxicológico inerente ao bionanoconjugado em si, no organismo. (Conde et al. 2012)

Vários estudos indicam que AuNPs com tamanhos menores (mínimo de 14 nm) e formatos esféricos apresentam uma melhor biocompatibilidade e ausência de toxicidade – contudo, tamanhos inferiores levam à diminuição significativa da população de macrófagos que são ativados, bem como ao aumento da produção de genes pró-inflamatórios como a interleucina-1 (IL-1), IL-6 e TNF- $\alpha$ . (Yen et al. 2009)

Outros autores advertem para o facto de que as AuNPs podem exercer efeitos tais como produção de ROS, toxicidade mitocondrial, libertação de citotoxinas, apoptose e necrose: a dualidade da questão ausência/presença de efeitos citotóxicos das AuNPs pode no entanto ser justificada pela diferença nos métodos usados aquando a síntese e funcionalização das mesmas, derivando da diferença dos tamanhos, formas, estruturas e carga das NPs utilizadas, bem como o tipo de células e animais presentes nos estudos em questão, a dosagem usada, o tempo de exposição, os métodos e técnicas de administração e a absorção das partículas, entre outros fatores. (Cabral & Baptista 2013)

Também a farmacocinética das AuNPs (ADME) se encontra relacionada com as propriedades químicas e físicas das mesmas, bem com das células ou animais modelo utilizados em estudo.

Assim sendo, para garantir o seu sucesso, os nanosistemas de entrega de fármacos devem ser sintetizados e funcionalizados atendendo ao esclarecimento pormenorizado de questões como o seu *design* e aplicação, a sua farmacocinética, a sua biodistribuição e *targeting* seletivo (garantindo o transporte do fármaco ao seu alvo, superando todas as barreiras biológicas, e no tempo certo), e por fim os efeitos secundários e toxicidade da nanoterapia. (Kumar et al. 2012; Conde et al. 2012)

## 2 – Objetivos

Na presente dissertação têm-se como objetivo estudar diferentes complexos metálicos que exibam potenciais efeitos terapêuticos: os complexos de vanádio e os complexos libertadores de CO, CORMs. Para os complexos de vanádio pretende-se caracterizar a sua possível interação com proteínas de forma a esclarecer os efeitos vantajosos/adversos da sua utilização. Quanto aos CORMs visa-se explorar uma possível aplicação dos mesmos, recorrendo à Nanotecnologia, com o intuito de os tornar mais seletivos e eficazes. Escolheu-se o CORM-3, já que é o CORM mais estudado na literatura, sendo que as metodologias desenvolvidas poderão ser aplicadas em futuros estudos com outros CORMs a desenvolver.

Como tal, os objetivos propostos para realização de um estudo no âmbito dos efeitos biológicos exercidos pelos compostos de vanádio, são:

- Caracterizar a interação de complexos de vanádio com duas classes de enzimas diferentes, a HEWL e a tripsina, por Cristalografia de raios-X;
- Averiguar o efeito que a formação destes aductos exercem na atividade enzimática das mesmas por Espectroscopia de UV/visível, visando observar a ausência ou a presença de um efeito inibitório por parte dos complexos. Caso a inibição se verifique, tenciona-se identificar o tipo de inibição, e determinar o valor da sua contante  $K_i$ ;

Já os estudos levados a cabo com o composto CORM-3 foram divididos em vários objetivos intermediários, de modo a que se pudesse avaliar a eficácia do composto, bem como os seus efeitos biológicos. Para tal, pretende-se:

- Produzir e caracterizar, por Espectroscopia UV/visível e DLS, nanoconjugados integrando o CORM-3 e as AuNPs, funcionalizados por meio das proteínas BSA e HEWL – AuNPs@PEG@BSA@CORM-3 e AuNPs@PEG@HEWL@CORM-3. Para tal é necessário recorrer à síntese de AuNPs, à sua funcionalização com PEG, e posteriormente, funcionalização com as proteínas, de modo a que se possa finalizar com a adição do CORM-3 ao nanosistema.
- Avaliar a toxicidade celular direta do composto CORM-3 através de ensaios de viabilidade celular recorrendo a linhas celulares tumorais, de modo a que se possa determinar o valor do  $IC_{50}$  do composto não conjugado;
- Avaliar potenciais efeitos terapêuticos do CORM-3, e CORM-3 conjugado com as proteínas BSA e HEWL em linhas celulares tumorais e linhas primárias de células saudáveis, recorrendo a ensaios de riscados celulares;
- Observar os efeitos anti-inflamatórios do CO em células expostas ao CORM-3, e ao composto conjugado com as proteínas BSA e HEWL, monitorizando os níveis de expressão relativos de citocinas interleucinas anti-inflamatórias, como a IL-10, e citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina IL-6 e o fator de necrose tumoral TNF- $\alpha$ , recorrendo à técnica de RT-qPCR em tempo real.



## 3 – Materiais e Métodos

### 3.1 – Compostos de vanádio

#### 3.1.1 – Ensaio de cristalização

Os ensaios de cristalização com os compostos de vanádio foram conduzidos utilizando as proteínas HEWL e tripsina.

##### 3.1.1.1 – Compostos de vanádio com a proteína HEWL

A HEWL foi adquirida à Sigma-Aldrich, enquanto os compostos de vanádio foram preparados no laboratório do Prof. João da Costa Pessoa, IST-UL. Os aminoácidos arginina e prolina foram adquiridos à Sigma-Aldrich e Fluka, respetivamente. As cristalizações foram realizadas em caixas de cristalização de 24 poços da Molecular Dimensions utilizando lamelas silinizadas. O tampão acetato de sódio ( $\text{NaCH}_3\text{COO}$ ) e o glicerol usado na solução crio-protetora foram adquiridos à Sigma-Aldrich, e o cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) à Scharlay. Os cristais foram visualizados no microscópio SteREO Discovery.V12, da Zeiss.

Nos ensaios de otimização dos cristais usou-se como solução precipitante 0,1 M de tampão acetato de sódio a pH 4,5, variando o  $\text{NaCl}$  entre 2 a 10%. Preparou-se uma solução de HEWL a 50 mg/mL, dissolvendo-a em 0,1 M de tampão acetato de sódio a pH 4,5. Efetuaram-se ensaios de gota suspensa, através do método de difusão de vapor, com 700  $\mu\text{L}$  de solução precipitante no reservatório e gotas de 2  $\mu\text{L}$  de proteína e 2  $\mu\text{L}$  de solução precipitante, a uma temperatura de 20°C.

De seguida foram preparadas as várias soluções de compostos de vanádio no estado de oxidação V(IV) (sulfato de vanadilo ( $\text{VO}(\text{SO}_4)_2$ )) na presença dos ligandos Hpic, arginina e prolina com o intuito de produzir complexos do tipo  $\text{VO}(\text{ligando})_2$ . Para tal, o vanádio e o ligando desejado foram dissolvidos na solução estabilizadora da proteína (*Harvesting Buffer*, contendo 0,1 M de tampão acetato de sódio a pH 4,5, e 12% de cloreto de sódio), para serem usados nas experiências de *soaking*. Os compostos de vanádio foram preparados de modo a estarem numa concentração de 10 mM; 5 M e 2,5 mM, encontrando-se os compostos V(IV):ligando numa estequiometria de 1:2. Realizou-se o *soaking*, transferindo-se cerca de 5/6 cristais de HEWL para uma gota de 5  $\mu\text{L}$  de cada composto, nas mesmas condições que as indicadas para obtenção dos cristais de HEWL descritas acima.

Os melhores cristais foram transferidos para a solução crio-protetora (solução estabilizadora da proteína, com a adição de 30% glicerol), e congelados em azoto liquido.

Os cristais congelados foram analisados por radiação de Sincrotrão nas linhas ID ID29 do ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*) (Grenoble, França) e Proxima I do Soleil (Paris, França).

Os dados de difração dos cristais foram indexados no programa XDS (Kabsch 2010), e processados com o programa AIMLESS, presente no conjunto de programas CCP4 (*Collaborative Computational Project Number*). (Dodson 1987)

### 3.1.1.2 – Compostos de vanádio com a proteína tripsina

A tripsina de pâncreas bovino foi adquirida à Sigma-Aldrich. O reagente sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) foi adquirido à Panreac, e os reagentes cacodilato de sódio, HEPES, cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), PEG 8000 e PEG3350 adquiridos à Sigma-Aldrich.

A otimização dos cristais de tripsina foi levada a cabo dissolvendo a tripsina, nas concentrações 60 mg/mL e 30 mg/mL, em 25 mM de tampão HEPES a pH 7,5, e 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, quer na presença de 10 mg/mL do inibidor benzamidina, quer na sua ausência. Utilizaram-se as condições 15, 20, 30 e 31 do *screen* de cristalização Crystal Screen HT da Hampton Research, por serem condições que originam os melhores resultados (Tabela 3.1), recorrendo a ensaios de gota suspensa, através do método de difusão de vapor, com 700 µL de solução precipitante no reservatório e gotas de 2 µL de proteína e 2 µL de solução precipitante, a uma temperatura de 20°C.

Tabela 3.1 – Condições de cristalização, e respetivas soluções estabilizadoras (*Harvesting Buffer*), testadas para a tripsina, provenientes do do *screen* de cristalização Crystal Screen HT da Hampton Research.

Condição	Sal	Tampão	Agente Precipitante	Agente Precipitante na solução estabilizadora
15	0,2 M sulfato de amónio	0,1 M cacodilato de sódio pH 6,5	PEG 8000, 30%	PEG 8000, 35%
20	0,2 M sulfato de amónio	0,1 M acetato de sódio pH 4,6	PEG 3350, 25%	PEG 3350, 30%
30	0,2 M sulfato de amónio	–	PEG 8000, 30%	PEG 8000, 35%
31	0,2 M sulfato de amónio	–	PEG 3350, 30%	PEG 3350, 35%

Procedeu-se então aos ensaios de co-cristalização da proteína nas mesmas concentrações, e no mesmo tampão, tanto na ausência como presença da benzamidina, incubada durante 1 hora com os compostos de V(IV), VO(pic)<sub>2</sub>, VO(dipic)<sub>2</sub>, VO(maltol)<sub>2</sub>, VO(dhp)<sub>2</sub> e V(V) (metavanadato de sódio (NaVO<sub>3</sub>)), bem como ensaios de co-cristalização e *soaking* para a proteína apenas na concentração de 30 mg/mL, na ausência de benzamidina, incubada durante 1 hora com os compostos de VO(pic)<sub>2</sub> com arginina, VO(pic)<sub>2</sub> com prolina e V(IV) com prolina.

Nos ensaios de co-cristalização, o V(IV) de cada um dos compostos encontrava-se a uma concentração de 10 mM, com os compostos V(IV):ligando numa estequiometria de 1:2.

Os ensaios de *soaking* foram realizados através da transferência de 5/6 cristais de tripsina sem benzamidina para uma gota de 5 µl de cada um dos compostos dissolvidos em soluções estabilizadoras de cada uma das condições (Tabela 3.1), com o V(IV) a uma concentração de 10 mM, e sucessivas diluições para concentrações de 5 mM e 2,5 mM, encontrando-se os compostos V(IV):ligando numa estequiometria de 1:2.

Os melhores cristais foram então recolhidos e congelados em azoto líquido, utilizando uma solução crio-protetora (solução estabilizadora de cada condição, discriminadas na Tabela 3.1, com a adição de 30% glicerol).

Os cristais congelados foram analisados por radiação de Sincrotrão nas linhas ID29 do ESRF (Grenoble, França) e Proxima I do Soleil (Paris, França).

Os dados de difração dos cristais foram indexados no programa XDS (Kabsch 2010), e processados com o programa AIMLESS presente no conjunto de programas CCP4 (Dodson 1987).

Para o cristal de tripsina com o composto VO(pic)<sub>2</sub>, utilizou-se o programa PHASER (McCoy et al. 2007) para determinar as fases através do método de Substituição Molecular, utilizando como modelo a estrutura depositada no PDB, com o código 1S0Q. O refinamento da estrutura foi conseguido utilizando o programa REFMAC5 (Murshudov et al. 2011), intercalado com a visualização e ajuste do modelo molecular no programa COOT (*Crystallographic Object-Oriented Toolkit*) (Emsley & Cowtan 2004). Os mapas de densidade anómala foram gerados a partir dos programas CAD e FFT (Read & Schierbeek 1988), e por fim as figuras foram geradas através do programa Pymol (DeLano 2002).

### **3.1.2 – Ensaios Cinéticos por Espectroscopia de UV/visível**

Os ensaios cinéticos com os compostos de vanádio foram conduzidos utilizando as proteínas HEWL e tripsina, visando determinar os potenciais feitos inibitórios que os compostos possam exercer na atividade das proteínas.

#### **3.1.2.1 – Compostos de vanádio com a proteína HEWL**

Os ensaios cinéticos de Espectroscopia UV/visível foram realizados num espectrofotómetro Ultrospec 2100 pro da Amersham Biosciences recorrendo a células de quartzo de 1 mL da Hellma, e no leitor SpectraMax Microplate da Molecular Devices com placas de 96 poços NUNCLON™, da NUNC. Os reagentes constituintes do meio LB, tais como a triptona e o extrato de levedura foram adquiridos à NZYTech, e o cloreto de sódio à Scharlay. O glicerol foi adquirido à Panreac. As células de *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*) foram fornecidas pela Prof.<sup>a</sup> Isabel Sá Nogueira (grupo Microbial Genetics, laboratório 327 do Departamento de Ciências da Vida, FCT UNL) numa placa de cultura, sem antibiótico. A incubação *overnight* do pré-inoculo e inoculo foram feitas na Orbital shaker-incubater es-20 da Grant-Bio, e a centrifugação das células/inoculo foi levada a cabo na centrífuga Centrifuge 5804R, da Eppendorf.

Foi feito um pré-inoculo inoculando com uma ansa (em ambiente estéril, à chama) as células de *B.subtilis* (provenientes da placa) num *falcon* de 50 mL contendo 10 mL de meio LB. O meio LB foi feito a partir da dissolução da mistura de 0,1 g triptona, 0,005 g de extrato de levedura e 0,1g de NaCl em 10 mL de água Mili-Q sem azida. O meio LB inoculado com as células foi incubado *overnight* na *shaker* a 37°C, com agitação de 230 rpm.

No dia seguinte, foram utilizados volumes dessas células, para formar dois *stocks* de glicerol de 1 mL, armazenados a -80°C: 200 µL de células em meio LB com 800 µL de 50% glicerol, e 500 µL das mesmas células com 500 µL de 50% glicerol. O glicerol foi adicionado para ajudar a manter a integridade das células armazenadas e evitar a formação de gelo aquando o armazenamento a -80°C.

O pré-inóculo (8 mL) foi adicionado a um *erlenmeyer* de 2 L contendo 500 mL de meio LB (5 g de triptona, 2,5 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl em 500 mL de água Mili-Q sem azida) autoclavado e estéril, crescendo *overnight* na Orbital shaker-incubater a 37°C, com agitação de 230 rpm.

Após a incubação, o inóculo foi centrifugado durante 20 minutos, a 4°C e 7500 g. O sobrenadante foi descartado, e as alíquotas contendo os *pellets* das células de *B.subtilis* foram congelados a -20°C, para serem usadas nos ensaios de atividade da HEWL na presença e na ausência dos compostos de vanádio.

Os ensaios cinéticos foram efetuados através da leitura da densidade ótica (D.O.) a 600 nm das células na presença da proteína ativa, e proteína incubada durante 0; 1 e 2 horas com os compostos de V(IV) e VO(pic)<sub>2</sub> ao longo do tempo. As culturas de *B.subtilis* foram diluídas com meio LB de modo a obter uma D.O. de cerca de 1. Adicionou-se HEWL a 0,1 mg/mL, e o V(IV) numa concentração de 0,275 mM (o equivalente a uma estequiometria HEWL:V(IV) de 1:2), e o composto V(IV):Hpic numa estequiometria de 1:2. Foi ainda realizado um ensaio nas mesmas condições, onde a D.O foi medida apenas as células de *B.subtilis* com o V(IV) numa concentração de 0,275 mM. Após uma abordagem inicial dos ensaios, estes prosseguiram apenas com o estudo das células com a proteína, e com a proteína incubada com composto VO(pic)<sub>2</sub>, nas mesmas concentrações, e com 0; 1; 2 e 3 horas de incubação.

No espectrofotómetro os ensaios foram conduzidos à temperatura ambiente, numa célula de quartzo com um percurso ótico de 1 cm, recorrendo ao programa SWIFT II do espectrofotómetro, e o volume total das amostras analisadas foi de 1 mL (980 µL de células e 20 µL de proteína/proteína com incubada com os compostos). No leitor de microplacas os ensaios foram efetuados com temperaturas controladas, e variadas entre os 20°C; 27°C; 37°C e 45°C, utilizando microplacas de 96 poços, sendo o volume total da amostra de 200 µL (180 µL de células e 20 µL de proteína/proteína incubada com os compostos).

Os diversos ensaios foram realizados sob a forma de replicados técnicos.

### **3.1.2.2 – Compostos de vanádio com a proteína tripsina**

Os ensaios cinéticos de Espectroscopia UV/visível foram realizados no leitor SpectraMax Microplate da Molecular Devices, em placas de 96 poços NUNCLON™, da NUNC. O reagente dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido à Merck, enquanto Tris-HCl e cloreto de cálcio foram adquiridos à Sigma-Aldrich. Para os ensaios foi utilizado o substrato BApNA (N-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida), um substrato cromogénico adquirido à Sigma-Aldrich.

Foram inicialmente efetuados ensaios para otimização das condições que melhor demonstravam a atividade da tripsina. Para tal, utilizou-se a proteína com uma concentração final de 0,002 mM; 0,0015 mM; 0,001 mM e 0,0005 mM, dissolvida em 50 mM de tampão Tris-HCl a pH 7,5 e 20 mM de CaCl<sub>2</sub>, enquanto o substrato BApNA foi usado com as concentrações finais nos poços de 1 mM; 0,75 mM; 0,5 mM e 0,25 mM, dissolvido em 20% DMSO. Os ensaios decorreram durante 45 minutos, com uma temperatura controlada de 37°C, num volume total de 200 µL. Primeiro foram lidas as absorvâncias a



410 nm durante 5 minutos, até se verificar a estabilização do substrato, e só depois foram adicionados volumes de 20 µL da solução de tripsina nas várias concentrações, utilizando a pipeta multicanal Finnpipette Digital Multichannel 5-50 µL, da Labsystems. O procedimento realizado baseou-se em vários protocolos para atividade da tripsina (Josephraj Kumar et al. 2005; Jedinák et al. 2006; Bosnic et al. 2009), de onde foram selecionadas e otimizadas as melhores condições (soluções a utilizar, o comprimento de onda para medir absorvância, a temperatura ideal) para realizar a experiência.

Nos ensaios visando analisar o potencial inibitório do complexo VO(pic)<sub>2</sub> na atividade da tripsina, o procedimento decorreu como descrito acima, excetuando que o composto de VO(pic)<sub>2</sub> foi adicionado à reação.

O complexo VO(pic)<sub>2</sub> foi incubado com a tripsina a 0,0025 mM durante 1 hora, numa estequiometria de proteína:V(IV):ligando de 1:5:15; 1:10:30; 1:20:60; 1:50:150; 1:63:189; 1:75:225; 1:86:264 e 1:100:300.

Todas as concentrações do complexo foram testadas para cada concentração de substrato, que foi dissolvido em 20% DMSO e diluído no tampão da proteína, de modo a atingir as concentrações finais de 0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM; 1 mM e 1,25 mM nos poços, e as leituras foram feitas como descrito anteriormente.

Os ensaios foram realizados sob a forma de replicados técnicos.

## **3.2 – CORM-3**

O CORM-3 foi adquirido à Sigma-Aldrich, possuindo um peso molecular de 294,61 Da, e armazenado a -20°C. O composto foi solubilizado em água Mili-Q filtrada e estéril, tendo sido preparadas soluções *stock* a uma concentração de 3000 µM, para a realização dos diversos ensaios.

### **3.2.1 – Síntese, funcionalização e caracterização das AuNPs**

#### **3.2.1.1 – Síntese de AuNPs**

A solução coloidal de AuNPs foi preparada através do método de redução do citrato (Lee & Meisel 1982). Os reagentes ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>), ácido cloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>) e citrato de sódio foram adquiridos à Sigma-Aldrich. A caracterização por espectroscopia de UV/visível foi levada a cabo no espectrofotómetro UVmini-1240 da Shimadzy, utilizando células de quartzo de 100 µL 105.202-QS, da Hellma.

Todo o material utilizado para a síntese foi previamente lavado em água-régia, e de seguida com água Mili-Q. A água-régia é uma solução aquosa preparada com 3:1 porções de HCl:HNO<sub>3</sub>.

250 mL de solução de HAuCl<sub>4</sub> (1 mM) foram sujeitos a ebulição, sob agitação, num balão de fundo redondo de 500 mL. Após refluxo constante da solução foram adicionados 25 mL de 38,8 mM de citrato de sódio, prolongando-se o refluxo por mais 20 minutos, em agitação.

Após os 20 minutos, a solução coloidal foi arrefecida até atingir temperatura ambiente, filtrada para *falcons* de 50 mL e armazenada a 4°C, tendo-se colocado os *falcons* envoltos em película de prata comercial, de modo a se encontrarem protegidos da luz.

A determinação da concentração das AuNPs, e a obtenção do seu espectro de absorção entre 400 a 800 nm foi realizada, por espectroscopia UV/visível, e para obtenção dos dados que permitiram a caracterização das partículas, o espectro foi normalizado a 400 nm.

### 3.2.1.2 – Funcionalização das AuNPs

#### 3.2.1.2.1 – Funcionalização com PEG: AuNPs@PEG

O biopolímero PEG, e os reagentes dodecil sulfato de sódio (SDS), hidrogenofosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), dihidrogenofosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) e ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) foram adquiridos à Sigma-Aldrich. A agitação da solução contendo a mistura de AuNPs e PEG foi levada a cabo na *shaker* GFL 3016, da Gesellschaft für Labortechnik, e a centrifugação foi feita na centrífuga 3-16K, da Sigma-Aldrich. As absorvâncias foram lidas no leitor de microplacas Infinite M200 da Tecan.

Para funcionalização das AuNPs com 100 % PEG preparou-se uma solução contendo 0,035 mg/mL de PEG, 10 nM de AuNPs e 0,028% (m/V) de SDS, perfazendo-se o volume com água Mili-Q até 50 mL. A solução foi incubada à temperatura ambiente na *shaker* GFL 3016, durante 16 horas, após as quais foi removido o excesso de PEG, centrifugando-se 3x a 14000 g, durante 30 minutos, a 4°C. A cada centrifugação, os sobrenadantes eram removidos e guardados em *falcons*, sendo que o volume removido era substituído pelo mesmo volume de água Mili-Q. Após a última centrifugação o *pellet* foi recolhido e armazenado a 4°C.

Finalizado o processo de funcionalização, e tendo-se guardado todos os sobrenadantes resultantes das 3 centrifugações, estes foram novamente centrifugados nas mesmas condições, e então analisados pelo método de Ellman's. Este método visa quantificar o número de cadeias tióis existentes no sobrenadante de modo a determinar-se, por interpolação, a quantidade de moléculas de PEG que funcionalizaram às AuNPs.

Para o método de Ellman's foi utilizada uma placa de 96 poços, e usado o tampão fosfato a 0,5 M, pH 7, preparado através de uma mistura de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (288,5 M) e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (211,5 M). Aos poços foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante, 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato a 0,5 M, pH 7 e 7  $\mu\text{L}$  de 2 mg/mL do reagente de Ellman's (DTNB, preparado por dissolução no tampão fosfato 0,5 M, pH 7, incubado à temperatura ambiente durante 15 minutos). No mesmo ensaio foi feita uma curva de calibração para o PEG, utilizando uma gama de concentrações de 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL, procedendo-se do mesmo modo para os sobrenadantes, com a diferença que os sobrenadantes foram substituídos por PEG, nas várias concentrações descritas. Procedeu-se então à leitura das absorvâncias entre 400 a 600 nm no leitor de microplacas, e o tratamento dos dados foi feito numa folha de cálculo do *software* Excel.

Procedeu-se ainda à obtenção do espectro de absorção das AuNPs@PEG entre 400 a 800 nm, por espectroscopia UV/visível, e para obtenção dos dados que permitiram a caracterização das partículas, o espectro foi normalizado a 400 nm.

### **3.2.1.2.2 – Funcionalização com proteínas: AuNPs@PEG@BSA e AuNPs@PEG@HEWL**

Os reagentes N-hidroxissulfosuccinimida (sulfo-NHS), carbodimina hidrocloreídica 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) (EDC), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico (MES) foram adquiridos à Sigma-Aldrich, e o *kit* Pierce™ Coomassie (Bradford) Assay Reagent à Thermo Scientific. As proteínas BSA e HEWL, utilizadas para funcionalização, foram adquiridas à Sigma-Aldrich.

A funcionalização das AuNPs@PEG com as proteínas BSA e HEWL foi realizada através da reação de EDC/NHS (Bartczak & Kanaras 2011). Foi preparada uma solução contendo 21 nM de AuNPs@PEG, 1,25 mg/mL de sulfo-NHS, e 0,312 mg/mL EDC, dissolvidos em tampão MES a 10 mM, pH 6. A mistura foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente, e depois centrifugada a 14000 g, durante 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi removido e substituído por um volume equivalente de tampão MES a 2,5 mM, pH 6. Foram adicionados 700 µL da solução em 4 *ependorfs* diferentes, de modo a obter a funcionalização com BSA 10 µg/mL, e HEWL a 2,5; 5 e 10 µg/mL (solução stock de 0,2 mg/mL das proteínas liofilizadas, dissolvidas em água Mili-Q) – dado não existirem quaisquer estudos acerca da funcionalização de AuNPs com a HEWL, foram testadas três concentrações diferentes para uma concentração fixa de AuNPs@PEG, procedendo-se do mesmo modo, e utilizando as mesmas condições que as usadas para a funcionalização de AuNPs@PEG com BSA. Para cada um dos 4 *ependorfs* foi ainda adicionada água Mili-Q, perfazendo o volume até 1 mL. A mistura resultante foi incubada com agitação, à temperatura ambiente, durante 16 horas.

Tal como descrito para a funcionalização com PEG, após as 16 horas de incubação, as soluções foram centrifugadas 3x a 14000 g, durante 30 minutos, a 4°C, removendo-se nas 3x os sobrenadantes, e adicionando um volume equivalente de tampão MES a 2,5 mM, pH 6. Uma vez que os sobrenadantes continham o excesso das proteínas BSA e HEWL que não se ligaram às AuNPs@PEG, estas foram quantificadas pelo método de Bradford, de modo a se poder posteriormente determinar a quantidade de proteína que se ligou às partículas.

Para o ensaio de Bradford, levado a cabo no leitor de microplacas, recorreu-se a uma placa de 96 poços, onde foram adicionados 150 µL de cada sobrenadante, e 150 µL de *Coomassie Brilliant Blue*, de acordo com as instruções do fabricante. Nas mesmas condições, foi ainda efetuada uma curva de calibração para ambas as proteínas, utilizando 150 µL de uma gama de concentrações de 0; 2,5; 5; 10 e 15 µg/mL, e 150 µL de *Coomassie Brilliant Blue*. Após preparados os poços, as soluções resultantes foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente, e as absorvâncias a 595 nm lidas.

Os dados foram tratados recorrendo ao *software* Excel, e a quantidade de proteína funcionalizada às AuNPs@PEG calculada através da curva de calibração polinomial de 3º grau (How to use a protein assay standard curve, Thermo Scientific - TECH TIP #57)

Procedeu-se ainda à obtenção do espectro de absorção das AuNPs@PEG@BSA e AuNPs@PEG@HEWL entre 400 a 800 nm por espectroscopia UV/visível, e para obtenção dos dados que permitiram a caracterização das partículas funcionalizadas com ambas as proteínas, o espectro foi normalizado a 400 nm.

### 3.2.1.3 – Caracterização por DLS

Os conjuntos de AuNPs, AuNPs@PEG, AuNPs@PEG@BSA e AuNPs@PEG@HEWL foram caracterizadas por DLS (Dispersão Dinâmica de Luz, do inglês *Dynamic Light Scattering*), de modo a determinar os seus diâmetros hidrodinâmicos, e índices de polidispersão. A técnica de DLS foi levada a cabo no aparelho Nanoparticle Analyzer SZ-100 da Horiba Scientific, a uma temperatura de 25°C, encontrando-se as amostras analisadas numa concentração de 2 nM (face às AuNPs), diluídas em água Mili-Q.

### 3.2.2 – Culturas das linhas celulares

O crescimento das células ocorreu em meio de cultura celular, composto de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, adquirido à Life Technologies), 10% (V/V) de Soro Bovino Fetal (adquirida à Life Technologies) e 1% (V/V) de antibiótico/antimicótico Penicilina-Estreptomicina com 1000 unidades/mL de penicilina, 1000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL do antimicótico Fungizona® (adquiridos à Invitrogen). Os frascos de cultura 75 cm<sup>2</sup> foram adquiridos à Tissue Culture Flasks VWR. A incubação das células foi levada a cabo na incubadora Sanyo CO<sub>2</sub> Incubator. A aderência e a confluência das células foi visualizada no microscópio ótico invertido Nikon TMS, da Emílio de Azevedo Campos. A tripsina (TrypLE™ Express Enzyme (1X), no phenol red) foi adquirida à Invitrogen.

As linhas celulares utilizadas ao longo desta dissertação foram HCT116 (linha celular de carcinoma cólon-retal humano), A549 (linha celular de carcinoma pulmonar humano), MDA-MB-453 (linha celular de carcinoma mamário humano) e a linha primária de fibroblastos humanos, adquiridas à ATCC (American Type Culture Collection). Foi ainda utilizada a linha celular NINA (linha celular de tumor complexo tubulo-papilífero da glândula mamária de grau II), obtida através de um tumor mamário canino. Uma vez que este projeto deriva da colaboração entre o grupo X-ray Crystallography e os grupos Human Genetics and Cancer Therapeutics e Nanomedicine, esta etapa foi levada a cabo no laboratório 315 do Departamento de Ciências da Vida, FCT-UNL.

As células crescerem em meio de cultura celular numa atmosfera com 99% de humidade, contendo 5% (V/V) de CO<sub>2</sub>, a 37°C, sendo mantidas nos frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup>, e o procedimento decorreu de igual forma para todas as linhas de células.

A manutenção das culturas de células é feita quando estas atingem 80% de confluência, e o meio de cultura celular é removido, adicionando-se 5 mL de tripsina e incubando as células durante 5 minutos numa atmosfera com 99% de humidade, contendo 5% (V/V) de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Após visualizar-se ao microscópio a perda da aderência das células aos frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup>, são adicionados 5 mL de meio de cultura celular. As células são então transferidas para um *falcon*, e centrifugadas a 1500 g

durante 5 minutos, a 4°C. Por fim o sobrenadante é removido, e o *pellet* ressuspendido em volume adequado de meio de cultura celular. Deste volume, 50 uL são transferidos para frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo 10 mL de meio de cultura celular, e incubados nas condições descritas anteriormente, sendo o restante volume utilizado para os ensaios celulares.

### 3.2.3 – Ensaios de citotoxicidade do CORM-3

Para esta etapa foram utilizadas as linhas celulares HCT116, A549 e MDA-MB-453.

#### 3.2.3.1 – *Seeding* celular e incubação com CORM-3

Para contagem de células, estas foram colocadas no hemocitómetro da Hirschmann, e contadas no microscópio ótico invertido Nikon TMS de Emílio de Azevedo Campos. O reagente *Trypan Blue* foi adquirido à Sigma-Aldrich. O *seeding* das células HCT116, A549 MDA-MB-453 foi efetuado numa placa de 96 poços, da VWR, e com o meio de cultura celular descrito na secção 3.2.2. A proteína BSA foi dissolvida em água Mili-Q, preparando-se uma solução *stock* de concentração 100 µM.

As células presentes na ressuspensão celular foram contadas pelo método de *Trypan Blue*, utilizando-se 100 uL do reagente *Trypan Blue*, 50 uL de células e 350 uL de meio de cultura celular. A contagem de células no hemocitómetro foi feita ao microscópio, e o cálculo da densidade celular efetuado através do valor obtido pela Equação 8.

$$\frac{\text{número de células viáveis}}{\text{número de quadrantes}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4 \text{ (volume da camara de Neubauer (mm}^3\text{))} \quad (\text{Eq. 8})$$

Após cálculo da densidade celular, as células foram diluídas em meio de cultura celular, de modo a se obter um *seeding* de 7500 células/poço de HCT1166 e de A549, e 30000 células/poço de MDA-MB-453, em 100 µL de meio de cultura celular, incubadas numa atmosfera de 99% de humidade, contendo 5% (V/V) de CO<sub>2</sub>, a 37°C, durante 24 horas (em placas de 96 poços). Depois das 24 horas, a aderência das células foi confirmada, e procedeu-se à incubação das células com o CORM-3, e CORM-3 conjugado com a proteína BSA.

Para as células HCT116 e A549, o meio de cultura celular foi removido, e substituído por outros 100 µL de meio de cultura celular fresco (controlo), e 100 µL de uma gama de concentrações de 0,1; 1; 5; 10 e 20 µM de CORM-3 em meio de cultura celular para diferentes tempos de incubação. A incubação das células com o composto foi feita para períodos de 6; 12 e 48 horas, numa atmosfera de 99% de humidade, contendo 5% (V/V) de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Procedeu-se ainda à incubação das células HCT116 e A549, mas para uma gama superior de concentrações CORM-3 (50; 75; 100; 125 e 150 µM), prolongando-se os tempos de incubação por 24; 48 e 72 horas, nas mesmas condições.

Posteriormente, o processo foi repetido para as células de MDA-MB-453, onde foram adicionados 100 µL de meio de cultura celular fresco (controlo), e 100 µL de uma gama de concentrações de 50; 75; 100; 125 e 150 µM de CORM-3. As células foram incubadas com o composto durante 48 e 72 horas, também nas condições descritas anteriormente.

Por fim, as três linhagens celulares foram incubadas com 100 µL de meio de cultura celular fresco (controlo), e 100 µL de uma gama de concentrações de 10; 20; 50; 100; 200 e 500 µM de CORM-3 conjugado com BSA numa estequiometria de 10:1 e, como controlo, 100 µL de 50 µM de BSA, durante 48 e 72 horas de incubação, nas mesmas condições.

Todos os ensaios foram efetuados sob a forma de replicados técnicos.

### **3.2.3.2 – Ensaios de viabilidade celular por MTS**

Os ensaios de viabilidade celular foram efetuados de acordo com o *kit* CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, (comumente designado de ensaio por MTS) adquirido à Promega. A solução de MTS final foi preparada usando 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboxi-metoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS), metassulfato de fenazina (PMS), e meio de cultura celular, numa razão de 100:19:1, respetivamente.

Após os respetivos períodos de incubação do CORM-3 e CORM-3–BSA com as várias linhas celulares descritas na secção 3.2.3.1, foram realizados os ensaios de viabilidade celular pelo método colorimétrico MTS. Para cada poço, removeu-se 100 µL de meio e adicionou-se 100 µL da solução de MTS, incubando-se durante 30 a 45 minutos, numa atmosfera de 99% de humidade, contendo 5% (V/V) de CO<sub>2</sub>, a 37°C.

As absorvâncias foram lidas no leitor de microplacas, a um comprimento de onda de 490 nm, realizando o tratamento de dados numa folha de cálculo do *software* Excel, onde se determinaram as percentagens de viabilidade celular através da divisão dos valores de absorvâncias das amostras pelo valor de absorvância do respetivo controlo, e multiplicando por 100%. Os resultados finais descritos e analisados na secção 4.2.2 dos Resultados e Discussão correspondem à média dos replicados técnicos.

### **3.2.3.3 – Contagem de células pelo método de *Trypan Blue***

Para a contagem de células, estas foram colocadas no hemocitómetro da Hirschmann, e visualizadas e contadas no microscópio ótico invertido Nikon TMS de Emílio de Azevedo Campos. O reagente *Trypan Blue* foi adquirido à Sigma-Aldrich.

Após realizados os ensaios de viabilidade celular para as células HCT116 e A549 expostas a uma gama de concentrações de 50; 75; 100; 125 e 150 µM de CORM-3 durante 24; 48 e 72 horas, foi procedida à contagem das células viáveis pelo método de *Trypan Blue*.

Para tal, o conteúdo dos 100 µL de meio de cultura celular (controlo) e de meio de cultura celular com o CORM-3, foram removidos dos poços, adicionando-se 100 µL de tripsina para destacar as células aderidas. Foram então removidos os 100 µL de tripsina, e transferidos para *ependorfs*, aos quais se adicionaram 200 µL de meio celular de modo a neutralizar o efeito da tripsina (evitando a lise das células), e diluir as células. Desses 200 µL foram feitas diluições para cada uma das amostras, retirando-se 100 µL, que foram adicionados a 100 µL de *Trypan Blue* a 0,4% (V/V). As amostras foram colocadas no hemocitómetro, e a contagem do número de células viáveis foi feita no microscópio. O

cálculo final do número de células/mL foi obtido através da Equação 8, e corresponde à média dos replicados técnicos.

### **3.2.4 – Ensaios de regeneração celular: Riscados celulares**

Para realização dos riscados celulares foram utilizadas a linha celular NINA e a linha primária de fibroblastos humanos.

#### **3.2.4.1 – Seeding celular**

O cálculo da densidade celular foi realizado como descrito na secção 3.2.3.1. O *seeding* celular foi feito em placas de 35 mm, da VWR. As proteínas BSA e HEWL foram dissolvidas em água Milli-Q, preparando-se uma solução *stock* de concentração 100 µM para ambas.

Após o cálculo da densidade celular, as células foram diluídas em meio de cultura celular de modo a se obter um *seeding* de  $1 \times 10^5$  células/placa de NINA e de fibroblastos, em 1 mL de meio de cultura celular, e as células foram incubadas numa atmosfera de 99% de humidade, contendo 5% (V/V) de CO<sub>2</sub>, a 37°C, durante 24 horas (em placas 35 mm). Após as 24 horas, a aderência das células foi confirmada recorrendo ao microscópio, e procederam-se aos riscados e às incubações das células com os compostos, onde foram usadas 6 placas de 35 mm com as células de NINA, e 6 placas de 35 mm com os fibroblastos.

#### **3.2.4.2 – Riscados celulares**

As fotografias foram tiradas com a máquina fotográfica Sony Cyber-shot DSC-W800, recorrendo ao auxílio do microscópio ótico invertido Nikon TMS, da Emílio de Azevedo Campos, e uma ampliação de 400x.

O meio de cultura celular foi removido das placas e estas foram riscadas na vertical, utilizando uma ponta P200 descartável (com um tamanho aproximando de 100 µm). Foram adicionados 1 mL de meio de cultura celular fresco (controlo), e 1 mL de meio de cultura celular onde se encontrava 1) o CORM-3 (a 3 µM); 2) a proteína BSA (a 0,6 µM); 3) a proteína HEWL (a 0,6 µM); 4) o conjugado CORM-3–BSA (com o CORM-3 a 3 µM e uma estequiometria CORM-3:BSA de 5:1) e 5) o conjugado CORM-3–HEWL (com o CORM-3 a 3 µM e uma estequiometria CORM-3:HEWL de 5:1).

As placas foram fotografadas imediatamente após os ensaios de riscados celular (correspondendo ao tempo de 0 horas), e após 24 horas de incubação das células com os compostos numa atmosfera de 99% de humidade, contendo 5% (V/V) de CO<sub>2</sub>, a 37°C (correspondendo ao tempo 24 horas), visando a análise da regeneração celular.

Os ensaios foram feitos sob a forma de replicados biológicos apenas para as células NINA, e os resultados finais para os tamanhos dos riscados e percentagens de regeneração correspondem à média dos replicados. Para os fibroblastos, foi apenas realizado um ensaio de regeneração celular, devido ao facto de não se ter conseguido obter, com sucesso, novas culturas celulares dos mesmos.

As fotografias foram processadas pelo programa ImageJ, onde se determinou o diâmetro dos riscados, que permitiram o cálculo das percentagens de regeneração celular das células, dividindo o diâmetro correspondente às 24 horas do riscado pelo diâmetro correspondente às 0 horas, e multiplicando o seu valor por 100%.

### **3.2.5 – Análise dos níveis de expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias derivadas do efeito do CORM-3, por RT-qPCR em tempo real.**

#### **3.2.5.1 – Seeding celular e incubação com o CORM-3, proteínas, e conjugados do CORM-3**

O benzaldeído foi adquirido à Sigma-Aldrich, e preparada uma solução com uma concentração final de 0,1 M em 1 mL meio de cultura celular. A lipofectamina, proveniente do *kit* Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent, adquirida à ThermoFisher Scientific, foi adicionada num volume de 50 µL, com o restante meio de cultura celular. As AuNPs@PEG-30% e AuNPs@PEG-100% foram fornecidas pelo grupo Nanomedicine, e adicionadas numa concentração de 6 nM.

Para esta etapa recorreu-se de novo à linha celular NINA e aos fibroblastos, tendo-se efetuado o *seeding* e a incubação das células, com os mesmos compostos e controlos e nas mesmas condições que as descritas na secção 3.2.4.1. Efetuou-se também o riscado nas placas, recorrendo ao procedimento descrito na secção 3.2.4.2.

Posteriormente, as células foram ainda incubadas com 1 mL de meio de cultura (controlo não riscado) e com os reagentes benzaldeído (a 0,1 M), lipofectamina (50 µL), e com AuNPs@PEG-30% e AuNPs@PEG-100% (com as AuNPs a uma concentração de 6 nM), seguindo também o mesmo procedimento, com a exceção de que neste passo experimental, as placas não foram riscadas.

Finalizado o *seeding* celular, e exposição das células aos vários compostos e reagentes, todas as placas de 35 mm contendo as células foram incubadas numa atmosfera de 99% de humidade, contendo 5% (V/V) de CO<sub>2</sub>, a 37°C, durante 4 horas.

Os ensaios foram feitos sob a forma de replicados biológicos para as células de NINA.

#### **3.2.5.2 – Extração de RNA**

O reagente TRIsure™ utilizado para a extração de RNA foi adquirido à Biotek. Os reagentes clorofórmio, álcool isopropílico, etanol 75%, e água DEPC foram adquiridos à Sigma-Aldrich.

Após as 4 horas de incubação, procedeu-se à extração de RNA das células dos vários ensaios. A extração foi feita utilizando o método de Trizol, de acordo com as instruções do fabricante, com a exceção de duas alterações:

- 1) No passo de lavagem com etanol 75% foram efetuadas 3 lavagens em vez de 1, visando garantir a qualidade do RNA extraído, e evitar contaminações.



- 2) No passo final de secagem do *pellet* foi efetuado um *spin-down* às amostras, removendo-se de seguida o sobrenadante, deixando-se secar à temperatura ambiente durante 10 minutos antes da adição de água DEPC.

Finalizado o processo de extração de RNA, este foi quantificado e a sua pureza determinada em função das razões de absorvâncias 260 nm/280 nm, e 260 nm/230 nm (cujos valores devem ser aproximadamente 2), no NanoDrop 1000 (ND-1000 Spectrophotometer ThermoFisher Scientific).

### 3.2.5.3 – Síntese de cDNA

Foi sintetizado o DNA complementar (cDNA) ao RNA extraído das células, através do *kit* de síntese de cDNA NZY M-MuLV First-Strand cDNA Synthesis, da Nzytech. A síntese decorreu de acordo com as instruções do fabricante, utilizando o termociclador S1000™ Thermal Cycler, da Bio-Rad. A concentração de cDNA sintetizada, e os seus valores de pureza foram determinados do mesmo modo que o procedido para o RNA extraído, por espectroscopia UV/visível no NanoDrop 1000 Spectrophotometer da ThermoFisher Scientific.

### 3.2.5.4 – RT-qPCR em tempo real

A técnica de RT-qPCR em tempo real foi realizada no Rotor Gene 6000 da Corbett Life Science. Os *primers* TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram desenhados recorrendo ao que está descrito na literatura (Chandramathi et al. 2010; Scott et al. 2007), e sintetizados pela Stab Vida, bem como o *primer* 18S. A enzima 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus foi fornecida pela Solis BioDyne.

Tabela 3.2 – Sequências *Foward* e *Reverse*, e temperaturas de *melting*, dos *primers* 18S, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 utilizados para os vários RT-qPCR em tempo real.

Gene	<i>Primer Foward</i>	T <sub>m</sub> (°C)	<i>Primer Reverse</i>	T <sub>m</sub> (°C)
<b>18S</b>	5' GTAACCCGTTGAACCCATT 3'	62,1	5' CCATCCAATCGGTAGTAGCG 3'	61,3
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	5' CCAGGCAGTCAGATCATCTTCTC 3'	63,6	5' TATCTCTCAGCTCCACGCCA 3'	64,2
<b>IL-6</b>	5' GGTACATCCTCGACGGCATCT 3'	64,9	5' TCTTTGCTGCTTTCACACAT 3'	60,5
<b>IL-10</b>	5' GGTTGCCAAGCCTTGTCTGA 3'	64,5	5' CCCCCAGGGAGTTCACATG 3'	63,5

A preparação das amostras foi levada a cabo usando 100 ng de cDNA, 0,25  $\mu$ M de *primer Foward*, 0,25 $\mu$ M de *primer Reverse* e concentração 1x da enzima 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus em 20  $\mu$ L de volume de reação, tal como descrito no protocolo do fabricante.

As condições de amplificação usadas para RT-qPCR em tempo real foram otimizadas ao longo dos ensaios, sendo estas de: 15 minutos a 95°C de desnaturação inicial, seguido de 10 ciclos com desnaturação a 95°C durante 20 segundos; temperatura de *annealing* 50°C durante 20 segundos, e temperatura de extensão 72°C durante 20 segundos; seguido de 30 ciclos com desnaturação a 95°C durante 20 segundos, temperatura de *annealing* específica para cada conjunto de *primers* durante 20

segundos, e temperatura de extensão 72°C durante 20 segundos – as temperaturas de *annealing*, correspondentes aos 30 ciclos, usadas para amplificação das sequências de TNF- $\alpha$  e IL-6 corresponderam a 50°C, e para IL-10 a 53°C. Apenas as condições de amplificação utilizadas para IL-10 se demonstraram otimizadas, encontrando-se as restantes ainda em otimização. Relativamente às condições de amplificação da sequência de 18S, foram usadas as mesmas condições experimentais das sequências anteriormente referidas.

Os resultados da técnica RT-qPCR em tempo real foram avaliados por eletroforese em gel de agarose.

#### **3.2.5.5 – Eletroforese em gel de agarose**

A agarose foi adquirida à ThermoFisher Scientific, o tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) e o reagente *GelRed* foram adquiridos à Biotium, enquanto o tampão de amostra corante (*Loading Buffer*) utilizado foi o *Orange G*. Foram utilizados dois marcadores de pesos moleculares diferentes, em função dos ensaios, tendo estes sido HyperLadder 100 pb fornecido pela Biotium, e GeneRuler 50 pb fornecido pela Fermentas Life Sciences. A eletroforese em gel de agarose foi efetuada recorrendo ao aparelho PowerPac Basic, da Bio-Rad.

O gel foi preparado com 2% (m/V) de agarose, 100 mL de tampão TAE 1X e pela adição de 1,5  $\mu$ L de *GelRed*, deixando-se polimerizar à temperatura ambiente, durante 45 minutos. As amostras carregadas no gel foram preparadas com 3  $\mu$ L de *Loading Buffer* e 2  $\mu$ L da amostra contendo o DNA de interesse. Os marcadores de pesos moleculares foram adicionados no primeiro e último poço do gel, visando facilitar a análise do tamanho das bandas obtidas. A eletroforese em gel de agarose decorreu durante 60 minutos, a uma voltagem constante de 90 V.

Os géis resultantes foram visualizados no aparelho GelDoc da Bio-Rad.

## 4 – Resultados e Discussão

### 4.1 – Compostos de vanádio

De modo a caracterizar estruturalmente a interação de diferentes compostos de vanádio com duas classes de enzimas diferentes, recorreu-se à Cristalografia de raios-X.

O estudo do efeito derivado da interação dos compostos de vanádio com ambas as proteínas foi seguido recorrendo a ensaios cinéticos de Espectroscopia UV/visível.

#### 4.1.1 – Ensaio de Cristalização

Após preparação dos compostos de vanádio, estes podem ser adicionados à condição de cristalização das proteínas (co-cristalização) ou a cristais já formados das mesmas (*soaking*). No fim dos ensaios de cristalização, os cristais foram congelados em azoto líquido, após terem sido mergulhados numa solução contendo 30% de glicerol. Este agente exerce uma ação crio-protetora, uma vez que impede a formação de gelo no interior do cristal.

Os cristais foram analisados, e vários conjuntos de dados foram recolhidos recorrendo a radiação de sincrotrão no ESRF (em Grenoble, França), e no Soleil (em Paris, França).

##### 4.1.1.1 – Compostos de vanádio com a proteína HEWL

Os melhores cristais obtidos foram originados pela condição 0,1 M de tampão acetato de sódio a pH 4,5, e 6% de NaCl, tendo sido escolhidos para as próximas fases do trabalho.

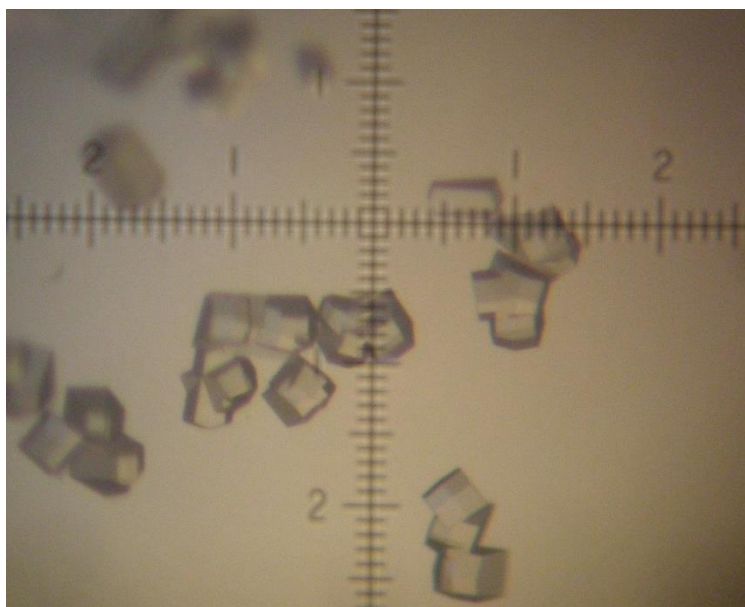


Figura 4.1 – Cristais de HEWL com um tamanho aproximado entre 0,4 e 0,8 mm, obtidos com 0,1 M de tampão acetato de sódio a pH 4,5, e 6% de NaCl.

De modo a formar aductos entre a proteína e os complexos, recorreu-se à técnica de *soaking*, visando a incorporação dos compostos nos cristais já formados. Para esta etapa foram utilizados vários

compostos contendo vanádio, tais como VO(pic)<sub>2</sub> com arginina, VO(pic)<sub>2</sub> com prolina e V(IV) com prolina. Os compostos foram dissolvidos na solução estabilizadora da proteína, nas concentrações de 10 mM; 5 mM e 2,5 mM de V(IV), tendo sido a solução estabilizadora usada com o objetivo de manter a integridade dos cristais, evitando danos nos mesmos.

Uma vez que já existe uma estrutura cristalina do aducto de HEWL com o complexo VO(pic)<sub>2</sub> (Santos et al. 2014), tentou aprofundar-se a existência desta interação, utilizando aminoácidos biológicos naturais já existentes no organismo humano, como a prolina, que possui uma estrutura molecular semelhantes à do ligando Hp<sub>ic</sub> (consultar imagem 1.5 na secção 1.1.3 da Introdução), e a arginina, de modo a verificar se estes conseguiriam formar complexos com o vanádio, ligando-se ao centro ativo das proteínas, e mimetizar ou substituir a ação do Hp<sub>ic</sub>. Os ligandos foram incubados com V(IV) numa proporção que visava a formação de complexos sob a forma de VO(ligando)<sub>2</sub>.

Na Tabela 4.1 encontram-se os dados relativos aos cristais de HEWL com os vários compostos.

Tabela 4.1 – Resumo das condições e resultados da difração dos cristais de HEWL com os compostos de vanádio VO(pic)<sub>2</sub> com arginina, VO(pic)<sub>2</sub> com prolina e V(IV) com prolina obtidos por *soaking*, com solução precipitante 0,1 M Tampão acetato de sódio a pH 4,5, e 6% NaCl, e analisados por radiação de Sincrotrão (ESRF e Soleil).

Proteína	Composto	Linha do Sincrotrão	Resolução máxima
HEWL 50 mg/mL	VO(pic) <sub>2</sub> com arginina, 10 mM	ESRF ID29	1,12 Å
	VO(pic) <sub>2</sub> com arginina, 5 mM	Proxima I Soleil	1,4 Å
	VO(pic) <sub>2</sub> com prolina, 10 mM	ESRF ID29	1,39 Å
	VO(pic) <sub>2</sub> com prolina, 5 mM	Proxima I Soleil	1,4 Å
	V(IV) com prolina, 10 mM	ESRF ID29	1,12 Å
	V(IV) com prolina, 2,5 mM	Proxima I Soleil	1,3 Å

#### 4.1.1.2 – Compostos de vanádio com a proteína tripsina

Os melhores cristais de tripsina, tanto a 30 mg/mL como 60 mg/mL, foram obtidos recorrendo a 0,2 M de sulfato de amónio e 30% de PEG 8000 (condição 30, do *screen* Crystal Screen HT), apresentando não só um maior tamanho e tridimensionalidade, como também um maior número de cristais por gota. A cristalização da tripsina é geralmente feita na presença de um inibidor, como a benzamidina, que ao ligar-se ao centro ativo da mesma previne a sua autocatálise (Renatus et al. 1998; Jiang et al. 2000). Apesar dos cristais na presença de benzamidina serem mais abundantes, foi possível obter alguns cristais de tripsina na ausência de benzamidina, embora em menor quantidade, em algumas gotas.

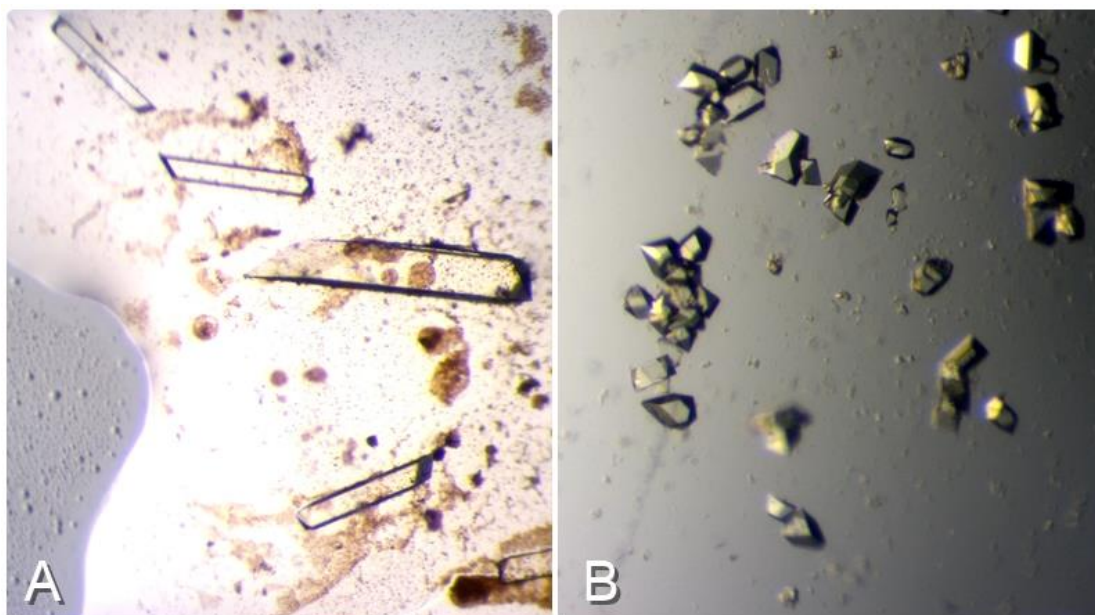


Figura 4.2 – Cristais de tripsina 30mg/ml obtidos na presença (A) e na ausência (B) de benzamidina, utilizando a condição 30.

Foram então levados a cabo os ensaios de co-cristalização dos compostos de vanádio com a tripsina 30 mg/mL e 60 mg/mL com e sem benzamidina, utilizando as condições 15; 20; 30 e 31. Os compostos utilizados foram V(IV), VO(pic)<sub>2</sub>, VO(dipic)<sub>2</sub>, VO(maltol)<sub>2</sub>, VO(dhp)<sub>2</sub> e V(V), dissolvidos no tampão da proteína, numa concentração de 10 mM de V(IV), tal como descrito na secção 3.1.1.2 dos Materiais e Métodos.

De todos os compostos usados, obtiveram-se cristais de tripsina apenas na presença dos compostos V(IV), VO(pic)<sub>2</sub> e VO(dipic)<sub>2</sub>.

Os cristais obtidos foram analisados, e os respetivos dados da difração encontram-se discriminados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Resumo das condições e resultados de difração dos cristais de tripsina com os compostos de vanádio V(IV), VO(pic)<sub>2</sub> e VO(dipic)<sub>2</sub> obtidos por co-cristalização e analisados por radiação de Sincrotrão (ESRF e Soleil).

Proteína	Composto	Condições de co-cristalização	Linha do Sincrotrão	Resolução máxima
Tripsina 30 mg/mL c/ benzamidina	V(IV)	Condição 30	Proxima I Soleil	Não difratou
Tripsina 30 mg/mL s/ benzamidina	V(IV)	Condição 31	Proxima I Soleil	1,031 Å
Tripsina 60 mg/mL c/ benzamidina	V(IV)	Condição 30	ESRF ID29	Não difratou
Tripsina 60 mg/mL s/ benzamidina	V(IV)	Condição 30	Proxima I Soleil	1,031 Å
Tripsina 30 mg/mL s/ benzamidina	VO(pic) <sub>2</sub>	Condição 30	Proxima I Soleil	1,09 Å
Tripsina 30 mg/mL c/ benzamidina	VO(pic) <sub>2</sub>	Condição 30	Proxima I Soleil	1,031 Å
Tripsina 60 mg/mL c/ benzamidina	VO(pic) <sub>2</sub>	Condição 30	Proxima I Soleil	Sal
Tripsina 30 mg/mL c/ benzamidina	VO(dipic) <sub>2</sub>	Condição 31	ESRF ID29	3 Å

Posteriormente, foram também realizados ensaios de cristalização quer por co-cristalização, quer por *soaking*, da tripsina com os compostos VO(pic)<sub>2</sub> com arginina, VO(pic)<sub>2</sub> com prolina e V(IV) com prolina. Porém, face aos resultados obtidos anteriormente, a cristalização foi restringida em dois pontos: a) foi apenas utilizada a proteína com concentração de 30 mg/mL, uma vez que face aos resultados das cristalizações anteriores, não foram reveladas diferenças significativas entre uma concentração e a outra, o que nos permite utilizar uma concentração mais baixa, e conseqüentemente menos proteína, sem no entanto comprometer os ensaios e respetivos resultados; b) apenas se utilizou a tripsina sem benzamidina, uma vez que a proteína cristaliza, a ausência da benzamidina permite-nos verificar se os compostos se ligam ao centro ativo da proteína, e caso o façam, estudar a sua interação e estrutura.

A co-cristalização foi realizada com os compostos numa concentração de 10 mM de V(IV), e usando as condições 15; 20; 30 e 31, tal como descrito na secção 3.1.1.2 dos Materiais e Métodos. Já o *soaking* foi realizado através da transferência de cristais de tripsina 30 mg/mL sem benzamidina, para a solução estabilizadora da proteína de cada uma das quatro condições (Tabela 3.1 da secção 3.1.1.2 dos Materiais e Métodos), contendo os compostos nas concentrações 10 mM; 5 mM e 2,5 mM de V(IV). Os resultados da difração dos cristais analisados encontram-se na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Resumo das condições e resultados de difração dos cristais de tripsina com os compostos de vanádio VO(pic)<sub>2</sub> com arginina, VO(pic)<sub>2</sub> com prolina e V(IV) com prolina tanto por co-cristalização, como por soaking, e analisados por radiação de Síncrotrão (ESRF e Soleil).

Proteína	Composto	Condições de cristalização	Linha do Síncrotrão	Resolução máxima
Tripsina 30 mg/mL s/ benzamidina	VO(pic) <sub>2</sub> com arginina (1)	Co-cristalização Condição 30	Proxima I Soleil	1,4 Å
	VO(pic) <sub>2</sub> com arginina (2)	Co-cristalização Condição 31	Proxima I Soleil	1,3 Å
	VO(pic) <sub>2</sub> com prolina (1)	Co-cristalização Condição 20	ESRF ID29	1,2 Å
	VO(pic) <sub>2</sub> com prolina (2)	Co-cristalização Condição 30	ESRF ID29	Não difratou
	V(IV) com prolina, 10mM (1)	<i>Soaking</i> Condição 30	Proxima I Soleil	1,8 Å
	V(IV) com prolina, 10mM (2)	<i>Soaking</i> Condição 31	Proxima I Soleil	1,5 Å
	V(IV) com prolina, 10 mM (3)	<i>Soaking</i> Condição 20	ESRF ID29	1,1 Å
	V(IV) com prolina, 2,5 mM	<i>Soaking</i> Condição 30	Proxima I Soleil	1,4 Å

#### 4.1.1.3 – Experiência de difração, resolução e refinamento da estrutura

Tanto para os cristais obtidos da HEWL, como da tripsina, com os compostos de vanádio apresentados anteriormente, foi selecionado o conjunto de dados com maior resolução, os quais foram processados utilizando o programa XDS. (Kabsch 2010)

As reflexões foram indexadas e integradas, e as constantes da célula foram refinadas. As estruturas foram resolvidas pelo método da substituição molecular usando como modelo estruturas depositadas na base de dados do PDB (PDB, [www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/)) de alta resolução das mesmas proteínas (descrição mais detalhada na próxima secção). Com base nas fases iniciais estimadas, os mapas de densidade eletrónica foram inspecionados para analisar a presença ou ausência de aductos da proteína com os complexos metálicos. Apesar de se ter procedido de igual modo para todos os cristais, verificou-se que apenas os cristais de tripsina 30 mg/mL sem benzamidina com o composto VO(pic)<sub>2</sub> obtido por co-cristalização, na condição 30 (da Tabela 4.2), e com o composto VO(pic)<sub>2</sub> com arginina obtido por co-cristalização, na condição 31 (da Tabela 4.3), mostravam ter uma densidade anómala referente ao átomo de vanádio na estrutura, indicativa de que o composto poderia encontrar-se ligado à proteína. Assim, os vários conjuntos de dados, quer de HEWL quer de tripsina, cujo *soaking*/co-cristalização não foram alcançados com sucesso, foram abandonados, e a análise das estruturas prosseguiu apenas para a estrutura da tripsina com o complexo VO(pic)<sub>2</sub> – a estrutura de tripsina na presença de V(IV) e arginina encontra-se ainda numa fase muito primária de refinamento, pelo que não será abordada nesta dissertação.

##### 4.1.1.3.1 – V<sup>IV</sup>O(pic)<sub>2</sub>-tripsina

Como referido anteriormente o cristal de tripsina com o composto VO(pic)<sub>2</sub> difratou até 1,09 Å, e recorreu-se ao programa XDS para indexar as imagens recolhidas do cristal aquando a sua experiência

de difração, e obter os parâmetros que caracterizam a célula unitária (constantes  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e ângulos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.4, onde se pode concluir que dado  $a=b\neq c$  e que  $\alpha=\beta=90^\circ$  e  $\gamma=120^\circ$ , o cristal pertence ao sistema cristalino hexagonal.

Utilizou-se o programa AIMLESS (Evans 2011) presente no conjunto de programas cristalográfico CCP4 (Dodson 1987) para determinar o grupo espacial mais provável, tendo em conta tendo em conta a posição relativa das reflexões e os elementos de simetria que as relacionam, bem como para escalar os dados e analisar a qualidade dos mesmos, podendo as intensidades das reflexões medidas não se encontrar na mesma escala – limitação esta que o programa AIMLESS ajuda a ultrapassar. Determinou-se que o cristal pertencia ao grupo espacial  $P3_121$ , e as estatísticas referentes aos dados recolhidos encontram-se discriminadas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Estatísticas da recolha e qualidade dos dados de difração para o cristal.  $R_{merge} = \frac{\sum |I_k| - \langle I \rangle}{\sum |I_k|}$ , onde  $I_k$  corresponde à intensidade de cada reflexão e  $\langle I \rangle$  corresponde à intensidade média de cada reflexão a partir de observações múltiplas;  $VM = \frac{V}{Z \times Mp}$ , onde  $V$  é o volume da célula unitária,  $Z$  é o número de unidades assimétricas presentes na célula unitária, e  $Mp$  é a massa molecular da proteína; Conteúdo de solvente =  $\left(1 - \frac{1,23}{VM}\right) \times 100$

Parâmetros	Valores globais	Camada externa de resolução
Comprimento de onda (Å)	1,04	–
Grupo espacial	$P3_121$	–
Constantes da Célula unitária (Å, °)	$a = b = 54,52$ , $c = 108,2$ $\alpha = \beta = 90$ , $\gamma = 120$	–
Resolução (Å)	47,22-1,09	1,11-1,09
$\langle I/\sigma \rangle$	8,2	2,2
$CC_{1/2}$	0,995	0,761
Número de Reflexões totais	423729	19569
Número de Reflexões únicas	78462	3802
$R_{merge}$ (%)	8,6	59,5
Multiplicidade	5,4	5,1
Mosaicidade (°)	0,04	–
Completeness (%)	100	100
Número de moléculas por unidade assimétrica	1	–
Coefficiente de Matthews (VM) (Å <sup>3</sup> /Da)	1,98	–
Conteúdo em solvente (%)	37,78	–

De modo a confirmar a qualidade dos dados recolhidos inspecionaram-se vários parâmetros, como o número de reflexões recolhidas, a relação entre intensidade da reflexão e nível de ruído, entre outros. O parâmetro  $\langle I/\sigma \rangle$  traduz o erro associado aos dados de difração (Wlodawer et al. 2008). O seu valor é de 8,2, o que nos indica que a intensidade medida para as reflexões do cristal é 8,2 vezes superior ao valor do desvio padrão das intensidades em questão, indicando, numa primeira análise, a qualidade dos dados de difração do cristal. O coeficiente de correlação,  $CC_{1/2}$  também é um parâmetro indicativo



da qualidade dos dados, usando apenas metade dos dados de cada reflexão única que são medidos, divididos de uma forma aleatória, sendo calculado entre as intensidades médias de cada subconjunto de dados (Karplus & Diederichs 2012).  $CC_{1/2}$  fornece igualmente uma avaliação direta da relação entre sinal/ruído que contribuem para a variação dos dados na camada de resolução, sendo ainda um indício da existência ou não de erros sistemáticos dos dados, que possam derivar de uma incorreta distribuição das intensidades das reflexões (Diederichs & Karplus 2013). O seu valor deve ser superior a 0,5 para a camada de resolução mais elevada (Karplus & Diederichs 2012), e para o caso concreto, é de 0,995.

O  $R_{merge}$  é outra medida utilizada para determinar a qualidade dos dados experimentais, a qual reflete a concordância entre reflexões equivalentes, e o seu valor deve situar-se entre os 5% e os 10% (Wlodawer et al. 2008), como é o caso do cristal em estudo, apresentando um valor de 8,6%. O seu valor pode aumentar até 50% na camada externa de resolução, tal como se verifica.

A multiplicidade deste conjunto de dados é de 5,4, e é calculada através da razão entre o número de reflexões únicas (não relacionadas por simetria) e o número de reflexões totais, sendo um parâmetro que indica o número de vezes que uma reflexão foi medida, assumindo que, quanto maior o valor de multiplicidade, mais precisa será a estimativa das intensidades associadas a cada reflexão e respetivo erro. (Wlodawer et al. 2008)

Por outro lado, a mosaicidade revela o grau de organização da rede cristalina, representando o desfasamento das várias células unitárias no espaço tridimensional do cristal. O cristal medido apresenta um valor de mosaicidade  $0,04^\circ$ , indicativo de que o cristal se encontra bem ordenado. (Carvalho et al. 2009)

Os dados recolhidos encontram-se completos já que, para a resolução selecionada todas as reflexões possíveis foram medidas, o que se traduz em termos percentuais pela *completeness*. (Wlodawer et al. 2008)

De acordo com o coeficiente de Matthews, o cristal apresenta 37,8% de solvente com apenas uma molécula de tripsina por unidade assimétrica. Este coeficiente relaciona o volume da célula unitária com a massa molecular da proteína em estudo. Estatisticamente, cristais de proteína apresentam um conteúdo de solvente entre 30-70%.

É então possível afirmar, que qualquer um dos parâmetros até aqui discutidos aponta para uma boa qualidade dos dados de difração recolhidos para o cristal.

Para iniciar a resolução da estrutura, é necessário calcular o ângulo da fase de cada reflexão, de modo a se obterem os fatores de estrutura ( $F_{hkl}$ ) necessários para o cálculo dos mapas de densidade eletrónica. Para tal, foi utilizado o método de Substituição Molecular (MR), dado que a estrutura desta proteína já é conhecida, selecionando-se a estrutura com o código 1S0Q, depositada no PDB, como modelo, e utilizando o programa PHASER (McCoy et al. 2007) do CCP4.

A estrutura escolhida apresenta uma resolução bastante elevada de 1,02 Å, sendo bastante semelhante à estrutura em estudo, e possuindo apenas um íão cálcio como ligando – o qual foi removido, bem como todas as moléculas de água da estrutura, utilizando-se apenas a cadeia polipeptídica.

Após a escolha da estrutura, é então possível proceder à substituição molecular, a qual foi feita recorrendo ao programa PHASER. Este programa calcula os ângulos da fase ( $\alpha_{hkl}$ ) necessários para o cálculo dos fatores de estrutura, usando as funções de rotação e translação para procurar uma molécula de proteína na unidade assimétrica.

Através dessas mesmas funções de rotação e translação, foi encontrada a solução para o conjunto de dados no grupo espacial  $P3_121$  do cristal, apresentando valores de LLG (*Log Likelihood Gain*) e *Z-score* bastante elevados, tanto de rotação (LLG de 92 e *Z-score* de 3,3) como de translação (LLG de 7598 e *Z-score* de 8,2).

O parâmetro LLG quantifica o quão melhor os dados experimentais podem ser previstos, utilizando o modelo em causa, do que com uma distribuição aleatória dos mesmos átomos, sendo que quanto maior o seu valor, mais correta é a previsão, enquanto o *Z-score* funciona como uma medida do desvio padrão da solução encontrada face à média, sendo que para ambos os casos, os valores encontram-se dentro do esperado.

De acordo com os resultados, é possível concluir que a estrutura foi resolvida, tendo-se obtido assim os fatores de estrutura e as fases (que permitem calcular mapas de densidade eletrónica) da estrutura do complexo de tripsina com VO(pic)<sub>2</sub>.

Nesta etapa toda a informação necessária para proceder com o refinamento da estrutura foi obtida – refinamento esse, que é crucial para a obtenção do modelo final. O refinamento consiste em, progressivamente, ajustar o modelo à sua densidade eletrónica, minimizando as diferenças entre os fatores de estrutura observados ( $F_o$ ) e os fatores de estrutura calculados ( $F_c$ ) anteriormente.

A estrutura foi refinada recorrendo ao programa REFMAC5 (Murshudov et al. 2011) do CCP4, e as estatísticas obtidas encontram-se na Tabela 4.5.

Também através do programa Coot (Emsley & Cowtan 2004), foi possível manipular o modelo, auxiliando o seu ajuste à densidade eletrónica.

Tabela 4.5 – Estatísticas do refinamento final da estrutura de VO<sup>IV</sup>(pic)<sub>2</sub>-tripsina.

<b>VO<sup>IV</sup>(pic)<sub>2</sub>-Tripsina</b>	
Fator R (%)	11,14
$R_{free}$ (%)	13,62
RMSD para o comprimento de ligação (Å)	0,015
RMSD para o ângulo de ligação (°)	1,813
Gráfico de Ramachandran (%)	
- resíduos nas regiões mais favoráveis	96,35
- resíduos nas regiões permitidas	3,65
- resíduos nas regiões não permitidas	0

Analisando as estatísticas da Tabela 4.5, podemos concluir que o modelo se encontra bem refinado e pronto a depositar na base de dados do PDB. O fator R obtido de 11,14% mostra que existe uma boa relação entre os fatores de estrutura calculados e os observados, devendo o seu valor ser o mais pequeno possível indicando que o modelo foi bem construído ao longo do refinamento. O fator  $R_{free}$  é outro parâmetro importante na avaliação da concordância entre o modelo calculado e os dados observados, sendo calculado da mesma forma que o fator R, mas usando apenas 5% das reflexões (separadas previamente aquando o uso do programa AIMLESS, e não utilizadas para o cálculo da estrutura). Torna-se importante a comparação entre ambos os fatores R e  $R_{free}$ , pois discrepâncias muito elevadas entre os seus valores podem indicar que existem problemas no ajuste do modelo. O  $R_{free}$  não deve ser superior ao fator R por mais de 5% (Wlodawer et al. 2008), tal como se verifica na estrutura em estudo.

Os valores de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) que indicam o desvio que a estrutura apresenta em relação aos valores teóricos expectáveis, encontram-se abaixo dos valores considerados razoáveis (0,02 Å em relação ao comprimento de ligação e 3° em relação ao ângulo de ligação).

Por fim, o gráfico de Ramachandran permite averiguar se a maioria dos resíduos de aminoácidos da estrutura se encontram nas regiões mais favoráveis, e conseqüentemente, uma correta disposição molecular do modelo. O gráfico representa os ângulos de torção  $\psi$  em função de  $\phi$  para cada aminoácido, sendo estes os ângulos de torção em torno da cadeia polipeptídica principal (Carvalho et al. 2009), e pela observação dos valores da Tabela 4.5, podemos verificar que a maioria dos resíduos se encontra nas regiões mais favoráveis.

A partir da análise dos parâmetros descritos, pode-se concluir que o modelo está correto e de acordo com os dados experimentais, não apresentando erros significativos, permitindo assim o avanço para a etapa de caracterização e análise da estrutura.

Através do mapa de densidade eletrónica tornou-se possível verificar a existência de um complexo metálico no centro ativo da proteína, que se interpretou como sendo o metal de vanádio, coordenado com dois ligandos de Hpic (ambos sob a forma de pic), um átomo de oxigénio, e à cadeia lateral do resíduo de Ser195, numa geometria octaédrica: para tal criou-se um mapa de densidade anómala, recorrendo-se ao programa CAD e FFT (Read & Schierbeek 1988) do CCP4. A identificação foi feita

com base no facto de o complexo possuir o átomo de vanádio, um metal de transição, que consegue absorver os raios-X e difratá-los de forma diferente – provocando uma alteração da fase das reflexões, quando comparado com outros átomos tais o carbono, o oxigénio e o hidrogénio. (Rhodes 2006)

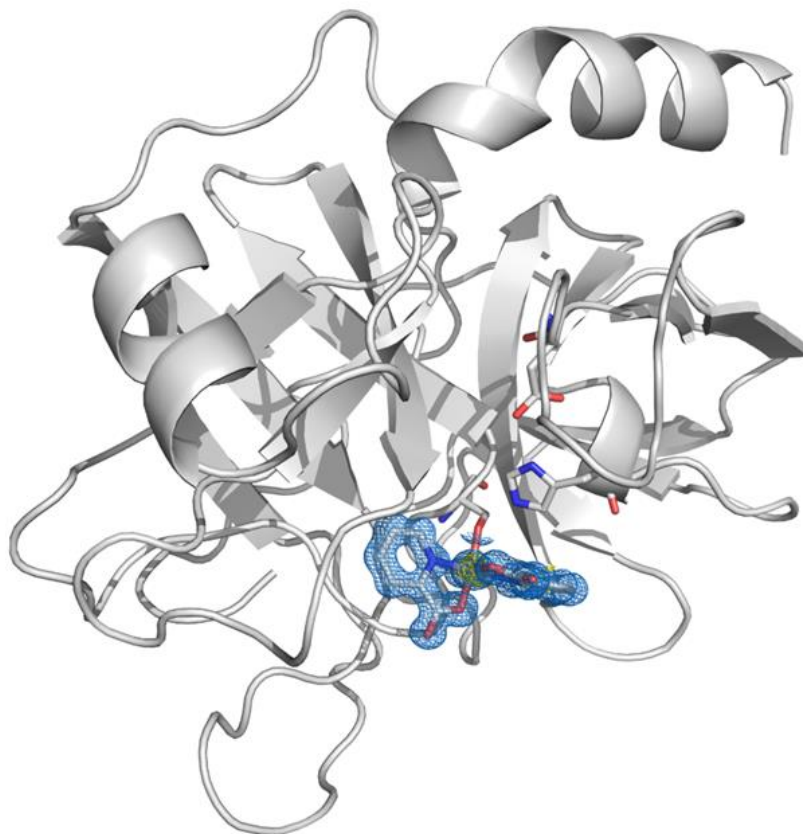


Figura 4.3 – Representação gráfica da estrutura do complexo  $V^{IVO}(pic)_2$ -tripsina. O mapa 2Fo-Fc (a azul) possui um contorno de  $1\sigma$ , enquanto o mapa de densidade anómala (a amarelo) possui um contorno de  $3\sigma$ . A imagem foi construída no programa Pymol (DeLano 2002).

Toda a superfície da estrutura foi analisada, verificando-se que, tal como na estrutura de  $V^{IVO}(pic)_2$ -HEWL (Santos et al. 2014), o complexo  $V^{IVO}(pic)_2$  encontrava-se localizado no centro ativo da proteína, de um modo semelhante à estrutura da HEWL. A ligação do complexo nas estruturas de HEWL e Tripsina ocorreu no centro ativo das proteínas, exibindo uma geometria octaédrica, e no caso do  $V^{IVO}(pic)_2$ -HEWL foi identificada uma interação com a cadeia lateral do resíduo de Asp52.

O centro ativo da tripsina é conhecido por integrar no seu domínio catalítico a tríade catalítica constituída pelos três resíduos Ser195, His57 e Asp102. Nesta região a enzima apresenta uma fenda na qual se ligam os substratos, onde a serina catalítica (Ser195), se encontra posicionada de um lado, e a His57 e o Asp102 do outro, fazendo uma rede de ligações de hidrogénio entre si, e com alguns resíduos vizinhos. Na Figura 4.4 é possível verificar, com maior detalhe, a ligação do complexo ao centro ativo, e a sua interação com a serina catalítica da tripsina.

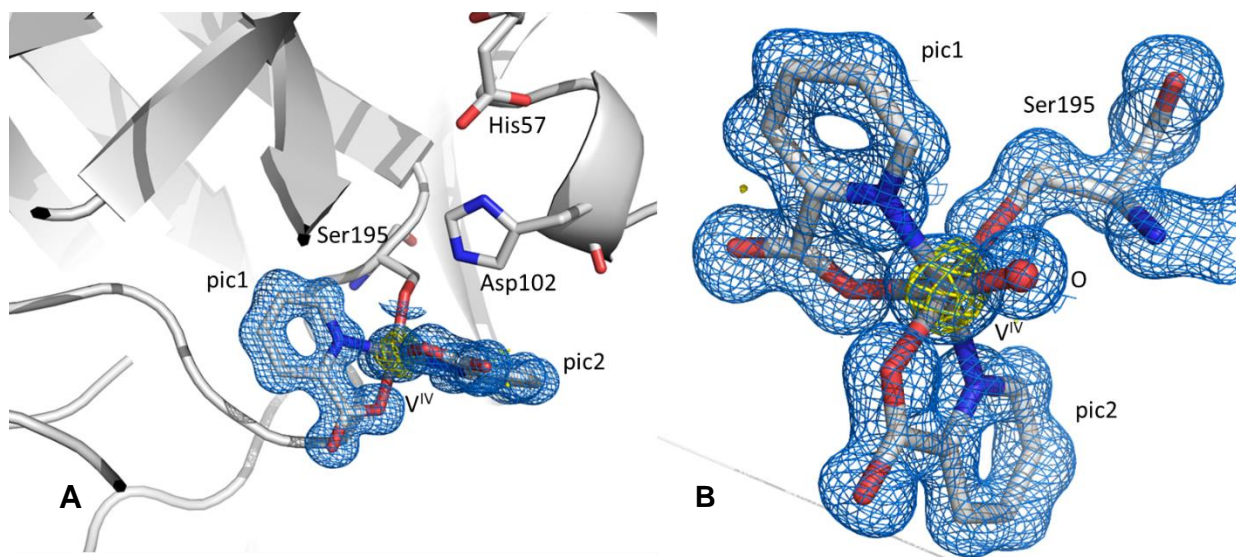


Figura 4.4 – Representação gráfica da estrutura do complexo  $V^{IV}O(pic)_2$ -tripsina, com interação detalhada entre  $V^{IV}O(pic)_2$  e o resíduo Ser195 (B), bem como os restantes resíduos da tríade catalítica, His57 e Asp102 (A). O mapa de densidade 2Fo-Fc (a azul) possui um contorno de  $1\sigma$ , enquanto o mapa de densidade anômala (a amarelo) possui um contorno de  $3\sigma$ . O átomo de vanádio encontra-se colorido a amarelo, no centro. A imagem foi construída no programa Pymol.

Estes resultados revelam não só que o vanádio pode ligar-se covalentemente à proteína, no seu centro ativo, como pode manter a coordenação aos ligandos adicionados, aquando da interação com a mesma. Esta característica já tinha sido observada na estrutura da HEWL na presença do mesmo complexo de vanádio (Santos et al. 2014). De acordo com estes dados, é possível extrapolar que alguns complexos de  $VO(\text{ligando})_2$  podem ligar-se covalentemente a outras proteínas ou enzimas, e assim desempenhar a sua ação biológica. Este tipo de interação poderá ocorrer também com as proteínas do plasma, responsáveis pelo seu transporte na corrente sanguínea até às células/tecidos alvo, favorecendo de alguma forma a absorção do metal pelas células.

Assim sendo, tendo em conta a localização do complexo no centro ativo da proteína, e sabendo o potencial terapêutico que os compostos de vanádio exibem, é necessário proceder-se a estudos que permitam caracterizar esta interação, suportando ou não, a teoria de que este composto ao ligar-se ao centro ativo da proteína, possa agir como um inibidor da sua atividade, e conseqüentemente, ser ou não responsável por efeitos secundários ainda não reportados. Para tal foram levados a cabo ensaios cinéticos para testar a atividade enzimática da HEWL, e da tripsina, bem como a sua eventual inibição.

## 4.1.2 – Ensaios Cinéticos

### 4.1.2.1 – Compostos de vanádio com a proteína HEWL

Nos ensaios cinéticos com a HEWL, foram utilizadas as bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis*, dado que a HEWL é uma proteína conhecida por quebrar a parede do peptidoglicano através da hidrólise das ligações glicosídicas, em bactérias Gram-positivas, como referido anteriormente (Callewaert et al. 2008; Callewaert & Michiels 2010).

Começou-se por testar de forma preliminar a atividade da HEWL utilizando um controlo negativo de apenas células *B.subtilis*, um controlo positivo com as células *B.subtilis* e a proteína, e as células com a proteína incubada com os compostos de V(IV) e VO(pic)<sub>2</sub>. Os ensaios foram realizados durante 100 minutos, à temperatura ambiente, tendo os compostos sido colocados em gelo durante os seus períodos de 0; 1 e 2 horas de incubação com a proteína. Os ensaios foram efetuados no espectrofotómetro, a 600nm – comprimento de onda ao qual se quantifica a D.O. das células (Paidhungat et al. 2002). Antes de dar início aos ensaios, verificou-se que não haveria interferência dos compostos de vanádio a este comprimento de onda, uma vez que o metal absorve na gama dos 244-320nm (Xiong et al. 2000). Todas as absorvâncias foram convertidas em percentagem para facilitar a comparação entre os resultados e a sua análise.

O estudo dos dois compostos V(IV) e VO(pic)<sub>2</sub> foi feito com um intuito comparativo, atendendo à tentativa de interpretar não só se existe um efeito inibitório na HEWL originado pelos compostos, como também, caso este exista, se é derivado da complexação do vanádio com o ligando Hpic, ou apenas pela eventual ligação do metal ao centro ativo da proteína.

Como esperado, a D.O. das células de *B.subtilis* manteve-se constante ao longo do tempo, com um valor aproximado de 100% (verificando-se apenas ligeiras oscilações não significativas), o que indica a estabilidade das células ao longo do ensaio. Na presença de HEWL, face à sua atividade enzimática, pode verificar-se a existência um decréscimo da D.O. (Figura 7.1 do Anexo 1, em Anexos), ao longo dos três tempos de solubilização da proteína, realizados paralelamente aos ensaios da variação dos tempos de incubação da proteína com os compostos. Já nos ensaios levados a cabo apenas com a proteína incubada com V(IV) (Figura 7.2 do Anexo 1, em Anexos), foi possível verificar um grande decréscimo da D.O. para os três períodos de incubação (os valores diminuíram até aproximadamente 20% nos três casos em estudo, valores estes, semelhantes aos que se obtêm quando se adiciona apenas a proteína às células), indicando que o metal sozinho não possui um efeito inibitório na atividade da HEWL. Por fim, os resultados correspondes à adição do complexo de VO(pic)<sub>2</sub> com HEWL às células (Figura 4.5) demonstraram um efeito inibitório do complexo na atividade da proteína, sendo este efeito mais acentuado para as 2 horas de incubação, onde os valores de D.O. apenas sofreram um decréscimo para valores de 70%. Para as 0 e 1 horas de incubação, a D.O. sofreu um decréscimo maior, atingindo os 50% e 55%, respetivamente.

Na Figura 4.5 é possível visualizar a comparação direta entre o efeito da adição de HEWL às células de *B.subtilis* (cujos valores correspondem à média dos seus 3 tempos de solubilização), e a adição do complexo VO(pic)<sub>2</sub> com a proteína, ao longo dos vários tempos de incubação, denotando-se o potencial inibitório do composto.

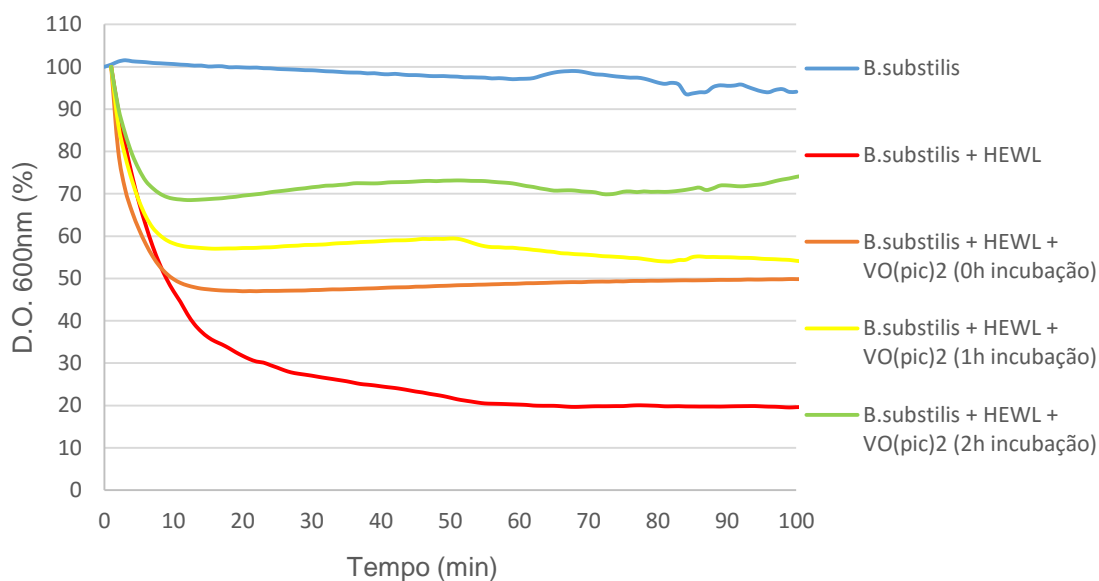


Figura 4.5 – Representação gráfica da D.O. (em %) a 600 nm ao longo do tempo de *B.subtilis* na presença de HEWL 0,1mg/mL, e *B.subtilis* na presença de HEWL com VO(pic)<sub>2</sub> 0,1mg/mL, com tempos de 0;1 e 2 horas de incubação, durante 100 minutos. Os compostos incubados com a proteína foram colocados em gelo até ao momento da realização dos ensaios. Os valores de D.O. correspondem à média dos replicados técnicos, e os ensaios foram realizados no espectrofotómetro Ultrospec 2100, à temperatura ambiente.

Desde modo, conclui-se que as 2 horas de incubação traduzem o pico de eficácia do potencial inibitório do complexo VO(pic)<sub>2</sub> face à atividade da HEWL. Sendo que o V(IV) não possui qualquer efeito inibitório sem a complexação com o ligando, não foram realizados mais testes com este composto, focando-se apenas no complexo VO(pic)<sub>2</sub>. Através destes dados, podemos ainda concluir que a duração ótima dos ensaios deve rondar os 60 minutos, tendo-se verificado que a partir dos 50 minutos a D.O. estabiliza, não havendo mais alterações no comportamento das células.

Adicionalmente, de modo a certificar que o metal sozinho não afetava as células de modo algum, foi ainda feito um controlo negativo, com duração de 15 minutos, à temperatura ambiente, para analisar o comportamento das células *B.subtilis* na ausência de HEWL, com apenas vanádio solubilizado durante um período de 0; 1 e 2 horas. Tal verificou-se, tendo em conta que a D.O. das células se manteve constante, em valores de aproximadamente 100%, tal como se pode verificar pela Figura 4.6.

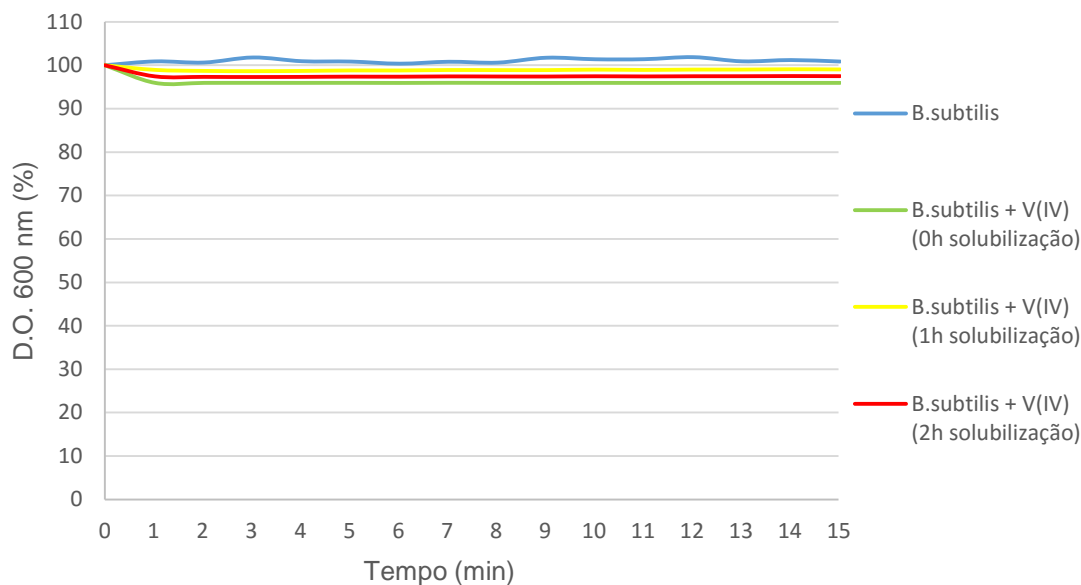


Figura 4.6 – Representação gráfica da D.O. (em %) a 600 nm ao longo do tempo de *B.subtilis* com V(IV) 0,275 mM solubilizado durante 0; 1 e 2 horas. Os valores de D.O. correspondem à média dos replicados técnicos, e os ensaios foram realizados no espectrofotómetro Ultrospec 2100, à temperatura ambiente, durante 15 minutos.

De modo a se poder tirar conclusões assertivas acerca dos resultados obtidos, é necessário otimizar as condições dos ensaios, variando parâmetros tais como a temperatura ideal a que devem ser realizados (garantindo a existência de atividade catalítica por parte da proteína), e o tempo de incubação do complexo VO(pic)<sub>2</sub> com a proteína que exibe maior eficácia, bem como até que ponto este deixa de ser eficaz – sendo a oxidação do V(IV) a V(V) uma hipótese, o que levaria a que o vanádio pudesse perder a coordenação com os seus ligandos, e até à proteína, deixando de exercer um efeito inibidor.

Para tal, procedeu-se à realização de novos ensaios, utilizando o leitor de microplacas, onde foi possível proceder-se à variação da temperatura à qual se realizam os ensaios.

Para o complexo de HEWL com VO(pic)<sub>2</sub>, bem como com as células de *B.subtilis* com a HEWL, foram testadas as temperaturas 20°C; 27°C; 37°C e 45°C durante 60 minutos. O complexo foi incubado com a proteína durante 2 horas, e mantido em gelo até à realização dos ensaios. Os resultados dos ensaios para as diferentes temperaturas encontram-se ilustrados no Anexo 1, em Anexos (Figura 7.3-7.6), sendo a Figura 4.7 uma compilação dos mesmos, onde é possível verificar uma comparação direta das várias temperaturas.

Os resultados obtidos indicam a temperatura de 27°C como a temperatura ideal, obtendo-se os melhores resultados para averiguar a inibição da atividade da HEWL por parte do complexo VO(pic)<sub>2</sub>, bem como para a estabilização das células no seu valor máximo de D.O. Foi assim determinada a temperatura ideal para prosseguir com os restantes ensaios.



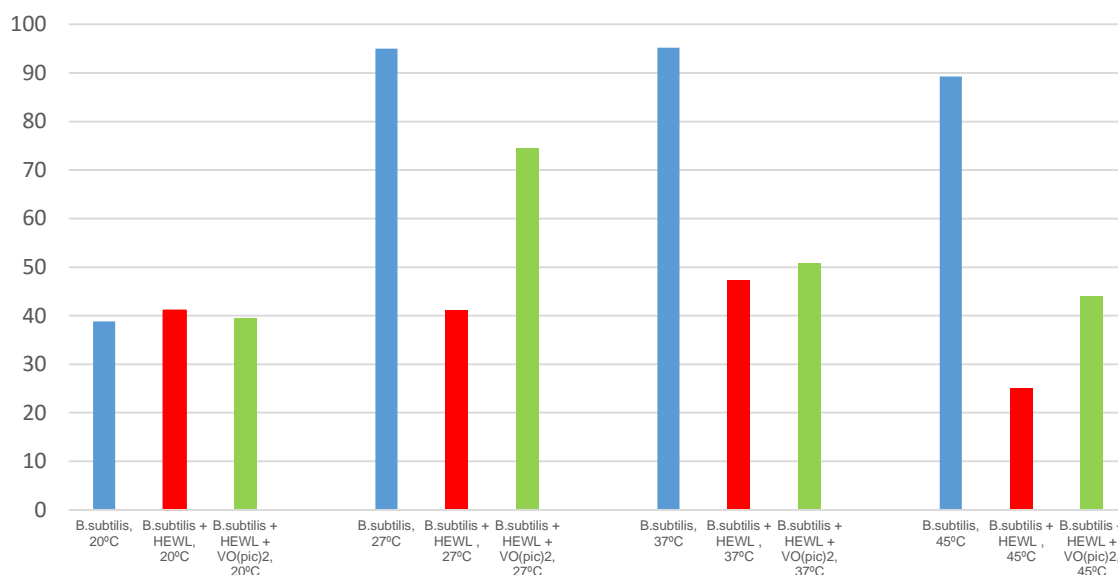


Figura 4.7 – Representação gráfica dos valores de D.O. (em %) a 600 nm ao longo do tempo de *B. subtilis* na presença de HEWL 0,1 mg/mL, e *B. subtilis* na presença de HEWL com VO(pic)<sub>2</sub> 0,1 mg/mL, com 2 horas de incubação do composto com a proteína, variando as temperaturas de realização dos ensaios entre 20°C; 27°C; 37°C e 45°C durante 60 minutos. Os compostos incubados com a proteína foram colocados em gelo até ao momento da realização dos ensaios. Os valores de D.O. correspondem à média dos replicados técnicos, e os ensaios foram realizados no leitor SpectraMax Microplate.

Após a escolha da temperatura ideal para a realização dos ensaios, prosseguiu-se com a variação dos tempos de incubação da proteína com o complexo de VO(pic)<sub>2</sub>, numa gama de 0; 1; 2 e 3 horas, a 27°C, utilizando de novo o leitor de microplacas, de forma a confirmar, de um modo mais concreto, se os resultados eram consistentes com os obtidos anteriormente.

Contudo, os ensaios demonstraram que os resultados não eram reproduzíveis como desejado. Para alguns casos, não foi possível observar um efeito inibitório por parte do complexo VO(pic)<sub>2</sub>, e nos casos onde o efeito foi observado, este demonstrou-se muito aquém do esperado (nomeadamente, os resultados correspondentes às 2 horas de incubação do complexo com a proteína).

Assim sendo, apesar de se ter verificado um efeito inibitório do composto VO(pic)<sub>2</sub> na atividade da HEWL com as células de *B. subtilis*, e se terem determinado as temperaturas ótimas para a realização dos ensaios, os resultados provaram-se um pouco inconstantes, não tendo sido reproduzíveis, e não se tendo otimizado os tempos de incubação – revelando a necessidade de recorrer a novas otimizações, e adquirir mais informação, para melhor compreender os comportamento que o complexo exerce na atividade da proteína. A próxima etapa será repetir de novo os ensaios visando a sua reprodutibilidade, e concluir acerca dos períodos de incubação ótimos dos compostos com a proteína, variar as concentrações de *B. subtilis* utilizadas, bem como as concentrações do composto de vanádio com o ligando Hp<sub>ic</sub>, e da HEWL.

A lisozima é uma proteína que forma fibras amilóides, estando diretamente associada à amiloidose sistêmica não-neuropática hereditária. Deste modo, a inibição da atividade desta enzima por complexos de vanádio, pode assim ajudar no tratamento de doenças relacionadas com a amiloidose (Shariatizi et

al. 2015). Estudos cinéticos complementares devem ser feitos com o intuito de compreender as consequências de terapias anti-diabéticas, usando complexos de vanádio, na atividade da lisozima.

#### 4.1.2.2 – Compostos de vanádio com a proteína tripsina.

Os ensaios cinéticos com a proteína tripsina foram realizados apenas para o composto de  $VO(pic)_2$ , tendo em conta que apenas se obteve uma estrutura cristalográfica para este aducto, como demonstrado na secção 4.1.1.3.1.

A otimização das condições dos ensaios com a tripsina, utilizando como substrato BApNA, foram realizadas no leitor de microplacas. O BApNA é substrato cromogénico, utilizado para ensaios cinéticos de endoproteases com especificidade para a arginina, que absorve a 410 nm.

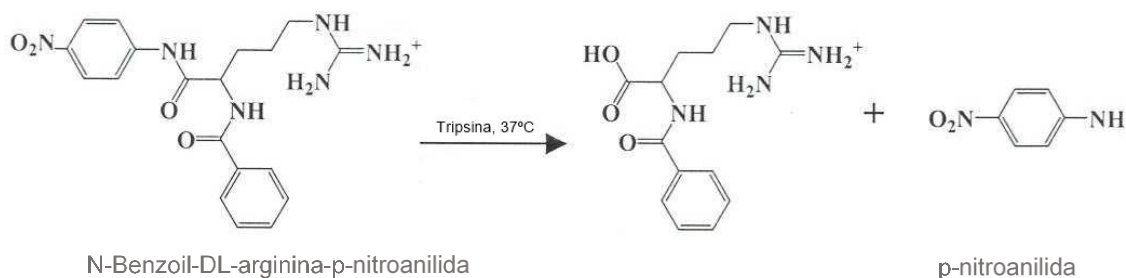


Figura 4.8 – Representação esquemática da reação entre o substrato cromogénico BApNA e a proteína.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 4.9, é possível verificar que as condições para a análise da atividade enzimática da tripsina se encontram otimizadas, exibindo a proteína uma maior atividade à medida que a sua concentração, e a concentração de substrato usada, aumenta.

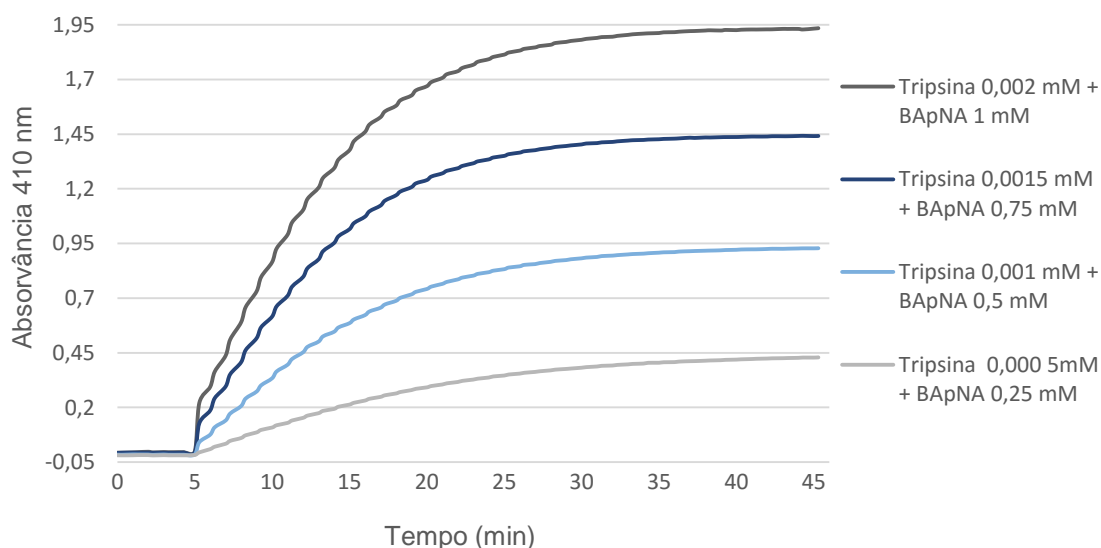


Figura 4.9 – Representação gráfica da absorbância a 410 nm ao longo do tempo, testando várias concentrações de substrato e de proteína. O substrato BApNA foi dissolvido em 20% DMSO, e a tripsina no seu tampão 50 mM Tris-HCl a pH 7,5, e 20 mM  $CaCl_2$ . Os resultados correspondem à média dos replicados técnicos, e o ensaio foi conduzido a 37°C durante 45 minutos, sendo que os primeiros 5 minutos da reação correspondem ao período de estabilização do substrato, no leitor SpectraMax Microplate.

Posto isto, foram então realizados ensaios cinéticos, de modo avaliar o potencial inibitório do complexo VO(pic)<sub>2</sub> na atividade da proteína. Foram utilizadas diferentes concentrações de substrato, e para cada uma delas, foram medidas as absorvâncias para diferentes estequiometrias do complexo, atingindo concentrações finais de 0,0125; 0,025; 0,05; 0,125; 0,1575; 0,1875; 0,2125 e 0,25 mM de V(IV), numa estequiometria de V(IV):Hpic de 5:15; 10:30; 20:60; 50:150; 63:189; 75:225; 86:264 e 100:300. Para todos os ensaios foi utilizada uma mesma concentração de tripsina, correspondente a 0,0025 mM.

Apesar dos ensaios terem sido realizados, os resultados foram inconclusivos, aparentando a existência de erros técnicos, impossibilitando também o cálculo das constantes cinéticas da reação.

Apesar de serem necessários mais estudos, os resultados preliminares sugerem que o complexo de vanádio com o ligando Hpic não exerce um efeito inibitório na atividade da proteína, havendo uma maior afinidade do substrato BApNA para com a proteína, do que a afinidade do complexo para com a mesma. Apesar de se ter verificado estruturalmente que o complexo se liga covalentemente ao centro ativo da enzima, são requeridos mais estudos e otimizações dos ensaios cinéticos, de modo a se poder obter resultados conclusivos acerca do potencial inibitório do complexo de VO(pic)<sub>2</sub> na atividade da proteína, bem como o cálculo das constantes cinéticas. Caso este efeito se verifique, interessa compreender se a ele estarão associados efeitos secundários provenientes da administração de complexos de vanádio.

Mais ainda, a importância de inibir proteínas como a tripsina reside no facto de os tripsinogénios (proteínas de serina pancreáticas, precursoras de tripsina), serem expressos em vários tipos de tumores sob a forma de tumor-associado a tripsinogénios (TAT 1 e 2), promovendo o desenvolvimento e a invasão das células tumorais, através da estimulação do recetor EGF, sendo um exemplo a expressão elevada de tripsinogénio-2, um indicador de pancreatite aguda. (Bjartell et al. 2005; Stenman 2015)

Para além disso, a tripsina integra a família das protéases, e caso os compostos de vanádio se integrassem na categoria de inibidores das protéases de serina, poderiam ser testados com outras enzimas de protéases para além desta. As investigações intensivas e constantes para achar inibidores de protéases são de extrema importância, uma vez que o principal motivo por detrás das mesmas se relaciona com a sua potencial aplicação terapêutica de diferentes doenças tais como cancro, Alzheimer e SIDA, às quais se encontra associada uma desregulação das protéases. (Bosnic et al. 2009; Zhang et al. 2013)

## **4.2 – CORM-3**

Para este trabalho, foi selecionado o CORM-3 visando a caracterização da sua interação, e os efeitos que este exerce em linhas celulares cancerígenas e numa linha primária de células saudáveis, aquando a formação de nanosistemas incorporando o CORM funcionalizado às AuNPs, ligado por meio de proteínas.

#### 4.2.1 – Síntese, funcionalização e caracterização das AuNPs

O primeiro passo para a obtenção das AuNPs foi a sua síntese, como descrito pelo método discriminado na secção 3.2.1.1 dos Materiais e Métodos. Após a síntese das AuNPs, estas foram caracterizadas por espectrofotometria UV/visível. Através do espectro de absorção obtido (Figura 4.9) recorreu-se à Lei de Lambert-Beer, utilizando o valor  $2,33 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  como coeficiente de extinção molar (Baptista et al. 2005; Soloviev 2012), para calcular a concentração das AuNPs, sendo esta de 13,2 nM (Soloviev 2012). O espectro apresenta um pico de absorção a 519 nm característico da banda SPR de NPs monodispersas e esféricas, com um diâmetro aproximado de 14 nm. (Lien Nghiem et al. 2012; Cabral & Baptista 2013)

As AuNPs foram então funcionalizadas com PEG de modo a aumentar a sua estabilidade, biocompatibilidade e facilitar subseqüentes passos de funcionalização química (Dreaden et al. 2012) para adição de proteínas e CORM-3. Após funcionalização, procedeu-se novamente à caracterização por espectrofotometria UV/visível, onde se observou um desvio do pico de absorção da banda SPR para valores de 520 nm (Figura 4.10), e a uma contínua estabilidade das AuNPs, não havendo presença de agregados das mesmas. O desvio obtido vai de encontro ao esperado, uma vez que representa uma mudança no ambiente que rodeia as AuNPs, confirmando o sucesso da ligação entre o ouro e o PEG. O espectro mostra ainda que não houve agregação das AuNP, uma vez que não se verifica o aparecimento de uma banda a 600 nm (Soloviev 2012).

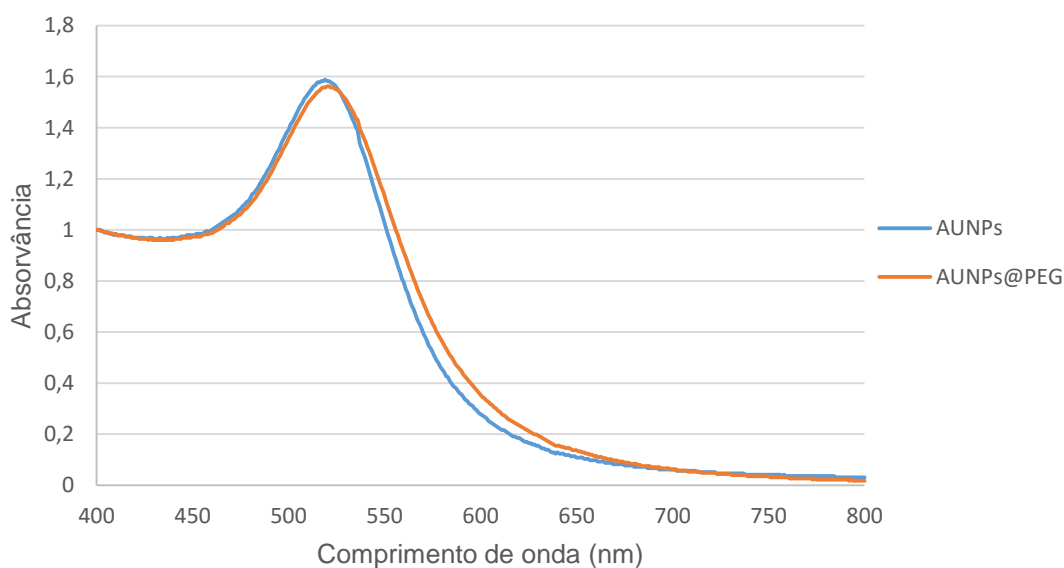


Figura 4.10 – Representação gráfica do espectro de absorção das AuNPs sintetizadas, e as AuNPs@PEG funcionalizadas, obtido por espectroscopia UV/visível, na gama de comprimentos de onda de 400 a 800 nm, no espectrofotómetro UVmini-1240.

Após caracterização por espectroscopia UV/visível, foi utilizado o método de Ellman's (Figura 7.7 do Anexo 2, em Anexos) para quantificar as cadeias de PEG ligadas covalentemente (através dos seus grupos tióis) à superfície das AuNPs. A quantidade de PEG (com peso molecular de 458,57 Da) utilizado para funcionalizar a superfície das AuNPs foi 0,035 mg/mL. O rácio calculado pelo método de

Ellman's foi de 1:2808, sendo que por cada AuNP ligaram-se covalentemente 2808 moléculas de PEG, correspondendo a uma concentração final de 0,0129 mg/mL de PEG (Conde et al. 2013). Este resultado sugere que a toda a superfície das AuNPs foi totalmente coberta por uma monocamada de PEG, encontrando-se saturada com o polímero, como desejável.

De seguida procedeu-se à funcionalização das AuNPs@PEG com as proteínas HEWL e BSA. A adição das proteínas ao nanoconjugado intendia facilitar a posterior ligação do CORM-3, uma vez que sabe-se que tanto as AuNPs como o CORM-3 conseguem ligar-se a proteínas, coloca-se o objetivo de que estas sirvam como intermediários biológicos para vectorização das AuNPs com o CORM-3 em questão.

A escolha das duas proteínas foi feita com base em diferentes critérios: por um lado, a BSA é uma proteína abundante do plasma, proteínas estas, que como referenciado na secção 1.2.2 da Introdução, se encontram na categoria de proteínas capazes de transportar os complexos de CORMs ao longo da corrente sanguínea. Para além disso, existem estudos onde a ligação da BSA ao CORM-3 (Chaves-Ferreira et al. 2015), se encontra bem caracterizada, sendo portanto possível recorrer a dados que permitam certificar o sucesso da interação entre ambos.

É sabido que a BSA se liga de modo não covalente a pequenas moléculas, resultando num aumento de solubilidade dos seus ligandos no plasma, podendo aumentar a eficácia da entrega dos mesmos nas células ou tecidos alvo. Para além disto, também a sua biocompatibilidade e a facilidade que apresenta em ser funcionalizada com outros ligandos, torna a BSA uma ótima candidata para integrar a vectorização de nanosistemas objetivando o *targeting* seletivo e a entrega de fármacos (Cañaveras et al. 2012).

A HEWL, apesar de não apresentar estudos que caracterizem a sua funcionalização às AuNPs, é uma proteína modelo simples no que toca à caracterização de interações com diversos compostos, tendo-se já dados da sua interação com o CORM em questão. (Teresa Santos-Silva et al. 2011; Chaves-Ferreira et al. 2015).

A funcionalização das AuNPs@PEG com ambas as proteínas foi levada a cabo utilizando a reação de EDC/NHS, como descrito na secção 3.2.1.2.1 dos Materiais e Métodos.

Inicialmente os conjugados AuNPs@PEG@BSA e AuNPs@PEG@HEWL foram caracterizados por espectroscopia UV/visível, onde é possível verificar novamente um desvio da banda SPR para cada um dos nanoconjugados, face as AuNPs@PEG. Os resultados encontram-se ilustrados nas Figuras 4.11 e 4.12, e os valores relativos aos desvios presentes na Tabela 4.6.

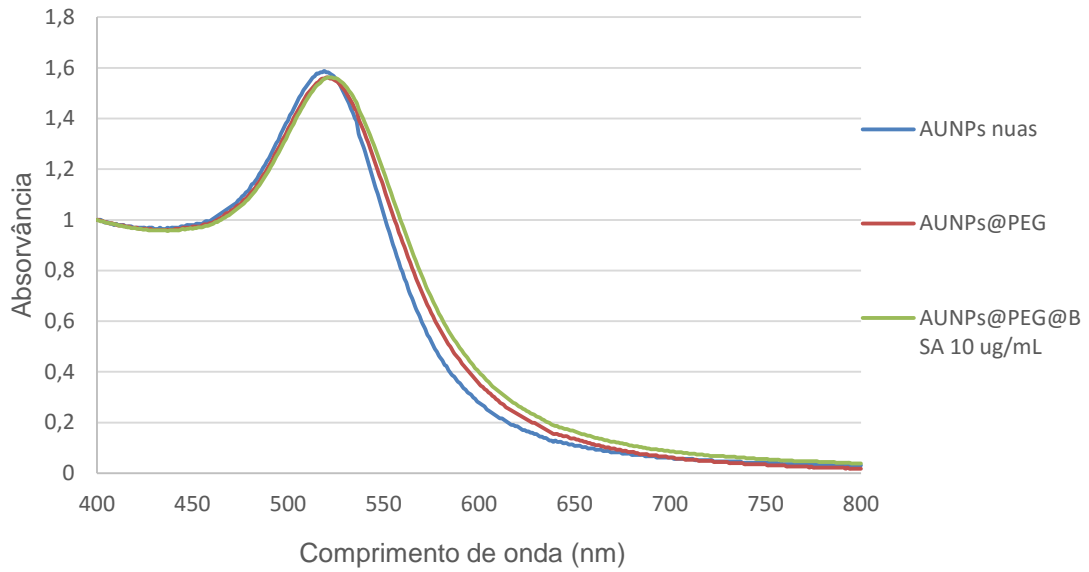


Figura 4.11 – Representação gráfica do espectro de absorção das AuNPs sintetizadas, AuNPs@PEG e AuNPs@PEG@BSA 10 µg/mL funcionalizadas, obtido por espectroscopia UV/visível, na gama de comprimentos de onda de 400 a 800 nm, no espectrofotômetro UVmini-1240.

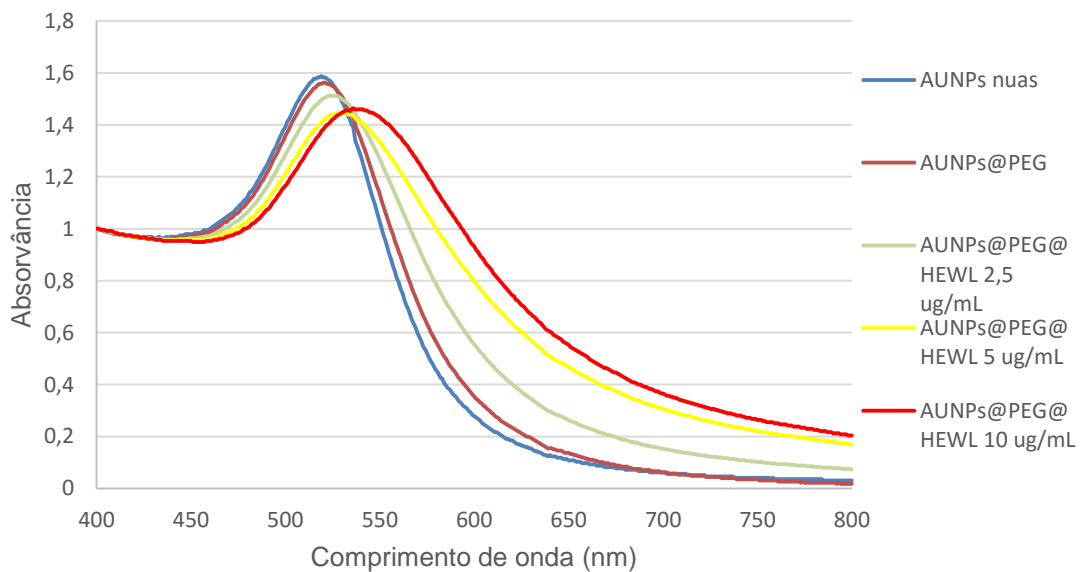


Figura 4.12 – Representação gráfica do espectro de absorção das AuNPs sintetizadas, AuNPs@PEG, AuNPs@PEG@HEWL 2,5 µg/mL, AuNPs@PEG@HEWL 5 µg/mL e AuNPs@PEG@HEWL 10 µg/mL funcionalizadas, obtido por espectroscopia UV/visível, na gama de comprimentos de onda de 400 a 800 nm, no espectrofotômetro UVmini-1240.

Tabela 4.6 – Valores correspondentes aos desvios dos picos da banda de absorção SPR das AuNPs@PEG@BSA 10 µg/mL, AuNPs@PEG@HEWL 2,5 µg/mL, AuNPs@PEG@HEWL 5 µg/mL e AuNPs@PEG@HEWL 10 µg/mL após a funcionalização com as proteínas, na gama de comprimentos de onda de 400 a 800 nm.

<b>Proteína (µg/mL)</b>	<b>Pico de absorção (nm)</b>
<b>BSA 10</b>	522
<b>HEWL 2,5</b>	524
<b>HEWL 5</b>	529
<b>HEWL 10</b>	537

De acordo com os valores apresentados na Tabela 4.6, é possível verificar que a funcionalização com a proteína BSA levou a um desvio de 2 nm do pico de absorção da banda SPR comparativamente ao valor apresentado pelas AuNPs@PEG (corresponde a 520nm, como enunciado anteriormente), o que se encontra de acordo com o esperado, devido à mudança da natureza que rodeia as AuNPs, ao ocorrer a ligação com a BSA. Também é possível verificar que à medida que a concentração de HEWL funcionalizada com as AuNPs@PEG aumenta, também o valor do desvio face ao valor do pico de absorção inicial das AuNPs@PEG aumenta. Tal pode ser justificado pela diferença de tamanhos entre ambas as proteínas: a BSA é uma proteína globular de maiores dimensões, sendo o seu peso molecular de 66463 Da, enquanto a HEWL é uma proteína de menores dimensões apresentando um peso molecular de 14500 Da. Deste modo, é possível inferir que enquanto a BSA cobre a superfície das AuNPs formando apenas uma monocamada, as HEWLs podem estar a estabelecer ligações entre elas, levando à formação de bicamadas – assunto este que será abordado mais detalhadamente na etapa de caracterização por DLS.

De seguida procedeu-se ao ensaio de Bradford de modo a determinar o rácio AuNP:BSA e AuNP:HEWL para cada caso em estudo (Figura 7.8 e 7.9 do Anexo 2, em Anexos, respetivamente). O rácio obtido para a BSA funcionalizada com AuNPs@PEG foi de 1:7, indicando que 7 proteínas de BSA se teriam ligado aos grupos carboxilos ativados das moléculas de PEG – a ligação por parte da proteína é levada a cabo com os resíduos de lisina existentes na sua estrutura. (Fischer 2010)

Quanto ao rácio obtido para a funcionalização com a HEWL 2,5 µg/mL; 5 µg/mL e 10 µg/mL este foi de 1:8, 1:16 e 1:32 respetivamente – tal evidencia um aumento proporcional para o dobro de HEWLs que funcionalizaram a superfície da proteína, relativamente à sua concentração. A natureza da ligação da HEWL aos grupos carboxilos ativados das cadeias de PEG não foi ainda identificada e caracterizada, tornando-se um objetivo futuro.

De modo a poder tirar conclusões e informações complementares acerca da funcionalização das NPs com as proteínas, bem como inferir acerca do tamanho das AuNPs sintetizadas inicialmente, e das AuNPs resultantes nos vários passos de funcionalização, procedeu-se à caracterização por DLS. Na técnica de DLS, partículas em suspensão possuindo pequenos tamanhos, são sujeitas à incidência de luz por um laser, e dado que as partículas se encontram em constantes movimentos, os chamados

movimentos Brownianos, a luz é dispersa pelas partículas de modo distinto. A luz dispersa é então detetada por um conjunto de dois detetores posicionados em diferentes ângulos (um situado 90° da amostra e o outro a 173° da amostra) – de seguida são feitas (por métodos computacionais) medições das diferenças de intensidade da luz causadas pelos movimentos Brownianos das NP, determinando assim o diâmetro hidrodinâmico das mesmas. (Dynamic Light Scattering, HORIBA Scientific, 2014 – a Guidebook To Particle Size Analysis.)

Com esta técnica, não só se pode inferir acerca do tamanho das NPs e o sucesso da sua funcionalização com outras moléculas, como também é possível avaliar o índice de polidispersão (Pi) das mesmas: para valores iguais ou inferiores a 0,5 estas encontram-se monodispersas, para valores superiores encontram-se polidispersas (Ilego 2012), indicativo de que a síntese de AuNPs ou a funcionalização não foram bem-sucedidas e que as AuNPs possuem diferentes tamanhos entre si, ou ainda uma possível ocorrência de agregação das partículas.

Os resultados obtidos encontram-se discriminados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Valores obtidos através de DLS correspondentes ao tamanho (e o erro associado) em nm, bem como o Pi (nm) das AuNPs, AuNPs@PEG, AuNPs@PEG@BSA 10 ug/mL, e AuNPs@PEG@HEWL 2,5; 5 e 10 ug/mL sintetizadas e funcionalizadas.

	<b>Diâmetro ± erro (nm)</b>	<b>Pi</b>
<b>AuNPs</b>	14,50 ± 0,46	0,50
<b>AuNPs@PEG</b>	17,12 ± 1,20	0,44
<b>AuNPs@PEG@BSA 10 ug/mL</b>	37,90 ± 8,60	0,26
<b>AuNPs@PEG@HEWL 2,5 ug/mL</b>	166,60 ± 6,26	0,48
<b>AuNPs@PEG@HEWL 5 ug/mL</b>	182,10 ± 10,72	0,54
<b>AuNPs@PEG@HEWL 10 ug/mL</b>	274,00 ± 7,78	0,42

Os resultados provenientes da técnica de DLS para as AuNPs sintetizadas pelo método de redução utilizando ácido cloroáurico e citrato indicam o sucesso da síntese, com um índice de Pi que confirma a monodispersividade das mesmas. O aumento do tamanho das AuNPs face a sua funcionalização com PEG é justificável pela substituição dos iões de citrato (que cobriam a superfície da partícula) pelas moléculas de PEG, uma vez que estas reduzem a viscosidade dinâmica das partículas, aumentando o seu diâmetro hidrodinâmico (Rahme et al. 2013). O tamanho obtido para as AuNPs encontra-se de acordo com o esperado, indicando a existência de uma monocamada de PEG cobrindo a superfície das partículas – uma vez que as moléculas de PEG possuem um tamanho aproximado de 3,25 nm (<http://www.iris-biotech.de/>), a sua conjugação às AuNPs provocaria um aumento para tamanhos aproximados de 17,75 nm, o que não difere significativamente face ao tamanho obtido, tendo em conta que o PEG é uma molécula muito flexível, podendo não se encontrar ligado às AuNPs numa



conformação linear. Também o índice de Pi confirma novamente a ausência de agregados das partículas, e a sua monodispersividade.

Quanto às AuNPs@PEG@BSA 10 µg/mL, a ligação da proteína às cadeias de PEG funcionalizadas à superfície das AuNPs foi mais uma vez confirmada pelo DLS. Considerando um diâmetro hidrodinâmico de 7 nm (Yohannes et al. 2010), tudo indica a formação de uma tripla camada de BSA's funcionalizadas às AuNPs, uma vez que o aumento do diâmetro hidrodinâmico encontra-se consistente com 3x o número do diâmetro hidrodinâmico da BSA. Novamente o valor do Pi obtido indica a monodispersividade das NPs, bem como a ausência da formação de agregados.

Por fim, as AuNPs@PEG@HEWL de várias concentrações apresentam resultados incoerentes. Tendo em conta que a HEWL possui um diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente 2 nm (Parmar & Muschol 2009), os tamanhos obtidos para os nanoconjugados indicam a existência de várias camadas de HEWL, sendo a quantidade de HEWL cobrindo a superfície das AuNPs@PEG muito superior à calculada pelos rácios apresentados anteriormente: tal resultado não é só é contraditório face aos rácios, como também se torna impossível obter tantas camadas de HEWL à superfície das AuNPs@PEG uma vez que a quantidade de HEWL adicionada para funcionalização, foi bastante inferior à necessária para obter o número de HEWLs por partícula que os tamanhos indicam. Assim, sendo, apesar dos índices de Pi indicarem a monodispersividade das partículas, e o espectro de absorção destes nanoconjugados não apresentar um pico de absorção a 600 nm característicos da agregação das AuNPs deste tipo, os resultados obtidos sugerem a formação de aglomerados das AuNPs@PEG@HEWL, podendo haver uma interação das proteínas, por ligações electroestáticas (devido às cargas da HEWL em solução se aproximam umas das outras), justificaria o aumento exponencial do tamanho medido.

No global, foi possível determinar a formação de nanoconjugados de AuNPs funcionalizadas com PEG, e posteriormente com as proteínas BSA e HEWL. Apesar da caracterização da interação com a HEWL ter de facto ocorrido, esta carece de mais estudos para caracterização e melhor compreensão da mesma.

#### **4.2.2 – Estudos de citotoxicidade do CORM-3: ensaios de viabilidade celular por MTS**

Numa etapa seguinte à síntese e funcionalização das AuNPs com as proteínas de interesse, procedeu-se a estudos de viabilidade celular em linhas celulares tumorais de modo a elucidar acerca da citotoxicidade e do possível efeito anti-tumoral produzido pelo CORM-3, na ausência da sua funcionalização com as AuNPs. As linhas celulares selecionadas foram a HCT116, A549 e MDA-MB-453, três linhas celulares recorrentemente utilizadas para estudos de viabilidade celular, sendo o cancro do cólon e do pulmão dois dos cancros que mais afetam a população em geral (GLOBOCAN, 2012). Os estudos *in vitro* levados a cabo em linhas celulares tumorais são o primeiro passo para a identificação do potencial terapêutico de compostos com potencial anticancerígeno, sendo necessário que o composto apresente uma diminuição da viabilidade celular das células tumorais. A viabilidade celular foi avaliada através de ensaios por MTS – o MTS é um reagente contendo tetrazólio, um

indicador metabólico da viabilidade celular, que quando reduzido pelas enzimas desidrogenases existentes no metabolismo celular ativo das células, dá origem a formazan, um composto solúvel no meio de cultura celular e com um máximo de absorvância a 490 nm (Riss, T. Cell-based Assays to Detect the Mechanism of Toxicity). Deste modo a quantidade de formazan produzido, e medido por espectroscopia UV/visível, torna-se na medida de viabilidade metabólica celular, estando diretamente relacionada com a viabilidade celular. Para dar início aos estudos com o CORM-3 nas linhas celulares tumorais indicadas, foi necessário identificar o IC<sub>50</sub> do composto – o IC<sub>50</sub> corresponde à concentração necessária do composto para causar uma redução de 50% da viabilidade celular nas linhas celulares em estudo.

Assim sendo, começou-se por realizar ensaios de MTS nas linhas celulares HCT116 e A549 durante períodos de 6; 12 e 24 horas de exposição das células ao composto CORM-3. As concentrações de CORM-3 utilizadas foram variadas entre 0,1; 1; 5; 10 e 20 µM. A viabilidade celular medida sob a forma de percentagem encontra-se representada na Figura 4.13, para ambas as linhas celulares.

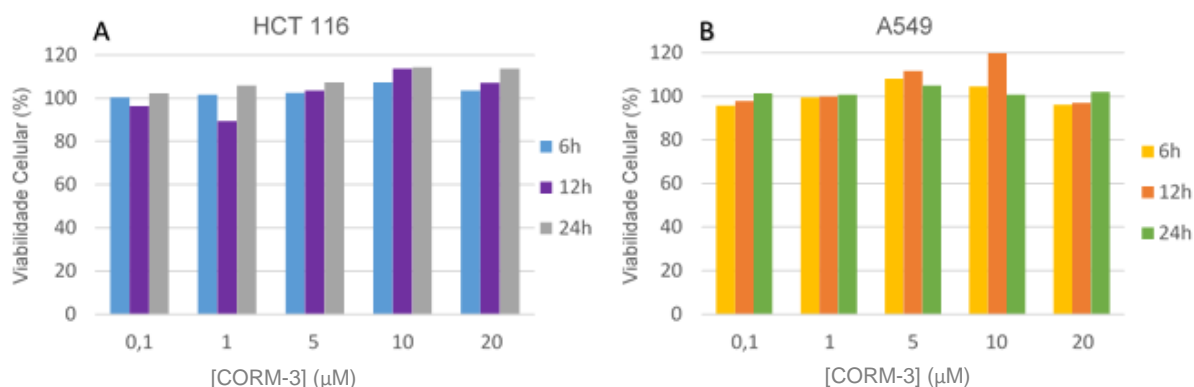


Figura 4.13 – Representação gráfica da viabilidade celular (em %) a 490 nm, de HCT 116 (A) e A549 (B) obtida através dos ensaios de MTS, em função da gama de concentrações 0,1; 1; 5; 10 e 20 µM de CORM-3 às quais as células foram expostas durante períodos de 6; 12 e 24 horas. A percentagem de viabilidade celular para cada concentração de CORM-3 corresponde à média dos replicados técnicos, e o ensaio decorreu no leitor de microplacas Infinite M200 da Tecan.

Para nenhuma das linhas celulares foi possível determinar o valor de IC<sub>50</sub> do CORM-3, uma vez que não se revelou a existência de um efeito citotóxico do mesmo, onde no global se pode observar que o metabolismo celular de ambas a HCT116 e A549 se manteve ativo, atingindo de um modo geral 100% de viabilidade celular. Dados os resultados obtidos, colocou-se a possibilidade de que para observação de um efeito citotóxico do CORM-3 nas células, fosse talvez necessário aumentar as concentrações de CORM-3 administrado às células tumorais para uma gama de concentrações mais elevadas, bem como prolongar os tempos de exposição das células ao composto.

Contudo, apesar dos vários ensaios de MTS realizados, onde foram variadas as concentrações de CORM-3 administrado (para gamas superiores), testadas as linhas celulares HCT116, A549 e MDA-MB-453, e variados os tempos de exposição das células ao composto (consultar Anexo 3, em Anexos para informação mais detalhada), não foi possível visualizar um efeito tóxico do composto em nenhum dos ensaios, impossibilitando o cálculo do IC<sub>50</sub> do composto. No entanto, pela análise dos resultados

obtidos, coloca-se a hipótese de que o CORM-3 poderá estar a exercer um efeito potenciador no metabolismo das células tumorais, uma vez que os resultados mostram um aumento da viabilidade das mesmas, face ao controlo. Contudo, a diferença de concentrações de CORM-3 administradas não se revelou um fator influenciável nos resultados, não levando à existência de um padrão que explique o efeito do composto. Na Tabela 4.8 encontra-se um resumo dos resultados obtidos nos vários ensaios, apresentando as percentagens finais de viabilidade celular de cada uma das três linhas celulares, em função das várias concentrações de CORM-3 administradas, e ao longo dos diferentes períodos de exposição das células ao composto.

Tabela 4.8 – Resumo dos resultados obtidos para os vários ensaios de viabilidade celular por MTS, visando obter um efeito citotóxico do CORM-3. Na tabela encontram-se discriminadas as percentagens finais das viabilidades celulares obtidas para as linhas celulares HCT116, A549 e MDA-MB-453 em função da gama de concentrações 50; 75; 100; 125 e 150  $\mu$ M de CORM-3 administrado às células, durante os diferentes tempos de exposição das células ao composto. As percentagens de viabilidade celular para cada concentração de CORM-3 corresponde à média dos replicados técnicos, e os ensaios decorrem no leitor de microplacas Infinite M200 da Tecan.

[CORM-3] ( $\mu$ M)	HCT116 (% viabilidade celular)			A549 (% viabilidade celular)			MDA-MB-453 (% viabilidade celular)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h		48h	72h
50 $\mu$ M	156,4	114,3	113,2	116,7	98,7	95,3	-	123,6	123,4
75 $\mu$ M	135,3	120,8	126,2	109,9	96,2	93,3	-	104,2	129,4
100 $\mu$ M	141,4	119,3	128,3	116,7	97,8	89,7	-	138,6	137,5
125 $\mu$ M	147,5	112,6	131,1	118,1	95,5	93,6	-	137,9	151,9
150 $\mu$ M	140,5	129,6	130,7	115,8	95,9	93,2	-	135,2	154,2

Para finalizar os ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular, foram realizados ensaios de MTS com as três linhas celulares HCT116, A549 e MDA-MB-453 expostas à proteína BSA numa concentração de 50  $\mu$ M, e CORM-3 conjugado com BSA, encontrando-se o CORM-3 uma gama de concentrações de CORM-3 entre 10; 20; 50; 100; 200 e 500  $\mu$ M, e uma estequiometria de CORM-3:BSA de 10:1. Os tempos de exposição das células às proteínas e aos conjugados foram de 48 e 72 horas, e os resultados encontram-se ilustrados na Figura 4.14.

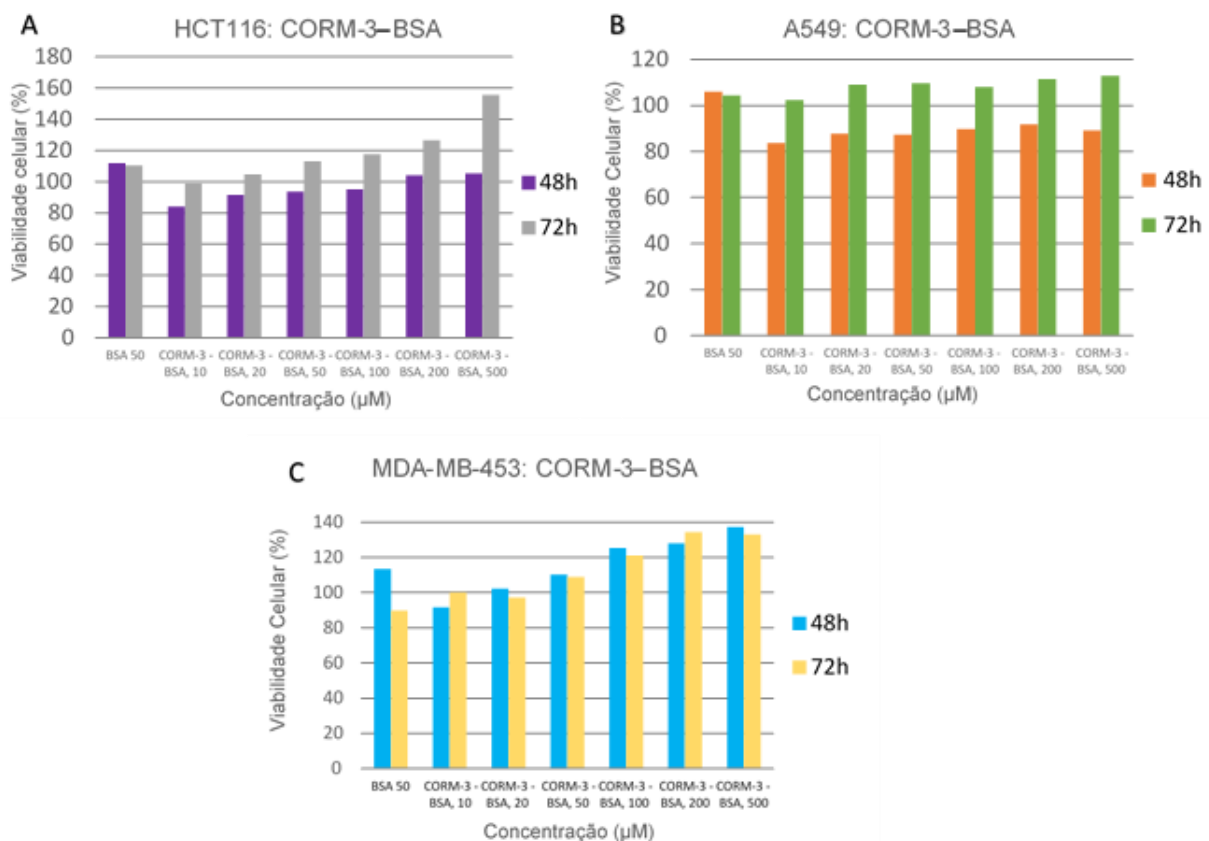


Figura 4.14 – Representação gráfica da viabilidade celular (em %) a 490 nm, de HCT 116 (A), A549 (B) e MDA-MB-453 (C) obtida através dos ensaios de MTS, em função da gama de concentrações 10; 20; 50; 100; 200 e 500 μM de CORM-3 conjugado com BSA (estequiometria de 1:10), e de BSA 50 μM, às quais as células foram expostas durante períodos de 48 e 72 horas. A percentagem de viabilidade celular para cada concentração corresponde à média dos replicados técnicos, e o ensaio decorreu no leitor de microplacas Infinite M200 da Tecan.

O objetivo deste ensaio visava novamente a obtenção de um efeito citotóxico do composto, uma vez que a sua conjugação com uma proteína plasmática poderia facilitar a absorção do composto para o interior das células e potenciar a libertação de CO, originando assim o efeito tóxico desejado nas mesmas. Porém, mais uma vez os resultados obtidos não foram os esperados.

Novamente, para as três linhas celulares, não se verificou uma diminuição da viabilidade celular em função da administração das crescentes concentrações de CORM-3 conjugado com BSA, mas sim um aumento das mesmas, para ambos os tempos de exposição 48 e 72 horas.

Contudo, contrariamente ao observado nos ensaios de viabilidade celular anteriores, verificou-se que à medida que se aumentava a concentração do conjugado CORM-3 com BSA, as percentagens de viabilidade celular aumentavam também.

Tal leva a crer, que o efeito do conjugado se apresenta mais benéfico (em termos de viabilidade celular) para maiores valores de concentração do mesmo, podendo este efeito estar relacionado com o facto de que conjugação com a BSA facilita a internalização do composto nas células.

De um modo geral, foi possível concluir que nem o CORM-3, nem o CORM-3 conjugado com a proteína exercem um efeito tóxico nas linhas celulares tumorais HCT116, A59 e MDA-MB-453 testadas, verificando-se ao invés, um efeito potenciador no metabolismo das células por parte do composto.

O próximo passo será realizar ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular utilizando o CORM-3 conjugado com as AuNPs@PEG@BSA e AuNPs@PEG@HEWL, visando verificar se os nanoconjugados exercem diferentes efeitos nas células tumorais, e significativos em termos terapêuticos, comparativamente aos descritos nesta secção de resultados.

#### **4.2.3 – Riscados celulares: ensaios de regeneração celular usando CORM-3 e as proteínas HEWL e BSA**

A ausência de um efeito citotóxico e anti-tumoral do composto CORM-3 não implica que este não possa exercer outros efeitos nas células. Como tal, foram conduzidos ensaios de riscados celulares de modo a perceber se o composto conseguia potenciar a regeneração das células, acelerando o processo – uma vez que este aparenta potenciar a capacidade proliferativa das células. Foram utilizadas uma linha celular tumoral, e uma linha primária de fibroblastos humanos saudáveis. A linha celular NINA (cuja caracterização se encontra em progresso) foi escolhida para esta etapa por possuir uma rápida regeneração celular (cerca de 24 horas). Já os fibroblastos são linhagens primárias de células saudáveis, constituintes dos tecidos conjuntivos, e capazes de se diferenciarem até atingirem uma fase adulta, onde permanecem num estado quiescente: esta propriedade confere-lhes a capacidade de auxiliar na cicatrização rápida de tecidos. Apesar da regeneração dos fibroblastos ocorrer de uma forma mais lenta que aquela apresentada pelas células NINA, os fibroblastos foram utilizados sob o pretexto de servirem como exemplo do efeito do CORM-3 em células saudáveis.

A preparação dos riscados decorreu como descrito na secção 3.2.4.2 dos Materiais e Métodos. Na Figura 4.15 é possível verificar os resultados para a regeneração das células NINA (A) e dos fibroblastos (B) 24 horas após as placas terem sido riscadas e se ter administrado CORM-3 (a 3  $\mu$ M), a proteína BSA (a 0,6  $\mu$ M, servindo como controlo, visando perceber se esta terá efeitos nas células), a proteína HEWL (a 0,6  $\mu$ M, servindo também como controlo), e os conjugados de CORM-3 (a 3  $\mu$ M) com BSA (a 0,6  $\mu$ M) e com HEWL (a 0,6  $\mu$ M), estando ambos os compostos CORM-3:BSA e CORM-3:HEWL numa estequiometria de 5:1. Na figura é ainda possível visualizar a percentagem de regeneração do controlo, correspondente apenas à placa com células e meio de cultura, que foram riscadas – o controlo dá-nos uma medida comparativa para avaliar a regeneração das células sozinhas, sem qualquer estímulo exterior.

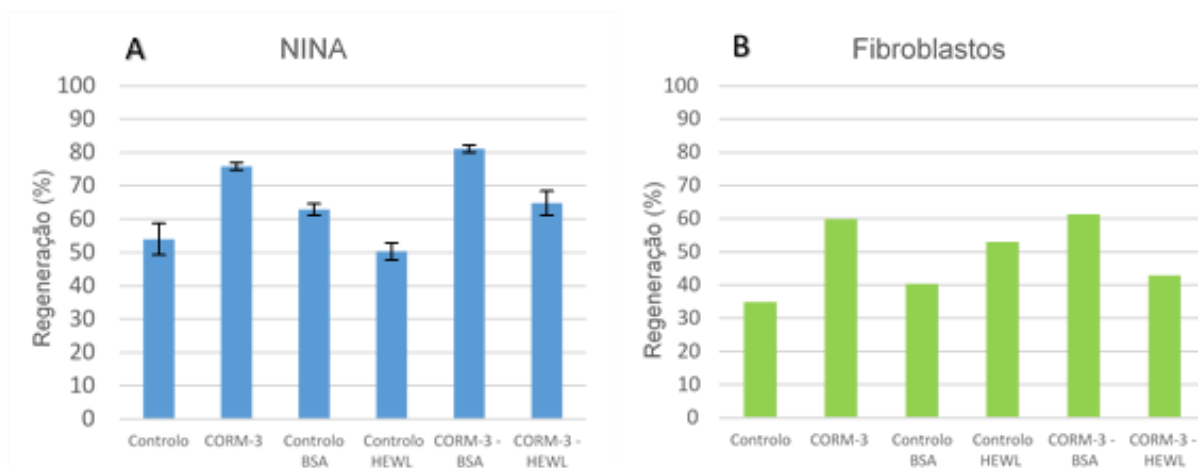


Figura 4.15 – Representação gráfica da regeneração celular (em %) dos ensaios de riscados das células NINA (1) e dos fibroblastos (B), após 24 horas da administração de CORM-3 (a 3  $\mu$ M), BSA (a 0,6  $\mu$ M), HEWL (a 0,6  $\mu$ M), CORM (a 3  $\mu$ M) conjugado com BSA (a 0,6  $\mu$ M) e CORM-3 conjugado com HEWL (a 0,6  $\mu$ M), encontrando-se os conjugados numa estequiometria de 5:1. As percentagens de regeneração das células NINA correspondem à média dos replicados biológicos.

Através da Figura 4.15 é possível concluir que a regeneração celular após as 24 horas foi maior para as células NINA do que para os fibroblastos, o que seria de esperar, uma vez que as primeiras regeneram mais rapidamente.

De um modo geral, é possível concluir que o CORM-3 exerceu um efeito potenciador na regeneração celular das células NINA e dos fibroblastos, tendo-se verificado os melhores resultados para o conjugado de CORM-3 com BSA (um aumento de 27,24% e 26,5% face ao controlo, em NINA e fibroblastos, respetivamente), seguido do CORM-3 sozinho (um aumento de 22% e 25% face ao controlo, em NINA e fibroblastos, respetivamente).

Para o caso da linhagem celular NINA, o conjugado CORM-3 com BSA demonstrou exercer um maior efeito de regeneração celular (81,2%), seguido da administração de apenas CORM-3 (75,8%) e por fim o conjugado CORM-3 com HEWL (64,8%). Ao que tudo indica, a junção dos efeitos do CORM-3 com as propriedades da BSA leva a um aumento do efeito do CORM na regeneração das células, face ao uso do CORM-3 sozinho – contudo, o efeito gerado não deriva exclusivamente da proteína, uma vez que os valores de regeneração para o controlo da BSA (63%) foram inferiores aos obtidos para o CORM-3 (75,8%).

Já os resultados referentes aos ensaios de riscados dos fibroblastos, novamente os melhores efeitos na regeneração celular derivaram do conjugado de CORM-3 com BSA (61,3%), seguido da administração do CORM-3 (59,8%). No entanto, para os fibroblastos verifica-se que a administração da HEWL sozinha leva a uma maior regeneração celular (53%) do que a administração da mesma conjugada de CORM-3 (43%), e que o controlo da BSA revelou a menor percentagem de regeneração celular (40,3%), ficando aquém dos resultados obtidos para as células NINA – contudo, a ausência de replicados biológicos dos ensaios com os fibroblastos, impossibilita a que se cheguem a conclusões

assertivas, sendo necessário proceder-se à repetição dos ensaios de modo avaliar melhor o eventual efeito do CORM-3 e respetivos conjugados.

No Anexo 4, em Anexos, encontram-se as figuras (Figura 7.12-7.23) correspondentes aos riscados efetuados nas placas, podendo visualizar-se as células às 0 horas (tempo para qual foi feito o riscado), e após as 24 horas. As figuras permitem ver a evolução da regeneração das células NINA e dos fibroblastos para cada ensaio.

#### **4.2.4 – Análise dos níveis de expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias derivadas do efeito do CORM-3 e conjugados, por RT-qPCR em tempo real.**

Como referido na secção 1.2.1.2.3 da Introdução, um dos efeitos das moléculas libertadoras de CO consiste na capacidade de levar a uma diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias (tais como a IL-6 e o TNF- $\alpha$ ), bem com levar ao aumento dos níveis de expressão de citocinas anti-inflamatórias (nomeadamente a IL-10), como consequência da sua ação anti-inflamatória (Chaves-Ferreira et al. 2015). Com base nos estudos conduzidos por Chaves-Ferreira et al. 2015, e sendo mais uma maneira de avaliar o potencial terapêutico do CORM-3, foram realizados ensaios de riscados celulares em placas de 35 mm contendo as linhas celulares NINA e linha celular primária de fibroblastos humanos, incubadas com o CORM-3 (a 3  $\mu$ M), os conjugados de CORM-3 (a 3  $\mu$ M) com BSA (a 0,6  $\mu$ M) e com HEWL (a 0,6  $\mu$ M), e com apenas as proteínas BSA e HEWL (ambas a 0,6  $\mu$ M) – visando estes dois últimos servirem como controlo, e para determinar a diferença entre o efeito derivado apenas pelas proteínas em si, face ao efeito exercido pela presença do CORM-3 quando conjugado com as mesmas. Realizou-se ainda um riscado celular contendo apenas as células NINA, servindo também como controlo (controlo riscado).

O objetivo dos ensaios residia na tentativa de se verificar um aumento da expressão de IL-10, e uma diminuição da expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$ , nos casos em estudo, indicando assim o possível efeito anti-inflamatório do composto.

Para efetuar um estudo eficaz e correto dos níveis de expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é necessário induzir uma resposta inflamatória nas células, de modo a verificar que as alterações a nível da expressão das citocinas são devidas ao efeito biológico do agente terapêutico, neste caso CORM-3. Como tal foram realizados ensaios paralelos com as células NINA e os fibroblastos (sem efetuar qualquer riscado), utilizando um conjunto de agentes indutores de *stress*, de modo a provocar uma resposta inflamatória nas linhas celulares. Assim, é esperado um aumento de expressão de citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente IL-6 e TNF- $\alpha$ , devido à resposta celular como defesa a agentes tóxicos. (Romagnani 1996). Os agentes indutores de *stress* escolhidos foram a lipofectamina (50  $\mu$ L), benzaldeído (a 0,1 M), AuNPs@PEG-30% e AuNPs@PEG-100% (encontrando-se as AuNPs a 6 nM). A escolha destes agentes recaiu no facto de todos serem considerados agentes tóxicos (em concentrações elevadas) para as células, sendo um pressuposto que estes consigam exercer o efeito pretendido. Numa análise individual, o benzaldeído é um composto reportado na literatura como citotóxico (levando a um aumento do *stress* oxidativo nas células) e genotóxico em

animais e linhas celulares, e inclusive, em linfócitos humanos, aquando a sua administração em concentrações elevadas (Ulker et al. 2013).

Já a lipofectamina é um reagente contendo lipossomas catiónicos, recorrentemente utilizado para reações de transfeção de RNA ou de DNA plasmídico, uma vez que aumenta a eficácia do processo. No entanto, foi reportado que o seu uso em concentrações elevadas consegue levar a um aumento dos níveis de expressão de TNF- $\alpha$  (Patel et al. 2011), e exercer um efeito citotóxico nas células HUVEC (células endoteliais de cordão umbilical humano). (Hunt et al. 2010)

Por fim, as AuNPs@PEG-30% e PEG-100% numa concentração de 6 nM, que não foram utilizadas com base em dados bibliográficos que reportem a sua administração às células como um fator capaz de despoletar uma resposta inflamatória, mas sim dado saber-se que a sua administração em determinadas concentrações, e em função do tempo de exposição, podem revelar um efeito tóxico para as células (Cabral & Baptista 2013). Deste modo, este ensaio é tido como um teste, para verificar se as AuNPs@PEG a 30% e a 100% podem ou não despoletar uma resposta inflamatória nas células.

Foram ainda utilizadas as células NINA e fibroblastos, sem a adição de qualquer estímulo, às quais foi extraído RNA, e sintetizado cDNA, de modo a ter um duplicado dos controlos não riscados.

Os ensaios visavam a obtenção de cDNA das células para cada caso em estudo, de modo a analisar os seus níveis de expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 por transcrição reversa quantitativa da reação em cadeia de polimerização (RT-qPCR), em tempo real. Para tal, os ensaios foram realizados durante um período de 4 horas de incubação das células com os compostos enunciados, após as quais foi extraído RNA e sintetizado cDNA. Apesar de se terem realizados os ensaios de incubação dos compostos com os fibroblastos, foi impossível extrair RNA dos mesmos, não se tendo sintetizado cDNA, e consequentemente, não foram efetuados os estudos por RT-qPCR em tempo real.

O RT-qPCR consiste na combinação de PCR quantitativa em tempo real com o processo de transcrição reversa. Esta requer a transcrição do RNA (total ou mensageiro) em cDNA pela enzima transcriptase reversa, para que o cDNA possa ser usado como molde para a reação de PCR, sendo amplificado e quantificado. Esta técnica pode ser efetuada em dois passos, ou num só. No RT-qPCR levado a cabo em dois passos, a transcrição do RNA em cDNA é feita separadamente do método de PCR. (Basic Principles of RT-qPCR, ThermoFisher Scientific)

A técnica de PCR quantitativa em tempo real combina a metodologia de PCR convencional com um mecanismo de deteção e quantificação por fluorescência. A principal diferença desta técnica face à técnica de PCR convencional é o uso de fluoróforos (sendo o mais comum o *SyberGreen*), que emitem fluorescência aquando incorporados nas sequências de DNA – incorporação essa, que a RT-qPCR em tempo real consegue detetar à medida que vai amplificando, ou seja, acompanhar o processo em tempo real. Esta metodologia permite que os processos de amplificação, deteção e quantificação de DNA sejam realizados numa única etapa, possibilitando uma maior rapidez e precisão na obtenção dos resultados de amplificação, apresentando ainda um menor risco de contaminação da amostra. (Videira 2011)



A qualidade do RNA extraído, do cDNA sintetizado pela reação de transcrição reversa, e a otimização das condições de amplificação do produto de interesse, são fatores cruciais para o sucesso da técnica de RT-qPCR em tempo real.

Foram feitas eletroforeses em gel de agarose no fim de cada RT-qPCR em tempo real, de modo a corroborar os resultados obtidos pela técnica, confirmando se o perfil de amplificação obtido derivava do produto de interesse, e não de produtos inespecíficos.

Como condições iniciais para otimização da técnica, foram selecionados cDNA de MDA-MB-453, como controlo de amplificação das citocinas uma vez que é conhecida a existência do gene IL-10 nesta linha celular (Liu et al. 2014, RefExA), e cDNA de NINA sintetizado anteriormente. Este passo do trabalho tinha como objetivo verificar a integridade dos cDNA's sintetizados, e presença das sequências de interesse a amplificar. Como tal foi necessário proceder-se à otimização das condições de amplificação dos genes de interesse, tendo-se apenas conseguido otimizar as condições correspondentes à amplificação de IL-10 (Tabela 4.9) (a informação detalhada acerca das sucessivas tentativas de otimização encontra-se discriminada no Anexo 5, em Anexos).

Tabela 4.9 – Condições de amplificação para realização de RT-qPCR em tempo real utilizando os *primers* TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10.

	<b>Condições de amplificação</b>
<b>RT-qPCR em tempo real</b>	95°C, 15 minutos
	10 ciclos: 95°C, 20 segundos
	50°C, 20 segundos
	72°C, 20 segundos
	30 ciclos: 95°C, 20 segundos
	53°C, 20 segundos
72°C, 20 segundos	

Para este ensaio foi selecionado o conjunto de amostras de cDNA de MDA-MB-453, NINA controlo riscado, controlo não riscado e NINA contendo benzaldeído (a 0,1 M). Foram ainda efetuados controlos negativos para cada conjunto de *primers*, visando confirmar a ausência de contaminação dos reagentes utilizados. O perfil de amplificação obtido encontra-se ilustrado na Figura 7.26 do Anexo 5, em Anexos.

Os resultados provenientes do PCR foram corroborados pelos resultados da eletroforese em gel de agarose (Figura 4.16), onde se pode verificar a amplificação do fragmento de IL-10 nas amostras de MDA-MB-453, de NINA controlo riscado, de NINA controlo não riscado, e de NINA expostas a benzaldeído (a 0,1 M).

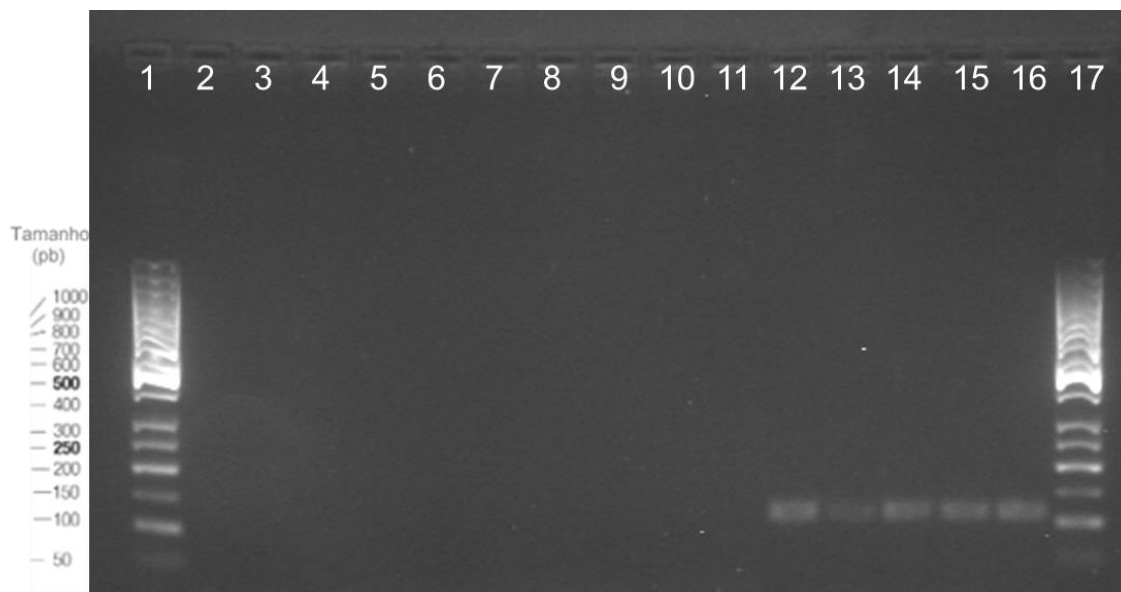


Figura 4.16 – Representação ilustrativa da eletroforese em gel de agarose (2%) das amostras amplificadas por RT-qPCR em tempo real, com os primers TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10. As amostras nos poços correspondem a: 1) Marcador 1 de pesos moleculares GeneRuler 50 pb; 2) TNF- $\alpha$  cDNA-MDA-MB-453; 3) TNF- $\alpha$  controlo negativo; 4) TNF- $\alpha$  cDNA-NINA controlo riscado; 5) TNF- $\alpha$  cDNA-NINA controlo não riscado; 6) TNF- $\alpha$  cDNA-NINA com benzaldeído (a 0,1 M); 7) IL-6 cDNA-MDA-MB-453; 8) IL-6 controlo negativo; 9) IL-6 cDNA-NINA controlo riscado; 10) IL-6 cDNA-NINA controlo não riscado; 11) IL-6 cDNA-NINA com benzaldeído (a 0,1 M); 12) IL-10 cDNA-MDA-MB-453; 13) IL-10 controlo negativo; 14) IL-10 cDNA-NINA controlo riscado; 15) IL-10 cDNA-NINA controlo não riscado; 16) IL-10 cDNA-NINA com benzaldeído (a 0,1M); 17) Marcador 2 de pesos moleculares GeneRuler 50 pb. A eletroforese decorreu durante 60 minutos, a uma voltagem constante de 90 V, e visualizado no GelDoc.

A banda existente apresenta o tamanho correspondente ao esperado (106 pb), no entanto, ocorreu amplificação no controlo negativo de IL-10, evidenciando a existência de contaminação nos reagentes, o que inviabiliza a análise dos níveis de expressão. Contudo as condições de amplificação para a sequência de IL-10 demonstram estar otimizadas.

Dado que as condições de amplificação da sequência de IL-10 se encontravam otimizadas, foi realizado um ensaio nas mesmas condições (Tabela 4.8) recorrendo a um *house keeping gene* (18S), de modo a se poderem calcular os níveis de expressão de IL-10.

O *house keeping gene* é um gene cujos níveis de expressão basal não são alterados quer pela presença, quer pela ausência de qualquer estímulo exteriores ou agentes terapêuticos, podendo assim ser usado para o cálculo relativo dos níveis de expressão de IL-10. (Bas et al. 2004)

Contudo, não foi possível proceder-se ao cálculo dos níveis de expressão relativos de IL-10, uma vez que em ambos os RT-qPCR em tempo real realizados com as sequências de IL-10 e do *house keeping gene* 18S, os *primers* se encontravam contaminados (os resultados da eletroforese e do perfil de amplificação obtido por RT-qPCR, encontram-se ilustrados na Figura 7.29 e 7.30, respetivamente, do Anexo 5, em Anexos).

Assim sendo, para além de ser necessário eliminar as contaminações dos reagentes, também as condições de amplificação para os genes TNF- $\alpha$  e IL-6 carecem de otimização, de modo a se poderem prosseguir com os estudos da análise de expressão relativa dos genes de interesse.

## 5 – Conclusões e perspectivas futuras

O vanádio é um elemento biologicamente importante, envolvido em numerosos processos fisiológicos. Uma das suas propriedades mais apelativas reside no facto de os compostos de vanádio conseguirem mimetizar a ação da insulina, tornando-se uma aposta promissora a sua administração, por via oral, para o tratamento da doença de Diabetes *mellitus*. Assim, o vanádio pode ser como uma poderosa ferramenta que visa diminuir significativamente as necessidades de insulina em pacientes com a doença de diabetes do tipo I e II, bem como impedir o aparecimento de complicações e efeitos secundários, frequentemente associados a este tipo de doença. No entanto, uma vez que a ação e os mecanismos pelos quais os compostos de vanádio conseguem mimetizar a insulina não se encontram completamente elucidados, a introdução destes agentes em testes clínicos carece de estudos mais pormenorizados, nomeadamente a caracterização da relação estrutura-função dos complexos, a possibilidade da existência de efeitos secundários e colaterais, a toxicidade e a determinação das doses eficazes de composto a administrar. (Fedorova et al. 2013)

No caso dos compostos de vanádio, é necessário ter em conta que o seu perfil toxicológico irá depender não só da via de administração selecionada, como também do estado de oxidação do vanádio, e das propriedades e características biológicas que a coordenação do metal apresenta com os seus ligandos. (Gambino 2011).

Na presente dissertação, foram realizados estudos de modo a compreender a interação que complexos de vanádio com ligandos orgânicos podem ter com duas enzimas, a lisozima da clara do ovo e a tripsina bovina. Recorrendo à Cristalografia de raios-X pretendia-se caracterizar estruturalmente o aducto formado pelos complexos metálicos e as proteínas e, caso este se verificasse, explorar o potencial inibitório que esta interação pudesse exercer nas atividades das proteínas em questão por Espectroscopia UV/visível.

Relativamente aos ensaios de cristalização, foi possível concluir que a tripsina cristaliza na ausência do inibidor benzamidina, e que podem ser usados cristais originados a partir de uma menor concentração da proteína (30 mg/mL). Nem todos os compostos de vanádio testados, recorrendo quer ao *soaking*, quer à co-cristalização, originaram cristais de proteína com os compostos – contudo, os que originaram foram congelados e sujeitos à experiência de difração. Após resolução das estruturas, verificou-se que os cristais de tripsina a 30 mg/mL com o complexo VO(pic)<sub>2</sub>, obtidos por co-cristalização usando 30% de PEG 8000 como agente precipitante, apresentavam densidade eletrónica anómala indicativa de que o complexo poderia encontrar-se ligado à proteína. A estrutura de VO<sup>IV</sup>(pic)<sub>2</sub>-tripsina a 1,09 Å de resolução foi resolvida e refinada com sucesso, com valores finais de R e R<sub>free</sub> de 11,14% e 13,62% respetivamente, e todos os átomos em zonas permitidas do gráfico de Ramachandran. A análise da estrutura revela que o complexo metálico interage com o centro ativo da mesma. O complexo VO<sup>IV</sup>(pic)<sub>2</sub> apresenta uma geometria octaédrica, coordenado à cadeia lateral da serina catalítica (Ser195) da proteína – os resultados observados assemelham-se aos descritos anteriormente para a estrutura de VO<sup>IV</sup>(pic)<sub>2</sub>-HEWL obtida em trabalhos anteriores (Santos et al. 2014). Cristais de tripsina na presença de VO(pic)<sub>2</sub> e arginina também foram preparados usando como

precipitante 30% de PEG 3350. Os dados de difração de raios-X estão ainda a ser analisados e, segundo uma análise preliminar, o complexo de vanádio ligou-se igualmente ao centro ativo da enzima. Estes resultados vêm reforçar a ideia que os complexos de vanádio podem interagir de um modo semelhante com outras proteínas, nomeadamente, proteínas do plasma, responsáveis pelo transporte do complexo na corrente sanguínea, facilitando assim a sua entrega aos tecidos alvo lesados, para que estes possam exercer os seus efeitos terapêuticos. Já os ensaios cinéticos foram levados a cabo com o objetivo de verificar se, devido à localização do complexo metálico no centro ativo das proteínas HEWL e tripsina, este complexo poderia agir como um inibidor da atividade das proteínas em questão, e consequentemente, ser responsável por efeitos secundários ainda não descritos.

Os ensaios cinéticos mostram que, apesar de haver um efeito inibitório por parte do complexo na atividade da HEWL, os resultados obtidos não foram reprodutíveis sendo necessário otimizar as experiências. Contudo, foi possível provar que o metal de vanádio sozinho não é responsável pelo efeito inibitório, sendo necessária a presença do ligando Hpic para que se verifique uma inibição na atividade da enzima.

É então necessário proceder-se à repetição e otimização das condições dos ensaios cinéticos para a HEWL, visando que os resultados se tornem reprodutíveis. Também a determinação dos tempos ótimos de incubação do complexo com a proteína, que traduzam o pico máximo de eficácia do composto, bem como a partir de quando este deixa de ser eficaz, se torna relevante, de modo a se poderem tirar conclusões assertivas acerca do potencial inibitório do complexo  $VO(pic)_2$  na atividade da HEWL. Posto isto, serão variadas as concentrações das células de *B.subtilis*, bem como as concentrações do composto de vanádio com o ligando Hpic incubados com a proteína, para que se possam recolher mais informações acerca da reação enzimática, bem como das constantes cinéticas que a caracterizam.

Quanto aos ensaios cinéticos com a tripsina, as condições da reação enzimática da proteína com o seu substrato BApNA foram otimizadas, contudo, os resultados obtidos revelam-se inconclusivos, não sendo possível estabelecer o eventual efeito inibitório por parte do complexo de  $VO(pic)_2$  na atividade da proteína, e consequentemente, proceder ao cálculo das constantes cinéticas da reação. Deste modo, é possível inferir que, apesar de se ter provado que o complexo  $VO(pic)_2$  se liga ao centro ativo da tripsina, esta interação pode não exercer um efeito significativo na atividade da mesma uma vez que o complexo pode ser substituído pelo substrato, que possui maior afinidade para a proteína. São então necessários estudos complementares para comprovar ou refutar esta teoria.

Os ensaios cinéticos com a tripsina e o complexo de  $VO(pic)_2$  carecem de otimizações visando obter resultados conclusivos que permitam inferir acerca da existência ou não de um efeito inibitório por parte do complexo na atividade da proteína – e caso este exista, eventualmente, determinar-se-á o tipo de inibição e a constante  $K_i$  associada, bem como as restantes constantes cinéticas que caracterizam a reação enzimática do complexo enzima-substrato.

Como perspectivas futuras relacionadas com a etapa de estudo do potencial terapêutico do vanádio, visa-se também a obtenção de cristais tanto para a HEWL, como para a tripsina, com os restantes compostos de vanádio, de modo a se poder estudar e caracterizar a interação dos mesmos com as proteínas. Por outro lado, é ainda necessário concluir o refinamento e a interpretação da estrutura obtida de tripsina com o complexo VO(pic)<sub>2</sub> e arginina.

O monóxido de carbono, considerado apenas um gás tóxico durante um longo período de tempo, é atualmente conhecido por desempenhar notórios efeitos biológicos, que derivam essencialmente das suas propriedades anti-proliferativas, anti-apoptóticas e anti-inflamatórias, sendo esta última a de maior ênfase e foco de atenção por parte de estudos da comunidade científica. Deste modo, visando o uso de CO no combate a doenças inflamatórias, como a artrite reumatoide, doenças inflamatórias intestinais (DII) tais como a Doença de Crohn e colite ulcerosa, entre outras, foram desenvolvidos os CORMs, moléculas libertadoras de CO, cujo propósito visa a libertação de CO de um modo seguro, transportado através da corrente sanguínea até aos tecidos lesados, para que este possa exercer os efeitos terapêuticos desejados. Contudo, apesar de uma aposta promissora, existem ainda muitas dificuldades e obstáculos que derivam do insucesso de alguns dos critérios necessários para a sua eficácia, impossibilitando assim o desempenho eficaz dos CORMs *in vivo*, e consequentemente a sua passagem a potentes fármacos. Tal como referido anteriormente, até hoje questões como o *targeting* seletivo, a libertação controlada e exata do CO, no momento e local específico, e a existência de um perfil farmacocinético adequado do composto, que permanecem por alcançar, revelam claramente a necessidade de se efetuarem mais estudos, aprofundando o conhecimento acerca dos mecanismos de ação destes compostos, bem como aperfeiçoar o *design* dos mesmos.

Assim sendo, estudaram-se as propriedades do composto libertador de CO CORM-3, e deste conjugado com as proteínas albumina de soro humano e HEWL, numa tentativa de determinar a toxicidade do composto, bem como averiguar a presença ou ausência de efeitos terapêuticos que estes possam exercer. Por outro lado, recorrendo às vantagens que a Nanotecnologia oferece, foram também realizados estudos preliminares para a formação de nanosistemas incorporando o CORM-3 funcionalizado nanopartículas de ouro, ligado por meio das proteínas BSA e HEWL, uma vez que as AuNPs são, neste momento, consideradas como uma das melhores e mais eficazes apostas de veículos transportadores de fármacos da atualidade.

Através dos resultados obtidos conclui-se que a síntese de AuNPs foi realizada com sucesso, tendo-se obtido partículas com um diâmetro de aproximadamente 15 nm, numa concentração de 13,2 nM, e uma banda de LSPR com um pico de absorção máximo a 519 nm. Também a funcionalização das mesmas com PEG, e posteriormente com a proteína BSA, foi efetuada com sucesso, dado que toda a superfície das AuNPs foi coberta por uma monocamada do biopolímero, e posteriormente, com uma monocamada de BSA, encontrando-se os rácios de funcionalização obtidos, e caracterizados, dentro do esperado. A funcionalização das AuNPs@PEG com proteína HEWL não está descrita na literatura, e foi aqui conseguida para três diferentes concentrações da proteína, revelando-se a menor concentração (2,5 µg/mL) a ideal. Contudo, apesar de os rácios de AuNPs:HEWL obtidos para as três

concentrações testadas indicarem uma funcionalização completa das partículas com proteína, os diâmetros dos nanoconjugados analisados por DLS são incoerentes, sugerindo a existência de aglomerados, pelo que é necessário otimizar as condições de funcionalização, bem como caracterizar detalhadamente esta interação.

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular por MTS em linhagens celulares tumorais, visando testar a citotoxicidade do CORM-3, permitem concluir que este não exerce um efeito citotóxico nas células testadas, nem mesmo quando a sua conjugação com a proteína BSA, até 500  $\mu\text{M}$ : contudo, foi possível observar que o composto induzia um aumento da viabilidade celular das células tumorais.

Uma vez que o composto não demonstrava ser tóxico para as células, outros efeitos foram testados, nomeadamente, o seu potencial regenerativo e anti-inflamatório.

Através de ensaios de riscados celulares, foi possível verificar que o CORM-3 acelera o efeito de regeneração tanto de células tumorais, como de células saudáveis, e que a sua conjugação com a proteína BSA (mas não a HEWL), potencia ainda mais o efeito regenerativo do CORM-3 em ambos os tipos de linhagens.

Já a análise dos níveis de expressão de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) e pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) em DNA de células tumorais, recorrendo à técnica de RT-qPCR, foi também executada apesar dos resultados obtidos serem inconclusivos. Os ensaios foram conduzidos com o objetivo de averiguar um efeito anti-inflamatório por parte do CORM-3 e seus conjugados. Para tal, foi extraído RNA, e sintetizado cDNA com sucesso, a partir de células da linhagem NINA, as quais foram expostas a vários estímulos visando despoletar uma resposta inflamatória, e expostas aos compostos de CORM-3 e CORM-3 conjugado com as proteínas BSA e HEWL. Contudo, apenas foi possível otimizar as condições de amplificação para expressão da citocina IL-10 e os resultados sugerem uma eventual contaminação dos reagentes, o que impossibilitou a análise correta do efeito dos compostos contendo CORM-3 nos níveis de expressão de IL-10 para os DNA sintetizados. Posto isto, também o cálculo dos níveis de expressão relativos da mesma, recorrendo ao *house keeping gene* 18S, foi inalcançada. No fim de cada ensaio conduzido, foi possível verificar que todos os *primers* utilizados se encontravam contaminados, comprometendo assim o estudo do efeito anti-inflamatório derivado do CORM-3.

Como perspetivas futuras pretende-se prosseguir a caracterização e otimização da funcionalização das AuNPs@PEG com a proteína HEWL, bem como a posterior funcionalização das AuNPs@PEG@BSA e AuNPs@PEG@HEWL com o CORM-3. Será ainda necessário recorrer a ensaios de citotoxicidade para estes nanoconjugados, através de ensaios de viabilidade celular por MTS, com o objetivo de verificar se a conjugação do composto com as AuNPs se traduz no aparecimento de um efeito tóxico para as células, ou num efeito significativo em termos terapêuticos, nas células tumorais. Face à tentativa de observar um efeito anti-inflamatório do CORM-3 através da técnica de RT-qPCR, o próximo passo será repetir o processo com *primers* não contaminados de modo a se poderem prosseguir com a análise de expressão de citocinas anti e pró-inflamatórias.

Relativamente ao IL-10 e 18S, será necessária a repetição de novos ensaios, em replicados biológicos, de modo a que se possa efetuar o cálculo dos níveis de expressão relativos da citocina anti-inflamatória IL-10.

Para monitorizar a expressão da TNF- $\alpha$ , e IL-6, será primeiro necessário otimizar as condições de amplificação, podendo-se proceder à adição de DMSO, e/ou aumentar a concentração do MgCl<sub>2</sub> presente na mistura das amostras analisadas por RT-qPCR, variando, em paralelo, as temperaturas de *annealing* das condições reacionais, até se encontrar a que promove o correto emparelhamento, e conseqüentemente, amplificação das sequências de interesse, para se poder prosseguir com a análise dos níveis de expressão relativos dos genes em questão.

Adicionalmente será ainda necessário proceder à obtenção e extração de RNA dos fibroblastos (e conseqüentemente, síntese de cDNA) nas mesmas condições que as efetuadas para as células NINA, de modo a que se possam também realizar ensaios de RT-qPCR em tempo real, que visem a determinação dos níveis de expressão das citocinas pró e anti-inflamatórias nesta linhagem.

Apesar de nem todos os objetivos propostos para esta dissertação terem sido concretizados, ou alcançados com sucesso, os resultados obtidos permitiram retirar algumas conclusões importantes, abrindo portas para novas perspectivas e trazendo novas ideias, ao mesmo tempo que enfatizam a necessidade de se realizarem mais estudos para melhor compreender, e tirar partido farmacológico, dos efeitos terapêuticos dos distintos compostos aqui apresentados.





## 6 – Bibliografia

- Alberto, R. & Motterlini, R., 2007. Chemistry and biological activities of CO-releasing molecules (CORMs) and transition metal complexes. *Dalton transactions (Cambridge, England: 2003)*, (17), pp.1651–1660.
- Alberts, B. et al., 2004. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª Edição, Porto Alegre, Artmed, pp.235-331.
- Baptista, P. et al., 2005. Colorimetric detection of eukaryotic gene expression with DNA-derivatized gold nanoparticles. *Journal of Biotechnology*, 119(2), pp.111–117.
- Baptista, P. et al., 2008. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(3), pp.943–950.
- Barrio, D. a & Etcheverry, S.B., 2010. Potential use of vanadium compounds in therapeutics. *Current medicinal chemistry*, 17(31), pp.3632–3642.
- Bartczak, D. & Kanaras, A.G., 2011. Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/Sulfo-NHS coupling. *Langmuir*, 27(16), pp.10119–10123.
- Bas, a et al., 2004. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology*, 59(6), pp.566–573.
- Basic Principles of RT-qPCR. *ThermoFisher Scientific* (consultado em Agosto, 2015).
- Bauer, I. & Pannen, B.H.J., 2009. Bench-to-bedside review: Carbon monoxide from mitochondrial poisoning to therapeutic use. *Critical care (London, England)*, 13(4), p.220.
- Benítez, J., Guggeri, L., Tomaz, I., Pessoa, J.C., et al., 2009. A novel vanadyl complex with a polypyridyl DNA intercalator as ligand: A potential anti-protozoa and anti-tumor agent. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(10), pp.1386–1394. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.07.013>.
- Benítez, J., Guggeri, L., Tomaz, I., Arrambide, G., et al., 2009. Design of vanadium mixed-ligand complexes as potential anti-protozoa agents. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(4), pp.609–616. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.10.018>.
- Benítez, J. et al., 2011. Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: New achievements. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(2), pp.303–312. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.11.001>.
- Bevan, P. et al., 1995. Peroxovanadium compounds: Biological actions and mechanism of insulin-mimesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 153(1-2), pp.49–58.
- Biggerstaff, J.P. et al., 1999. Soluble fibrin augments platelet/tumor cell adherence in vitro and in vivo, and enhances experimental metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis*, 17(8), pp.723–730.
- Bilban, M. et al., 2008. Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling. *Journal of Molecular Medicine*, 86(3), pp.267–279.
- Bjartell, A. et al., 2005. Expression of tumor-associated trypsinogens (TAT-1 and TAT-2) in prostate cancer. *Prostate*, 64(1), pp.29–39.

- Bordbar, A.K. et al., 2009. Calorimetric studies of the interaction between the insulin-enhancing drug candidate bis(maltolato)oxovanadium(IV) (BMOV) and human serum apo-transferrin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(4), pp.643–647. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.10.009>.
- Bosnic, O. et al., 2009. Inhibition of trypsin by heparin and dalteparin, a low molecular weight heparin. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74(4), pp.379–388.
- Bours, V. et al., 2000. Nuclear factor- $\kappa$ B, cancer, and apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, 60(8), pp.1085–1090.
- Brandão, T.S. et al., 2010. Insights into the reaction of protein-tyrosine phosphatase 1B: Crystal structures for transition state analogs of both catalytic steps. *Journal of Biological Chemistry*, 285(21), pp.15874–15883.
- Brichardt, S.M. & Jeanrenaud, B., 1992. Vanadate treatment markedly increases glucose utilization in muscle of insulin-resistant fa/fa rats without modifying glucose transporter expression. *Endocrinology*, 131 (1), pp.311-317
- Cabral, R.M. & Baptista, P. V., 2013. the Chemistry and Biology of Gold Nanoparticle-Mediated Photothermal Therapy: Promises and Challenges. *Nano LIFE*, 03(03), p.1330001. Available at: <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S179398441330001X>.
- Cabrera, E. et al., 2004. Ruthenium (II) nitrofurylsemicarbazone complexes: New DNA binding agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 39(4), pp.377–382.
- Caldwell, J. et al. 1995. An introduction to drug disposition: the basic principles of absorption, distribution, metabolism, and excretion. *Toxicologic pathology*, 23(2), pp.102–114.
- Callewaert, L. et al., 2008. A new family of lysozyme inhibitors contributing to lysozyme tolerance in gram-negative bacteria. *PLoS Pathogens*, 4(3).
- Callewaert, L. & Michiels, C.W., 2010. Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences*, 35(1), pp.127–160.
- Cañaveras, F. et al., 2012. Role of the functionalization of the gold nanoparticle surface on the formation of bioconjugates with human serum albumin. *Journal of Physical Chemistry C*, 116(18), pp.10430–10437.
- Capella, M. et al., 2007. Vanadate-induced cell death is dissociated from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. *Cell Biology and Toxicology*, 23(6), pp.413–420.
- Carvalho, A.L. et al., 2009. X-ray crystallography in drug discovery. In A. C. A. Roque, ed. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. Methods in Molecular Biology. Humana Press, pp. 31–56. Available at: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-244-5\\_3](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-244-5_3).
- Di Cera, E., 2009. Serine proteases. In *IUBMB Life*. pp. 510–515.
- Chandramathi, S., Suresh, K. & Kuppasamy, U.R., 2010. Solubilized antigen of Blastocystis hominis facilitates the growth of human colorectal cancer cells, HCT116. *Parasitology Research*, 106(4), pp.941–945.
- Chaves-Ferreira, M. et al., 2015. Spontaneous CO Release from Ru(II)(CO)<sub>2</sub>-Protein Complexes in Aqueous Solution, Cells, and Mice. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(4), pp.1172–1175. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201409344>.

- Clark, T. a. et al., 2014. Alternative therapies for diabetes and its cardiac complications: Role of vanadium. *Heart Failure Reviews*, 19(1), pp.123–132.
- Conde, J. et al., 2013. Gold-nanobeacons for simultaneous gene specific silencing and intracellular tracking of the silencing events. *Biomaterials*, 34(10), pp.2516–2523. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.12.015>.
- Conde, J. et al., 2014. Nano-Oncologicals. *Springer*. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-08084-0>.
- Conde, J., Doria, G. & Baptista, P., 2012. Noble Metal Nanoparticles Applications in Cancer. *Journal of Drug Delivery*, 2012, pp.1–12.
- Costa Pessoa, J. et al., 2013. New insights on vanadium binding to human serum transferrin. *Inorganica Chimica Acta*, 420, pp.60–68. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020169313006373>.
- Costa Pessoa, J. et al., 2015. Vanadium and proteins: Uptake, transport, structure, activity and function. *Coordination Chemistry Reviews*. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010854515001125>.
- Crans, D.C. et al., 2004. The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities Exerted by Vanadium Compounds. *Chemical Reviews*, 104(2), pp.849–902.
- DeLano, W., 2002. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter On Protein Crystallography*.
- DeLong, R.K. et al., 2010. Functionalized gold nanoparticles for the binding, stabilization, and delivery of therapeutic DNA, RNA, and other biological macromolecules. *Nanotechnology, Science and Applications*, 3(1), pp.53–63.
- Demoro, B. et al., 2012. New organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones as co-ligands: potential anti-trypanosomal agents. *Dalton Transactions*, 41(5), p.1534.
- Diederichs, K. & Karplus, P. a., 2013. Better models by discarding data? *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(7), pp.1215–1222.
- Djordjevic, C. et al., 1995. Peroxo heteroligand vanadates(V): Synthesis, spectra-structure relationships, and stability toward decomposition. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 153(1-2), pp.25–29.
- Dodson, E.J., 1987. [32] Collaborative computational project, number 4: Providing programs for protein crystallography, 16(4). Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687997770344\papers://1a564d0f-d1fa-4e54-8a8f-e91be9a68918/Paper/p2984>.
- Dreaden, E.C. et al., 2012. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chemical Society Reviews*, 41(7), p.2740.
- Dubar, F. et al., 2008. Ferroquine, an ingenious antimalarial drug: thoughts on the mechanism of action. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 13(11), pp.2900–2907.
- Dubyak, G.R. & Kleinzeller, a., 1980. The insulin-mimetic effects of vanadate in isolated rat adipocytes. Dissociation from effects of vanadate as a (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)ATPase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 255(11), pp.5306–5312.

- Dulak, J. & Józkwicz, A., 2003. Carbon monoxide - A "new" gaseous modulator of gene expression. *Acta Biochimica Polonica*, 50(1), pp.31–47.
- Elberg, G. et al., 1997. Vanadate activates membranous nonreceptor protein tyrosine kinase in rat adipocytes. *Diabetes*, 46(11), pp.1684–1690.
- Emsley, P. & Cowtan, K., 2004. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(12 I), pp.2126–2132.
- Erdmann, E. & Werdan, K., 2000. Vanadate and its significance in biochemistry and pharmacology, *Biochemical Pharmacology*, 33(7), pp.945–950.
- Evangelou, A.M., 2002. Vanadium in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42(3), pp.249–265.
- Evans, P.R., 2011. An introduction to data reduction: Space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 67(4), pp.282–292.
- Evans, R.W. et al., 2012. Iron mobilization from transferrin by therapeutic iron chelating agents. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1820(3), pp.282–290. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.11.007>.
- Fakruddin, M. et al., 2012. Retraction: Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. *Journal of Nanobiotechnology*, 10(1), p.40.
- Fedorova, E.V. et al., 2013. The vanadium compounds: Chemistry, synthesis, insulinomimetic properties. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 7(4), pp.259–270. Available at: <http://link.springer.com/10.1134/S1990750813040021>.
- Fernández, M. et al., 2013. A new series of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with phenanthroline-derived co-ligands: selective *Trypanosoma cruzi* growth inhibitors. *Dalton transactions (Cambridge, England: 2003)*, 42(33), pp.11900–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23787783>.
- Fischer, M.J.E., 2010. Surface Plasmon Resonance. *Methods in Molecular Biology*, 627, pp.55–73. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-60761-670-2>.
- Foresti, R., Bani-Hani, M.G. & Motterlini, R., 2008. Use of carbon monoxide as a therapeutic agent: Promises and challenges. *Intensive Care Medicine*, 34(4), pp.649–658.
- Fricke, S.P. et al., 2008. Metal compounds for the treatment of parasitic diseases. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102(10), pp.1839–1845.
- Fukui, K. et al., 1999. In vivo coordination structural changes of a potent insulin-mimetic agent, bis(picolinato)oxovanadium(IV), studied by electron spin-echo envelope modulation spectroscopy. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 77(3-4), pp.215–224.
- Gambino, D., 2011. Potentiality of vanadium compounds as anti-parasitic agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 255(19-20), pp.2193–2203. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.028>.
- Ghosh, S., Gal, J. & Marczin, N., 2010. Carbon monoxide: endogenous mediator, potential diagnostic and therapeutic target. *Annals of medicine*, 42(1), pp.1–12.
- Gibbons, S.J. & Farrugia, G., 2004. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. *The Journal of physiology*, 556(Pt 2), pp.325–336.

- GLOBOCAN 2012 - <http://globocan.iarc.fr> (consultado em Agosto de 2015).
- Gruzewska, K. et al., 2014. Essentiality and toxicity of vanadium supplements in health and pathology. *Physiology and Pharmacology*, 65(5), pp.603–611.
- Gustav E. Lienhard, 1992. How cells absorb glucose. *Scientific American*, pp.86-91.
- Heinemann, S.H. et al., 2014. Carbon monoxide--physiology, detection and controlled release. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 50(28), pp.3644–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24556640>.
- Heyliger, C., 1983. Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetics rats. *Science* 227, pp.1474-1477.
- Hirota, M. et al., 2006. The role of trypsin, trypsin inhibitor, and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis. *Journal of Gastroenterology*, 41(9), pp.832–836.
- Horiba Scientific, Dynamic Light Scattering Technology - <http://www.horiba.com/> (consultado em Agosto, 2015).
- Hunt, M. a et al., 2010. Optimizing transfection of primary human umbilical vein endothelial cells using commercially available chemical transfection reagents. *Journal of biomolecular techniques : JBT*, 21(2), pp.66–72.
- Huyer, G. et al., 1997. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *Journal of Biological Chemistry*, 272(2), pp.843–851.
- Lo Iacono, L. et al., 2011. A carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) uncouples mitochondrial respiration and modulates the production of reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(11), pp.1556–1564. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.033>.
- Idriss, N.K., Blann, A.D. & Lip, G.Y.H., 2008. Hemoxygenase-1 in Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 52(12), pp.971–978.
- Iris Biotech GMBH, Reagents - <http://www.iris-biotech.de/> (consultado em Agosto, 2015).
- Ilego, S. et al., 2012. A Guide To Dynamic Light Scattering Measurement and Analysis. *NanoComposix*, pp.1–7.
- Jabir, N.R. et al., 2012. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. *International Journal of Nanomedicine*, 7, pp.4391–4408.
- Jakusch, T. et al., 2010. Vanadate complexes in serum: a speciation modeling study. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)*, 1, pp.212–220.
- Jakusch, T. et al., 2011. The speciation of vanadium in human serum. *Coordination Chemistry Reviews*, 255(19-20), pp.2218–2226.
- Jedinák, A. et al., 2006. Antiprotease and antimetastatic activity of ursolic acid isolated from *Salvia officinalis*. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 61(11-12), pp.777–782.
- Jiang, H. et al., 2000. On-line characterization of the activity and reaction kinetics of immobilized enzyme by high-performance frontal analysis. *Journal of Chromatography A*, 903(1-2), pp.77–84.

- Josephraj Kumar, A. et al., 2005. Occurrence of trypsin-like protease in cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton). *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 42(4), pp.243–245.
- Kabsch, W., 2010. Xds. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(2), pp.125–132.
- Kahn, C.R. & White, M.F., 1988. The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. *Journal of Clinical Investigation*, 82(4), pp.1151–1156.
- Karplus, P. a. & Diederichs, K., 2012. Linking Crystallographic Model and Data Quality. *Science*, 336(6084), pp.1030–1033.
- Kim, Y.M. et al., 2011. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, 14(1), pp.137–167.
- Kiss, T. et al., 2008. Biospeciation of antidiabetic VO(IV) complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 252(10-11), pp.1153–1162.
- Korbecki, J. et al., 2012. Biochemical and medical importance of vanadium compounds. *Acta Biochimica Polonica*, 59(2), pp.195–200.
- Krauth-Siegel, R.L. et al., 2005. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: Old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angewandte Chemie - International Edition*, 44(5), pp.690–715.
- Kuida, K. et al., 1998. Reduced apoptosis and cytochrome C-mediated caspase activation in mice lacking Caspase 9. *Cell*, 94(3), pp.325–337.
- Kumar, A. et al., 2008. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide induces the Mycobacterium tuberculosis dormancy regulon. *Journal of Biological Chemistry*, 283(26), pp.18032–18039.
- Kumar, A. et al., 2012. Gold Nanoparticles: Emerging Paradigm for Targeted Drug Delivery System. *Biotechnology Advances*, (August 2015).
- Kustlin, K. & McLeod, G.C., 1983. Vanadium and other metal ions in the physiological ecology of marine organisms. *Structure and Bonding. Copper, Molybdenum, and Vanadium in Biological Systems.*, 53, pp.139–160.
- Ladj, R. et al., 2013. Individual inorganic nanoparticles: preparation, functionalization and in vitro biomedical diagnostic applications. *J. Mater. Chem. B*, 1(10), pp.1381–1396. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/C2TB00301E>.
- Lee, P.C. & Meisel, D., 1982. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J. Phys. Chem.*, 86(17), pp.3391–3395. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-2842588851&partnerID=40>.
- Li, Y. et al., 2013. Carbon monoxide alleviates ethanol-induced oxidative damage and inflammatory stress through activating p38 MAPK pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 273(1), pp.63–58. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.08.019>.
- Lien Nghiem, T.H. et al., 2012. Toxicity Studies of Gold Nanoparticles. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 3(1), p.015002.
- Liochev, S.I. & Fridovich, I., 1990. Vanadate-stimulated oxidation of NAD(P)H in the presence of biological membranes and other sources of O<sub>2</sub><sup>-</sup>. *Archives of biochemistry and biophysics*, 279(1), pp.1–7.

- Liu, J. et al., 2014. Inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript 4 was highly expressed in primary ductal and lobular breast cancer and significantly correlated with IL-10. *Diagnostic Pathology*, 105, pp.1–8.
- Long, R. et al., 2014. CORM-3, a water soluble CO-releasing molecule, uncouples mitochondrial respiration via interaction with the phosphate carrier. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(1), pp.201–209. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.002>.
- Madan, L.L. & Gopal, B., 2011. Conformational basis for substrate recruitment in protein tyrosine phosphatase 10D. *Biochemistry*, 50(46), pp.10114–10125.
- Mannaioni, P.F. et al., 2006. Carbon monoxide: The bad and the good side of the coin, from neuronal death to anti-inflammatory activity. *Inflammation Research*, 55(7), pp.261–273.
- Marques, A.R. et al., 2012. Generation of carbon monoxide releasing molecules (CO-RMs) as drug candidates for the treatment of acute liver injury: Targeting of CO-RMs to the liver. *Organometallics*, 31(16), pp.5810–5822.
- Martins, P. et al., 2014. Nanoparticle Drug Delivery Systems : Recent Patents and Applications in Nanomedicine. *Recent Patents on Nanomedicine*, 3(2).
- Maurya, M.R. et al., 2010. Vanadium complexes having [V(IV)O](2+) and [V(V)O(2)](+) cores with binucleating dibasic tetradentate ligands: Synthesis, characterization, catalytic and antiamebic activities. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)*, 39(5), pp.1345–1360.
- McCoy, A.J. et al., 2007. Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, 40(4), pp.658–674.
- McLauchlan, C.C. et al., 2010. Inhibition of acid, alkaline, and tyrosine (PTP1B) phosphatases by novel vanadium complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104(3), pp.274–281. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.12.001>.
- McLean, S. et al., 2012. Sulfite species enhance carbon monoxide release from CO-releasing molecules: Implications for the deoxyhemoglobin assay of activity. *Analytical Biochemistry*, 427(1), pp.36–40. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.04.026>.
- McNeill, J.H. et al., 1990. Enhanced in vivo sensitivity of vanadyl-treated diabetic rats to insulin. *European Journal of Pharmacology*, 183(2), pp.285–286.
- Mehtab, S. et al., 2013. Interaction of vanadium(IV) with human serum apo-transferrin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 121, pp.187–195. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.12.020>.
- Melchior, M. et al., 2001. Insulin-Enhancing Vanadium ( III ) Complexes. *Inor. Chem.*, 40, pp.4686–4690.
- Melchior, M. et al., 1999. Vanadium Complexes as Insulin Mimetic Agents: Coordination Chemistry and in Vivo Studies of Oxovanadium(IV) and Dioxovanadate(V) Complexes Formed from Naturally Occurring Chelating Oxazolate, Thiazolate, or Picolate Units. *Inorganic Chemistry*, 38(10), pp.2288–2293. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/ic981231y>.
- Mercurio, F. & Manning, A.M., 1999. Multiple signals converging on NFκB. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(2), pp.226–232.
- Miyabayashp, S. & Miyabayashp, S., 1992. Diabetologia 9. *Insulin*, pp.818–825.

- Morinville, A. et al., 1998. From Vanadis to Atropos: Vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 19(11), pp.452–460.
- Motterlini, R., 2007. Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs): vasodilatory, anti-ischaemic and anti-inflammatory activities. *Biochemical Society transactions*, 35(5), pp.1142–1146.
- Motterlini, R. et al., 2004. CORM-A1: a new pharmacologically active carbon monoxide-releasing molecule. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(2), pp.284–286.
- Motterlini, R. et al, 2005. Therapeutic applications of carbon monoxide-releasing molecules. *Expert opinion on investigational drugs*, 14(11), pp.1305–1318.
- Motterlini, R. & Otterbein, L.E., 2010. The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(9), pp.728–743. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3228>.
- Mukherjee, B. et al., 2004. Vanadium - An element of atypical biological significance. *Toxicology Letters*, 150(2), pp.135–143.
- Murshudov, G.N. et al., 2011. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 67(4), pp.355–367.
- Naahidi, S. et al., 2013. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 166(2), pp.182–194.
- Nakao, A., et al., 2006. Protective effect of carbon monoxide in transplantation. *Journal of cellular and molecular medicine*, 10(3), pp.650–671.
- Nankar, R.P. & Doble, M., 2013. Non-peptidyl insulin mimetics as a potential antidiabetic agent. *Drug Discovery Today*, 18(15-16), pp.748–755. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.04.005>.
- National Diabetes Statistics Report, 2014 (released June 10, 2014) Available at: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/statistics/#sthash.LfmL2dAY.dpuf>
- Navarro, M. et al., 2010. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: Recent achievements and perspectives. *Drug Discovery Today*, 15(23-24), pp.1070–1078. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2010.10.005>.
- Nechay, B.R., 1984. Mechanisms of action of vanadium. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 24(10), pp.501–524.
- Obame, F.N. et al., 2007. Peripheral Benzodiazepine Receptor-Induced Myocardial Protection is Mediated by Inhibition of Mitochondrial Membrane Permeabilization. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323(1), pp.336–345.
- Orvig, C. et al., 1999. Vanadium compounds as insulin mimics. *Metal ions in biological systems*, 31(5), pp.575–594.
- Otterbein, L.E. et al., 2003. Heme oxygenase-1: Unleashing the protective properties of heme. *Trends in Immunology*, 24(8), pp.449–455.
- Paidhungat, M. et al., 2002. Mechanisms of Induction of Germination of *Bacillus subtilis* Spores by High Pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), pp.1–5.



- Papaioannou, A. et al., 2004. Solid state and solution studies of a vanadium(III)-L-cysteine compound and demonstration of its antimetastatic, antioxidant and inhibition of neutral endopeptidase activities. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(6), pp.959–968.
- Parmar, A.S. & Muschol, M., 2009. Hydration and hydrodynamic interactions of lysozyme: Effects of chaotropic versus kosmotropic ions. *Biophysical Journal*, 97(2), pp.590–598. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2009.04.045>.
- Parveen, S. et al., 2012. Nanoparticles: A boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(2), pp.147–166. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.016>.
- Patel, S.J. et al., 2011. The inflammatory response to double stranded DNA in endothelial cells is mediated by NF $\kappa$ B and TNF $\alpha$ . *PLoS ONE*, 6(5), pp.1–7.
- Pepato, M.T. et al., 2008. Synthesis, characterization and biological analysis of the complex [VO(Hdhp)<sub>2</sub>] (H<sub>2</sub>dhp = 2,3-dihydroxypyridine). *Transition Metal Chemistry*, 33(3), pp.301–309.
- Pfaffl, M.W., 2004. Relative quantification. *Real-time PCR*, pp.63–82.
- Protein Data Bank - <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (último acesso Setembro, 2015).
- Rahme, K. et al., 2013. PEGylated gold nanoparticles: polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions. *RSC Advances*, 3(17), p.6085. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ra22739a>.
- Rajapakse, C.S.K. et al., 2009. Synthesis, characterization, and in vitro antimalarial and antitumor activity of new ruthenium(II) complexes of chloroquine. *Inorganic Chemistry*, 48(3), pp.1122–1131.
- Read, R.J. & Schierbeek, A.J., 1988. A phased translation function. *Journal of Applied Crystallography*, 21(5), pp.490–495. Available at: <http://dx.doi.org/10.1107/S002188988800562X>.
- RefExA (Reference database for gene Expression Analysis) - [http://www.lsbm.org/site\\_e/database/index.html#](http://www.lsbm.org/site_e/database/index.html#) (consultado em Abril, 2015).
- Rehder, D., 2012. The potentiality of vanadium in medicinal applications. *Future Medicinal Chemistry*, 4(14), pp.1823–1837.
- Renatus, M. et al., 1998. Structural and Functional Analyses of Benzamidine-Based Inhibitors in Complex with Trypsin : Implications for the Inhibition of Factor Xa , tPA , and Urokinase. *J. Med. Chem*, 41, pp.5445–5456.
- Rhodes, G., 2006. *Crystallography Made Crystal Clear*, Elsevier. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012587073350012X> [Accessed March 27, 2015].
- Riss, T. Cell-based Assays to Detect the Mechanism of Toxicity. *Promega* (consultado em Agosto, 2015).
- Roess, D. et al., 2008. Effects of vanadium-containing compounds on membrane lipids and on microdomains used in receptor-mediated signaling. *Chemistry and Biodiversity*, 5(8), pp.1558–1570.

- Romagnani, S., 1996. TH1 and TH2 in Human Diseases. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 80(3), pp.225–235.
- Romão, C.C. et al., 2012. Developing drug molecules for therapy with carbon monoxide. *Chemical Society Reviews*, 41(9), p.3571.
- Romão, M.J., 1996. Cristalografia de Proteínas: metodologias e aplicações me Bioquímica. *Boletim de Biotecnologia*, 53, pp.18–36.
- Ryter, S.W. et al., 2006. Heme Oxygenase-1 / Carbon Monoxide : From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiol Rev*, 86, pp.583–650.
- Ryter, S.W. et al., 2007. Carbon monoxide and bilirubin: Potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 36(2), pp.175–182.
- Ryter, S.W. & Otterbein, L.E., 2004. Carbon monoxide in biology and medicine. *BioEssays*, 26(3), pp.270–280.
- Sabbioni, E. et al., 1996. A critical review on normal concentrations of vanadium in human blood, serum, and urine. *Science of the Total Environment*, 188(1), pp.49–58.
- Sabbioni, E. et al., 1993. The intensity of vanadium(V)-induced cytotoxicity and morphological transformation in BALB/3T3 cells is dependent on glutathione-mediated bioreduction to vanadium(IV). *Carcinogenesis*, 14(12), pp.2565–2568.
- Sabbioni, E. & Marafante, E., 1981. Relations between iron and vanadium metabolism: in vivo incorporation of vanadium into iron proteins of the rat. *Journal of toxicology and environmental health*, 8(3), pp.419–429.
- Sakurai, H. et al., 2002. Antidiabetic vanadium(IV) and zinc(II) complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 226(1-2), pp.187–198.
- Sakurai, H., 1995. Orally active and long-term acting insulin-mimetic vanadyl complex: Bis(picolinato)oxovanadium (IV), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1095-1101.
- Sanna, D. et al., 2012. Transport of the anti-diabetic VO<sub>2</sub> + complexes formed by pyrone derivatives in the blood serum. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 115, pp.87–99. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.04.020>.
- Sanna, D. et al., 2010. A quantitative study of the biotransformation of insulin-enhancing VO(2+) compounds. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 15(6), pp.825–839.
- Sanna, D., Micera, G. & Garribba, E., 2010. New developments in the comprehension of the biotransformation and transport of insulin-enhancing vanadium compounds in the blood serum. *Inorganic Chemistry*, 49(1), pp.174–187.
- Santos, M.F.A et al., 2012. New insights into the chemistry of fac-[Ru(CO)<sub>3</sub>]<sub>2</sub> + fragments in biologically relevant conditions: The CO releasing activity of [Ru(CO)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>(1,3-thiazole)], and the X-ray crystal structure of its adduct with lysozyme. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 117, pp.285–291. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.06.018>.

- Santos, M.F.A. et al., 2014. Vanadium Complexes as Prospective Therapeutics: Structural Characterization of a V<sup>IV</sup> Lysozyme Adduct. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2014(21), pp.3293–3297. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejic.201402408>.
- Santos-Silva, T. et al., 2011. CORM-3 reactivity toward proteins: The crystal structure of a Ru(II) dicarbonyl-lysozyme complex. *Journal of the American Chemical Society*, 133(5), pp.1192–1195.
- Santos-Silva, T., Mukhopadhyay, A. et al., 2011. Towards Improved Therapeutic CORMs: Understanding the Reactivity of CORM-3 with Proteins. *Current medicinal chemistry*, 18(22), pp.3361–3366.
- Sato, K. et al., 2001. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(6), pp.4185–4194.
- Scior, T. et al., 2005. Are vanadium compounds drugable? Structures and effects of antidiabetic vanadium compounds: a critical review. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 5(11), pp.995–1008.
- Scott, M.G. et al., 2007. An anti-infective peptide that selectively modulates the innate immune response. *Nature biotechnology*, 25(4), pp.465–472.
- Seixas, J.D. et al., 2015. A contribution to the rational design of Ru(CO)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>L complexes for in vivo delivery of CO. *Dalton Trans.*, 44(11), pp.5058–5075. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4DT02966F>.
- Shariatzi, S. et al., 2015. Inhibition of amyloid fibrillation and cytotoxicity of lysozyme fibrillation products by polyphenols. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, pp.95–106. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014181301500433X>.
- Shechter, Y. et al., 2003. Historic perspective and recent developments on the insulin-like actions of vanadium; toward developing vanadium-based drugs for diabetes. *Coordination Chemistry Reviews*, 237(1-2), pp.3–11.
- Shechter, Y., 1980. Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl (IV) ions, *Macmillan Journals* 284, pp.556-558.
- Shi, X. et al., 1993. One-electron reduction of vanadium by Flavoenzymes/NADPH, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 302, pp.300-303.
- Shiloh, M.U. et al., 2008. Mycobacterium tuberculosis Senses Host-Derived Carbon Monoxide during Macrophage Infection. *Cell Host and Microbe*, 3(5), pp.323–330.
- Shisheva, A. & Shechter, Y., 1993. Role of cytosolic tyrosine kinase in mediating insulin-like actions of vanadate in rat adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 268(9), pp.6463–6469.
- Silva-Gomes, S. et al., 2013. Heme catabolism by heme oxygenase-1 confers host resistance to Mycobacterium infection. *Infection and Immunity*, 81(7), pp.2536–2545.
- Singh, A. et al., 2009. Mycobacterium tuberculosis WhiB3 Maintains redox homeostasis by regulating virulence lipid anabolism to modulate macrophage response. *PLoS Pathogens*, 5(8).
- Singh, S. et al., 2014. Immunogenic potential of latency associated antigens against Mycobacterium tuberculosis. *Vaccine*, 32(6), pp.712–716. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.065>.

- Soloviev, M., 2012. Nanoparticles in Biology and Medicine. *Springer*, 8(1), pp.167–167. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-61779-953-2>  
<http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-61779-953-2.pdf>.
- Song, H. et al., 2008. Chapter 7: Protects Endothelial Cells Cold Preservation , Resulting in Improved Vascular Function and Inhibition of Intimal Hyperplasia after Aorta Transplantation in Rats. *CORM-3 and Cold Preservation Injury*, pp.141–160.
- Srivastava, A.K. & Mehdi, M.Z., 2005. Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. *Diabetic Medicine*, 22(1), pp.2–13.
- Stenman, U., 2015. Biomarker development , from bench to bedside. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, pp.1–18. Available at: <http://dx.doi.org/10.3109/10408363.2015.1075468>.
- Sun, Y.N. et al., 2011. Shape dependence of gold nanoparticles on in vivo acute toxicological effects and biodistribution. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11(2), pp. 1210–1216.
- Szabo, C., 2010. Gaseotransmitters: new frontiers for translational science. *Science translational medicine*, 2(59), p.59ps54.
- Thompson, K.H., 1999. Vanadium and diabetes. *BioFactors (Oxford, England)*, 10(1), pp.43–51.
- Thompson, K.H. et al., 2009. Vanadium treatment of type 2 diabetes: A view to the future. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(4), pp.554–558. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.12.003>.
- Thompson, K.H. & Orvig, C., 2001. Coordination chemistry of vanadium in metallopharmaceutical candidate compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, 219-221, pp.1033–1053.
- Thompson, K.H. & Orvig, C., 2000. Design of vanadium compounds as insulin enhancing agents. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (17), pp.2885–2892.
- Thompson, K.H. & Orvig, C., 2006. Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(12), pp.1925–1935.
- Tiwari, P.M. et al., 2011. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomaterials*, 1(1), pp.31–63.
- Torchilin, V.P., 2010. *Drug Delivery*, Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-00477-3>.
- Tracey, A. et. al., 2007. Vanadium. *Chemistry, Biochemistry, Pharmacology and Practical Applications*,
- Tseng, F.J. et al., 2015. Carbon Monoxide Inhibits Receptor Activator of NF-κB (RANKL)-Induced Osteoclastogenesis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(3), pp.1250–1258. Available at: <http://www.karger.com/?doi=10.1159/000430294>.
- Tsuchiya, K. et. al., 1990. Insulin-like effect of vanadyl ion on streptozotocin-induced diabetics rats, *Journal of Endocrinology* (126), pp.451-459.
- Ulker, Z. et. al., 2013. Assessment of cytotoxic and apoptotic effects of benzaldehyde using different assays. *Human & experimental toxicology*, 32(8), pp.858–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23263855>.
- Valko, M. et al., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), pp.1–40.

- Valko, M. et al., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, 12(10), pp.1161–1208.
- Vera, T. et al., 2007. HO-1 induction lowers blood pressure and superoxide production in the renal medulla of angiotensin II hypertensive mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 292(4), pp.R1472–R1478.
- Videira, A., 2011. Engenharia genética: Princípios e aplicações. 2ª Edição, Portugal, *Lidel*.
- Voliani, V. et al., 2012. Smart Delivery and Controlled Drug Release with Gold Nanoparticles: New Frontiers in Nanomedicine. *Recent Patents on Nanomedicine*, 2(1), pp.34–44.
- Wallace, J.L. et al., 2015. Gaseous mediators in resolution of inflammation. *Seminars in Immunology*, pp.1–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2015.05.004>.
- Wang, J. et al., 2012. A selective fluorescent probe for carbon monoxide imaging in living cells. *Angewandte Chemie - International Edition*, 51(38), pp.9652–9656. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ange.201203684>.
- Wang, X. et al., 2007. Carbon Monoxide Protects against Hyperoxia-induced Endothelial Cell Apoptosis by Inhibiting Reactive Oxygen Species Formation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(3), pp.1718–1726.
- Wegiel, B. et al., 2008. Inhale to survive, cycle or die? Carbon monoxide and cellular proliferation. *Cell Cycle*, 7(10), pp.1379–1384.
- Weiss, A., 2003. Symposium papers. *Agronomy Journal*, 95(1), pp.1–3.
- Whittingham, S. et al., 1971. Diabetes mellitus, autoimmunity, and ageing. *Lancet*, 1(7703), pp.763–766.
- Willsky, G.R. et al., 2011. Anti-diabetic effects of a series of vanadium dipicolinate complexes in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Coordination Chemistry Reviews*, 255(19-20), pp.2258–2269. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.015>.
- Wlodawer, A. et al., 2008. HHS Public Access. *FEBS J.*, 275(1), pp.1–21.
- Wu, L. & Wang, R.U.I., 2005. Carbon Monoxide : Endogenous Production , Physiological Functions , and Pharmacological. *Pharmacological Reviews*, 57(4), pp.585–630.
- Xiong, G. et al., 2000. UV resonance Raman spectroscopic identification of transition metal atoms incorporated in the framework of molecular sieves, pp.341–346.
- Yen, H. et al., 2009. Cytotoxicity and Immunological Response of Gold and Silver Nanoparticles of Different Sizes. *Small (Inter Science)*, 5(13), pp.1553–1561.
- Yohannes, G. et al., 2010. Thermal aggregation of bovine serum albumin studied by asymmetrical flow field-flow fractionation. *Analytica Chimica Acta*, 675(2), pp.191–198. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.07.016>.
- Zacharia, V.M. et al., 2013. Cor, a novel carbon monoxide resistance gene, is essential for Mycobacterium tuberculosis pathogenesis. *mBio*, 4(6), pp.1–9.

Zhang, Q. et al., 2013. An ultrasensitive chemiluminescence turn-on assay for protease and inhibitor screening with a natural substrate. *Chemical Communications*, 49(30), p.3137. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3cc40906f>.

Zhang, Z. et al., 2001. Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Archives of biochemistry and biophysics*, 392(2), pp.311–320.

Zhou, J. et al., 2000. The role of adhesive proteins in the hematogenous spread of cancer. *In Vivo*, 14, pp.1999–2080.

## 7 – Anexos

### Anexo 1

Ensaio cinético de *B.subtilis* na presença de HEWL, HEWL com V(IV), e HEWL com VO(pic)<sub>2</sub> recorrendo a diferentes temperaturas, com o objetivo de avaliar o potencial inibitório dos compostos de vanádio.

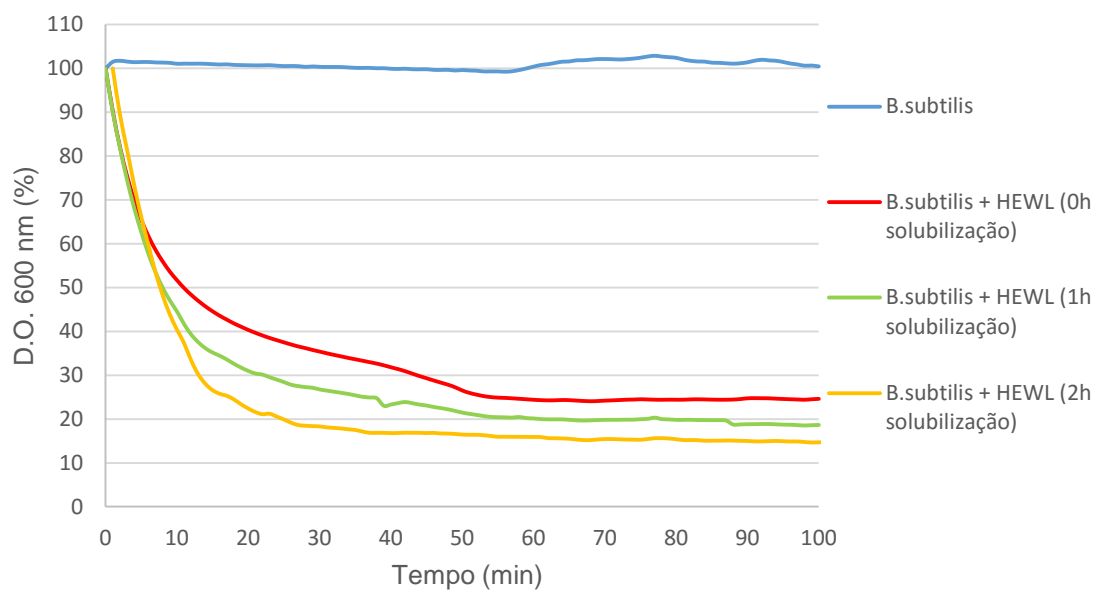


Figura 7.1 – Representação gráfica da D.O. (em %) a 600 nm ao longo do tempo de *B.subtilis* na presença de HEWL 0,1 mg/mL, durante 100 minutos. Os valores de D.O. correspondem à média dos replicados técnicos, e os ensaios foram realizados no espectrofotómetro Ultrospec 2100, à temperatura ambiente.

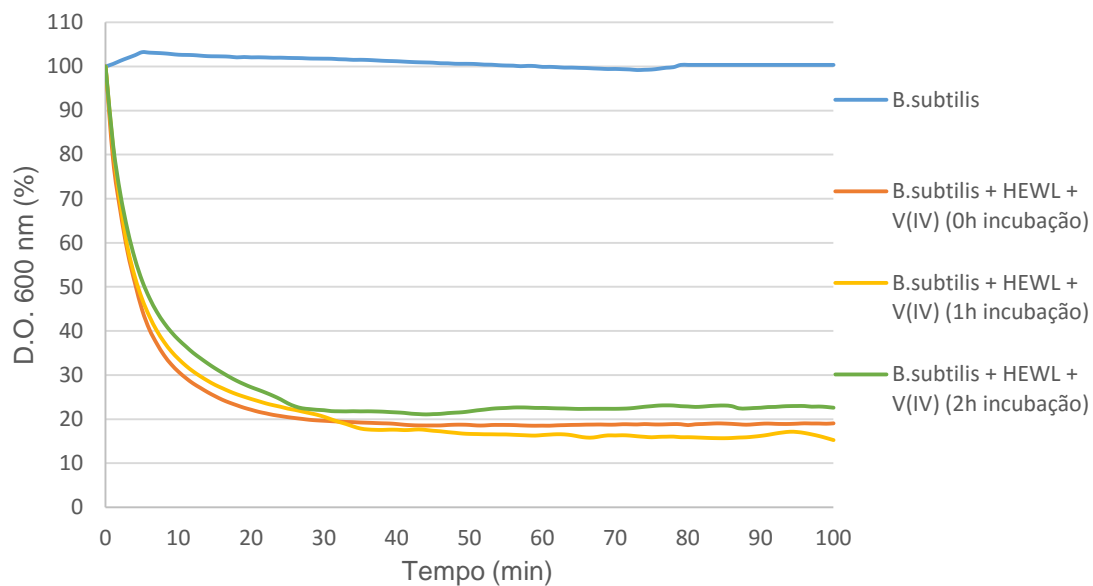


Figura 7.2 – Representação gráfica da D.O. (em %) a 600 nm ao longo do tempo de *B.subtilis* na presença de HEWL com V(IV) 0,1 mg/mL, com tempos de 0; 1 e 2 horas de incubação, durante 100 minutos. Os compostos incubados com a proteína foram colocados em gelo até ao momento da realização dos ensaios. Os valores de D.O. correspondem à média dos replicados técnicos, e os ensaios foram realizados no espectrofotómetro Ultrospec 2100, à temperatura ambiente.

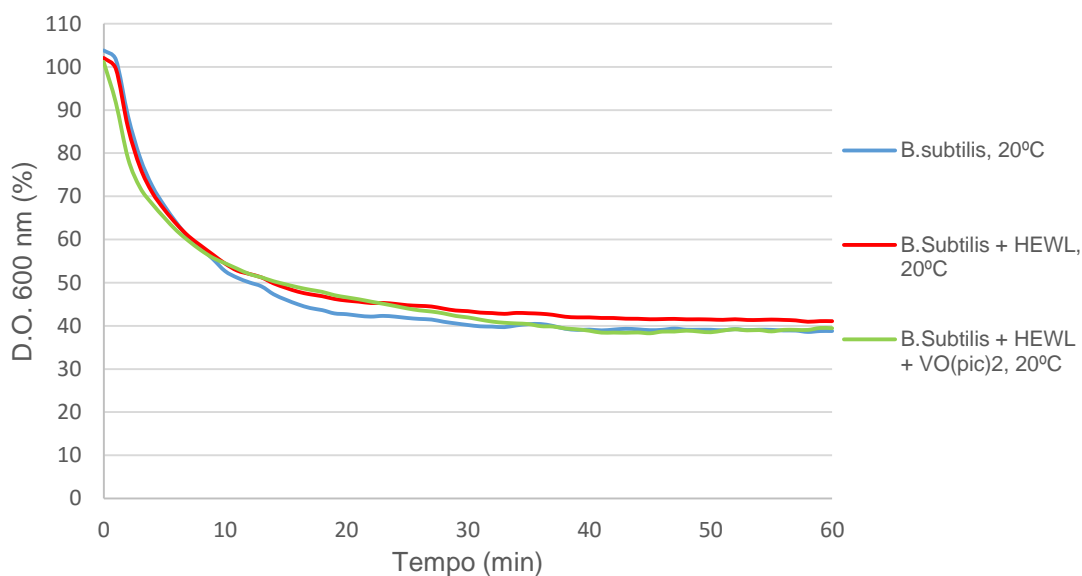


Figura 7.3 – Representação gráfica dos valores de D.O. (em %) a 600 nm ao longo do tempo de *B.subtilis* na presença de HEWL 0,1 mg/mL, e *B.subtilis* na presença de HEWL com VO(pic)<sub>2</sub> 0,1 mg/mL, com 2 horas de incubação do composto com a proteína. O ensaio foi realizado a 20°C durante 60 minutos. Os compostos incubados com a proteína foram colocados em gelo até ao momento da realização dos ensaios. Os valores de D.O. correspondem à média dos replicados técnicos, e os ensaios foram realizados no leitor SpectraMax Microplate.



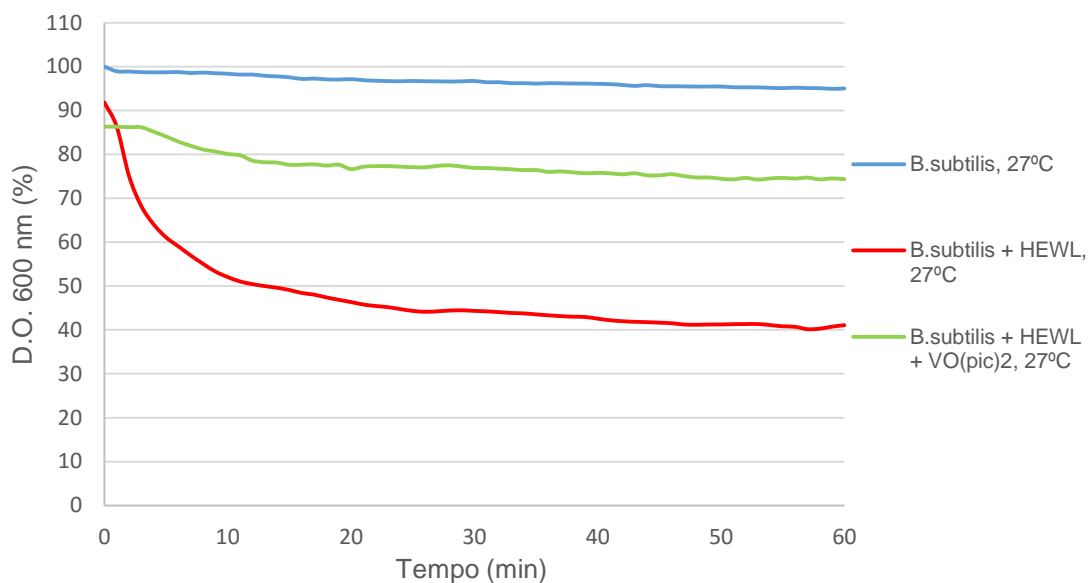


Figura 7.4 – Representação gráfica dos valores de D.O. (em %) a 600 nm ao longo do tempo de *B.subtilis* na presença de HEWL 0,1 mg/mL, e *B.subtilis* na presença de HEWL com VO(pic)<sub>2</sub> 0,1 mg/mL, com 2 horas de incubação do composto com a proteína. O ensaio foi realizado a 27°C durante 60 minutos. Os compostos incubados com a proteína foram colocados em gelo até ao momento da realização dos ensaios. Os valores de D.O. correspondem à média dos replicados técnicos, e os ensaios foram realizados no leitor SpectraMax Microplate.

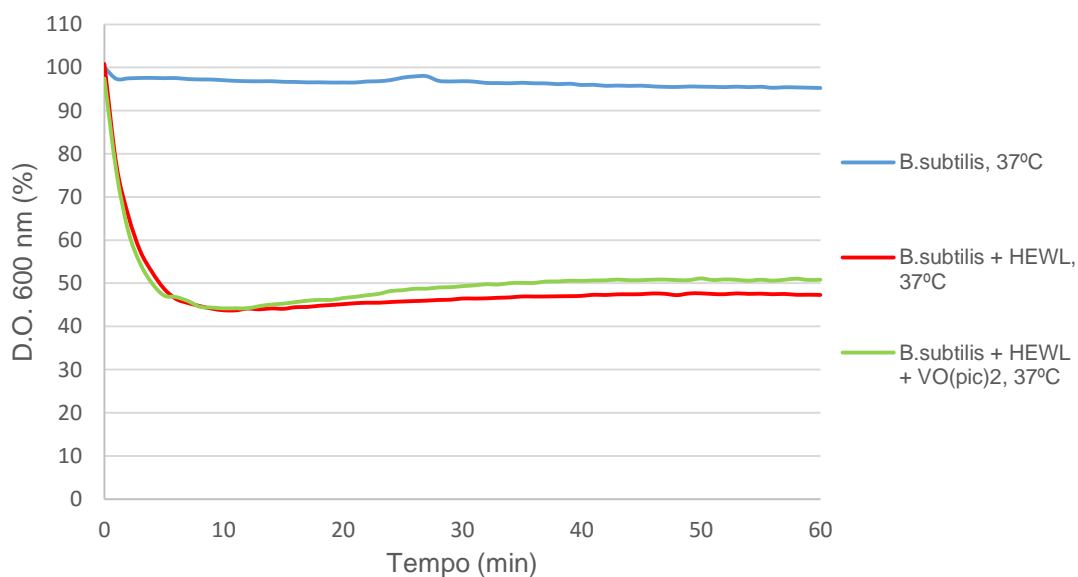


Figura 7.5 – Representação gráfica dos valores de D.O. (em %) a 600 nm ao longo do tempo de *B.subtilis* na presença de HEWL 0,1 mg/mL, e *B.subtilis* na presença de HEWL com VO(pic)<sub>2</sub> 0,1 mg/mL, com 2 horas de incubação do composto com a proteína. O ensaio foi realizado a 37°C durante 60 minutos. Os compostos incubados com a proteína foram colocados em gelo até ao momento da realização dos ensaios. Os valores de D.O. correspondem à média dos replicados técnicos, e os ensaios foram realizados no leitor SpectraMax Microplate.

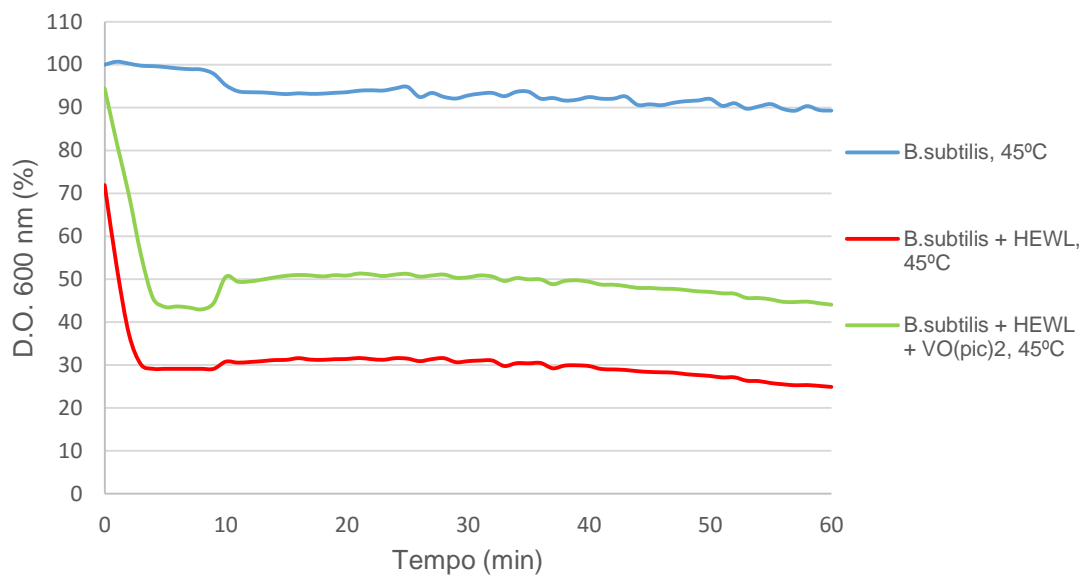


Figura 7.6 – Representação gráfica dos valores de D.O. (em %) a 600 nm ao longo do tempo de *B.subtilis* na presença de HEWL 0,1 mg/mL, e *B.subtilis* na presença de HEWL com VO(pic)<sub>2</sub> 0,1 mg/mL, com 2 horas de incubação do composto com a proteína. O ensaio foi realizado a 45°C durante 60 minutos. Os compostos incubados com a proteína foram colocados em gelo até ao momento da realização dos ensaios. Os valores de D.O. correspondem à média dos replicados técnicos, e os ensaios foram realizados no leitor SpectraMax Microplate.

## Anexo 2

Curvas de calibração correspondentes à etapa de funcionalização de AuNPs@PEG (Curva de calibração de PEG, pelo método de Ellmans), AuNPs@PEG@BSA (curva de calibração da BSA, pelo método de Bradford) e AuNPs@PEG@HEWL (curva de calibração de HEWL, pelo método de Bradford).

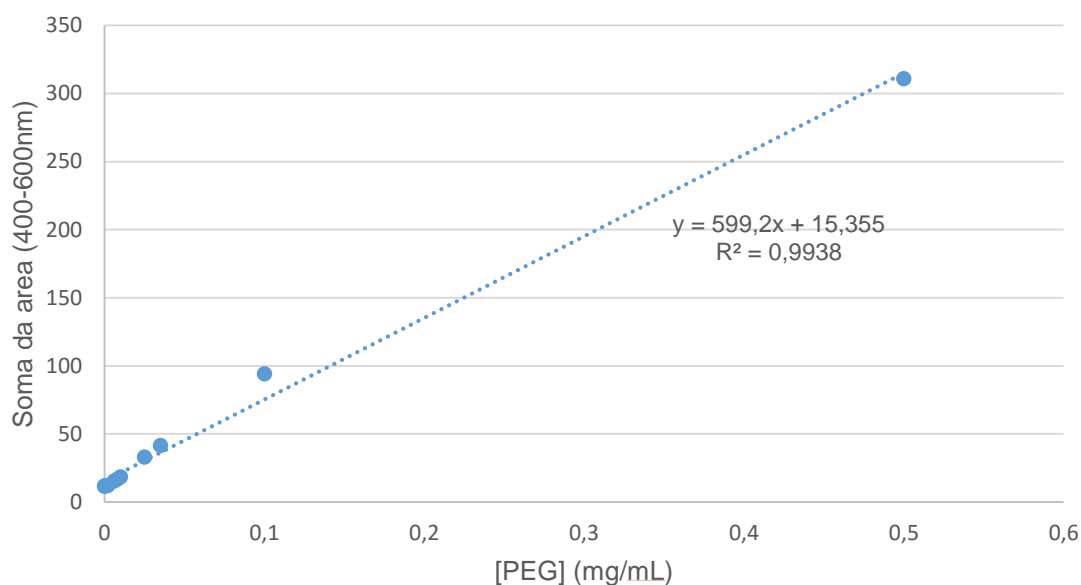


Figura 7.7 – Representação gráfica da curva de calibração linear obtida através do método de Ellman's, utilizando uma gama de concentrações de 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL de PEG, por espectroscopia de UV/visível, cujos valores corresponde ao somatório da área debaixo da curva para uma gama de comprimentos de onda de 400 a 600 nm. A concentração de PEG funcionalizada à superfície das AuNPs foi determinada através da equação da regressão linear fornecida no gráfico, e o rácio de AuNP:PEG obtido por interpolação da concentração de PEG em função do seu peso molecular e a concentração de AuNPs (10 nM). O ensaio foi realizado no leitor de microplacas Infinite M200 da Tecan.

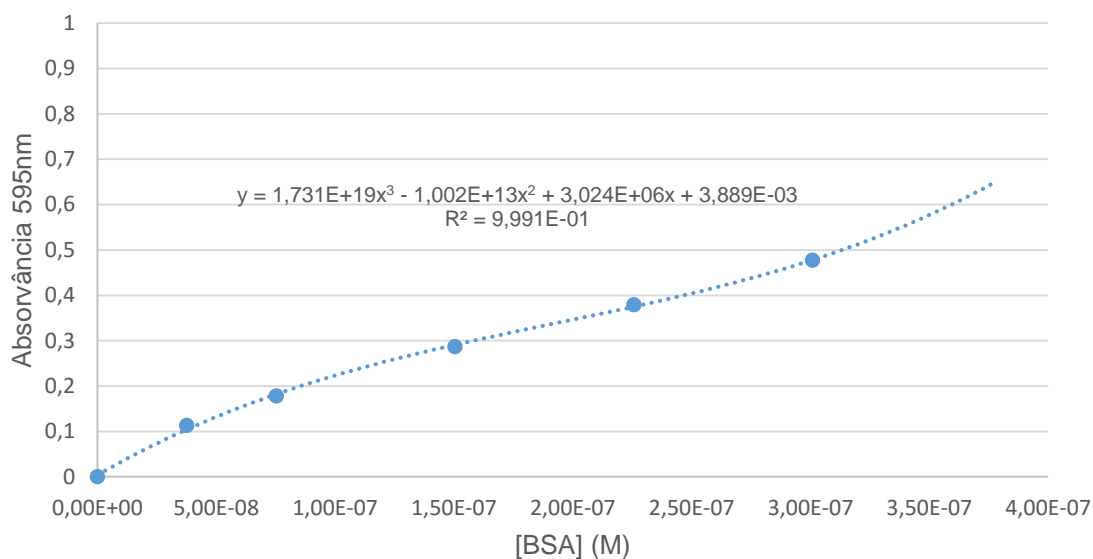


Figura 7.8 – Representação gráfica da curva de calibração polinomial de 3º grau para a BSA obtida através do ensaio de Bradford, utilizando uma gama de concentrações de 0; 2,5; 5; 10 e 15 µg/mL de BSA, por espectroscopia de UV/visível a um comprimento de onda de 595 nm. A concentração de BSA (convertidas para M) funcionalizada à superfície das AuNPs@PEG foi determinada por interpolação da equação da regressão polinomial fornecida no gráfico, e o rácio de AuNP:BSA obtido através do número de moles de AuNPs (2,1E-11) em função do número de moles de proteína que se ligou às AuNPs. O ensaio foi realizado no leitor de microplacas Infinite M200 da Tecan.

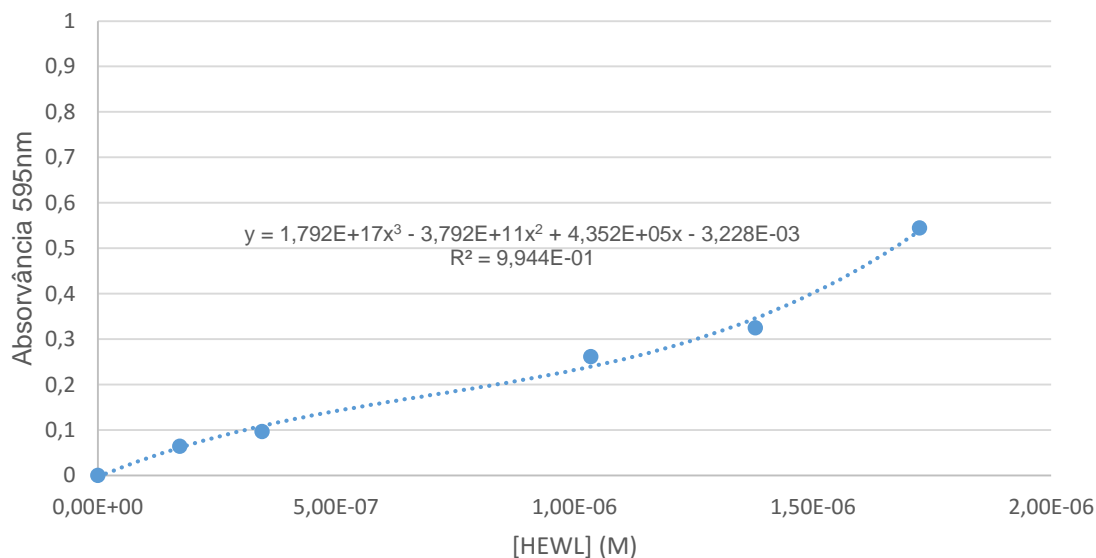


Figura 7.9 – Representação gráfica da curva de calibração polinomial de 3º grau para a HEWL obtida através do ensaio de Bradford, utilizando uma gama de concentrações de 0; 2,5; 5; 10 e 15 µg/mL de HEWL, por espectroscopia de UV/visível a um comprimento de onda de 595 nm. A concentração de HEWL (convertidas para M) funcionalizada à superfície das AuNPs@PEG foi determinada por interpolação da equação da regressão polinomial fornecida no gráfico, e o rácio de AuNP:lis obtido através do número de moles de AuNPs (2,1E-11) em função do número de moles de proteína que se ligou às AuNPs. O ensaio foi realizado no leitor de microplacas Infinite M200 da Tecan.

### Anexo 3

Para continuidade dos estudos de viabilidade celular por MTS visando determinar a toxicidade do CORM-3, foram realizados novos ensaios, recorrendo de novo às linhas tumorais HCT116 e A549, com administração do CORM-3 numa gama de concentrações entre 50; 75; 100; 125 e 150  $\mu\text{M}$ , prolongando o tempo de exposição das células ao composto por 24; 48 e 72 horas, e os resultados encontram-se ilustrados na Figura 7.10. Adicionalmente, procedeu-se à contagem de células viáveis no fim de cada ensaio de MTS, visando distinguir a diferença entre a contribuição das atividades metabólicas de células de diferentes tamanhos, que possam estar a interferir com as percentagens de viabilidade celular obtidas – através dos ensaios por MTS é impossível distinguir a quantidade de células que se encontram viáveis, e conseqüentemente, a percentagem de viabilidade celular medida é uma resultante da soma equitativa do conjunto de todas as células, não distinguindo, nem tendo em conta, que o metabolismo celular de uma célula maior e mais robusta possa equivaler à soma dos metabolismos celulares de um conjunto de várias pequenas células. Para distinção das células viáveis face às células cuja integridade membranar se encontrava comprometida (tais como as células em apoptose) recorreu-se ao reagente *Trypan Blue*, que confere uma coloração azul às células que perdem a integridade das suas membranas, contrariamente às células viáveis que apresentam ausência de coloração. Por fim, o cálculo do número de células viáveis foi realizado recorrendo à Equação 8 (secção 3.2.3.1 dos Materiais e Métodos), e os resultados encontram-se discriminados nas Tabelas 7.1 e 7.2 para a HCT116 e A549, respetivamente.

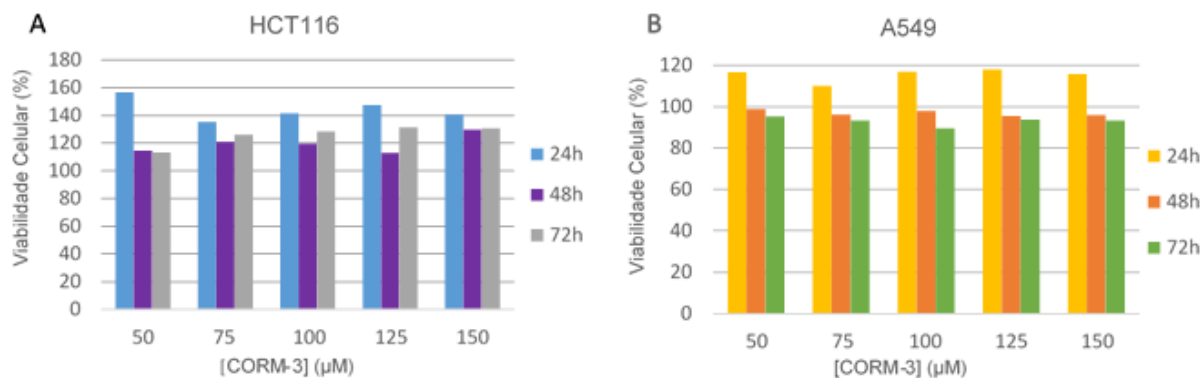


Figura 7.10 – Representação gráfica da viabilidade celular (em %) a 490 nm, de HCT 116 (A) e A549 (B) obtida através dos ensaios de MTS, em função da gama de concentrações 50; 75; 100; 125 e 150  $\mu\text{M}$  de CORM-3 às quais as células foram expostas durante períodos de 24; 48 e 72 horas. A percentagem de viabilidade celular para cada concentração de CORM-3 corresponde à média dos replicados técnicos, e o ensaio decorreu no leitor de microplacas Infinite M200 da Tecan.

Tabela 7.1 – Contagem do número de células viáveis/mL para HCT116 após realização dos ensaios de MTS na qual se administraram, por períodos de exposição de 24; 48 e 72 horas, várias concentrações de CORM-3 às células. Cada um do número de células viáveis obtidas corresponde ao somatório das células contadas em ambos os replicados técnicos de cada concentração de CORM-3 testados. Foi utilizado o reagente *Trypan Blue*, e a contagem foi feita no microscópio ótico invertido Nikon TMS.

	<b>HCT116 (células viáveis)</b>		
<b>[CORM-3] (µM)</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
<b>Controlo (0 µM)</b>	380000	1240000	3260000
<b>50 µM</b>	350000	1010000	3210000
<b>75 µM</b>	420000	1100000	2010000
<b>100 µM</b>	430000	480000	1180000
<b>125 µM</b>	400000	690000	2680000
<b>150 µM</b>	320000	1220000	2080000

Tabela 7.2 – Contagem do número de células viáveis/mL para A549 após realização dos ensaios de MTS na qual se administraram, por períodos de exposição de 24; 48 e 72 horas, várias concentrações de CORM-3 às células. Cada um do número de células viáveis obtidas corresponde ao somatório das células contadas em ambos os replicados técnicos de cada concentração de CORM-3 testados. Foi utilizado o reagente *Trypan Blue*, e a contagem foi feita no microscópio ótico invertido Nikon TMS.

	<b>A549 (células viáveis)</b>		
<b>[CORM-3] (µM)</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
<b>Controlo (0 µM)</b>	230000	950000	3150000
<b>50 µM</b>	380000	1630000	3290000
<b>75 µM</b>	270000	1360000	2830000
<b>100 µM</b>	250000	1440000	1680000
<b>125 µM</b>	160000	1670000	3020000
<b>150 µM</b>	210000	2340000	2540000

Novamente, os resultados correspondentes aos ensaios de MTS não mostraram um efeito citotóxico do CORM-3 nas células tumorais, nem com aumento da concentração administrada do CORM-3, nem com o aumento do tempo de exposição, não sendo também possível proceder-se ao cálculo do IC<sub>50</sub> do composto. No entanto, apesar da alteração do período de exposição das células ao CORM-3 não apresentar diminuições significativas na viabilidade celular é, contudo, possível verificar uma diferença nas percentagens de viabilidade celular, para ambas as linhas HCT116 e A549, entre os períodos de

exposição de 24 horas, onde a viabilidade celular se encontra muito mais elevada – os valores rondam 140% a 160% para HCT116, e 110% a 120% para A549 – face às 48 e 72 horas.

Relativamente à etapa da de contagem de células, o aumento do número de células em ambas as linhas celulares, à medida que os tempos de incubação aumentam, pode ser justificado pelo facto de as linhas celulares permanecerem mais tempo em cultura nas placas de 96 poços, uma vez que na ausência de um composto citotóxico (tal como aparenta ser o CORM-3), as células proliferam.

Contudo, analisando o número de células/mL para as respetivas concentrações, é possível observar que independentemente da concentração de CORM-3 administrado, o número de células/mL é idêntico ao controlo para cada tempo de incubação realizado. Como tal, seria esperado que a percentagem de viabilidade celular para cada concentração de CORM-3 testada, fosse um valor aproximado de 100%. No entanto para o tempo de exposição de 24h de ambas as linhas celulares, as percentagens de viabilidade são muito superiores a 100% – tal pode ser devido a um efeito do CORM-3 no metabolismo celular, sendo mais notório este efeito na linha celular HCT116. Pode ainda observar-se para a linha celular HCT116, que a viabilidade das células nos restantes tempos de exposição (às quais foi administrado o composto) supera o valor de 100%, indicando que estas se possam encontrar com um metabolismo mais ativo do que as células do controlo (que carecem da administração de CORM). Assim, coloca-se a hipótese de que o CORM-3 poderá estar a exercer um efeito potenciador no metabolismo das células tumorais.

Uma vez observado que a contagem de células não demonstrou o pressuposto de que com o aumento da concentração administrada de CORM-3 haveria menos células, mas de dimensões maiores, apresentando uma maior atividade metabólica que células de dimensões inferiores, não se procedeu mais à contagem de células nos ensaios de MTS realizados posteriormente.

Por fim foram ainda realizados ensaios de MTS utilizando as mesmas concentrações de CORM-3 recorrendo à linha celular MDA-MB-453, com um tempo de exposição de 48 e 72 horas das células ao composto, de modo a avaliar os efeitos que o CORM-3 poderia exercer nestas células, e se se distinguiam dos obtidos para as duas linhas celulares anteriores (Figura 7.11).

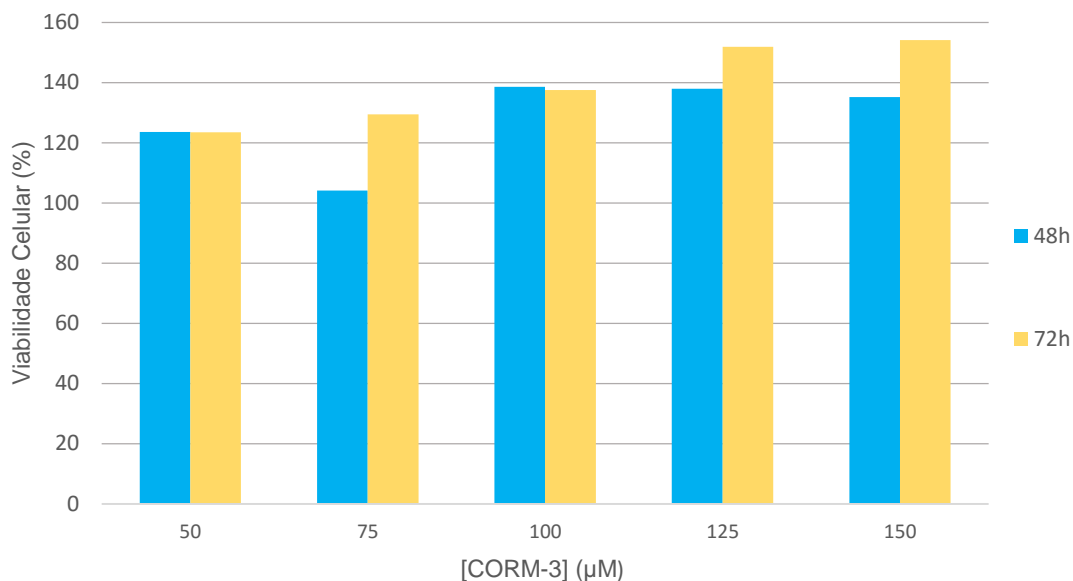


Figura 7.11 – Representação gráfica da viabilidade celular (em %) a 490 nm, de MDA-MB-453 obtida através dos ensaios de MTS, em função da gama de concentrações 50; 75; 100; 125 e 150  $\mu\text{M}$  de CORM-3 às quais as células foram expostas durante períodos de 48 e 72 horas. A percentagem de viabilidade celular para cada concentração de CORM-3 corresponde à média dos replicados técnicos, e o ensaio decorreu no leitor de microplacas Infinite M200 da Tecan.

Os resultados dos ensaios de MTS obtidos para a MDA-MB 453, no entanto, não diferiram dos obtidos para a HT116 e A549: não houve quaisquer evidências de um efeito citotóxico do composto, mantendo-se a impossibilidade de calcular o seu  $\text{IC}_{50}$ . Também as percentagens de viabilidade obtidas possuíam valores acima de 100%, sendo no entanto menores para as 48 horas de exposição das células às várias concentrações de CORM-3, face às 72 horas.



## Anexo 4

Ilustrações dos resultados provenientes dos riscados celulares das células NINA e fibroblastos com administração de CORM-3, BSA, HEWL e CORM-3 conjugado com as proteínas, nos tempos 0 e 24 horas após os riscados.

Controlo (NINA)

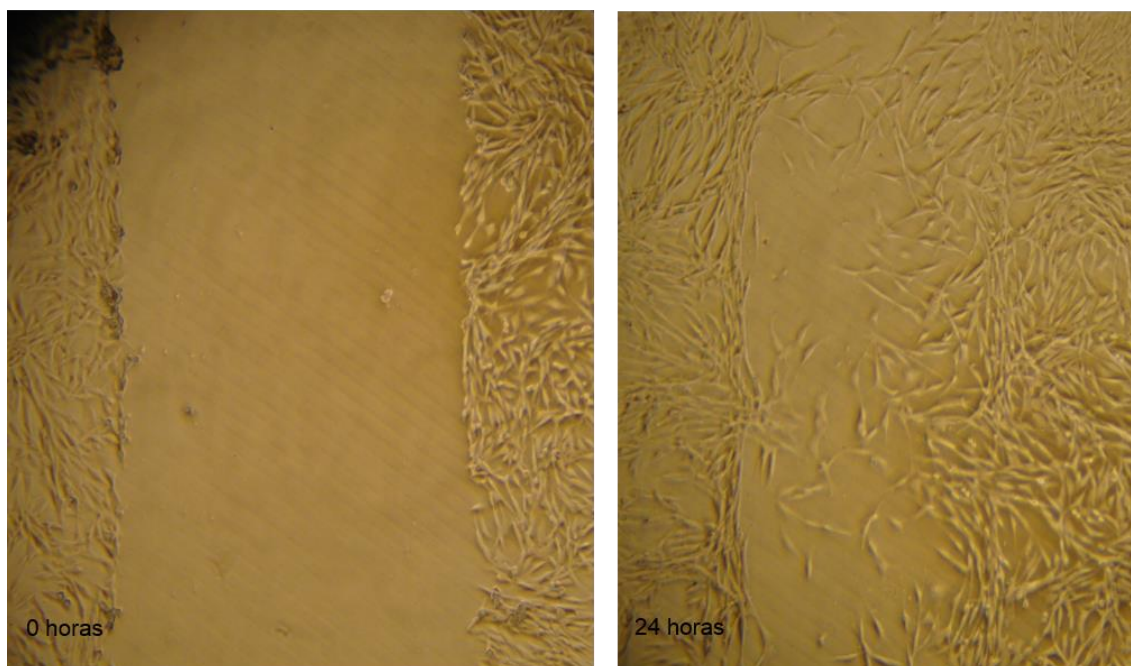


Figura 7.12 – Representação ilustrativa dos riscados das células NINA, comparando os tempos 0 e 24 horas após efetuado o riscado, e contendo apenas as células – controlo. Riscado às 0 horas apresenta um tamanho de  $63,14 \pm 6,45 \mu\text{m}$ , e o riscado às 24 horas apresenta uma redução para  $29,065 \pm 2,99 \mu\text{m}$ . As imagens foram processadas, e os tamanhos obtidos através do programa ImageJ.

### CORM-3 (NINA)

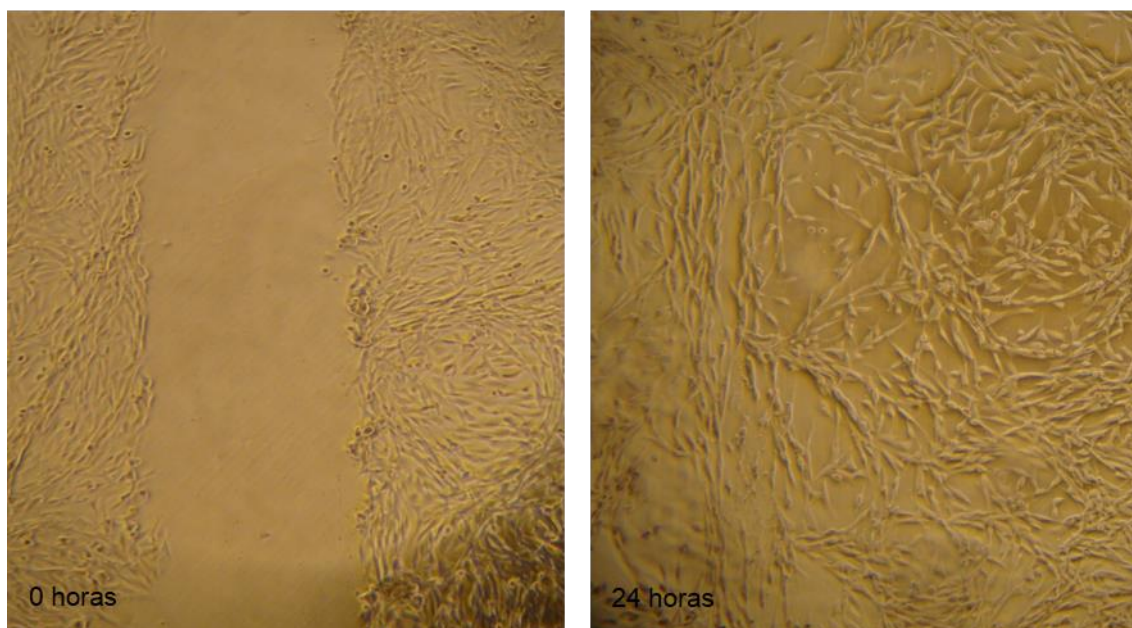


Figura 7.13 – Representação ilustrativa dos riscados das células NINA, comparando os tempos 0 e 24 horas após efetuado o riscado e administrado o CORM-3 (a 3  $\mu\text{M}$ ). Riscado às 0 horas apresenta um tamanho de  $44,71 \pm 1,83 \mu\text{m}$ , e o riscado às 24 horas apresenta uma redução para  $10,81 \pm 0,35 \mu\text{m}$ . As imagens foram processadas, e os tamanhos obtidos através do programa ImageJ.

### BSA (NINA)

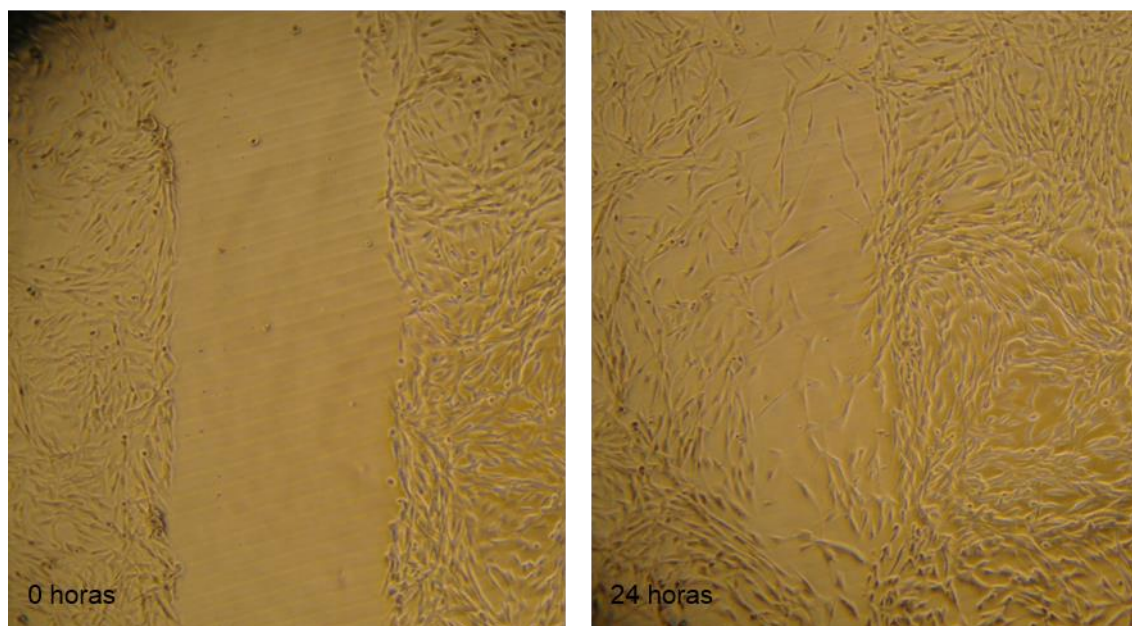


Figura 7.14 – Representação ilustrativa dos riscados das células NINA, comparando os tempos 0 e 24 horas após efetuado o riscado e administrado a proteína BSA (a 0,6  $\mu\text{M}$ ) – controlo da BSA. Riscado às 0 horas apresenta um tamanho de  $55,80 \pm 3,04 \mu\text{m}$ , e o riscado às 24 horas apresenta uma redução para  $20,69 \pm 0,36 \mu\text{m}$ . As imagens foram processadas, e os tamanhos obtidos através do programa ImageJ.

#### HEWL (NINA)

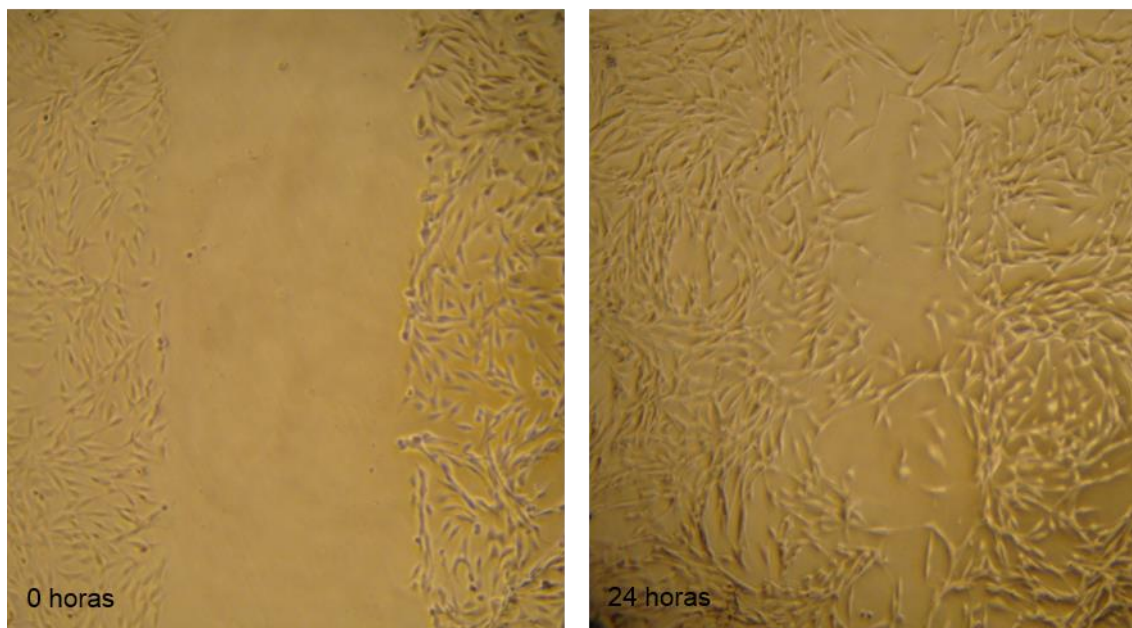


Figura 7.15 – Representação ilustrativa dos riscados das células NINA, comparando os tempos 0 e 24 horas após efetuado o riscado e administrado a proteína HEWL (a  $0,6 \mu\text{M}$ ) – controlo da HEWL. Riscado às 0 horas apresenta um tamanho de  $53,35 \pm 2,012 \mu\text{m}$ , e o riscado às 24 horas apresenta uma redução para  $26,53 \pm 3,02 \mu\text{m}$ . As imagens foram processadas, e os tamanhos obtidos através do programa ImageJ.

#### CORM-3-BSA (NINA)

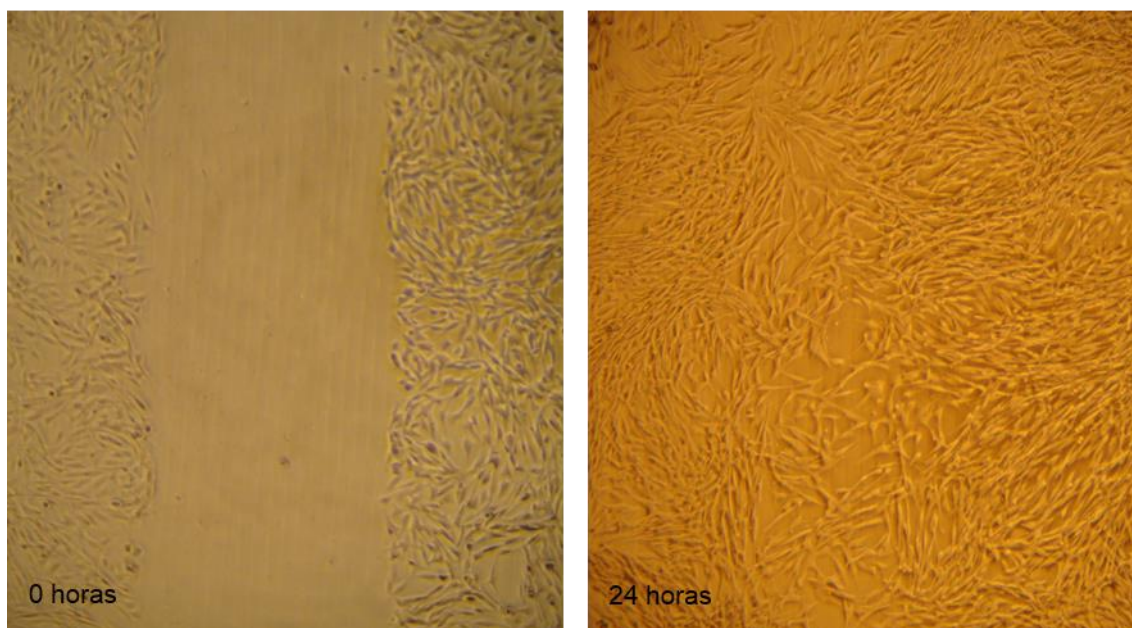


Figura 7.16 – Representação ilustrativa dos riscados das células NINA, comparando os tempos 0 e 24 horas após efetuado o riscado e administrado o CORM-3 (a  $3 \mu\text{M}$ ) conjugado com BSA (a  $0,6 \mu\text{M}$ ). Riscado às 0 horas apresenta um tamanho de  $50,1 \pm 1,83 \mu\text{m}$ , e o riscado às 24 horas apresenta uma redução para  $9,44 \pm 0,43 \mu\text{m}$ . As imagens foram processadas, e os tamanhos obtidos através do programa ImageJ.

### CORM-3-HEWL (NINA)

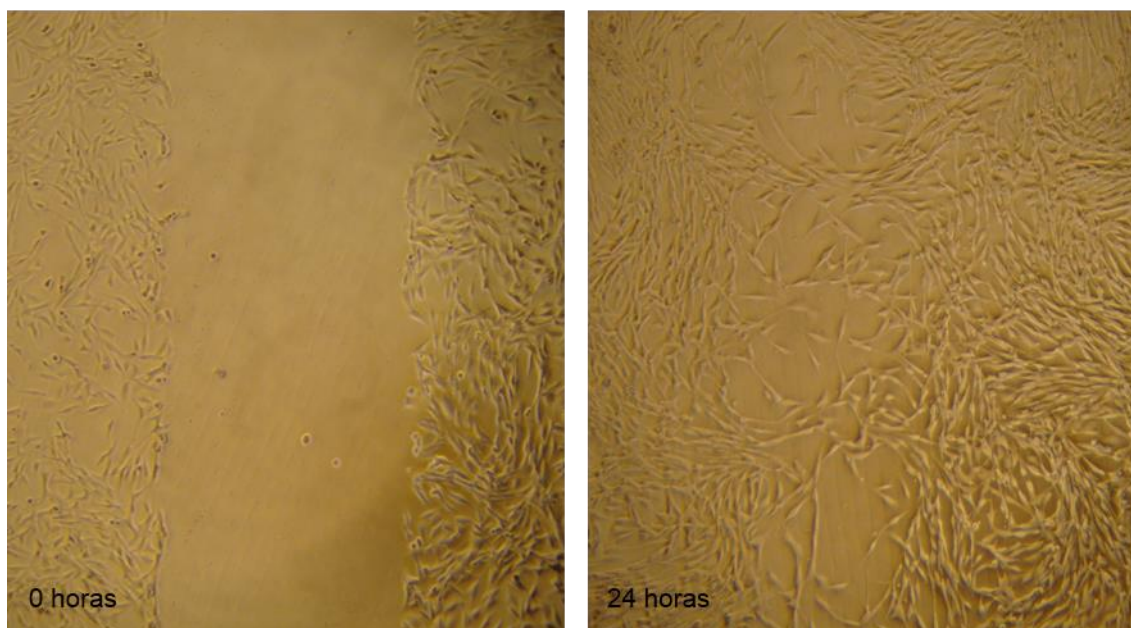


Figura 7.17 – Representação ilustrativa dos riscados das células NINA, comparando os tempos 0 e 24 horas após efetuado o riscado e administrado o CORM-3 (3  $\mu\text{M}$ ) conjugado com HEWL (0,6  $\mu\text{M}$ ). Riscado às 0 horas apresenta um tamanho de  $54,61 \pm 5,09 \mu\text{m}$ , e o riscado às 24 horas apresenta uma redução para  $19,25 \pm 2,29 \mu\text{m}$ . As imagens foram processadas, e os tamanhos obtidos através do programa ImageJ.

### Controlo (Fibroblastos)

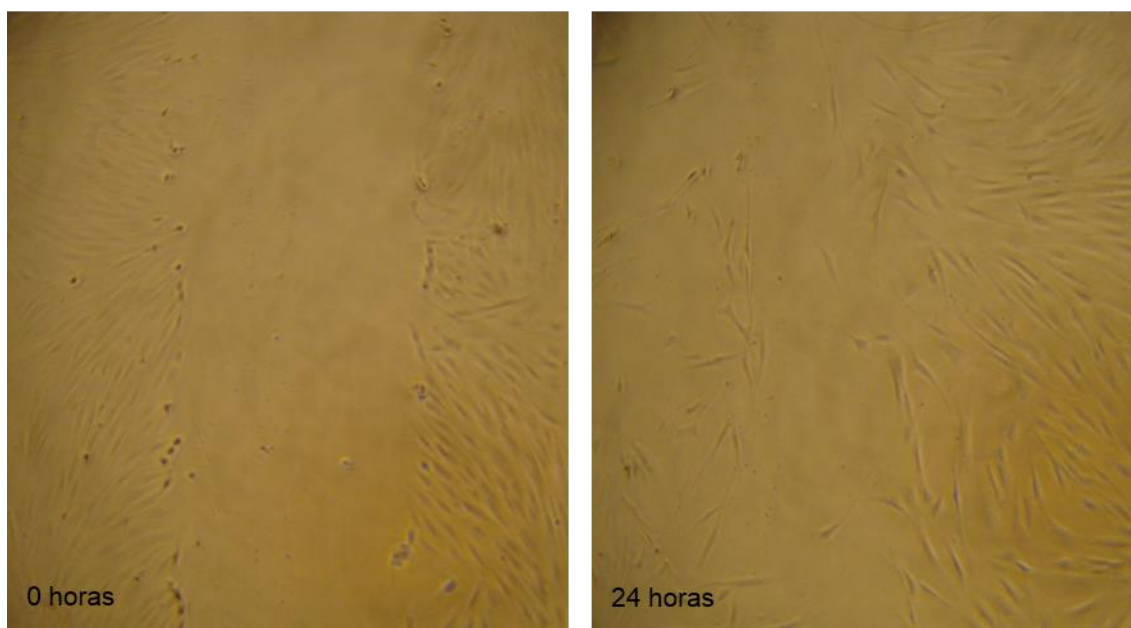


Figura 7.18 – Representação ilustrativa dos riscados das células de fibroblastos, comparando os tempos 0 e 24 horas após efetuado o riscado, e contendo apenas as células – controlo. Riscado às 0 horas apresenta um tamanho de  $63,42 \pm 3,56 \mu\text{m}$ , e o riscado às 24 horas apresenta uma redução para  $41,34 \pm 15,1 \mu\text{m}$ . As imagens foram processadas, e os tamanhos obtidos através do programa ImageJ.

### CORM-3 (Fibroblastos)

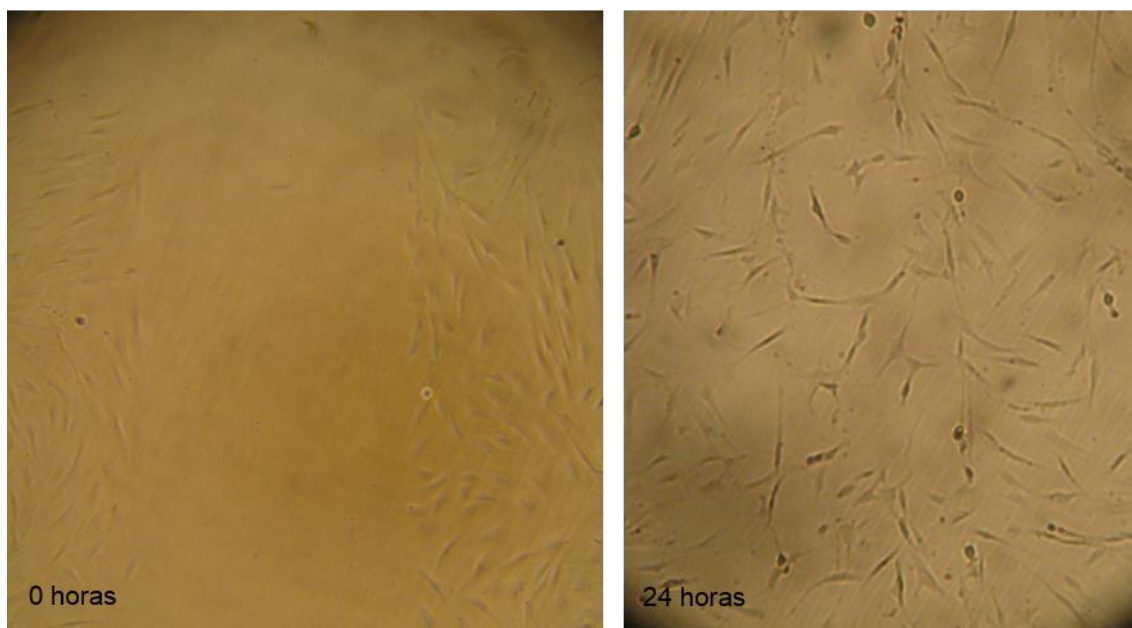


Figura 7.19 – Representação ilustrativa dos riscados das células de fibroblastos, comparando os tempos 0 e 24 horas após efetuado o riscado e administrado o CORM-3 (a  $3 \mu\text{M}$ ). Riscado às 0 horas apresenta um tamanho de  $68,9 \pm 11,1 \mu\text{m}$ , e o riscado às 24 horas apresenta uma redução para  $27,53 \pm 12,4 \mu\text{m}$ . As imagens foram processadas, e os tamanhos obtidos através do programa ImageJ.

### BSA (Fibroblastos)

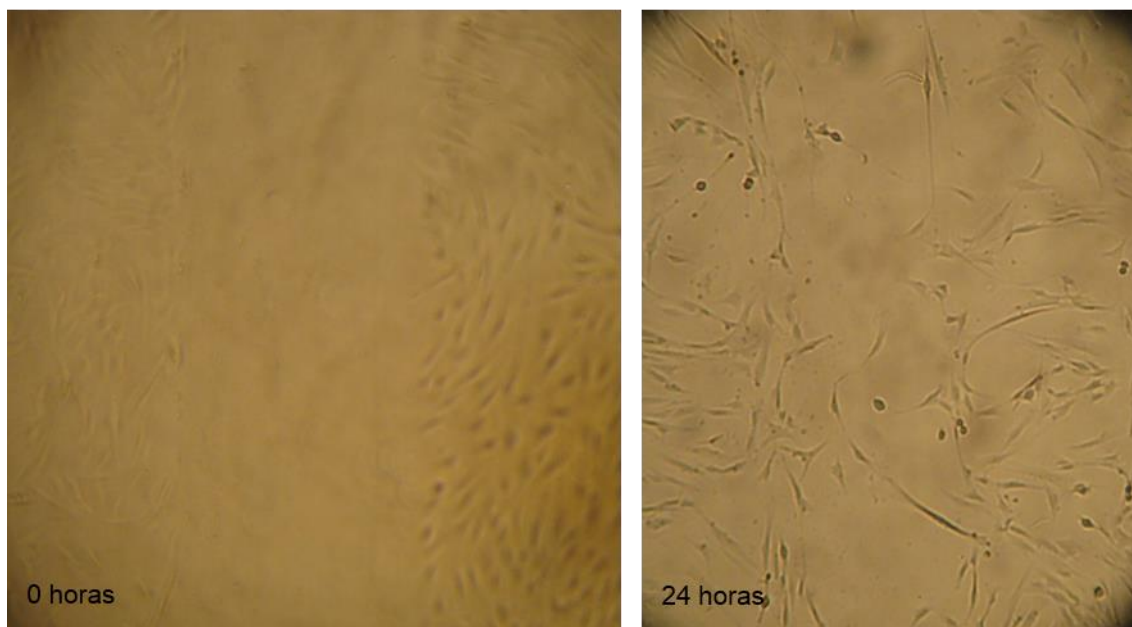


Figura 7.20 – Representação ilustrativa dos riscados das células de fibroblastos, comparando os tempos 0 e 24 horas após efetuado o riscado e administrado a proteína BSA (a  $0,6 \mu\text{M}$ ) – controle da BSA. Riscado às 0 horas apresenta um tamanho de  $62,1 \pm 8,8 \mu\text{m}$ , e o riscado às 24 horas apresenta uma redução para  $37,08 \pm 11,9 \mu\text{m}$ . As imagens foram processadas, e os tamanhos obtidos através do programa ImageJ.

### HEWL (Fibroblastos)

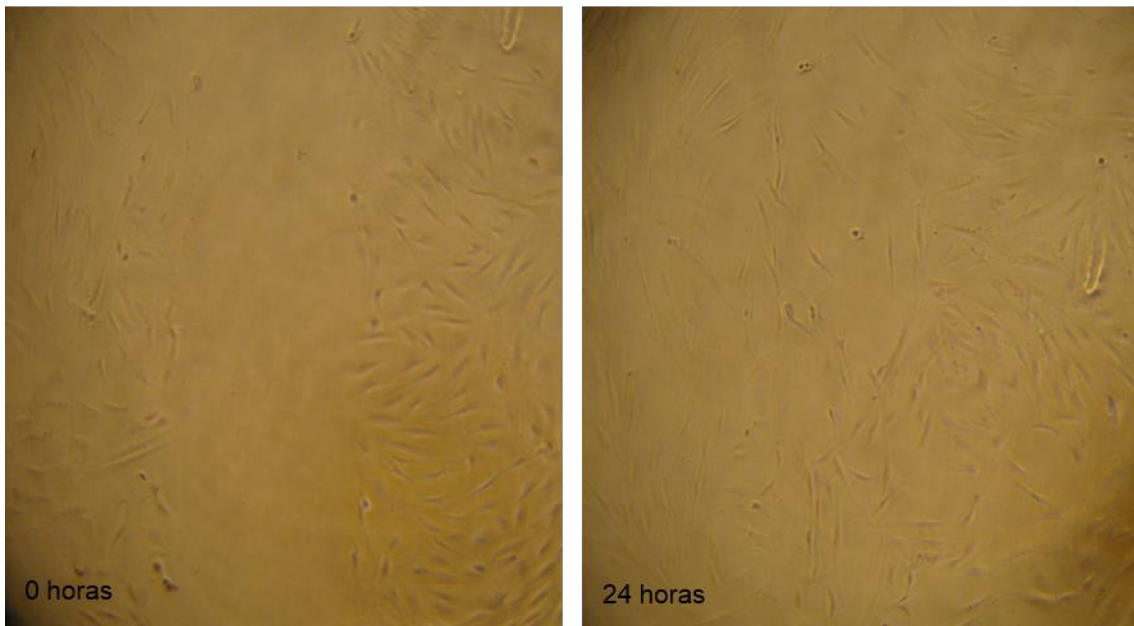


Figura 7.21 – Representação ilustrativa dos riscados das células de fibroblastos, comparando os tempos 0 e 24 horas após efetuado o riscado e administrado a proteína HEWL (a  $0,6 \mu\text{M}$ ) – controlo da HEWL. Riscado às 0 horas apresenta um tamanho de  $54,5 \pm 16,02 \mu\text{m}$ , e o riscado às 24 horas apresenta uma redução para  $25,6 \pm 6,7 \mu\text{m}$ . As imagens foram processadas, e os tamanhos obtidos através do programa ImageJ.

### CORM-3-BSA (Fibroblastos)

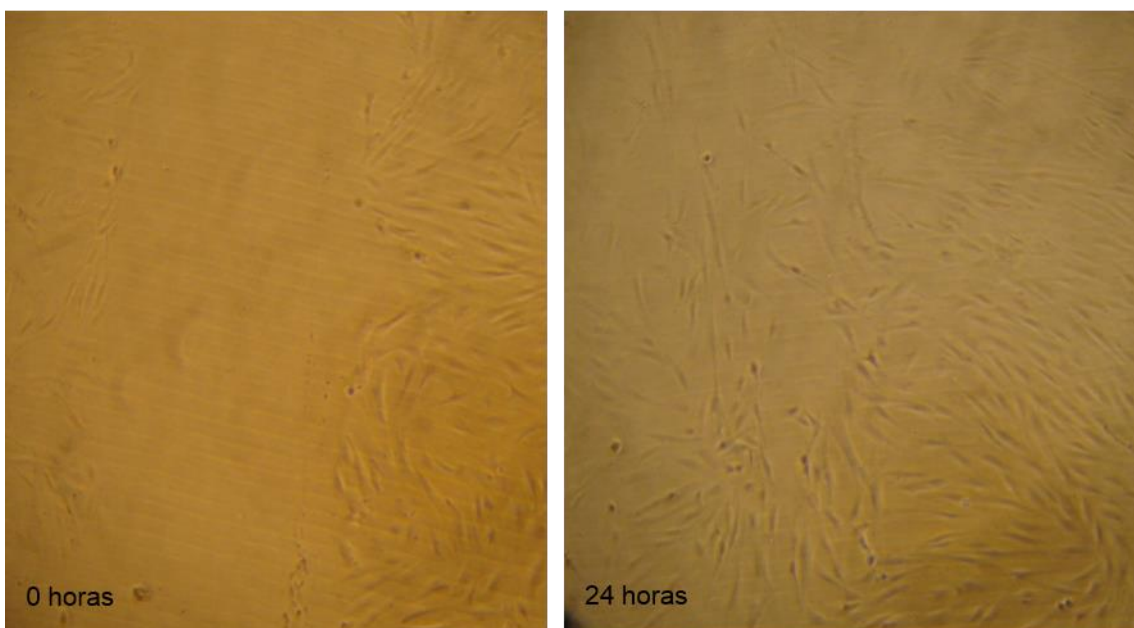


Figura 7.22 – Representação ilustrativa dos riscados das células de fibroblastos, comparando os tempos 0 e 24 horas após efetuado o riscado e administrado o CORM-3 (a  $3 \mu\text{M}$ ) conjugado com BSA (a  $0,6 \mu\text{M}$ ). Riscado às 0 horas apresenta um tamanho de  $66,2 \pm 17,17 \mu\text{m}$ , e o riscado às 24 horas apresenta uma redução para  $25,6 \pm 9,5 \mu\text{m}$ . As imagens foram processadas, e os tamanhos obtidos através do programa ImageJ.

CORM-3-HEWL (Fibroblastos)

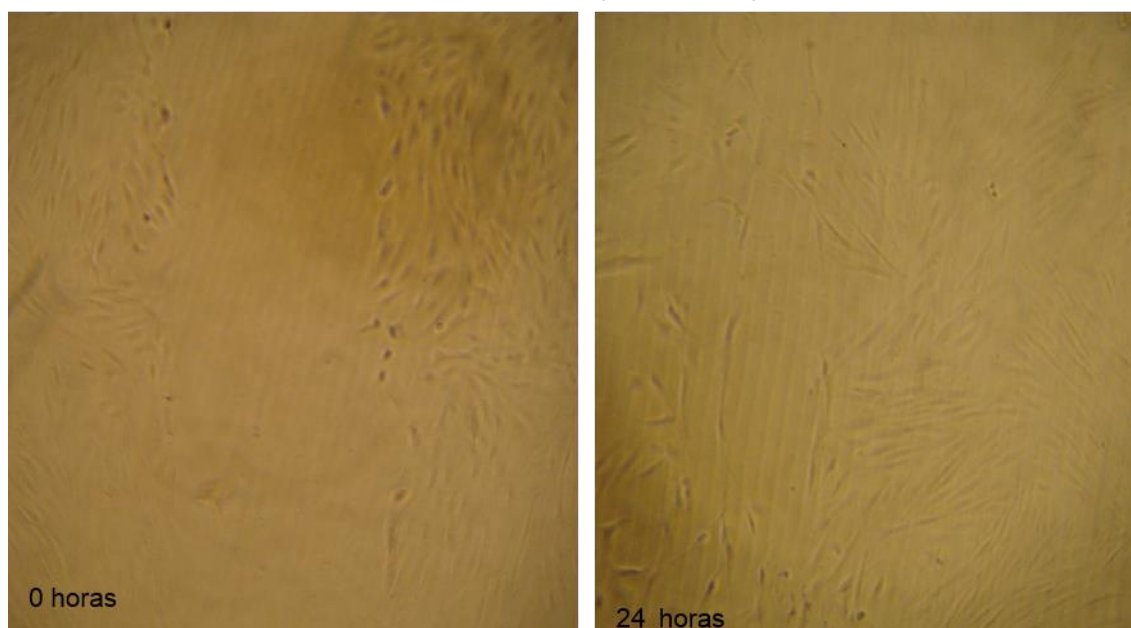


Figura 7.23 – Representação ilustrativa dos riscados das células de fibroblastos, comparando os tempos 0 e 24 horas após efetuado o riscado e administrado o CORM-3 (a 3  $\mu\text{M}$ ) + HEWL (a 0,6  $\mu\text{M}$ ). Riscado às 0 horas apresenta um tamanho de  $54,33 \pm 2,91 \mu\text{m}$ , e o riscado às 24 horas apresenta uma redução para  $31,03 \pm 7,4 \mu\text{m}$ . As imagens foram processadas, e os tamanhos obtidos através do programa ImageJ.

## Anexo 5

Foram inicialmente usadas as condições de amplificação discriminadas na Tabela 7.3, seguindo as instruções do fabricante da enzima 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (secção 3.2.5.4 dos Materiais e Métodos).

Tabela 7.3 – Condições iniciais de amplificação para realização de RT-qPCR utilizando os *primers* IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10.

	Condições de amplificação
<b>RT-qPCR em tempo real</b>	95°C, 15 minutos 30 ciclos: 95°C, 20 segundos 60°C, 20 segundos 72°C, 20 segundos

Pela análise da Figura 7.24, que confirma os resultados obtidos por RT-qPCR em tempo real (Figura 7.25), é possível verificar que apenas a sequência de IL-10 para cDNA de MDA-MB-453 amplificou, apresentando uma banda com aproximadamente 100 pb, correspondendo ao tamanho esperado da sequência de IL-10 (106 pb). Contudo, a amplificação é tardia, e pela análise dos dados, conclui-se que a temperatura de *annealing* utilizada não favorece o emparelhamento dos *primers* em todas as sequências de interesse.



Figura 7.24 – Representação ilustrativa da eletroforese em gel de agarose (2%) das amostras amplificadas por RT-qPCR em tempo real, com os *primers* IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10. As amostras nos poços correspondem a: 1) Marcador 1 de pesos moleculares HyperLadder 100 pb; 2) IL-6 cDNA-MDA-MB-453; 3) IL-10 cDNA-MDA-MB-453; 4) TNF- $\alpha$  cDNA-MDA-MB-453; 5) IL-6 cDNA-NINA controlo não riscado; 6) IL-10 cDNA-NINA controlo não riscado; 7) TNF- $\alpha$  cDNA-NINA controlo não riscado; 8) IL-6 controlo negativo; 9) IL-10 controlo negativo; 10) TNF- $\alpha$  controlo negativo. A eletroforese decorreu durante 60 minutos, a uma voltagem constante de 90 V, e visualizado no GelDoc.



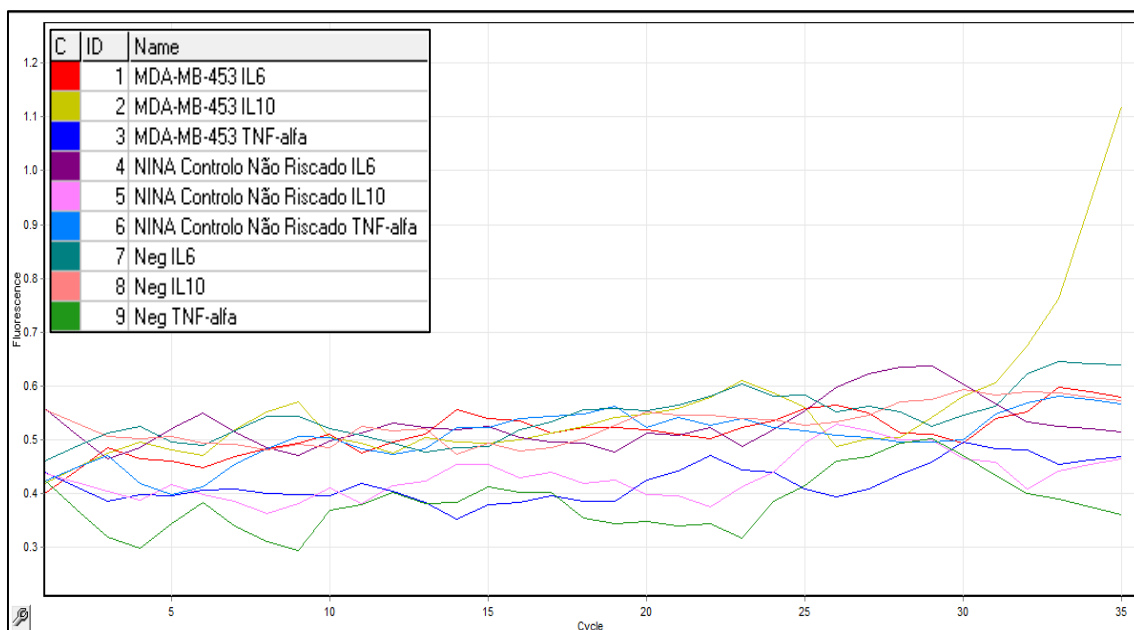


Figura 7.25 – Representação ilustrativa dos perfis de amplificação das várias amostras por RT-qPCR em tempo real, utilizando os *primers* IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10. A técnica de RT-qPCR foi realizada no Rotor Gene 6000.

Como tal realizou-se um novo ensaio, onde se acrescentaram 10 ciclos de reação com uma temperatura de *annealing* de 50°C, e diminuiu-se a temperatura de *annealing* nos 30 ciclos, de modo a favorecer o empalhamento dos *primers* nas sequências de interesse (Tabela 4.11), tendo-se otimizado assim as condições de amplificação de IL-10. A Figura 7.26 ilustra o perfil de amplificação obtido por RT-qPCR em tempo real.

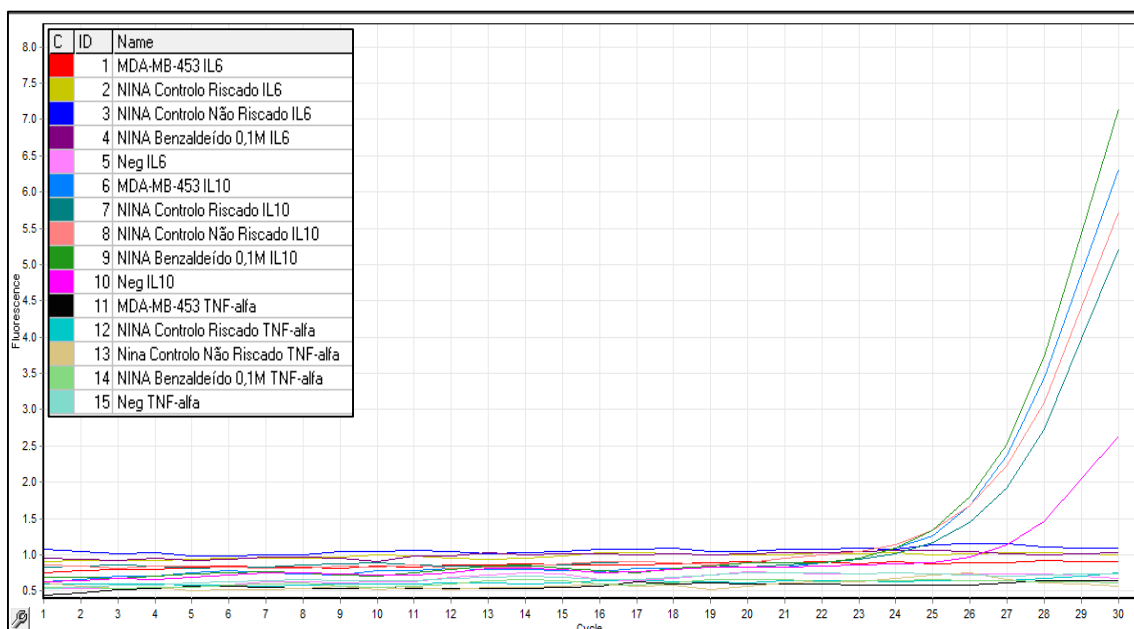


Figura 7.26 – Representação ilustrativa dos perfis de amplificação das várias amostras por RT-qPCR em tempo real, utilizando os *primers* TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10. A técnica de RT-qPCR foi realizada no Rotor Gene 6000.

Uma nova reação de RT-qPCR em tempo real foi levada a cabo, utilizando as mesmas amostras que o a reação anterior, mas desta vez apenas recorrendo aos *primers* TNF- $\alpha$  e IL-6, onde se procedeu à tentativa de otimização das condições de amplificação dos mesmos, diminuindo-se de novo a temperatura de *annealing* (Tabela 7.4).

Tabela 7.4 – Condições de amplificação para realização de RT-qPCR em tempo real utilizando os *primers* IL-6 e TNF- $\alpha$ .

	Condições de amplificação
RT-qPCR em tempo real	95°C, 15 minutos
	10 ciclos: 93°C, 20 segundos
	50°C, 20 segundos
	72°C, 20 segundos
	30 ciclos: 95°C, 20 segundos
	50°C, 20 segundos
72°C, 20 segundos	

É possível visualizar através do gel de agarose obtido por eletroforese (Figura 7.27) que houve amplificação da sequência de TNF- $\alpha$  para a amostra de cDNA de MDA-MB-453, apresentando uma banda com aproximadamente 250 pb, não correspondendo ao tamanho real do *primer* (143 pb), revelando a existência de ligações inespecíficas dos *primers* a outras sequências no cDNA. Os perfis de amplificação resultantes da técnica de RT-qPCR encontram-se ilustrados na Figura 7.28.



Figura 7.27 – Representação ilustrativa da eletroforese em gel de agarose (2%) das amostras amplificadas por RT-qPCR em tempo real, com os *primers* IL-6 e TNF- $\alpha$ . As amostras nos poços correspondem a: 1) Marcador 1 de pesos moleculares GeneRuler 50 pb; 2) IL-6 cDNA-MDA-MB-453; 3) IL-6 cDNA-NINA controlado riscado; 4) IL-6 cDNA-NINA controlado não riscado; 5) IL-6 cDNA-NINA com benzaldeído (a 0,1M); 6) TNF- $\alpha$  cDNA-MDA-MB-453; 7) IL-6 controlado negativo; 8) TNF- $\alpha$  cDNA-NINA controlado riscado; 9) TNF- $\alpha$  cDNA-NINA controlado não riscado; 10) TNF- $\alpha$  cDNA-NINA com benzaldeído (a 0,1 M); 11) TNF- $\alpha$  controlado negativo; 12) Marcador 2 de pesos moleculares GeneRuler 50 pb. A eletroforese decorreu durante 60 minutos, a uma voltagem constante de 90 V, e visualizado no GelDoc.

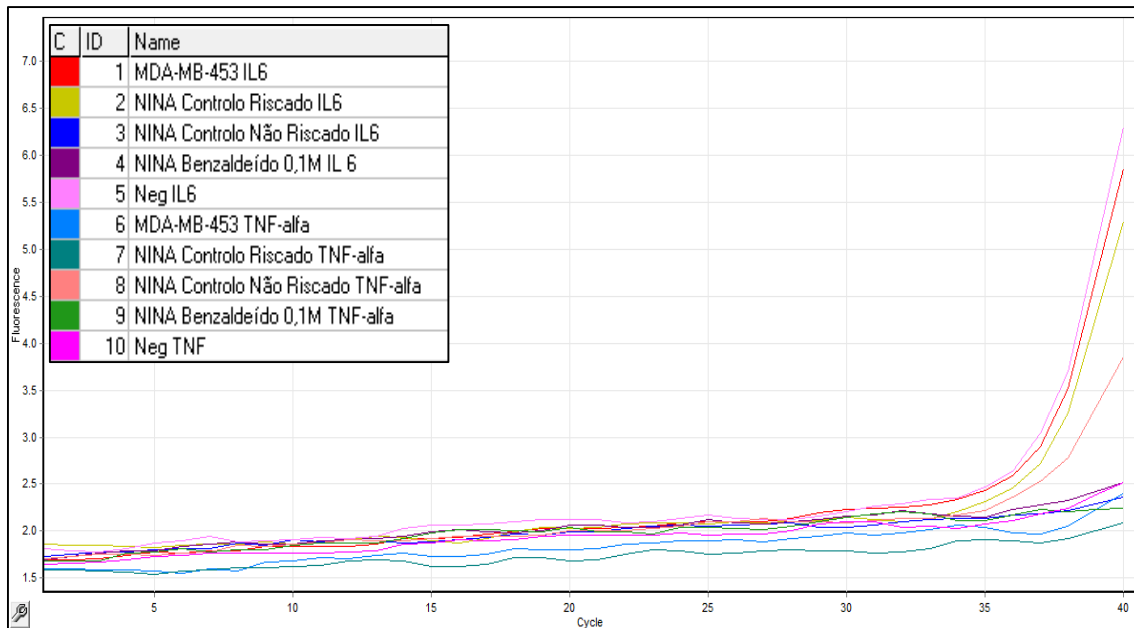


Figura 7.28 – Representação ilustrativa dos perfis de amplificação das várias amostras por RT-qPCR em tempo real, utilizando os *primers* IL-6 e TNF- $\alpha$ . A técnica de RT-qPCR foi realizada no Rotor Gene 6000.

Por outro lado, ocorreu também amplificação dos controlos negativos de IL-6 e TNF- $\alpha$ , onde se poder verificar a existência de uma banda para o primeiro e duas bandas para o segundo, resultado que deriva da contaminação dos reagentes. Tal revela, não só a necessidade de otimizar as condições de amplificação das sequências IL-6 e TNF- $\alpha$ , como também a necessidade de eliminar o fator de contaminação dos reagentes, de modo a se poderem prosseguir com os ensaios e estudos dos níveis de expressão dos mesmos.

Por fim, foi realizado um último ensaio para o *house keeping gene* 18S, visando calcular os níveis de expressão relativos de IL-10, onde foram utilizadas todas as amostras de cDNA sintetizadas para as células NINA.

O cálculo dos níveis de expressão pode ser feito através do Método  $\Delta\Delta CT$  (Pfaffl 2004) (Equação 9):

$$R\acute{a}c\acute{i}o = 2^{-[\Delta CT \text{ da amostra} - \Delta CT \text{ do controlo}]} \leftrightarrow R\acute{a}c\acute{i}o = 2^{-[\Delta\Delta CT]} \quad (Eq. 9), \text{ onde:}$$

$$\Delta CT = Gene \text{ de interesse} - House \text{ keeping gene} \quad (Eq. 10)$$

Os resultados da eletroforese em gel de agarose encontram-se ilustrados na Figura 7.29, e os perfis de amplificação obtidos por RT-qPCR em tempo real na Figura 7.30.

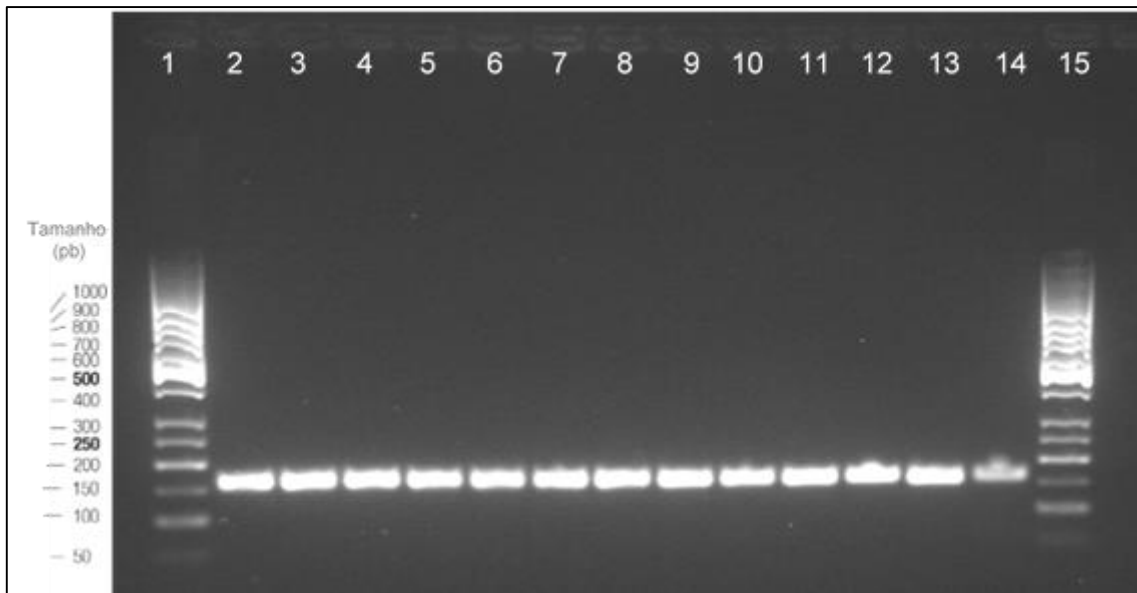


Figura 7.29 – Representação ilustrativa da eletroforese em gel de agarose (2%), das amostras amplificadas por RT-qPCR em tempo real, com o *primer* 18s. As amostras nos poços correspondem a: 1) Marcador 1 de pesos moleculares GeneRuler 50 pb; 2) 18s cDNA-NINA controlo riscado; 3) 18s cDNA-NINA com CORM-3 (a 3  $\mu$ M); 4) 18s cDNA-NINA com CORM-3-BSA (a 3  $\mu$ M); 5) 18s cDNA-NINA com CORM-3-HEWL (a 3  $\mu$ M); 6) 18s cDNA-NINA com BSA (a 0,6  $\mu$ M); 7) 18s cDNA-NINA com HEWL (a 0,6  $\mu$ M); 8) 18s cDNA-NINA controlo não riscado; 9) 18s cDNA-NINA controlo não riscado (duplicado); 10) 18s cDNA-NINA com benzaldeído (a 0,1 M); 11) 18s cDNA-NINA com lipofectamina (50  $\mu$ L); 12) 18s cDNA-NINA com AuNPs@PEG-30% (a 6 nM); 13) 18s cDNA-NINA com AuNPs@PEG-100% (a 6 nM); 14) 18s controlo negativo; 15) Marcador 2 de pesos moleculares GeneRuler 50 pb. A eletroforese decorreu durante 60 minutos, a uma voltagem constante de 90 V, e visualizado no GelDoc.

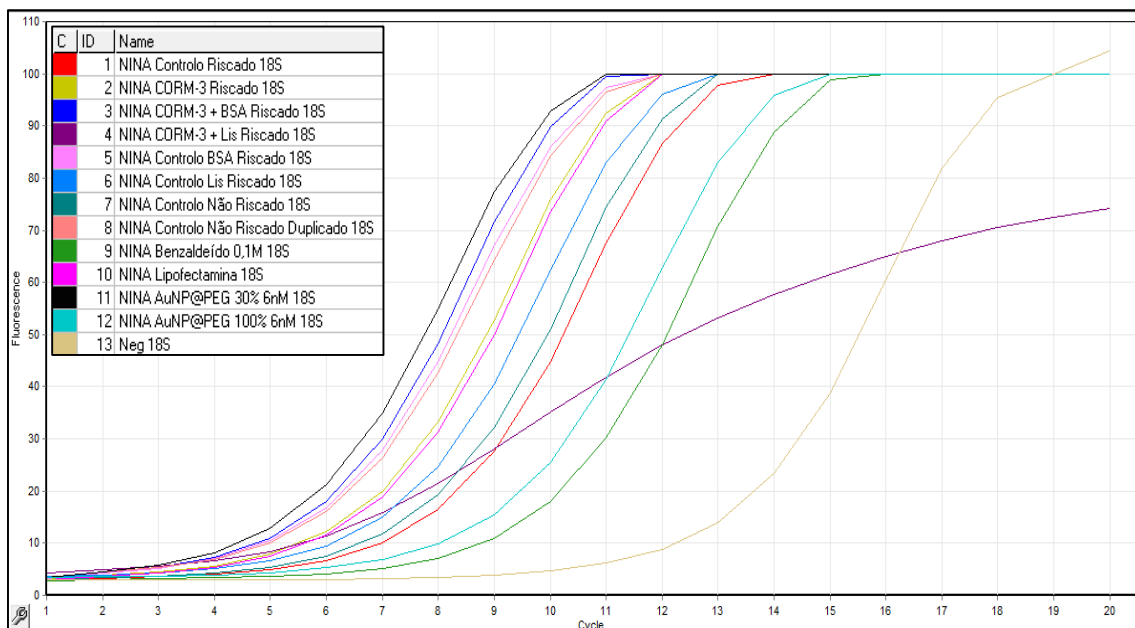


Figura 7.30 – Representação ilustrativa dos perfis de amplificação das várias amostras por RT-qPCR em tempo real, utilizando o *primer* 18S. A técnica de RT-qPCR foi realizada no Rotor Gene 6000.

Pela análise dos resultados, é possível verificar que, não só houve amplificação para todas as amostras de cDNA usadas no ensaio (tendo as bandas o tamanho esperado, correspondente ao tamanho do

*primer*, 151 pb), como também, novamente, ocorreu amplificação do controlo negativo de 18S – mais uma vez se conclui a existência de contaminações, inviabilizando assim a análise correta dos níveis de expressão.