

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



# Complexos de Ruténio como potenciais agentes terapêuticos: estudos dos mecanismos de captação celular e modulação de enzimas metabólicos

**Leonor de Sá Nogueira Côrte-Real**

Dissertação de Mestrado em Química Inorgânica

Biomédica: Aplicações em Diagnóstico e Terapia

**VERSÃO PÚBLICA**

Lisboa

2012



UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



# Complexos de Ruténio como potenciais agentes terapêuticos: estudos dos mecanismos de captação celular e modulação de enzimas metabólicos

Tese de Mestrado orientada por:

Doutora Fernanda Marujo Marques (orientadora)

Prof<sup>a</sup> Doutora Maria Helena Garcia (co-orientadora)

**Leonor de Sá Nogueira Côrte-Real**

Dissertação de Mestrado em Química Inorgânica

Biomédica: Aplicações em Diagnóstico e Terapia

Lisboa

2012



Esta tese foi realizada no âmbito do 2º Ciclo em Química Inorgânica Biomédica – Aplicações em Diagnóstico e Terapia da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Parte do trabalho experimental apresentado nesta tese foi realizado no Campos Tecnológico e Nuclear do IST, polo de Loures, sob a orientação da Dra. Fernanda Marques.

O restante trabalho foi realizado no Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de Lisboa, sob a orientação da Dra. Fernanda Marques e Prof. Dr. Manuel Pires Bicho.

À memória do meu querido pai...

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora Doutora Fernanda Marques pelo apoio, confiança e amizade que demonstrou durante todo este tempo e sem os quais não teria sido possível a realização desta tese.

Agradeço igualmente à minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Doutora Helena Garcia pelo apoio prestado não só no decorrer do meu trabalho mas também como coordenadora do Mestrado.

Da mesma forma, agradeço à Prof<sup>a</sup> Doutora Isabel Santos pelos conselhos e apoio prestado nos momentos importantes.

Aos colegas do Centro de Ciências Moleculares e Materiais da FCUL, em especial à Tânia pela síntese dos “seus meninos” e que sem eles esta tese não seria possível.

Ao Prof. Doutor Manuel Pires Bicho pelos sábios conselhos e pela orientação prestada nos momentos de decisão mais delicados. Agradeço também à Irina, Fernanda e D. Manuela pela amizade e simpatia. Estou grata por vos ter conhecido.

À Joana Coimbra do Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro que tão bem me deu a conhecer os encantos dessa cidade.

Aos meus colegas e amigos e em especial ao Denis pela sua amizade e compreensão.

A toda a minha família que directa ou indirectamente me encorajaram nos momentos mais difíceis e decisivos da minha vida.

Por fim aos meus grandes amigos de toda a vida, aos meus pais que sempre me apoiaram em todos os momentos importantes, que me ouviram e encaminharam, que reconhecem as minhas qualidades e defeitos e que sei me amam incondicionalmente. Para vós e em especial para ti, meu querido pai, dedico esta tese, para que nunca te esqueças do que prometi. Todo o esforço que dedico em tudo o que faço na vida é fundamentalmente para te orgulhar, onde quer que estejas...

...Um agradecimento sincero a todos!

## RESUMO

Os complexos de metais de transição têm demonstrado serem bons candidatos como agentes antitumorais. Para que o seu efeito terapêutico seja eficaz, os complexos devem ser capturados pela célula e interagir com alvos intracelulares. A exploração dos mecanismos de transporte celular é de extrema importância na avaliação do seu potencial terapêutico.

Uma das características das células tumorais é apresentarem disfunção metabólica, *i.e.*, elevada actividade glicolítica conhecida como efeito de Warburg. A interacção de compostos metálicos antitumorais com proteínas/enzimas celulares tem constituído actualmente uma área de investigação de grande interesse, como uma tentativa de identificação de outros alvos celulares para além do ADN.

Resultados recentes obtidos pela equipa FCUL-CTN/IST revelaram que alguns compostos de Ru (II) são citotóxicos em algumas linhas celulares tumorais humanas. Pretendeu-se então estudar os mecanismos de captação de compostos de Ru (II), como potenciais agentes antitumorais usando moduladores do transporte celular e estudaram-se as interacções desses compostos com alvos celulares relacionados com o metabolismo (enzimas glicolíticos, enzimas redox da membrana celular, sistemas de transporte de membrana).

## ABSTRACT

The transition metal complexes have shown to be good candidates as antitumor agents. For their therapeutic effect to be efficient, the complexes must enter the cell and interact with intracellular targets. The exploitation of the mechanisms of cellular transport is extremely important in evaluating the therapeutic potential.

One of the characteristics of tumor cells is exhibiting metabolic dysfunction, *i.e.*, high glycolytic activity known as Warburg effect. The interaction of antitumor metal compounds with cellular proteins/enzymes has constituted an area of research currently of great interest as an attempt to identify other cellular targets besides DNA.

Recent results obtained by the team FCUL-CTN/IST revealed that some compounds of Ru (II) are cytotoxic for some human tumor cell lines.

It was intended to study the mechanisms of uptake of Ru (II) compounds, as potential antitumor agents using modulators of cellular transport and the interactions of the compounds with cellular targets related to metabolism (glycolic enzymes, redox enzymes of cellular membrane, transport membrane systems) were also studied.

## **PALAVRAS-CHAVE**

- Complexos de Ruténio (II) com ligandos ciclopentadienilo
- Mecanismos de captação celular
- Efeito de Warburg
- Enzimas metabólicos
- Glicólise Aeróbia

## **KEYWORDS**

- Ruthenium (II) complexes with Cyclopentadienyl ligands
- Mechanisms of cellular uptake
- Warburg effect
- Metabolic enzymes
- Aerobic glycolysis

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	ii
RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	iv
PALAVRAS-CHAVE .....	v
ÍNDICE GERAL .....	vi
ÍNDICE DE COMPLEXOS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xviii
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....	xx
<b>Capítulo I.....</b>	<b>xxv</b>
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1. Incidência na População Mundial e Europeia.....	1
2. Terapias .....	2
2.1. Cirurgia.....	2
2.2. Radioterapia .....	2
2.3. Imunoterapia.....	3
2.4. Terapêutica hormonal.....	4
2.5. Quimioterapia.....	5
3. Complexos metálicos na terapêutica do cancro .....	5
3.1. Complexos de platina.....	5
3.2. Complexos de Ruténio .....	8
3.3. Complexos de Ru com ligandos areno .....	10
3.4. Complexos de RuCp .....	10

MATERIAIS E MÉTODOS .....	11
1. Ensaio de viabilidade celular .....	11
2. Moduladores da captação celular e dependência da temperatura .....	12
3. ICP-MS .....	13
4. Espectroscopia de fluorescência .....	15
5. Viabilidade Celular na presença da HSA .....	19
6. Viabilidade Celular na presença da transferrina .....	19
7. Ciclo celular .....	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
1. Ensaio de viabilidade celular .....	23
2. Moduladores da captação celular e dependência da temperatura .....	26
3. ICP-MS .....	30
4. Espectroscopia de fluorescência .....	33
5. Viabilidade Celular na presença da HSA .....	34
6. Viabilidade Celular na presença da transferrina .....	39
7. Ciclo celular .....	42
CONCLUSÕES – CAP.I.....	44
<b>Capítulo II .....</b>	<b>46</b>
INTRODUÇÃO GERAL.....	47
1. Glicólise e Efeito de Warburg.....	47
1.1. Utilidade do efeito de Warburg na clínica: FDG-PET em pacientes com cancro.....	50
2. Inibição da via glicolítica.....	51
2.1. 3-Bromopiruvato .....	51
2.2. 2-Deoxiglucose .....	54
2.3. Dicloroacetato .....	54
3. Lactato desidrogenase.....	55

4. Fosfatase ácida.....	56
5. Componentes t-PMET e RTM.....	59
MATERIAL E MÉTODOS.....	63
1. Ensaio de determinação dos níveis de lactato.....	63
2. Inibição da via glicolítica.....	64
3. Determinação da actividade da fosfatase ácida .....	64
4. Determinação da actividade da redutase transmembranar.....	65
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
1. Ensaio de determinação dos níveis de lactato.....	66
2. Inibição da via glicolítica.....	68
3. Determinação da actividade da fosfatase ácida .....	71
4. Determinação da cinética e actividade da RTM.....	75
CONCLUSÕES – CAP. II.....	77
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
ANEXO A – Reagentes e Material suplementar.....	88
ANEXO B - Dados suplementares.....	89