



Diogo André Sequeira

Licenciado em Bioquímica

Avaliação de compostos de Cu(I) como novos agentes quimioterapêuticos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre no
Mestrado em Bioquímica

Orientador: Professora Doutora Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos
Fernandes, Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Doutora Tânia Morais, Centro de Química Estrutural
da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Setembro de 2019



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

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

Licenciado em Bioquímica

Diogo André Sequeira

**Avaliação de compostos de Cu(I) como novos agentes
quimioterapêuticos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre no
Mestrado em Bioquímica, pela Universidade Nova de
Lisboa, Faculdade de Ciência e Tecnologia

Orientador: Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos Fernandes, Professora Auxiliar,
(FCT/UNL)

Co-orientador: Dr^a Tânia Morais, Investigadora, (CQE/FCUL)

Setembro de 2019

Avaliação de compostos de Cu(I) como novos agentes quimioterapêuticos

Copyright ©

Diogo André Sequeira

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Universidade Nova de Lisboa

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

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, a professora Doutora Alexandra Fernandes, a possibilidade que me deu de trabalhar no seu laboratório. Sinto que cresci imenso ao longo deste ano sob a sua orientação. Obrigado por toda a ajuda prestada e a confiança demonstrada nas minhas capacidades. Sem dúvida, que juntamente com a liberdade e exigência que me foram dadas, se revelaram essenciais para o sucesso deste trabalho.

De seguida agradecer também à minha co-orientadora, a Dr^a Tânia Morais, responsável pela síntese dos compostos, sem os quais este trabalho não seria possível. Mesmo à distância esteve sempre disponível para me ajudar, seja pela prontidão em enviar novas alíquotas de composto ou pelo esclarecimento de dúvidas acerca dos compostos.

Queria também agradecer à Dr^a Catarina Roma Rodrigues e ao Dr^o Luís Raposo todo o auxílio que me deram na realização dos ensaios e os conhecimentos que me transmitiram ao longo deste ano. Foram uma ajuda preciosa.

Uma palavra especial para as minhas colegas de laboratório do 319, a Inês e a Filipa. Foi um ano complicado e exigente, e sem vocês, certamente que teria sido mais difícil. Juntos, com boa disposição e com o apoio constante de parte a parte, foi bem mais fácil!

Uma palavra não menos especial para a Daniela. Mostraste-te sempre disposta a ficar até tarde e más horas para que eu pudesse terminar os meus ensaios. Muito obrigado por isso, e pelo maravilhoso patê!

Agradecer aos “meus” dois alunos do projeto de licenciatura, o Miguel e o Rúben. Ao Miguel por ter tornado as horas passadas na câmara menos aborrecidas, e ao Rúben pelos constantes momentos de boa disposição. Aprendi e diverti-me imenso com cada um de vocês.

A todo o pessoal dos laboratórios 319 e 315, do grupo *Human Genetics and Cancer Therapeutics e Nanomedicine*, um muito obrigado pela forma como me receberam.

A nível pessoal, agradecer aos meus amigos todo o apoio que me dão, por me ajudarem a ser todos os dias melhor pessoa e por todos os momentos passados ao longo destes anos. Para cada um de vocês terei sempre um lugar especial no meu coração. Não vou especificar nomes, pois vocês sabem quem são.

Por último, mas o maior e mais especial agradecimento de todos, à minha família. Aos meus irmãos, Tiago e João, chatos a maior parte das vezes, mas fundamentais. E aos meus pais, por tudo o que se esforçaram ao longo destes 5 anos que agora terminam para que eu pudesse ter condições de estudar, e por serem os primeiros a estar lá sempre que preciso. Lutei por mim, por vocês e para vocês. Tenho muito orgulho em cada um de nós. Conseguimos!

Resumo

As doenças oncológicas assumem-se como um dos problemas mais graves a nível mundial, representando a segunda maior causa de morte. É esperado que o número de novos casos continue a aumentar devido ao aumento e envelhecimento populacional, pelo que é imprescindível entender melhor os mecanismos subjacentes ao cancro e investir no desenvolvimento de novas terapias, nomeadamente pela procura de novos fármacos que possam substituir os utilizados na quimioterapia atual. Os fármacos utilizados atualmente neste tipo de terapia apresentam alguns problemas como a resistência adquirida pelas células tumorais a estes compostos, e a baixa especificidade para o local do tumor, que resulta em efeitos secundários indesejáveis.

Neste trabalho foi estudado o potencial anticancerígeno de novos compostos metálicos de Cu(I) em células tumorais HCT116 (cancro colorretal) através de ensaios de citotoxicidade, bem como os mecanismos de ação subjacentes a estes compostos pela realização de diversos ensaios biológicos.

Ficou demonstrado que estes compostos apresentam uma citotoxicidade elevada para células tumorais HCT116, principalmente o composto JL10, não demonstrando toxicidade em células saudáveis, o que pode permitir reduzir os efeitos secundários durante o tratamento. Os valores de IC₅₀ calculados são bastante promissores, sendo menores que os valores dos compostos utilizados atualmente na quimioterapia.

Os compostos mostraram a capacidade de despoletar a via intrínseca da apoptose e autofagia, bem como de internalização em células HCT116. O composto JL10 foi também capaz de induzir a produção de ROS em células HCT116, que podem ser responsáveis pela ativação da via intrínseca da apoptose, e demonstrou uma ação citostática ao bloquear o ciclo celular na fase G1. Para além disso, também mostrou capacidade de clivar o pDNA através de mecanismos oxidativos. Pela análise proteómica observou-se a interferência com diversas vias celulares, afetando o *folding* e síntese de proteínas, e diminuindo a atividade metabólica das células.

Palavras-chave: cancro, quimioterapia, células HCT116, complexos de Cu(I), citotoxicidade, potencial antiproliferativo

Abstract

Oncologic diseases are one of the worst health issues worldwide, representing the second cause of death. It is expected that the number of cases keep increasing due to the populational increase and aging. This makes necessary to better understand the mechanisms leading to these diseases and develop new therapies that replace the drugs used nowadays in chemotherapy. The drugs used nowadays face some challenges like the acquired resistance of the tumoral cells and their low specificity to the tumour leading to unwanted side effects.

In this work it was studied the anticarcinogenic potential of the metal compounds of Cu(I) in tumour cells of the cell line HTC116 (colorectal cancer), through assays of cytotoxicity, as well as the mechanisms of action of the compounds through several biological assays.

It was demonstrated that these compounds present a high toxicity towards the tumour cells HTC116. Interestingly, the compound JL10 does not show a high toxicity towards healthy cells, which might reduce the side effects during treatment. The calculated IC₅₀ values are quite promising, as they are lower than the ones of the drugs used nowadays in chemotherapy.

The compounds show the ability to induce cell death through apoptosis for the intrinsic pathway and autophagy, as well as internalization in HCT116 cells. The compound JL10 was also able to induce the production of ROS in the cells HTC116, which might be responsible for the activation of the intrinsic pathway of apoptosis, showing also a potential cytostatic, as it blocks the cell cycle in the G1 phase. Besides it also shows the ability to cleave pDNA through oxidative mechanisms. Proteomic analysis showed interference with several cellular pathways, affecting the protein folding and synthesis, diminishing the metabolic activity of the cells.

Key words: cancer, chemotherapy, HCT166 cells, Cu(I) complexes, cytotoxicity, antiproliferative potential

Índice

Agradecimentos.....	VII
Resumo.....	IX
Abstract.....	XI
Índice de figuras.....	XVII
Índice de tabelas.....	XIX
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	XXI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Cancro - Taxa de incidência, mortalidade e fatores de risco.....	3
1.1.1 Cancro colorretal – Incidência, mortalidade e fatores de risco.....	6
1.2 Carcinogénese.....	7
1.2.1 Etapas que levam à formação de um cancro.....	7
1.2.2 Oncogenes e genes supressores de tumor.....	11
1.2.3 Carcinogénese do cancro colorretal.....	13
1.2.3.1 Desenvolvimento do tumor.....	13
1.2.3.2 Biomarcadores do cancro colorretal.....	15
1.3 Regulação do ciclo celular.....	17
1.3.1 Progressão do ciclo celular.....	18
1.3.2 <i>Checkpoints</i> de verificação.....	19
1.4 Mecanismos de morte celular.....	21
1.4.1 Apoptose.....	21
1.4.1.1 Via intrínseca da apoptose.....	22
1.4.1.2 Via extrínseca da apoptose.....	23
1.4.2 Necrose.....	24
1.4.3 Autofagia.....	25
1.5 Tratamento do cancro.....	26
1.5.1 Quimioterapia.....	27
1.5.1.1 Fármacos utilizados na quimioterapia.....	28
1.5.1.2 Problemas decorrentes da quimioterapia atual.....	29
1.5.1.3 Complexos metálicos no tratamento do cancro.....	31
1.5.1.4 Complexos de cobre(I) como potenciais agentes quimioterapêuticos.....	32
2. OBJECTIVOS.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 MATERIAIS.....	41
3.2 MÉTODOS.....	42
3.2.1 Compostos em estudo.....	42
3.2.1.1 Solubilidade e estabilidade dos compostos em diferentes solventes.....	42
3.2.2 Linhas celulares humanas.....	44
3.2.2.1 Características.....	44
3.2.2.2 Manutenção das culturas celulares.....	45
3.2.3 Ensaio de viabilidade celular.....	46
3.2.4 Potencial Apoptótico.....	48

3.2.4.1	Marcação com Hoechst 33258	48
3.2.4.2	Marcação com Anexina V-FITC e IP	49
3.2.4.3	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	50
3.2.4.4	Produção de espécies reativas de oxigénio (ROS)	51
3.2.4.5	Expressão de proteínas anti- e pro-apoptóticas por Western blot	52
3.2.4.5.1	Extração e quantificação das proteínas	52
3.2.4.5.2	Transferência para a membrana PVDF e SDS-PAGE	53
3.2.4.5.3	Incubação com o anticorpo primário e secundário	54
3.2.4.5.4	Exposição do filme	55
3.2.5	Autofagia	55
3.2.6	Progressão do ciclo celular	56
3.2.7	Internalização dos compostos	Erro! Marcador não definido.
3.2.8	Interação dos compostos com o DNA <i>in vitro</i>	58
3.2.8.1	Interação dos compostos pela análise do DNA genómico de células HCT116	59
3.2.8.1.1	Estímulo das células pelo composto	59
3.2.8.1.2	Extração do DNA genómico das células HCT116	59
3.2.8.1.3	Interação dos compostos com o DNA genómico extraído	60
3.2.8.2	Interação dos compostos com o DNA plasmídico	60
3.2.8.2.1	Cultura de <i>Escherichia Coli</i> e extração de DNA plasmídico	60
3.2.8.2.2	Interação dos compostos com o DNA plasmídico extraído	60
3.2.8.3	Determinação do mecanismo de clivagem do DNA pelos compostos	61
3.2.9	Proteómica	62
3.2.9.1	Preparação da amostra, precipitação e purificação das proteínas	62
3.2.9.2	Eletroforese bidimensional (2-DE): Focagem isoeétrica e SDS-PAGE	63
3.2.9.3	Revelação dos géis	65
3.2.10	Estatística	65
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1	Solubilidade e estabilidade dos compostos	69
4.2	Ensaio de viabilidade celular	70
4.3	Avaliação dos mecanismos de morte celular	75
4.3.1	Marcação com Hoechst 33258	75
4.3.2	Marcação com Anexina V-FITC e IP por citometria de fluxo	77
4.3.3	Avaliação da morte celular por autofagia	80
4.3.4	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	83
4.3.5	Efeitos do composto JL10 nos níveis de expressão de BAX e BCL-2	86
4.3.6	Determinação de espécies reativas de oxigénio (ROS)	89
4.4	Regulação do ciclo celular	90
4.5	Internalização dos compostos	Erro! Marcador não definido.
4.6	Estudos de interação dos compostos de Cu(I) com o DNA	92
4.6.1	Interação dos compostos de Cu(I) pela análise do DNA genómico	93
4.6.1.1	Interação dos compostos com o DNA genómico em células crescidas na presença dos compostos	93

4.6.1.2	Interação dos compostos de Cu(I) com o DNA genómico.....	94
4.6.2	Interação dos compostos de Cu(I) com o DNA plasmídico	95
4.6.2.1	Exposição de pUC18 a concentrações crescentes dos compostos de Cu(I).....	96
4.6.2.2	Variação do tempo de exposição de pUC a uma concentração fixa de composto.....	97
4.6.2.3	Determinação dos mecanismos de clivagem do DNA pelos compostos de Cu(I).....	98
4.7	Análise proteómica	100
5.	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	109
6.	BIBLIOGRAFIA	115
7.	ANEXOS	125
7.1	Espetros de estabilidade	125
7.1.1	Anexo A.....	125
7.1.2	Anexo B.....	126
7.1.3	Anexo C.....	127
7.1.4	Anexo D.....	129
7.2	Ensaio de viabilidade celular.....	130
7.3	Mecanismos de morte celular	134
7.3.1	Marcação com Hoechst 33258	134
7.3.2	Avaliação da morte celular por autofagia	135
7.3.3	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	136
7.4	Análise proteómica	137

Índice de figuras

Figura 1.1- Número de casos incidentes e de mortes pelos tipos de cancro representados	4
Figura 1.2- Número de casos incidentes e de mortes a nível mundial no sexo masculino pelos tipos de cancro representados.....	4
Figura 1.3- Número de casos incidentes e de mortes a nível mundial no sexo feminino pelos tipos de cancro representados.....	5
Figura 1.4- Taxa de incidência e mortalidade dos tipos de cancro mais comuns em Portugal.	5
Figura 1.5- <i>Hallmarks</i> emergentes do cancro	9
Figura 1.6- Regulação do ciclo celular	19
Figura 1.7- Apoptose:via intrínseca e extrínseca.....	22
Figura 3.1- Estrutura dos complexos metálicos de cobre(I).....	42
Figura 3.2- Dispositivo de transferência	54
Figura 4.1- Viabilidade celular de células HCT116 após exposição aos compostos. ...	71
Figura 4.2- Viabilidade celular de células HCT116 resistentes à dox após exposição aos compostos.....	72
Figura 4.3- Visualização de células HCT116 em apoptose após marcação com Hoechst 33258.....	76
Figura 4.4- Quantificação de células HCT116 em apoptose após marcação com Hoechst 33258	77
Figura 4.5- Quantificação de células da linha tumoral HCT116 viáveis, em apoptose inicial e tardia, e em necrose.	79
Figura 4.6- Visualização de células HCT116 para avaliação do potencial autofágico dos compostos em estudo.	81
Figura 4.7- Quantificação de células HCT116 em autofagia após exposição aos compostos em estudo	82
Figura 4.8- Imagens de microscopia de fluorescência de células HCT116 para medição da alteração do potencial mitocondrial	84
Figura 4.9- Avaliação da alteração no potencial mitocondrial em células HCT116, após exposiçãoaos compostos	85
Figura 4.10- Imagens da expressão de BAX e BCL-2 em células HCT116 após exposição ao JL10 ou a DMSO.	86
Figura 4.11- A) Rácio da expressão BAX/BCL-2 (B) Níveis de expressão relativa das proteínas BAX e BCL-2.....	87
Figura 4.12- Imagens da expressão de BAX e BCL-2 em células HCT116 resistentes à dox após exposição ao JL10 ou a DMSO	88
Figura 4.13- A) Rácio da expressão BAX/BCL-2 (B) Níveis de expressão relativa das proteínas BAX e BCL-2.....	88
Figura 4.14- Quantificação do stress oxidativo em células HCT116 após exposição aos compostos.....	90
Figura 4.15- Progressão do ciclo celular em células HCT116 após exposição aos compostos por 5 horas (A), 9 horas (B), 24 horas (C) e 32 horas (D).....	91
Figura 4.16- Eletroforese de amostras de células HCT116 expostas aos compostos ...	93
Figura 4.17- Eletroforese de amostras de gDNA de células HCT116 expostas aos compostos.....	94

Figura 4.18- Eletroforese de amostras de pDNA expostas aos compostos (tempo de exposição fixo e variação da concentração de composto).....	96
Figura 4.19- Eletroforese de amostras de pDNA expostas aos compostos (concentração de composto fixa e variação do tempo de exposição).....	97
Figura 4.20- Eletroforese para determinação dos mecanismos de clivagem do DNA pelo composto JL10.	99
Figura 4.21- Expressão de proteínas em células HCT116 após exposição ao JL10....	101
Figura 4.22- Eletroforese bidimensional (2D) de extratos de proteínas de células HCT116 após exposição ao JL10 ou DMSO.....	102
Figura 7.1- Espectros de absorção do composto JL7 em DMSO.....	125
Figura 7.2- Espectros de absorção do composto JL7 em PBS.....	125
Figura 7.3- Espectros de absorção do composto JL7 em DMEM.....	126
Figura 7.4- Espectros de absorção do composto JL10 em DMSO.....	126
Figura 7.5- Espectros de absorção do composto JL10 em PBS.....	127
Figura 7.6- Espectros de absorção do composto JL10 em PBS.....	127
Figura 7.7- Espectros de absorção do composto JL12 em DMSO.....	127
Figura 7.8- Espectros de absorção do composto JL12 em PBS.....	128
Figura 7.9- Espectros de absorção do composto JL12 em DMEM.....	128
Figura 7.10- Espectros de absorção do composto JL14 em DMSO.....	129
Figura 7.11- Espectros de absorção do composto JL14 em PBS.....	129
Figura 7.12- Espectros de absorção do composto JL14 em DMEM.....	130
Figura 7.13- Viabilidade celular de células MCF-7 após exposição aos compostos ..	130
Figura 7.14- Viabilidade celular de células A2780 após exposição aos compostos ...	131
Figura 7.15- Viabilidade celular de células HCT116 após exposição aos ligandos e composto de partida.	132
Figura 7.16- Viabilidade celular de fibroblastos após exposição aos ligandos e composto de partida.	133
Figura 7.17- Visualização de células HCT116 após marcação com Hoechst 33258 ..	134
Figura 7.18- Imagens de microscopia de fluorescência de células HCT116 marcadas para avaliação do potencial autofágico dos compostos em estudo.	135
Figura 7.19- Imagens de microscopia de fluorescência de células HCT116 para medição da alteração do potencial mitocondrial.	136
Figura 7.20- Gel 2D de referência de células HCT116	137

Índice de tabelas

Tabela 1.1- Biomarcadores de diagnóstico e prognóstico do cancro colorretal.	17
Tabela 3.1 - Propriedades dos compostos utilizados	43
Tabela 3.2 - Características das linhas celulares estudadas.....	44
Tabela 3.3 - Programa utilizado para a focagem isométrica	64
Tabela 4.1 - Valores de IC_{50} de cada um dos compostos em estudo obtidos para as diferentes linhas tumorais.....	73
Tabela 4.2 - Valores de IC_{50} dos ligandos e do composto de partida em células HCT116 e fibroblastos.....	74
Tabela 4.3- Proteínas identificadas nos géis 2D e os seus níveis de expressão.	102

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

- A2780** - Linha proveniente de um carcinoma de ovário humano
- Apaf-1** - do inglês *apoptotic protease activating factor-1*
- APS** - Persulfato de amônio, do inglês *Ammonium Persulfate*
- APC** - do inglês *adenomatous polyposis coli*
- ASR** - Taxa de incidência padronizada para a idade, do inglês *age-standardised rate*
- ATCC** - do inglês *American Type Culture Collection*
- ATG** - Proteínas da autofagia, do inglês *autophagy-related*
- BAX** - do inglês *Bcl-2-associated X protein*
- BCL-2** - do inglês *B-cell lymphoma 2*
- Bid** - do inglês *BH3-interacting-domain death agonist bipy 2,2'-bipiridina*
- bipy** - 2,2'-bipy
- Caspases** - Protease de cisteína, do inglês *Cysteine-aspartic protease*
- CCR** - Cancro colorretal
- CDKs** - Cinasas dependentes de ciclinas, do inglês *Cyclin-dependent protein kinases*
- CIMP** - Metilação de ilhas CpG, do inglês *CpG islands methylator phenotype*
- CIN** - Instabilidade cromossômica, do inglês *chromosome instability*
- DCF** - 2,7-diclorofluorescina
- DISC** - Complexo de sinalização de morte, do inglês *death-inducing signaling complex*
- DMEM** -do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- Dox** - Doxorrubicina
- dpp** - 2,3-bis(2-piridil)pirazina
- dptyz** - 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina
- DTT** - Ditioneitol
- FADD** - do inglês *Fas-associated protein death domain*
- FAP** - Poliposes Adenomasas Familiares, do inglês *Familial Adenomatous Polyposis*
- FBS** - Soro Fetal Bovino, do inglês *Fetal Bovine Serum*
- FITC** - Isotiocianato de fluoresceína, do inglês *Fluorescein Isothiocyanate*
- H2DCF-DA** - Diclorofluoresceína diacetato
- HCT116** - Linha celular tumoral proveniente do cancro colorretal

Hoechst - do inglês *Phenol,4-[5-(4-methyl-1-piperazinyl)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-yl]- trihydrochloride*

IARC - Agência Internacional de Pesquisa do Cancro, do inglês *International Agency for Research on Cancer*

IC₅₀ - Concentração de composto para a qual a viabilidade celular é de 50%

ICP-AES - Espetrometria de emissão atômica com plasma indutivo, do inglês *Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*

IEF - Focagem Isoelétrica

IP - Iodeto de propídeo

JC-1 - do inglês *5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3 tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide*

JL7 - [Cu(dppe)(dptyz)][BF₄]

JL10 - [Cu(dppe)(dpp)][BF₄]

JL12 - [Cu(dppe)(bipy)][BF₄]

JL14 - [Cu(dppe)(Me2bpy)][BF₄]

Me₂bpy - 4,4'-dimetil-2,2'-dipiridil

MMR - do inglês *mismatch repair*

MSI - Instabilidade de microssatélites, do inglês *microsatellite instability*

mTOR - do inglês *mammalian target of rapamycin*

MTS - do inglês *[3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfohenyl)-2H-tetrazolium]*

pDNA – DNA plasmídico

Pen/Strep - Antibióticos penicilina/estreptomicina

p21 - do inglês *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*

PBS - Tampão de Fosfato Salino, do inglês *Phosphate Buffered Saline*

ROS - Espécies reativas de oxigénio, do inglês *reactive oxygen species*

RPMI - do inglês *Roswell Park Memorial Institute medium*

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida – Dodecil sulfato de sódio

TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA

TEMED - N,N,N',N' - tetrametiletenodiana

TNF - Fator de necrose tumoral, do inglês *Tumor necrosis factor*

TFDP-1- do inglês, *transcription factor Dp-1*

WHO - Organização Mundial de Saúde, do inglês *World Health Organization*

$\Delta\Psi_M$ - Potencial de membrana mitocondrial

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Cancro - Taxa de incidência, mortalidade e fatores de risco

O cancro apresenta-se como um dos grandes problemas de saúde a nível mundial, sendo a segunda principal causa de morte em todo o mundo [1, 2].

Segundo dados recolhidos pela Agência Internacional de Pesquisa do Cancro (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), só no ano de 2018, apareceram mais de 18 milhões de novos casos e cerca de 9,6 milhões de mortes devido a esta doença [1]. O sexo masculino é o que mais sofre com este tipo de doença, pois, estudos indicam que 1 em cada 5 homens e 1 em cada 6 mulheres desenvolvem cancro em alguma fase da sua vida, sendo que 1 em cada 8 homens e 1 em cada 11 mulheres acabam por morrer devido a doenças oncológicas [2].

Relativamente aos tipos de cancro com maior taxa de incidência, dados recentes de 2018 (IARC, <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis>, consultado em 15-07-2019), indicam que o cancro do pulmão e da mama são os mais abundantes, sendo que o do pulmão apresenta-se como o tipo de cancro causador de maior número de mortes anualmente, seguido do cancro colorretal, como é possível observar na **figura 1.1**. De acordo com a IARC, estes três tipos de cancro são responsáveis por um terço dos novos casos e da mortalidade em todo o mundo. O cancro do pulmão e o cancro da mama tiveram cada um mais de dois milhões de novos diagnósticos em 2018, o cancro colorretal, o terceiro mais comum, 1,8 milhões de novos casos, seguindo-se o cancro da próstata com 1,3 milhões e o cancro do estômago com aproximadamente um milhão de novos diagnósticos [1, 3].

Relacionando a taxa de incidência com a de morte, os tipos de cancro onde há uma menor taxa de sucesso no seu tratamento são o do fígado e do esófago, seguido do cancro do estômago.

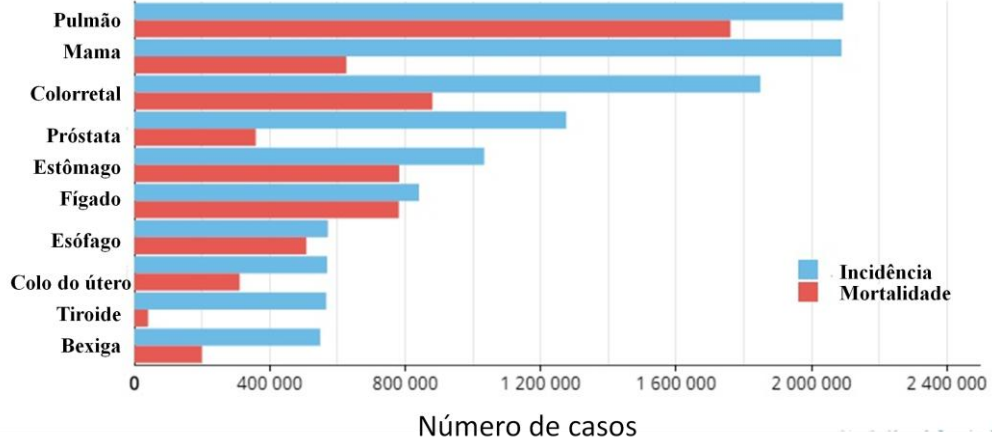


Figura 1.1- Estimativa do número de casos incidentes e de mortes pelos tipos de cancro representados em todo o mundo no ano de 2018, para ambos os sexos e todas as idades (Adaptado de Globcan 2018)

Analisando e comparando as estatísticas para cada género, é possível observar que o cancro do pulmão é o mais comum no sexo masculino (**figura 1.2**), enquanto que no sexo feminino o tipo de cancro com maior incidência é o da mama (**figura 1.3**). Em homens, o cancro da próstata também apresenta um nível de incidência bastante significativo. No entanto, embora abundantes, tanto o cancro da mama como o da próstata apresentam percentagens de cura aproximadamente de 70%. Por outro lado, a incidência do cancro colorretal aparenta ser ligeiramente maior no homem, em relação à mulher, tendo uma percentagem de insucesso de cerca de 50% para ambos os géneros [1]. É preciso ter em conta que as possibilidades de cura, para além do tipo de cancro, dependem diretamente do estadio/fase em que o cancro é detetado. Quanto mais precoce for feito o diagnóstico, maiores serão as probabilidades de cura [3].

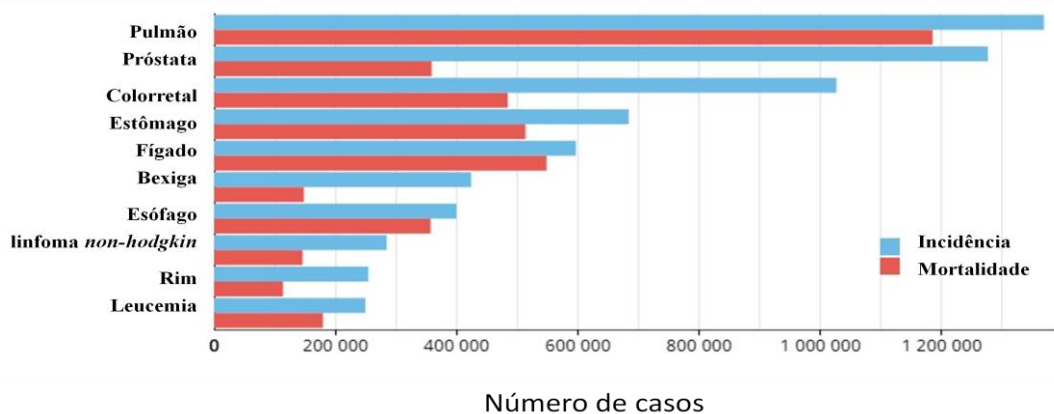


Figura 1.2 - Estimativa do número de casos incidentes e de mortes a nível mundial em pessoas do sexo masculino pelos tipos de cancro representados. Estes dados são relativos ao ano de 2018 (Adaptado de Globcan 2018)

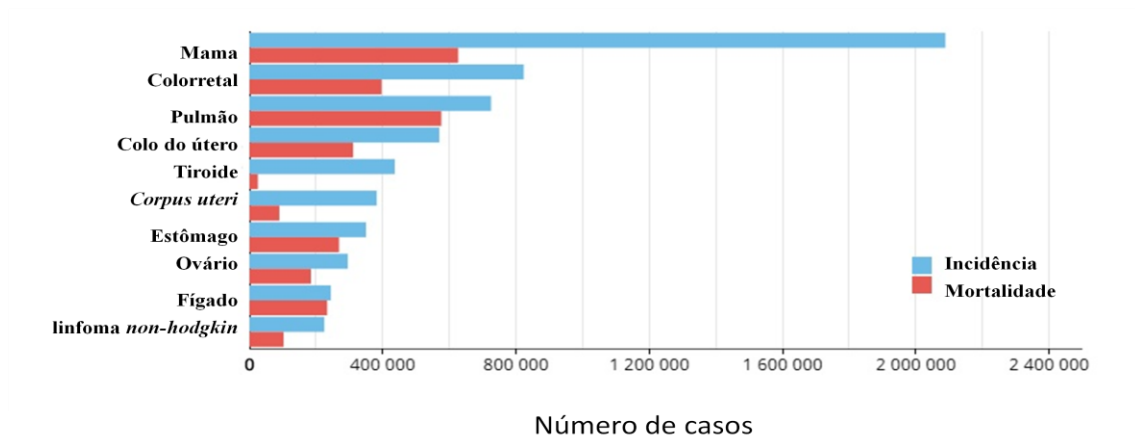


Figura 1.3 - Estimativa do número de casos incidentes e de mortes a nível mundial em pessoas do sexo feminino dos tipos de cancro representados. Estes dados são relativos ao ano de 2018 (Adaptado de Globocan 2018)

Em Portugal no ano de 2018, o número de novos diagnósticos de cancro ultrapassou os 58 mil, com uma taxa de mortalidade de mais de 29 mil pessoas por doença oncológica, segundo a IARC. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) cerca de um quarto da população portuguesa está em risco de desenvolver cancro até aos 75 anos e 10% corre risco de morrer de doença oncológica. O cancro colorrectal foi o tipo de cancro com mais diagnósticos, seguindo-se o cancro da mama, o da próstata, e só depois o do pulmão (tipo de cancro mais incidente em termos mundiais) (**figura1.4**). Contudo, embora o cancro do pulmão seja o quarto tipo de cancro mais abundante, foi o mais mortal no nosso país em 2018 (14,3%) (IARC,2019).

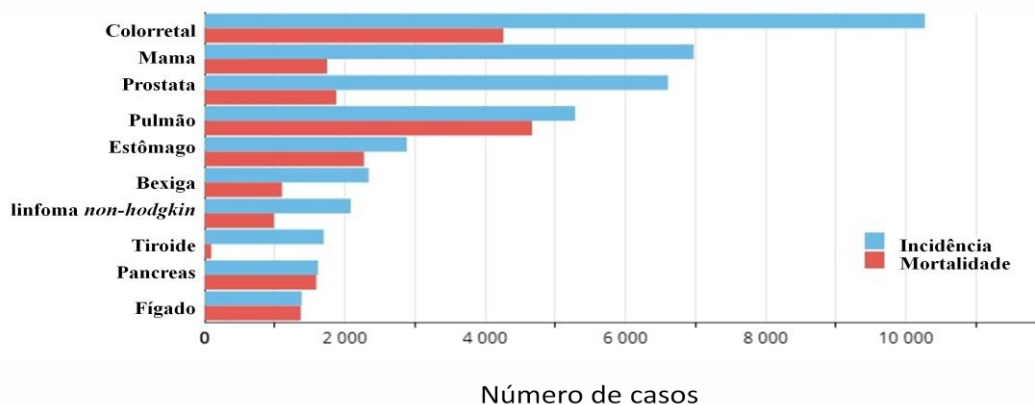


Figura 1.4 - Estimativa da taxa de incidência e mortalidade dos tipos de cancro mais comuns diagnosticados em Portugal. Estes dados são relativos ao ano de 2018 (Adaptado de Globocan 2018).

O risco de desenvolver cancro provém principalmente dos fatores ambientais, como os hábitos diários e comportamentos de cada pessoa, visto que apenas 10% do risco de desenvolver cancro advém da informação genética herdada. Entre os comportamentos de risco estão o tabagismo, exposição a radiação (nomeadamente radiação ultravioleta e ionizante) ou a determinados produtos químicos, hábitos alimentares, consumo de álcool, sedentarismo, entre outros [3, 4]. O avançar da idade também representa um fator de risco, pois à medida que envelhecemos, mais prolongada é a exposição a agentes mutagénicos e maior é o aumento de erros acumulados na replicação do DNA [5].

É esperado que a taxa de incidência do cancro continue a aumentar ao longo dos anos, seja pelo crescimento e envelhecimento da população ou pelo aumento da exposição a fatores de risco, associado ao desenvolvimento socioeconómico [2, 3]. Desta forma, torna-se essencial desenvolver medidas mais eficazes para combater este flagelo, nomeadamente ao nível da prevenção, diagnóstico, e sobretudo da terapia.

1.1.1 Cancro colorretal – Incidência, mortalidade e fatores de risco

Tal como acima descrito, o cancro colorretal é um dos tipos de cancro com maior taxa de incidência a nível mundial, sendo o terceiro mais abundante e o segundo com maior taxa de mortalidade (**figura 1.1**). Estima-se que no ano de 2018 tenham sido diagnosticados cerca de 1,8 milhões de novos casos (10,2 %), e ocorrido aproximadamente 880 mil mortes por este tipo de cancro (9,2 %) (IARC, 2019) [1]. Apesar de ser abundante em ambos os géneros, aparenta ser ligeiramente mais frequente em homens (**figuras 1.2 e 1.3**), o que pode dever-se a diferenças na dieta, níveis de tabagismo, ou de hormonas sexuais [6]. Este tipo de cancro é mais comum em adultos, sendo que 90% dos diagnósticos acontecem em pessoas com 50 ou mais anos [7]. Não obstante esse facto, as taxas de incidência em pessoas entre os 20-49 anos tem vindo a aumentar [8].

Em Portugal, esta neoplasia apresenta-se como a mais incidente (**figura 1.4**), com o aparecimento de cerca de 10 mil novos casos em 2018 (17,5%) [2].

Os sintomas podem variar de pessoa para pessoa, mas os mais comuns são: existência de alterações prolongadas nos hábitos intestinais (diarreia ou alteração na consistência das fezes); sangramento retal ou a presença de sangue nas fezes; desconforto e dor abdominal persistente; perda de peso sem razão aparente; e sinais de

fraqueza [9]. A sobrevivência e o tempo médio de vida após o diagnóstico dependem bastante do estadio da doença no momento da detecção, e tipicamente para uma taxa de sobrevivência de 5 anos, é de 90% para cancros detetados no estágio localizado; 70% para cancros no seu estágio regional e apenas de 10% para diagnósticos em que o cancro já apresenta metástases [7].

Os fatores de risco associados a este tipo de cancro não diferem muito em relação aos restantes cancros, sendo que fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (tais como a idade, consumo de tabaco e álcool, inatividade física, obesidade, dieta desequilibrada, nomeadamente consumo de carnes vermelhas processadas e carboidratos refinados [5], e doenças como a diabetes) estão na base do seu desenvolvimento [10]. Certas doenças crónicas e genéticas como a colite ulcerativa, a doença de Crohn, e a polipose adenomatosa familiar também aumentam esse risco [11]. Cerca de 5-10% dos casos de cancro colorretal devem-se à herança hereditária recebida [7].

1.2 Carcinogénese

A carcinogénese caracteriza-se pelo crescimento, diferenciação e proliferação descontrolados de células anormais, sendo um processo constituído por múltiplas etapas que resultam na acumulação sequencial de mutações genéticas nas células e requer a eliminação de vários mecanismos antiproliferativos ou mecanismos de indução de morte celular programada [12].

Segundo Hanahan e Weinberg, as propriedades mais importantes das células cancerígenas que permitem o desenvolvimento do tumor são a capacidade de proliferar independentemente de sinais de crescimento e de ignorar sinais inibidores de crescimento; resistência à morte celular programada; potencial replicativo ilimitado; indução da angiogénese, que consiste no crescimento de vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos já existentes; e a capacidade em formar metástases, através da propagação do tumor para outro local diferente do local de origem [13].

1.2.1 Etapas que levam à formação de um cancro

A acumulação de diferentes mutações no DNA conduz à desregulação das atividades genéticas envolvidas no controlo dos mecanismos de reparação, crescimento

celular e regulação da morte celular programada. Este processo é lento, podendo demorar vários anos para que uma célula cancerígena prolifere e dê origem a um tumor visível [14]. Tudo começa com uma mutação inicial, ao nível do DNA que os sistemas de reparação não conseguiram detetar ou reparar. Estas mutações podem surgir devido à vulnerabilidade do DNA a determinados metabolitos endógenos, a agentes carcinogénicos ambientais ou químicos ou a alguns fármacos anti-inflamatórios. Estas alterações tanto podem ser ao nível da sequência ou da estrutura do gene, sendo estas chamadas de genéticas ou epigenéticas, respetivamente [15].

Uma das características comuns do metabolismo de células cancerígenas é a sua capacidade em adquirir os nutrientes necessários, mesmo num ambiente pobre em nutrientes, utilizando-os para manter a viabilidade e construir nova biomassa para sustentar a proliferação desregulada, levando à formação de metástases [16].

A partir desta observação foram identificados 6 *hallmarks* emergentes para o desenvolvimento da tumorigénese, que correspondem a características comuns adquiridas pelas células durante este processo (**figura 1.5**) [17]. Estas características consistem na capacidade da célula em: a) alterar o “*uptake*” de metabolitos, desregulando a absorção de glucose e aminoácidos (*hallmark 1*) e conferindo-lhe uma maior aptidão para obter os nutrientes necessários (*hallmark 2*); b) moldar a seu benefício o modo como os metabolitos são utilizados nas vias metabólicas intracelulares, utilizando a glicólise e intermediários do ciclo de krebs para biossíntese e produção de NADPH (aumento do consumo de carbono) (*hallmark 3*) e aumentado a procura por azoto, essencial para a síntese de novo de uma série de biomoléculas (nucleótidos, aminoácidos não essenciais e poliaminas) (*hallmark 4*); c) aproveitar as suas reprogramações metabólicas a seu favor, provocando alterações na diferenciação das próprias células cancerígenas (*hallmark 5*) e também em células e componentes que integram o seu microambiente tumoral (*hallmark 6*), promovendo em última instância, a formação de metástases.

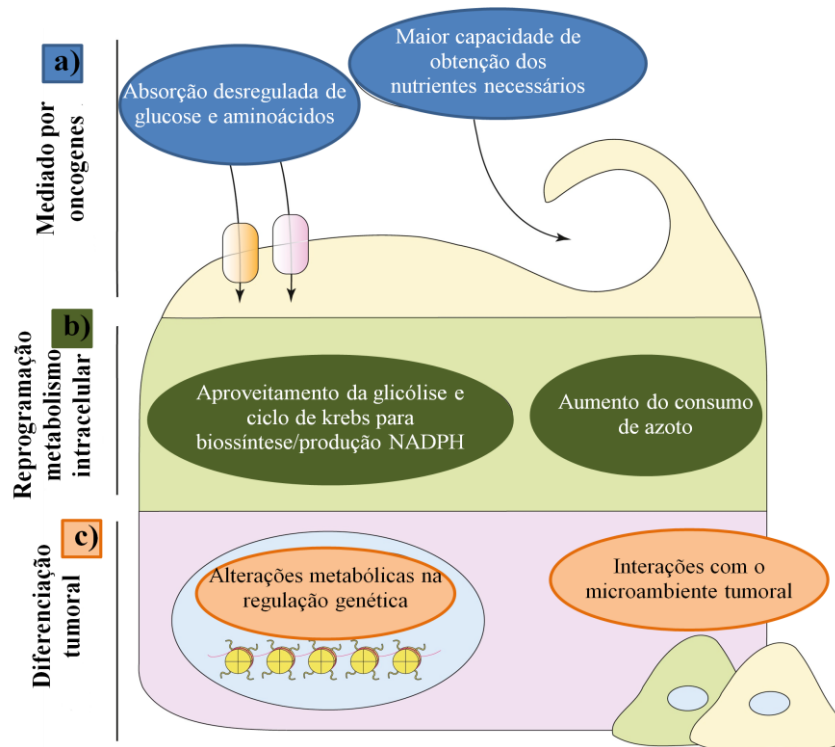


Figura 1.5 – *Hallmarks* emergentes do cancro, características comuns às células cancerígenas (Adaptado de: N. Pavlosa, C. Thompson) [17].

Foi observado um aumento significativo no consumo de glucose em células tumorais, em comparação com células não tumorais [18]. Uma célula cancerígena para conseguir responder às suas necessidades nutritivas e anabólicas decorrentes do crescimento e proliferação celular, tem que aumentar a obtenção de nutrientes do meio exterior para dentro da célula, nomeadamente glucose e glutamina (*Hallmark 1*).

Mesmo em condições de escassez de nutrientes devido ao elevado consumo para “suportar” o tumor, alguns tipos de cancro adquirem mutações que ativam a capacidade das células em utilizar formas alternativas de obter os nutrientes que precisam, bem como recuperar moléculas pré-sintetizadas quando a sua síntese dentro da célula estiver comprometida (*Hallmark 2*). Desta forma, as células tumorais conseguem sobreviver e proliferar, mesmo em condições metabolicamente desfavoráveis, nomeadamente através de processos auto catabólicos [19].

Em condições normais, a absorção de nutrientes é estritamente regulada pela sinalização dos fatores de crescimento, sendo este aumento em células tumorais mediado por oncogenes, levando a uma reprogramação metabólica da célula [20]. Esta adaptação também permite a este tipo de células um aumento na regulação da via apoptótica pelas proteínas envolvidas no aumento da glicólise, tornando-as mais

resistentes a este tipo de morte celular, o que possibilita a sua sobrevivência a longo prazo [21].

A forma como os nutrientes são utilizados e as vias metabólicas também diferem em células normais e tumorais (*Hallmark 3*).

Em células normais, a glucose é maioritariamente utilizada para a geração de acetil-CoA mitocondrial, que é então submetida à oxidação no ciclo de krebs. Os elétrons resultantes destas reações de oxidação são transportados através de NAD / NADH e FAD / FADH₂ para a cadeia de transporte eletrônico, criando um gradiente eletroquímico que leva à produção de ATP.

Por outro lado, em células tumorais a principal finalidade da glucose prende-se com a biossíntese de um vasto conjunto de biomoléculas, como nucleótidos, glicerol, aminoácidos não essenciais, ácidos gordos e colesterol, entre outros [22]. As vias catabólicas da glucose e da glutamina facultam à célula tumoral a possibilidade de utilizar os seus intermediários de carbono para a biossíntese de macromoléculas, ao mesmo tempo que a oxidação completa dos esqueletos de carbono destes dois metabolitos faz com que a célula ganhe poder redutor na forma de NADH e FADH₂, auxiliando a transferência de elétrons e a geração de ATP pela cadeia de transporte eletrônico, ou na forma de um cofator NADPH, importante para a manutenção da capacidade redox das células [23].

A glutamina, não só fornece os intermediários de carbono, mas também reduz o azoto para a biossíntese de novo de nucleótidos e diversos componentes que contêm azoto e são essenciais para uma célula em crescimento e proliferação (*Hallmark 4*).

Os componentes das vias metabólicas ativadas, para além de receberem informação de sinais de crescimento, também transmitem diretamente as informações sobre o estado metabólico celular a um vasto conjunto de enzimas reguladoras, entre as quais aquelas que medeiam a deposição e remoção de marcas epigenéticas da cromatina. Por exemplo, um dos metabolitos que se acumula no citoplasma quando as células metabolizam mais glucose do que o necessário devido ao suporte bioenergético do tumor é a acetil-CoA, fundamental para a ativação de enzimas que acetilam as histonas e outras proteínas num processo mediado por oncogenes [24]. O aumento da acetilação de histonas promove a ativação transcripcional, resultando numa expressão genética aumentada e mais ampla [25].

Desta forma, a expressão genética, um processo no qual a informação hereditária contida num gene, tal como a sequência de DNA, é transcrita em RNA e traduzida em

proteínas também pode ser alterada em células tumorais pela remoção de marcas epigenéticas (*Hallmark 5*).

As modificações epigenéticas são hereditárias e provocam mudanças no funcionamento de um gene, que não são causadas por alterações na sequência de DNA, e que se mantêm nas divisões celulares seguintes. Assim, as marcas epigenéticas fornecem uma informação genética extra, que através de modificações na cromatina ou metilação do DNA estimulam ou inibem a expressão de determinado genes [26]. Estes mecanismos são altamente complexos e essenciais para o desenvolvimento normal e a manutenção de padrões de expressão genética específica para cada tipo de célula (cada célula expressa um número restrito de genes). A existência de pequenas falhas no estabelecimento dos processos epigenéticos pode levar à alteração da função do gene, e consequentemente à alteração da fisiologia normal da célula, conduzindo à formação de uma célula tumoral [25].

A capacidade que as células cancerígenas possuem de interagir com o microambiente tumoral, quer seja pela secreção de fatores de crescimento, alterações na matriz extracelular, ou interações célula-célula, confere-lhes o poder de influenciar o fenótipo das células presentes nesse microambiente (*Hallmark 6*). Já foram observadas alterações fenotípicas características em linhas celulares presentes na vizinhança de um tumor em crescimento, nomeadamente em fibroblastos, células endoteliais e componentes do sistema imune inato e adaptativo [27].

É raro um tumor manifestar estas 6 características (*Hallmarks*), no entanto, a maior parte dos tumores manifesta sempre a maior parte delas, sendo que conseguir avaliá-las e percebê-las pode ajudar bastante a delinear a estratégia de tratamento a seguir.

1.2.2 Oncogenes e genes supressores de tumor

O processo de formação de um cancro ocorre, sobretudo, através de alterações genéticas em oncogenes, genes supressores de tumor ou genes que codificam para enzimas reparadoras de lesões ao nível do DNA [28].

Os oncogenes são genes que codificam para proteínas relacionadas com o aparecimento e crescimento de tumores, enquanto que, os genes supressores de tumor codificam para proteínas envolvidas na inibição da formação e crescimento dos mesmos.

Os oncogenes são ativados a partir de mutações ou aumento da expressão genética em proto-oncogenes, que são genes responsáveis pela sinalização das vias que regulam o ciclo celular [29]. Por outro lado, os genes supressores de tumor, têm como função evitar a desregulação do ciclo, reparar erros na divisão e replicação do DNA e controlar o processo de apoptose, sendo que quando mutados perdem essas funções [28].

As células têm mecanismos de controle durante o ciclo celular (*checkpoints*) que permitem responder ao dano no DNA ativando vias complexas de sinalização que podem promover a reparação e sobrevivência do DNA, ou no caso de não ser possível reparar o dano, induzir processos de morte celular. Estes processos funcionam como barreiras à progressão do tumor que retardam ou inibem o aparecimento da neoplasia. O destino das células vai ser decidido com base em fatores que estão envolvidos no reconhecimento, reparação e tolerância à lesão no DNA, como também nos fatores envolvidos na ativação dos sistemas de morte celular (apoptose, necrose, autofagia), podendo funcionar como supressores de tumor. Quando estes processos falham surge o aparecimento de tumores.

Um dos oncogenes mais estudado relativamente ao desenvolvimento do cancro é o RAS. O gene *RAS* no seu estado normal desempenha um papel essencial na sinalização celular, ativando diversas cascatas de sinalização que definem as respostas celulares a curto e longo prazo, incluindo a proliferação, diferenciação ou sobrevivência [30]. As proteínas RAS são pequenas GTPases que circulam entre as conformações de ligação ao GTP ativo (trifosfato de guanósina) e ao GDP (difosfato de guanósina) e regulam as respostas celulares a muitos estímulos extracelulares, incluindo fatores de crescimento. Estas proteínas são reguladas negativamente pelas proteínas ativadoras da GTPase (GAPs), que estimulam a atividade intrínseca da GTPase pela estabilização de um estado de transição de alta energia que ocorre durante a reação de hidrólise RAS-GTP [31].

Uma mutação neste proto-oncogene, que pode ser causada por agentes carcinogénicos exógenos ou endógenos, conduz à ativação do oncogene *RAS*, que é encontrado na maior parte dos diferentes tumores, desregulando as respostas celulares mencionadas. Assim sendo, substituições de aminoácidos nos codões 12, 13 ou 61 de um das três proteínas RAS, (*HRAS*, *KRAS* e *NRAS*) estão na base desta activação [32]. Estas alterações prejudicam a atividade intrínseca da GTPase e conferem resistência aos GAPs, fazendo com que as proteínas RAS mutantes associadas ao cancro se acumulem

na sua conformação ativa, ligada ao GTP. Cada um destes oncogenes é prevalente em diferentes tipos de cancro. Por exemplo, o oncogene *KRAS* é maioritariamente encontrado em cancros como o do pâncreas, colorretal, pulmão e colo do útero [31].

Por outro lado, um dos genes supressor de tumor mais estudado é o *TP53* (do inglês *tumour protein 53*), conhecido como “*the guardian of the genome*”, codifica para a proteína TP53 que regula o ciclo celular [33]. Qualquer anomalia verificada no ciclo celular é detetada, sendo induzida a sua paragem pela ativação do gene *TP53*, que vai auxiliar o processo de reparação do DNA [33].

Assim sendo, o gene *TP53* controla múltiplos processos celulares, incluindo a transcrição, reparação de DNA, controlo do ciclo celular, indução de proteínas proapoptóticas no caso de não ser possível a reparação do DNA, entre outros [34].

A perda de função deste gene pode ocorrer por mutações estruturais (mutações *missense*), interação com produtos virais ou devido a mecanismos celulares endógenos, e contribui para o desenvolvimento de tumores, pois, quando inativado, este gene perde a sua capacidade de ligação ao DNA [35].

Compreender as vias bioquímicas pelas quais o gene *TP53* induz a paragem do ciclo celular e a apoptose, ou a forma como o oncogene *KRAS* é ativado e apresenta resistência aos GAPs, pode permitir a identificação de alvos moleculares para os quais a terapia pode ser direcionada [35, 36].

1.2.3 Carcinogénese do cancro colorretal

1.2.3.1 Desenvolvimento do tumor

O tumor desenvolve-se no intestino grosso, no colon ou no reto, e resulta do crescimento anormal de células que têm a capacidade de se espalhar para outras partes do corpo. Esta neoplasia é das mais letais em todo o mundo, sendo que, na maior parte dos casos, os pacientes não morrem pelo tumor primário, mas sim pelo desenvolvimento de metástases noutros órgãos [37].

A invasão do tumor do seu local de origem para outros órgãos e tecidos do organismo é consequência de fenómenos como a invasão do estroma, ou a incursão das células cancerígenas, através da membrana basal, no sistema circulatório com a libertação para o local secundário. Estes processos requerem a degradação de componentes da matriz extracelular por enzimas proteolíticas. Existem vários tipos de

proteínases que participam neste processo, nomeadamente as metaloproteínases da matriz (MMPs), entre as quais MMP-2 e MMP-9, e as gelatinases (enzimas responsáveis pela hidrólise do colagénio) [38].

Os mecanismos envolvidos na formação primária do tumor ainda não estão completamente elucidados, mas existem evidências de que a lesão da mucosa colorretal despoleta uma resposta imunitária crónica, que conduz à proliferação e regeneração celular [37]. Caso a resposta imune não consiga reparar a lesão, forma-se um microambiente rico em citocinas, fatores de crescimento e produtos da respiração celular devido à proliferação contínua destes produtos. Este microambiente resultará na acumulação de erros genéticos que transformam as células epiteliais glandulares normais em adenocarcinomas invasivos. Numa primeira fase, estes fatores levam à formação de uma lesão pré-cancerígena, um adenoma (ACF, do inglês *aberrant crypt foci*), que pode ou não evoluir em seguida para um carcinoma.

A mutação mais comum encontrada nos estágios iniciais deste tipo de cancro é a inativação do gene *APC* (do inglês *adenomatous polyposis coli*), um gene supressor de tumor. A proteína *APC* normal regula negativamente a via de sinalização WNT, fazendo parte de um complexo multiproteico que se liga à β -catenina, direcionando-a para a degradação proteossomal pela ubiquitina. A perda de função desta proteína resulta no aumento da sinalização da via pela acumulação da β -catenina nuclear, devido à incapacidade em formar o complexo proteico necessário para a sua degradação [39].

Numa mucosa colorretal normal, as células-tronco migram para fora das criptas epiteliais à medida que se diferenciam, num processo controlado pela β -catenina, sendo posteriormente o elevado número de células produzido controlado por apoptose que demora entre 3 a 7 dias. Em pessoas saudáveis, é normal várias células adquirirem mutações durante a replicação e a diferenciação, mas como são sujeitas a processos de morte celular por apoptose no espaço de uma semana, não têm a oportunidade de desenvolver uma neoplasia. No entanto, a acumulação de β -catenina devido à inativação do gene *APC* leva à criação de um fenótipo de célula-tronco indiferenciadas, o que impede as mesmas de se deslocarem para a superfície e serem removidas da cripta. Desta forma, estas células-tronco indiferenciadas acumulam-se nas criptas, levando à formação de um pólipo. O adenoma formado (pólipo), e a aquisição de mutações adicionais, envolvendo genes, como o *KRAS*, o *TP53* ou o *DCC* (do inglês *deleted in colorectal cancer*), pode eventualmente induzir um carcinoma [40].

A mutação no gene *APC* pode ser hereditária - polipose adenomatosa familiar (FAP do inglês *Familial Adenomatous Polyposis*), ou esporádica, pelo aparecimento em células somáticas, muitas vezes como resultado de mutações noutros genes devido à incapacidade de reparar mutações no DNA. A inativação do gene *APC* acontece em cerca de 70% dos casos de cancro colorretal esporádicos e são a causa para a predisposição genética à doença (FAP) [11].

Quando o gene *APC* não possui uma mutação que leva à perda de função, podem existir mutações no gene da β -catenina, *CTNNB1*, que protegem a proteína da degradação mediada pelo APC. No entanto, a mutação no gene *CTNNB1* é encontrada mais frequentemente em adenomas (12,5%), do que em carcinomas invasivos (1,4%), sugerindo que, na maior dos casos, esta mutação não tem a capacidade de despoletar um cancro invasivo [39, 41].

Desta forma, a inflamação crónica do intestino grosso e a instabilidade genómica e epigenética estão correlacionados com o subsequente desenvolvimento do cancro colorretal. É importante conseguir determinar a origem da neoplasia para definir a estratégia de tratamento, pois consoante a sua proveniência diferentes vias são despoletadas [10].

1.2.3.2 Biomarcadores do cancro colorretal

O cancro colorretal é uma doença heterogénea, existindo pelo menos três tipos de instabilidade genética ou epigenética relacionados com esta neoplasia: 1) instabilidade cromossómica (CIN, do inglês *chromosome instability*); 2) instabilidade de microssatélites (MSI, do inglês *microsatellite instability*); 3) fenótipo rico na metilação de ilhas *CpG* (CIMP, do inglês *CpG island methylator phenotype*) e hipometilação global do DNA [10].

O tipo mais comum de instabilidade genética é a CIN, que é encontrada em cerca de 85% dos diagnósticos. Esta instabilidade deve-se à presença de aneuploidia (alterações no número de cromossomas) ou a múltiplas alterações estruturais e pode ser identificada recorrendo a técnicas como a citometria de fluxo [10]. Consoante a origem do cancro, a alteração cromossómica ocorre em diferentes genes. Quando a origem é esporádica, estas alterações acontecem em genes supressores de tumores como o *TP53* e o *DCC* e em proto-oncogenes como o *KRAS* [42]. Por outro lado, se for hereditária

ocorrem mutações no gene *APC*, envolvido na via de sinalização WNT, tornando-a continuamente ativa pela inativação da proteína APC [39].

Os MSI são menos comuns e encontram-se em aproximadamente 15% dos câncros colorretais. Esta instabilidade deve-se à inativação do sistema MMR (do inglês *mismatch repair*) de reparação do DNA pela presença de mutações em certos genes que fazem parte deste sistema [10]. Na maior parte dos casos, estes dois fenómenos, CIN e MSI, são mutuamente exclusivos, pois nesta última condição, o organismo apresenta um cariótipo normal.

A instabilidade epigenética caracteriza-se pela hipermetilação em regiões promotoras de genes associados à supressão de tumores ou ao controlo do ciclo celular (metilação de ilhas CpG - CIMP), e pela hipometilação global do DNA [10]. Estes mecanismos ainda não estão totalmente claros, mas existe uma forte correlação com o aparecimento de mutações no gene *BRAF* (*Serine/threonine-protein kinase B-raf*) (ex. V600E), que traduz uma proteína envolvida na sinalização e crescimento celular, sendo que, a ativação do oncogene *BRAF* leva ao crescimento celular descontrolado e à hipermetilação do gene *MLH1* (do inglês, *MutL homolog 1*) que faz parte do sistema de reparação do DNA (MMR) e está associado à instabilidade de microssatélites [43, 44]. Este gene localiza-se no cromossoma 3 e está ligado ao desenvolvimento do cancro colorretal hereditário sem polipose (HNPCC, do inglês *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*), também conhecido como síndrome de *Lynch*, que é uma condição genética autossómica dominante correlacionada com um aumento do risco em desenvolver a neoplasia [44].

Outra característica associada a este tipo de cancro é a presença de mutações nos codões 12 e 13 do gene *KRAS*, que conduzem ao aumento na frequência do aparecimento de cancro colorretal [43].

Identificar e entender o papel das mutações nos oncogenes *BRAF* e *KRAS*, e o conhecimento das vias de sinalização dos fatores de crescimento neste tipo de cancro pode permitir um melhor direcionamento no tratamento dos pacientes.

Na **tabela 1.1** é possível ver as relações entre as alterações genéticas referidas neste capítulo e a identificação de biomarcadores emergentes do cancro colorretal. A exploração conjunta destes biomarcadores genéticos apresenta-se como promissora para a realização de uma deteção precoce e prognóstico deste tipo de patologia [45].

Tabela 1.1- Biomarcadores de diagnóstico e prognóstico do cancro colorretal. Nesta tabela são apresentados os biomarcadores, bem como as alterações celulares provocadas, a frequência dos mesmos no aparecimento do cancro colorretal e a sua capacidade para contribuírem para o diagnóstico e prognóstico (avaliação do risco).

Biomarcador	Alteração celular	Frequência (%)	Diagnóstico	Prognóstico
CIN	Aneuploidia	85	-----	Sim
MSI	Inativação do sistema MMR	15	Síndrome de <i>Lynch</i>	Sim
CIMP	Metilação de ilhas <i>CpG</i>	15	-----	Incerto
Mutação APC	Perda de função do gene <i>APC</i> e estabilização da β -catenina	70	FAP	-----
Mutação CTNB1	Estabilização de β -catenina	2	-----	-----
Mutação BRAF	Hipermetilação do gene <i>MLH1</i>	10	Síndrome de <i>Lynch</i>	Provável
Mutação KRAS	Alterações nos codões 12 e 13 da proteína KRAS	40	-----	-----

1.3 Regulação do ciclo celular

As células estão em constante duplicação mediante a existência de estímulos induzidos por fatores de crescimento ou hormonas para que ocorra a divisão celular. O ciclo celular é controlado por inúmeros mecanismos que garantem a divisão celular correta, em processos que envolvem a ação da ação de ciclinas dependentes de cinases (CDK, do inglês *cyclin-dependent kinases*), que como o próprio nome indica, necessitam da ligação de ciclinas e de fosforilação num sítio específico para serem ativadas [46, 47].

Em células eucarióticas, o ciclo celular divide-se em 4 fases distintas: G0/G1, S, G2 e M, sendo a progressão celular entre as fases controlada por pontos de controlo - *checkpoints*, que impedem a célula de passar para a próxima fase do ciclo no caso de existirem erros, num processo controlado por inibidores de CDK, (CKI, do inglês *Cyclin dependent kinases inhibitors*).

As fases G₀/G₁, S e G₂ englobam a interfase, uma fase na qual se dá o crescimento celular, pela duplicação do material genético na fase S, fazendo com que cada cromossoma apresente um cromatídeo irmão, ao mesmo tempo que se inicia a duplicação dos centrossomas e o início do seu movimento para os polos da célula. As fases G₁ e G₂ são fases em que a célula se prepara para a síntese de DNA e para a divisão, respetivamente. Algumas células adultas, nomeadamente células musculares e nervosas, entram numa fase G₀, na qual as células se encontram num estado estacionário e não sofrem divisão celular, podendo este ser permanente ou temporário. Caso seja temporário, as células reentram no ciclo celular na fase G₁. [48]

No fundo, ao longo destas 3 fases ocorre a preparação das células para a divisão mitótica que vão sofrer na Fase M. Na fase M, que se divide em diferentes estágios (prófase, metáfase, anáfase e telófase), acontece a separação dos cromossomas da célula mãe e a rutura da membrana plasmática (citocinese), dando origem a duas células filhas.

1.3.1 Progressão do ciclo celular

A progressão do ciclo celular pelas diferentes fases está dependente da atividade das CDK, uma família de proteínas cinases de serina/treonina que são ativadas em pontos específicos do ciclo celular. Os complexos mais importantes neste processo são: CDK6-ciclina D, CDK4-ciclina D, CDK2-ciclina E, CDK2-ciclina A, CDK1-ciclina A, CDK1-ciclina B, ativados em diferentes fases do ciclo (**figura 1.6**). Quando ativada, as CDK induzem a fosforilação de determinadas proteínas selecionadas. Ao contrário dos níveis de CDK que se mantêm constantes ao longo do ciclo celular, os níveis das suas proteínas ativadoras, as ciclinas, variam muito, pois são necessárias diferentes ciclinas nas diferentes fases do ciclo [46].

As atividades de CDK 4 e 6 são controladas positivamente pela associação com ciclinas do tipo D, que são importantes na entrada na fase G₁. A sua ativação depende da fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb), durante o início da fase G₁, que leva à ruptura do complexo CDK - ciclina com a proteína histona deacetilase (HDAC) e à libertação dos fatores de transcrição E2F-1 (*Retinoblastoma-associated protein 1*) e TFDP-1 (do inglês, *transcription factor Dp-1*), que regulam positivamente a transcrição de genes cujos produtos são necessários para a progressão para a fase S, incluindo ciclina A, ciclina E, Cdc25. A pRb permanece hiperfosforilada durante o resto do ciclo celular, num processo mediado pelo complexo CDK2-ciclina, pois esta proteína na sua

forma não fosforilada pode ligar-se a proteínas da família E2F, inativando a síntese do DNA e bloqueando a progressão do ciclo para a fase S [47].

O complexo CDK2-ciclina E regula a passagem de G1 para a fase S, através da fosforilação do seu inibidor p27, que induz a sua degradação dependente de proteossomas. Este complexo também é responsável pela fosforilação de uma proteína NPAT (do inglês, *nuclear protein mapped to the ATM locus*), que atinge o seu nível máximo imediatamente antes da entrada na fase S, existindo evidências de que desempenha um papel importante neste processo. A CDK2-ciclina E fosforila a histona H1, num processo mediado pela NPAT, sendo este acontecimento muito importante para a condensação dos cromossomas necessária durante a replicação do DNA na fase S [49]. Os níveis da ciclina A aumentam durante a fase S, e esta liga-se à CDK2, sendo que no final da fase G2, a ciclina A complexa com a CDK1 para promover a entrada na fase M. A mitose é ainda regulada pela associação da ciclina B com a CDK1 (**figura 1.6**)

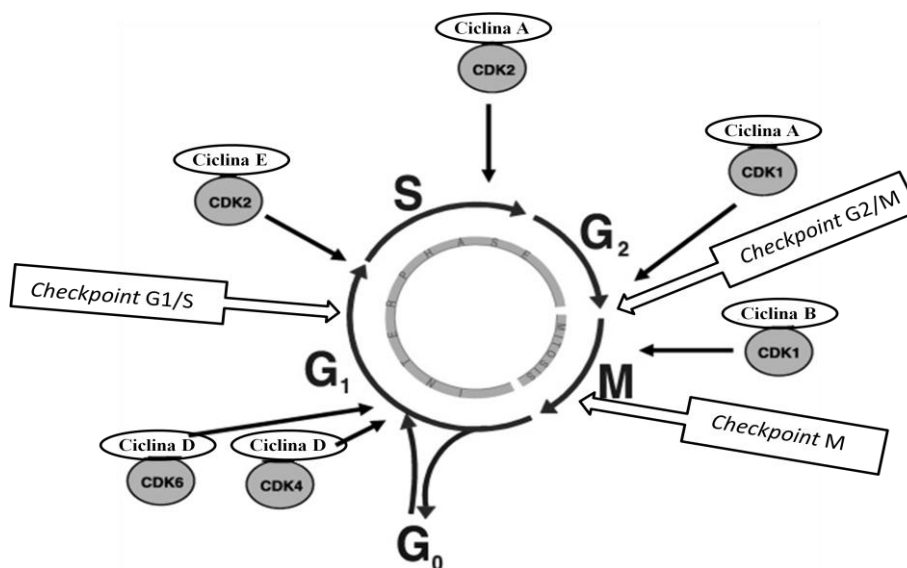


Figura 1.6 - Regulação do ciclo celular. Identificação dos locais de atividade regulatória dos complexos CDK-ciclina, bem como dos respetivos *checkpoints* envolvidos na verificação do ciclo. (Adaptado de Vermeulen *et al*, 2003). [50]

1.3.2 Checkpoints de verificação

Para garantir a correta divisão celular e uma sequência ordenada de acontecimentos existem 3 *checkpoints* principais de verificação que interrompem o ciclo em caso de anomalias para tentar reparar o dano: 1) antes da célula entrar na fase S

(*checkpoint* G1-S); 2) após a replicação do DNA (*checkpoint* S); e 3) durante a fase M (*checkpoint* do fuso mitótico) (**figura 1.6**).

No *checkpoint* G1-S, a paragem do ciclo celular é causada por danos no DNA que leva ao aumento dos níveis de TP53, que em situações normais se encontra baixo. Este aumento estimula a transcrição de genes diferentes como o p21 (do inglês, *cyclin-dependent kinase inhibitor 1*), Mdm2 (do inglês, *Murine double minute 2*) e o BAX (do inglês, *Bcl-2-associated X protein*). O p21 funciona como uma CKI, inibindo a atividade da CDK, e consequentemente promovendo a interrupção do ciclo e a não replicação do DNA danificado. O Mdm2 funciona como um regulador negativo do TP53, inibindo a sua atividade transcripcional, e contribuindo para a sua degradação proteolítica. A proteína BAX está envolvido na via apoptótica e é estimulada em casos de lesões severas no DNA, conduzindo à morte celular [51].

Por outro lado, quando os danos ao nível do DNA ocorrem durante a fase G2, a paragem do ciclo pode acontecer por processos mediados pelo aumento do nível de TP53, mas também em processos onde este não intervém. A entrada na fase M pode ser evitada mantendo a CDK1 numa forma que impede a sua associação com a ciclina B, pela fosforilação de Cdc25, num processo mediado por 2 proteínas cinases (Chk1 e Chk2) [52].

Após a entrada na fase M, existe outro ponto de verificação que monitoriza a ligação dos cromossomos aos microtúbulos durante a divisão celular e está apto a impedir a progressão do ciclo na metáfase. Para a célula entrar na anáfase é necessário garantir a segregação idêntica do material genético entre as células-filhas e preservar a integridade do genoma ao nível cromossómico, através da distribuição homogénea dos pares homólogos dos cromatídeos irmãos para os polos opostos do fuso mitótico. A ligação dos cromatídeos aos microtúbulos do fuso ocorre pelo cinetócoro. Se isto não acontecer, uma das células filha pode herdar duas cópias de um cromossoma, e a outra nenhuma. Desta forma, é necessário retardar o início da anáfase até que todos os cinetócoros estejam adequadamente ligados aos microtúbulos, num processo onde intervém proteínas como a MAD (do inglês, *mitotic arrest deficient*) e BUB (do inglês, *budding uninhibited by benzimidazole*), que inibem a ativação do complexo APC (do inglês, *anaphase promoting complex*), pela ligação direta ao Cdc20 (uma subunidade do complexo APC) [53].

Qualquer falha que exista ao nível dos checkpoints aqui mencionados, quer seja por mutações em genes e proteínas que regulam estes processos ou por uma não deteção da anomalia, pode ser suficiente para a formação de uma célula cancerígena.

1.4 Mecanismos de morte celular

Quando existe lesões celulares que os mecanismos de reparação não conseguem reparar, existem uma diversidade de processos que conduzem à morte celular. Neste capítulo serão abordados os fenómenos principais como a apoptose, a necrose, e a autofagia. A apoptose e a necrose são os fenómenos mais abundantes, existindo uma interação equilibrada e vários mediadores comuns para estes tipos de morte [54].

1.4.1 Apoptose

A apoptose consiste na morte programada das células, sendo um processo altamente regulado a nível genético, que envolve uma cascata dependente de energia que culmina na eliminação das células danificadas. As células em apoptose apresentam sinais morfológicos e bioquímicos característicos, como um encolhimento celular, do qual resultam células mais pequenas, núcleos mais densos e organelos mais empacotados; condensação da cromatina; formação de bolhas nas membranas (*blebbing*); e fragmentação do DNA nuclear, levando à formação de vesículas com material genético no seu interior que acabam por se separar conduzindo ao aparecimento de corpos apoptóticos (*budding*). Os corpos apoptóticos são sujeitos a um processo de fagocitose pelos macrófagos e degradados dentro de fagolisossomas [55].

Este processo é essencial para o desenvolvimento do organismo, participando em processos como o *turnover* celular normal, o desenvolvimento embrionário, a homeostase tecidual, entre outros. Desta forma, a sua desregulação pode resultar em distúrbios metabólicos e conduzir à formação de tumores, sendo que a maior parte das células cancerígenas apresenta grande resistência à sinalização da apoptose [56].

O mecanismo apoptótico pode ser desencadeado por duas vias: a via extrínseca e a intrínseca, resultantes de estímulos celulares externos ou internos, respetivamente (**figura 1.7**). Independentemente da via ativada, ambas vão depender da ativação de

caspases, uma enzima proteolítica responsável por desencadear uma complexa cascata de eventos que termina com a morte celular [55].

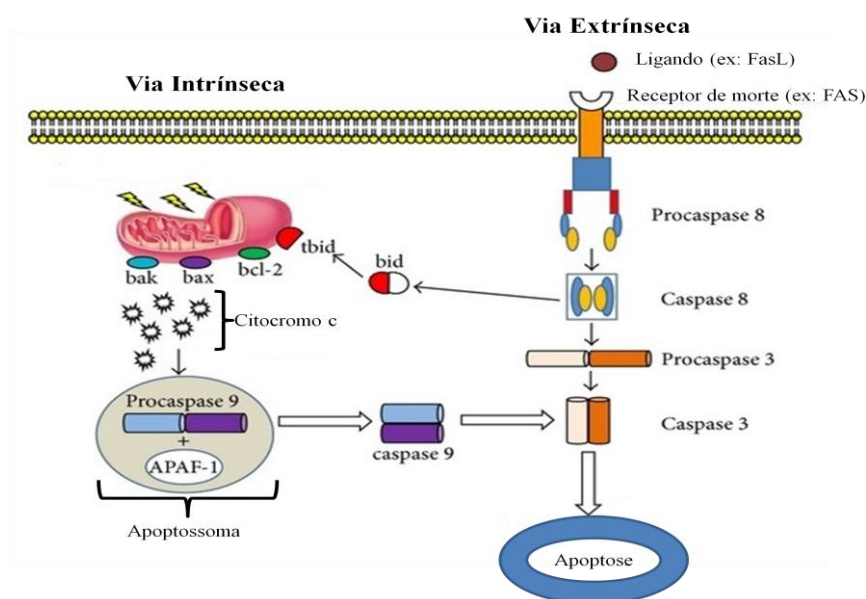


Figura 1.7 – Mecanismos de morte celular por apoptose através de duas vias, intrínseca e extrínseca. A via intrínseca encontra-se representada na parte esquerda imagem, e é despoletada por estímulos celulares internos (Bax, Bcl-2, Bak, tBid) que permitem a libertação do citocromo c pela permeabilização da membrana e consequente ativação das caspases. A via extrínseca encontra-se representada na parte direita da imagem e a sua ativação está dependente da ligação de ligandos a determinados receptores de morte na superfície da membrana por estímulos externos. (Adaptado de Loreto *et al.*, 2014) [57].

1.4.1.1 Via intrínseca da apoptose

A via apoptótica intrínseca é despoletada por estímulos intracelulares não mediados por recetores, como danos irreparáveis no DNA, hipoxia, temperatura, falta de nutrientes, entre outros.

O passo crucial para a ativação desta via apoptótica consiste na libertação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma, pelo aumento da expressão dos genes regulados pelo TP53. O TP53 é uma proteína ativada em resposta a danos no DNA, e é responsável pela ativação de várias proteínas pró-apoptóticas, como a BAX. Em condições normais, existem proteínas anti-apoptóticas como a BCL-2, que previnem a apoptose ao manter a integridade membranar. A libertação do citocromo c para o citoplasma está relacionada com a permeabilização da membrana mitocondrial que é conseguida pela entrada de proteínas pró-apoptóticas na membrana mitocondrial [58]

O citocromo c é uma proteína associada à membrana interna da mitocôndria, essencial na cadeia de transporte de eletrões, devido à sua capacidade redox. Quando

libertado para o citoplasma, este liga-se e ativa o APAF-1 (do inglês *apoptotic protease activating factor-1*), levando à formação do apoptossoma, um complexo ativador de caspases. Este complexo subsequentemente vai recrutar a procaspase-9, permitindo a sua interação com a caspase-3. Uma vez ativada, a caspase-3 induz a clivagem de proteínas numa cascata de eventos que culmina com a morte celular (**figura 1.7**).

A ativação das caspases pela via intrínseca da apoptose é regulada negativamente por proteínas da família BCL-2 e por inibidores das proteínas de apoptose (IAPs, do inglês, *inhibitors of apoptosis proteins*).

A atividade pró-apoptótica do citocromo c é influenciada pelo seu estado redox e aumenta na presença de espécies reativas de oxigênio (ROS). Por outro lado, em células cancerígenas a apoptose mediada pelo citocromo c é inibida por um mecanismo dependente do metabolismo da glucose [59].

Para além do citocromo c, outras proteínas são libertadas pela mitocôndria, como as proteínas SMAC (do inglês *second mitochondria-derived activator of caspases*) e HtrA2 (do inglês *high temperature requirement protein A2*). Estas proteínas também contribuem para a indução da apoptose pela inibição da atividade de proteínas que impendem este fenómeno (IAPs), ou pela ativação direta de caspases [60].

1.4.1.2 Via extrínseca da apoptose

Em oposição à via intrínseca, a ativação da via extrínseca da apoptose é dependente de recetores de morte celular que pertencem à superfamília TNF (do inglês *tumour necrosis factor*), e encontram-se na superfície da membrana plasmática. Entre estes recetores, destaca-se o FAS, como sendo um dos melhor caracterizados até ao momento [61].

Para o recetor de morte ser ativado é necessária a ligação de um ligando específico ao seu domínio extracelular, que no caso do recetor de morte FAS é o FasL. Em seguida, o domínio intracelular deste recetor vai recrutar proteínas adaptadoras, como a FADD (do inglês, *Fas-associated death domain*), e também proteases, nomeadamente a procaspase-8. Este recrutamento leva à formação de um complexo sinalizador indutor de morte formado pelo recetor, respetivo ligando e proteínas adaptadoras, denominado de DISC (do inglês, *death inducing signaling complex*) [61].

A formação deste complexo conduz à proteólise da procaspase-8, resultando na ativação da caspase-8, que promove a libertação de enzimas ativas no citoplasma,

responsáveis por clivar e ativar caspases efetoras, como a caspase-3 a partir da procaspase-3. Uma vez ativadas, estas caspases efetoras iniciam uma cascata de eventos que leva à apoptose (**figura 1.7**).

A ativação das caspases é regulada negativamente ao nível do recetor pelo FLIP, que bloqueia a ativação da caspase-8 [62].

Existe uma conexão (*crosstalk*) entre estas duas vias de apoptose dada pela proteína Bid da família BCL-2. Esta proteína pode ser clivada pela caspase-8 a tBid que é transportado para a membrana mitocondrial externa, funcionando como um estímulo apoptótico para a libertação do citocromo c na via intrínseca [63].

1.4.2 Necrose

Enquanto que a apoptose é um processo bioquímico altamente controlado, a necrose distingue-se como a morte patológica das células devido a uma lesão celular aguda [54].

Durante algum tempo pensou-se que este processo não era regulado e acontecia de maneira acidental, sendo uma consequência passiva do dano irreparável causado à célula. Para essa associação contribuiu o facto de o processo necrótico conduzir a um rápido inchaço da célula, à rutura da membrana e à consequente libertação do conteúdo celular, devido a causas como pressões mecânicas, hipoxia severa ou temperaturas extremas. Para reforçar esta teoria, este tipo de morte celular surge associado a condições patológicas, incluindo a progressão de tumores, o acidente vascular cerebral (AVC) e distúrbios neurodegenerativos [64].

Contudo, estudos anteriores evidenciaram que a inibição de caspases conduz a processos alternativos de morte celular, incluindo a necrose, afastando assim a ideia de que este mecanismo seria resultado de um acontecimento acidental, mas sim de uma escolha ativa por parte da célula. Desta forma, a necrose apresenta-se como um processo ativo, regulado e controlado, sendo a atividade das proteínas RIP (do inglês, *receptor-interacting protein kinase*) fundamental no controlo deste processo [65].

A ligação a recetores de morte é um dos mecanismos pelos quais as células são marcadas para morrer. Esta ligação resulta na formação de um complexo constituído, entre outros, pelo recetor de morte (RIP) e respetivo ligando, pela caspase-8 e por proteínas adaptadoras (FADD). A proteína RIP é inativada através da clivagem pela caspase-8, sendo que quando não é possível ativar a via das caspases devido à presença

de inibidores, a proteína RIP mantém-se ativa, interagindo com várias enzimas de função bioenergética e aumentando a sua atividade. O aumento do metabolismo celular resulta numa maior quantidade de energia e substrato respiratório para a célula dado pelo aumento da degradação do glicogénio, a principal reserva energética da célula. Este aumento pode provocar a geração de espécies reativas de oxigénio (ROS) que conduz à permeabilização da membrana mitocondrial, e, em última instância, à necrose programada [64].

Assim, quando esta morte é induzida, ocorre a rutura da integridade membranar, com a conseqüente perda das estruturas celulares e aumento do volume dos organelos. Como todo o material intracelular é libertado para o meio extracelular, este tipo de morte pode causar uma resposta inflamatória por parte do sistema imunitário. Devido a estas conseqüências potencialmente perigosas para o ambiente celular, a morte por necrose é geralmente evitada, e apenas ativada quando os outros mecanismos de morte falham [54].

1.4.3 Autofagia

A autofagia é uma via de degradação lisossomal (auto-degradativa) que entrega os constituintes do citoplasma ao lisossoma, sendo essencial para a sobrevivência, diferenciação, desenvolvimento e homeostase do organismo [66, 67].

Este processo é ativado para proteger e adaptar o organismo ao ambiente celular, em resposta a diversas patologias (infecções, cancro, envelhecimento e doenças cardíacas), em condições de *stress* nutricional (hipoxia, falta de energia), ou como resposta ao tratamento com agentes farmacológicos. Contribui também para a remoção de agregados de proteínas, organelos danificados ou microrganismos patogénicos [66].

A autofagia é um processo dinâmico de várias etapas que ocorre no retículo endoplasmático. Um dos principais reguladores deste processo é a cinase TOR (do inglês, *mammalian target of rapamycin*), que funciona como um sinal inibitório, bloqueando o processo autofágico na presença de nutrientes e fatores de crescimento abundantes devido à ligação de moléculas sinalizadoras de classe I PI3K/Akt, que ativam o TOR [67].

Desta forma, o TOR apresenta-se como o principal alvo da rapamicina (indutor de autofagia), que impede a ligação das moléculas sinalizadoras ao TOR, e facilita a sua

interação com proteínas de autofagia (ATG, do inglês, *autophagy-related*), nomeadamente ATG1, possibilitando o início do processo.

Os passos iniciais envolvem a formação (nucleação da vesícula) e a alongação (alongamento da vesícula) de uma membrana de isolamento, chamada de fagóforo (do inglês, *phagophore*). Em seguida, com o preenchimento da vesícula forma-se o autofagossoma, uma vesícula de dupla membrana responsável por sequestrar o material citoplasmático. Este preenchimento é feito através do *input* de vários organelos intracelulares, como o complexo de golgi, o retículo endoplasmático e a membrana plasmática. Por último, dá-se a maturação com a fusão do autofagossoma com um lisossoma, formando-se um autolisossoma onde o material capturado, juntamente com a membrana, é degradado.

O processo autofágico pode assumir um duplo papel para o organismo, podendo funcionar como um supressor ou um promotor de tumores. Por um lado, é capaz de suprimir certas condições patológicas, como a tumorigénese, limitando a necrose e o processo inflamatório resultante, induzindo a paragem do ciclo celular e prevenindo a instabilidade do genoma. Por outro, é um mecanismo de sobrevivência celular, podendo promover resistência a fármacos quimioterapêuticos e ajudar na adaptação das células tumorais ao *stress*. Assim, o papel da autofagia no tumor pode ser específico para o tipo de célula e estadio do mesmo.

Compreender melhor os mecanismos e princípios deste processo pode ajudar a desenvolver novas estratégias para o tratamento do cancro, nomeadamente através de novos métodos que permitam ultrapassar a resistência a fármacos [68].

1.5 Tratamento do cancro

Como já referido anteriormente, o cancro é um grupo de doenças que resultam da acumulação de sucessivas alterações genéticas e epigenéticas, promovendo uma resistência aos mecanismos de morte celular, a proliferação celular descontrolada, a indução de metástases, a angiogénese e a desregulação do sistema imunológico.

Atualmente são utilizadas diferentes estratégias para combater o desenvolvimento do cancro, entre as quais se destacam a cirurgia, a radioterapia ou a quimioterapia. O tipo de tratamento a ser utilizado depende do tipo de cancro, da sua localização, e da fase em que se encontra, sendo que, também é preciso ter em conta o estado de

saúde e preferência do paciente antes de iniciar o tratamento. Estas estratégias podem ser utilizadas isoladamente, ou em conjunto, com o objetivo de remover a massa tumoral e diminuir a possibilidade de invasão e formação de metástases [69].

Em fases iniciais de desenvolvimento tumoral, recorre-se maioritariamente à cirurgia com vista a remover a massa tumoral. A radioterapia é mais utilizada no tratamento de tumores sólidos, enquanto que a quimioterapia é principalmente empregue quando o paciente já exibe um quadro de metastização.

Tanto a radioterapia, como a quimioterapia são bastante utilizadas em conjugação com a cirurgia, podendo estas serem neoadjuvantes ou adjuvantes, quando aplicadas antes ou depois da cirurgia, respetivamente. Com a terapia neoadjuvante pretende-se reduzir o tamanho do tumor, antes de se proceder à sua remoção por cirurgia, enquanto que, a terapia adjuvante tem como objetivo diminuir o risco de reaparecimento do tumor após a sua remoção por cirurgia [70, 71].

Devido à constante necessidade de melhorar os tratamentos atuais e reduzir os efeitos secundários decorrentes, têm sido estudadas novas abordagens promissoras como a hipertermia, recorrendo ao uso de nanopartículas para aumentar a especificidade para o local do tumor e a imunoterapia [72].

Para desenvolver terapias mais eficazes contra o cancro é necessária uma melhor compreensão do desenvolvimento e disseminação do tumor. O cancro é uma doença muito complexa sendo essa complexidade parcialmente devida ao grande nível de heterogeneidade que existe dentro massa tumoral.

1.5.1 Quimioterapia

A quimioterapia envolve o uso de fármacos de baixo peso molecular com o objetivo de destruir as células tumorais, ou pelo menos limitar a sua proliferação. O tipo de fármaco utilizado depende do tipo de patologia que se pretende tratar, e o modo de administração ao paciente pode variar consoante as propriedades do fármaco *in vivo* podendo ser por via oral, intravenosa ou intramuscular [73].

Estes fármacos intervêm geralmente ao nível da síntese e sistemas de reparação do DNA, induzindo a paragem do ciclo celular (*checkpoints*), e promovendo mecanismos de morte celular como a apoptose. É sabido que uma das características principais das células tumorais é a resistência que apresentam à sinalização das vias de morte celular, pelo que uma melhor compreensão da forma de como a célula ultrapassa este balanço

entre sobreviver ou morrer, decidindo pelo caminho da morte celular pode ajudar a potencializar o efeito de matar as células tumorais através da quimioterapia genotóxica [74].

Outro mecanismo pelo qual estes fármacos podem atuar é bloqueando o fornecimento de nutrientes e sangue para as células tumorais, através da interferência com vias de biossíntese. Como as células cancerígenas são bastante ativas ao nível da divisão, vias de sinalização de crescimento e proliferação em comparação com as células normais, replicam o DNA com maior frequência, sendo por isso mais suscetíveis a este tipo de fármacos [73].

1.5.1.1 Fármacos utilizados na quimioterapia

Existem vários tipos de substâncias químicas utilizadas no tratamento do cancro, que variam no seu alvo biológico e mecanismos de ação. Desta forma, os agentes quimioterapêuticos são divididos em 3 grandes grupos: agentes genotóxicos, antimetabolitos e inibidores do fuso mitótico [75].

Por sua vez os agentes genotóxicos, que são agentes que interagem direta ou indiretamente com o DNA, produzindo danos e afetando enzimas envolvidas na sua replicação e transcrição, são o grupo mais importante dos 3 mencionados, e encontram-se subdivididos de acordo com o seu modo de interação com o DNA. Deste subgrupo fazem parte: a) agentes alquilantes, que contêm grupos alquilo que vão substituir um átomo de hidrogénio, normalmente por guaninas na molécula de DNA, modificando as bases do mesmo, e interferindo na replicação e transcrição. Estes agentes provocam a ligação cruzada (*cross-linking*) de átomos no DNA, impedindo a separação das cadeias para a síntese e promovendo a ocorrência de *base mispairing*, emparelhamento incorreto de bases (ex: cisplatina, ciclofosfamida, melfalano, mitomicina C e temozolomida); b) agentes intercalantes, que se ligam nas *grooves* da hélice do DNA, entre pares de bases, interferindo com a atividade da polimerase durante a replicação ou transcrição (ex: epirubicina e doxorubicina); c) inibidores enzimáticos, nomeadamente inibidores de topoisomerasas, que estão envolvidas na clivagem e no empacotamento do DNA durante a sua replicação e transcrição. A utilização deste tipo de agentes genotóxicos acarreta riscos, porque as suas propriedades mutagénicas tornam estes agentes

potencialmente cancerígenos, o que aumenta a possibilidade de desenvolvimento de um tumor secundário, como a leucemia (ex: etoposido, topotecano e irinotecano) [75, 76].

Os antimetabolitos são tipos de fármacos com uma estrutura bioquímica semelhante a metabolitos endógenos necessários para a normal atividade das células. Devido à semelhança estrutural, o antimetabolito vai inibir o metabolito correspondente por competição, alterando assim o metabolismo celular, pois embora seja reconhecido pelo organismo, o antimetabolito não tem a capacidade de manter a função normal do metabolito. Entre estes fármacos destacam-se os: a) antagonistas de folato, que inibem a di-hidrofolato redutase (DHFR), uma enzima envolvida no metabolismo dos nucleótidos. O fármaco entra na célula através do transportador de folato e liga-se reversivelmente à DHFR, reduzindo a quantidade de DHFR disponível para redução dos precursores de tetra-hidrofolato, como o ácido fólico (ex: metotrexato); b) antagonistas de pirimidinas, que são incorporados no DNA recém sintetizado, bloqueando a formação de citosinas e timinas, e conseqüentemente o crescimento celular (ex: 5-flúorouracil, gemcitabina e arabinosilcitosina); c) antagonistas de purinas, que inibem a síntese de adeninas e guaninas (ex: aciclovir, 6-mercaptopurina e 6-tioguanina).

Por último, existem os inibidores do fuso mitótico que atuam ao nível da mitose. Estes afetam a formação e função das fibras do microtúbulo do fuso necessárias para o alinhamento dos cromossomas, ao mesmo tempo impedem a polimerização de monómeros de tubulina (ex: alcalóides da vinca derivados de plantas, o paclitaxel e o docetaxel) [76].

1.5.1.2 Problemas decorrentes da quimioterapia atual

A maior parte dos fármacos anticancerígenos utilizados atualmente na quimioterapia têm propriedades farmacêuticas e farmacológicas que os tornam pouco eficazes [77].

Características como a baixa solubilidade em água, pouca estabilidade, rápido metabolismo e a distribuição não seletiva para o local pretendido podem levar à diminuição da eficácia do tratamento devido à baixa biodisponibilidade do fármaco no local de ação, ao mesmo tempo que aumentam os efeitos secundários. O aparecimento de efeitos secundários deve-se à pouca especificidade do fármaco e à necessidade de

aumentar a dose administrada pela sua rápida metabolização, provocando também a morte de células saudáveis.

Os efeitos secundários podem manifestar-se a curto prazo no decorrer do tratamento, ou a longo prazo, podendo manifestar-se após o término do tratamento. Entre os efeitos a curto prazo estão a fadiga extrema, perda de cabelo, perda de apetite, náuseas, lesões no trato gastrointestinal, entre outros, sendo que a longo prazo podem aparecer insuficiências cardíacas, aumento do peso, menopausa prematura ou infertilidade e também leucemia [78].

Com vista a resolver estes problemas têm sido desenvolvidos sistemas de entrega de fármacos, nomeadamente com a utilização de lipossomas e nanopartículas, que permitem aumentar a especificidade e o tempo de semi-vida em circulação, diminuindo os efeitos secundários e melhorando a eficácia em termos clínicos [77, 79].

Contudo, o principal problema relacionado com a quimioterapia prende-se com a aquisição de resistência por parte das células tumorais aos fármacos utilizados, o que contribui para a falha do tratamento. Em muitos casos, numa primeira fase, os pacientes começam por responder bem ao tratamento, verificando-se uma diminuição da massa tumoral, mas com o decorrer do tempo começa a existir uma perda na resposta, o que conduz a uma recidiva do tumor, precisamente pelas células tumorais adquirirem resistência após a exposição ao fármaco. A quantidade de fármaco administrada e o crescente aparecimento de alterações genéticas e epigenéticas características de um tumor contribuem para o desenvolvimento dessa resistência, num fenómeno onde estão implicadas proteínas transportadoras na membrana celular que alteram o transporte dos fármacos para fora das células tumorais [75].

Para tentar contornar este problema tem sido estudada a possibilidade de conjugar diferentes fármacos com mecanismos de ação distintos, permitindo aumentar a dose administrada e reduzir o intervalo entre os ciclos de tratamento.

Devido a todos estes problemas mencionados e com o esperado aumento do número de casos de cancro nos próximos anos, têm sido feitos esforços na tentativa de desenvolver novos agentes quimioterapêuticos que melhorem a eficácia do tratamento e a qualidade de vida do paciente [80].

1.5.1.3 Complexos metálicos no tratamento do cancro

Ao longo dos últimos anos tem havido um crescimento no desenvolvimento, caracterização e utilização de compostos metálicos em ensaios *in vitro* com vista a substituir os compostos utilizados atualmente na quimioterapia. O objetivo é aumentar a citotoxicidade para as células tumorais, ao mesmo tempo que se pretende reduzir os efeitos colaterais para o paciente e a resistência adquirida por parte das células tumorais, sendo as propriedades físico químicas destes complexos metálicos potencialmente promissoras para obter esse fim [81].

Os complexos metálicos têm a vantagem de poderem apresentar uma diversidade estrutural dada por diferentes modos de coordenação, troca de ligandos, atividade redox e propriedades catalíticas que permitem uma reatividade contra substratos orgânicos.

Este interesse em compostos inorgânicos à base de metais começou com a descoberta da cisplatina e da sua capacidade de induzir a morte celular de células tumorais na década de 60, tendo a sua aprovação para uso clínico pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) acontecido em 1978. A cisplatina é um composto inorgânico (ou de coordenação), de geometria quadrangular planar, que contém um átomo central de platina rodeado por dois átomos de cloro e dois grupos NH_3 . Este composto mostrou um elevado potencial anticancerígeno numa variedade de tumores, provocando lesões ao nível do DNA de células tumorais, através da formação de adutos, que provocam a inibição da síntese e reparação de DNA, bloqueando a progressão do ciclo celular. A paragem do ciclo celular vai ativar a sinalização das vias de morte celular, induzindo maioritariamente apoptose, mas também necrose [82].

No entanto, o facto da cisplatina apresentar alguma citotoxicidade para células saudáveis pela baixa especificidade, existindo também em alguns casos, resistência das células tumorais ao fármaco, adquirida ou intrínseca, e a descoberta do mecanismo de ação da cisplatina desencadearam a procura e síntese de um grande número de análogos de cisplatina, como a carboplatina, oxaliplatina, nedaplatina, heptaplatina, entre outros, na tentativa de se desenvolver uma terapia baseada em compostos de platina mais segura e eficaz [82].

Nos dias de hoje, estes compostos são largamente utilizados na quimioterapia, mas apesar de todos os esforços para o desenvolvimento de terapias mais eficazes, o cancro continua a ser uma das principais causas de morte em todo o mundo.

Desta forma, a procura por compostos à base de metais permanece em crescente, tendo sido desenvolvidos nos últimos anos compostos com centro metálico de ruténio (Ru), prata (Ag), cobalto (Co), estanho (Sn), titânio (Ti) e cobre (Cu), enfatizando a relevância clínica dos compostos de metais de transição. Assim, com o explorar de novos mecanismos de ação espera-se conseguir ultrapassar a resistência adquirida a fármacos de platina por parte das células tumorais e aumentar a seletividade para o alvo biomolecular [80, 81, 83].

1.5.1.4 Complexos de cobre(I) como potenciais agentes quimioterapêuticos

Nos dias de hoje, devido a alguns problemas existentes com a quimioterapia atual e com os compostos utilizados na mesma, tem sido cada vez mais crescente a procura e o desenvolvimento de complexos de coordenação metálicos que possam vir a ser utilizados no tratamento do cancro. Entre estes complexos destacam-se os de cobre, que pelo facto de ser um metal endógeno, pensa-se que é menos tóxico para o organismo [84].

O cobre é um micronutriente essencial que tem a capacidade de adotar dois estados redox diferentes, Cu(I) e Cu(II), em meio fisiológico, funcionando como um cofator catalítico responsável pela ativação de muitas metaloenzimas e metaloproteínas importantes, que intervêm numa variedade de processos biológicos essenciais para a manutenção da vida, como é o caso da sinalização celular, síntese de ATP, o transporte de ferro, proteção contra o *stress* oxidativo, entre outros [85]. Este metal de transição também pode estar envolvido em processos de monitorização relacionados com a progressão do cancro, nomeadamente o aparecimento da angiogénese e formação de metástases [86].

Na superfície das células existem transportadores específicos para os iões de Cu(I), como o CTR1 (do inglês, *High affinity copper uptake protein 1*), pelo que, antes de entrar para dentro das células, o Cu(II) tem que ser reduzido a Cu(I) por metaloredutases que existem na sua superfície. O cobre é potencialmente tóxico, sendo a sua homeostase cuidadosamente regulada por um sistema de transportadores de proteínas [87, 88]. A homeostase modificada do cobre está associada ao desenvolvimento de algumas patologias e doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer e o Parkinson [89].

O déficit de cobre no organismo prejudica o seu normal funcionamento, através de uma diminuição na produção de energia, alterações no metabolismo da glicose e colesterol, aumento do dano oxidativo e dos níveis de ferro teciduais, processamento anormal de neuropéptidos, entre outros. Por outro lado, o aumento do nível de cobre está diretamente relacionado com vários distúrbios como a doença de Wilson ou a doença de Menkes [90, 91].

A suposição de que este metal é menos tóxico para o organismo por ser endógeno, permitindo reduzir a toxicidade para as células saudáveis e os efeitos secundários resultantes, levou ao desenvolvimento de uma nova geração de compostos de coordenação com o cobre no seu centro metálico. As propriedades destes compostos são em grande parte determinadas pela natureza dos ligandos e átomos doadores coordenados ao centro metálico, tendo sido já sintetizados compostos de cobre com fosfanos, imidazóis, tiossemicarbazonas e carbenos que mostraram atividade anticancerígena, pela elevada toxicidade que apresentam para as células tumorais. Ao mesmo tempo são também menos agressivos para as células saudáveis do que os compostos utilizados atualmente na quimioterapia, como é o caso, dos fármacos feitos à base de platina [92].

A maior parte dos complexos de cobre desenvolvidos são na forma de Cu(II) [93] devido à enorme dificuldade que existe em estabilizar a forma Cu(I), que reage facilmente com o ar, sendo oxidado a Cu(II). No entanto, já existem estudos publicados com complexos de coordenação de Cu(I) que mostraram enorme potencial [94].

Embora os mecanismos de ação do cobre nas células tumorais ainda não estejam completamente elucidados, resultados publicados demonstram que os compostos de cobre têm a capacidade de induzir apoptose e outras formas de morte celular, como necrose e autofagia; causar *stress* oxidativo; e inibir a atividade proteossomal [84].

A propensão do cobre em formar radicais livres de oxigénio (ROS), causando *stress* oxidativo nas células advém da capacidade dos iões de Cu(I) livres reagirem com o peróxido de hidrogénio (H₂O₂), um subproduto do metabolismo do oxigénio, formando o radical hidroxilo (HO), numa reação conhecida como reação de Fenton [84]. Na maior parte dos casos, o H₂O₂ resultante do metabolismo do oxigénio em concentrações da ordem dos µM é relativamente inofensivo, pois existem enzimas específicas que facilitam a sua remoção. No entanto, perante certos metais, como o cobre, a presença de H₂O₂ pode levar à reação de Fenton, gerando o radical HO, que de

entre todos os radicais livres formados nas células é o mais potente, podendo danificar as células através da oxidação não seletiva de proteínas, lípidos e ácidos nucleicos [89].

Também já foi demonstrado que os complexos de Cu(I) são capazes de superar a resistência à cisplatina, explorando diferentes mecanismos de ação, num processo em que os transportadores de cobre assumem um papel importante. Estes complexos modulam a homeostase do cobre através destes transportadores, nomeadamente o CTR1, que representa uma importante via para a entrada de fármacos feitos à base de platina na célula, sensibilizando novamente as células cancerígenas para estas drogas [95].

Desta forma, é de extrema importância entender melhor as propriedades químicas que o cobre apresenta, os mecanismos biológicos em que intervém e o modo como a sua homeostase é alcançada, nomeadamente ao nível dos seus transportadores para que no futuro se possam desenvolver fármacos anticancerígenos à base de cobre mais eficazes do que os atuais.

OBJETIVOS

2. OBJECTIVOS

Tendo em conta a necessidade cada vez maior em se desenvolver terapias mais eficazes para o flagelo que é o cancro, devido aos fatores mencionados no capítulo 1, o trabalho desenvolvido ao longo desta tese vai ter como objetivo explorar o potencial citotóxico e o mecanismo de ação de 4 compostos metálicos de Cu(I) em diferentes linhas celulares tumorais, com vista a que no futuro possam substituir os compostos utilizados na quimioterapia atual.

Para tal, em primeiro lugar será selecionada a linha tumoral mais sensível a estes compostos recorrendo a ensaios de citotoxicidade, e em seguida serão feitos vários ensaios biológicos na linha celular escolhida.

Os ensaios biológicos servirão para avaliar a via de morte celular preferencialmente ativada pelos compostos (apoptose, autofagia ou necrose), avaliar o seu potencial citostático, através da sua capacidade em interferir com o ciclo celular, analisar a interação dos compostos com o DNA para verificar se os mesmos conseguem chegar ao núcleo da célula, e por último para perceber quais as vias celulares maioritariamente afetadas por estes compostos será feita uma análise proteómica.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS e MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Anexina V-FITC (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA)

Culturas de células tumorais (A2780, HCT116, HCT116 resistentes à Doxorubicina, MCF-7) e normais (Fibroblastos)

Citómetro de fluxo (Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer, Invitrogen, Carlsbad, California, EUA)

Compostos de cobre(I) – JL7, JL10, JL12 e JL14 (Centro de Química Estrutural da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa)

CYTO-ID® Autophagy Detection Kit (Enzo Life Sciences, Reino Unido)

DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA)

Doxorrubicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA)

Espectrofotómetro (Shimadzu UVmini-1240, Quioto, Japão)

Estufa de CO₂ (SANYO CO₂ Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão)

Frascos T25 cm² e T75 cm² (SPL Life Sciences, Coreia do Sul)

H₂DCF-DA (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, California, EUA)

Hemocitómetro (Hirschmann, Eberstadt, Alemanha)

Hoechst 33258 (Molecular Probes®, Invitrogen, Carlsbad, California, EUA)

Iodeto de propideo (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA)

JC-1 (Abnova Corporation, Walnut, California, EUA)

Kit de MTS (Promega, Madison, EUA)

Kit ECL (Advansta, EUA)

Kit para quantificação de proteína - método de Pierce (Thermo Scientific, MA, EUA)

Leitor de microplacas (Infinite® M200, Tecan, Suíça)

Meio DMEM e RPMI (Gibco™, Invitrogen, Carlsbad, California, EUA)

Membrana PVDF (GE Healthcare, Life Sciences, Coreia do Sul)

Microscópio ótico invertido (Nikon TMS, Nikon Instruments, Tóquio, Japão)

Paraformaldeído (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA)

Placas de 6, 24 e 96 poços (SPL Life Sciences, Coreia do Sul)

TrypLE™ (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA)

Trypan Blue (Gibco™, Invitrogen, Carlsbad, California, EUA)

2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare, Reino Unido)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Compostos em estudo

Estes compostos foram sintetizados e caracterizados pela Doutora Tânia Morais, no Centro de Química Estrutural da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa [94]. Os complexos metálicos contêm o íon Cu(I), com uma fosfina bidentada, e têm a fórmula geral $[\text{Cu}(\text{dppe})(\text{NN})][\text{BF}_4]$, sendo cada um deles constituídos por diferentes ligandos, onde NN = ligandos NN-heteroaromáticos, como é possível observar na **figura 3.1**.

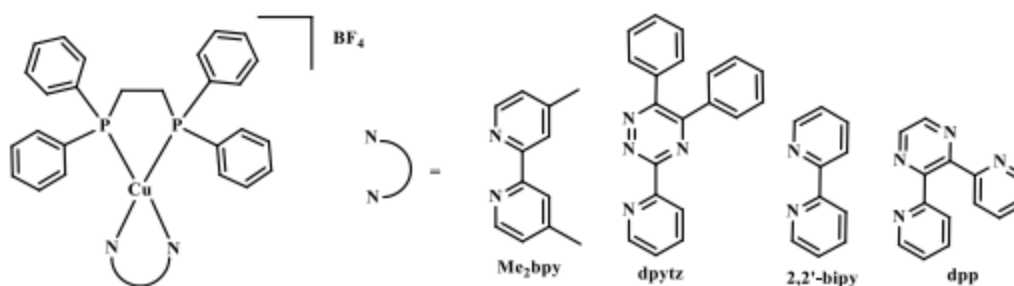


Figura 3.1- Estrutura dos complexos metálicos de cobre(I), de fórmula geral $[\text{Cu}(\text{dppe})(\text{NN})][\text{BF}_4]$, onde NN = Me₂bpy, dpytz, 2,2'-bipy ou dpp, respetivamente

As diferentes características e propriedades dos compostos em estudo encontram-se descritas na **tabela 3.1**. Os compostos no estado sólido foram armazenados à temperatura ambiente e protegidos da luz por precaução.

3.2.1.1 Solubilidade e estabilidade dos compostos em diferentes solventes

Com o objetivo de se perceber qual a melhor solução ou meio orgânico e aquoso para dissolver os compostos, bem como a melhor forma de armazenamento dos mesmos, foi estudada por espectroscopia de UV-Visível (espectrofotómetro Shimadzu UVmini-1240, Quioto, Japão) a estabilidade dos compostos em diferentes soluções (DMSO, PBS e DMEM). Esta estabilidade é dada pelo aparecimento ou não de variações em bandas características ao longo do tempo.

As medições foram efetuadas numa gama de comprimentos de onda de 250 a 700 nm e foi utilizada uma cuvette de quartzo com um percurso ótico de 1 cm.

A concentração de composto utilizada foi de 25 μM e os espectros foram obtidos para diferentes tempos de incubação (0h, 24h, 48h e 72h). O armazenamento durante o período de incubação foi realizado a 4°C.

Tabela 3.1 Propriedades dos compostos utilizados, assim como dos respectivos ligandos. (Nome, Fórmula Química, Massa Molar (g/mol) e Solvente).

	Nome	Formula Química	Massa Molar (g/mol)	Solvente
Compostos utilizados	JL7	[Cu(dppe)(dptyz)][BF ₄]	835,05	DMSO
	JL10	[Cu(dppe)(dpp)][BF ₄]	783,02	DMSO
	JL12	[Cu(dppe)(bipy)][BF ₄]	704,95	DMSO
	JL14	[Cu(dppe)(Me2bpy)][BF ₄]	704,95	DMSO
Composto de partida	CP	[Cu(dppe)(NCCH ₃) ₂][BF ₄]	630,80	DMSO
Ligandos	Dptyz	3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina	310,35	DMSO
	Dpp	2,3-bis(2-piridil)pirazina	234,26	DMSO
	Bipy	2,2'-bipy	156,18	DMSO
	Me2bpy	4,4'-dimetil-2,2'-dipiridil	184,24	DMSO

Na impossibilidade de dissolver os compostos em água, devido à sua baixa solubilidade, estes foram dissolvidos em DMSO (dimetilsulfóxido - (CH₃)₂SO, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

O DMSO é um solvente orgânico com propriedades polares e apróticas, e sendo de natureza anfipática, consegue solubilizar uma vasta gama de fármacos e compostos de natureza hidrofóbica, apresentando ainda pontos de ebulição e temperatura de solidificação relativamente altos [96, 97].

Desta forma, para todos os ensaios biológicos realizados foram preparadas soluções stock de fresco em DMSO para cada composto em estudo. Por uma questão de minimizar a toxicidade celular inerente ao DMSO, antes da adição dos compostos nas células, foram realizadas diluições seriadas em meio completo partindo da solução stock (100% DMSO (v/v)) até se atingir a concentração de composto pretendida, de modo a que a concentração de DMSO presente em cada ensaio biológico seja de 0,1% (v/v).

3.2.2 Linhas celulares humanas

3.2.2.1 Características

Ao longo do presente estudo foi avaliado o potencial citotóxico destes 4 compostos de cobre(I) em várias linhagens de células tumorais humanas. Entre elas estão células HCT116 (linha celular proveniente de um carcinoma colorectal), células HCT116 resistentes à doxorubicina, criadas nas condições referidas em [79] (linha celular proveniente de um carcinoma colorectal com resistência à doxorubicina), células A2780 (linha celular proveniente de um carcinoma de ovário) e células MCF-7 (linha celular proveniente de um carcinoma de mama).

Com o objetivo de se avaliar a toxicidade que estes compostos possam apresentar em células humanas não tumorais recorreu-se a uma linha celular primária de fibroblastos da derme humana. Todas as linhas celulares estudadas, à exceção das HCT 116 resistentes à doxorubicina, provêm do ATCC (*American Type Culture Collection*). As suas características encontram-se resumidas na **tabela 3.2**.

Tabela 3.2 – Características das linhas celulares estudadas (origem, morfologia e meio de cultura utilizado). DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Invitrogen, Nova Iorque, EUA); RPMI – *Roswell Park Memorial Institute medium* (Invitrogen, Nova Iorque, EUA); FBS – Soro Fetal Bovino (Invitrogen, Nova Iorque, EUA); Pen/Strep – Penicilina/ Estreptomicina (antibiótico) (Invitrogen, Nova Iorque, EUA); MEM – *non-essential amino acid* (Sigma, St. Louis Missouri, EUA).

Linha Celular	Origem	Morfologia	Meio de cultura %(V/V)
HCT116	Carcinoma colorectal	Epitelial	DMEM, FBS 10%, Pen/Strep 1%
HCT116 resistentes	Carcinoma colorectal	Epitelial	DMEM, FBS 10%, Pen/Strep 1%, 3.6µM Dox
A2780	Carcinoma de ovário	Epitelial	RPMI, FBS 10%, Pen/Strep 1%
MCF-7	Carcinoma de mama	Epitelial	DMEM, FBS 10%, Pen/Strep 1%;
Fibroblastos	Derme humana	Fusifformes	DMEM, FBS 10%, Pen/Strep 1%

3.2.2.2 Manutenção das culturas celulares

As linhas celulares utilizadas foram cultivadas em meio de cultura (DMEM ou RPMI) suplementado com 10 % (v/v) FBS e 1 % (v/v) solução antibiótica Pen/Strep (penicilina a 10000 U/mL e estreptomicina a 10000 µg/mL) como está indicado na **tabela 2.2**. Os meios suplementados são designados de meio completo.

Cada linha celular foi crescida em frascos de cultura de 25 cm² (SPL Life Sciences, Coreia do Sul). As culturas foram incubadas numa estufa de CO₂ (SANYO CO₂ Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ e 99 % (v/v) de humidade relativa, até atingirem uma confluência de cerca de 80%. A confluência foi avaliada recorrendo-se ao microscópio ótico invertido (Nikon TMS, Nikon Instruments, Tóquio, Japão). Quando esta confluência é atingida é realizada uma nova subcultura, para evitar a inibição do crescimento celular por contacto e garantir a presença de todos os nutrientes necessários para o crescimento exponencial das culturas. A concentração de células semeada foi realizada de maneira a que essa confluência demore aproximadamente uma semana a ser obtida.

Para a realização de uma nova subcultura, em primeiro lugar, é retirado o meio onde as células estavam a crescer, sendo as células destacadas do fundo do frasco através da adição de 2 ml de tripsina (TrypLETM Express, Invitrogen), ficando a incubar cerca de 5 min numa estufa de CO₂ (SANYO CO₂ Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ e 99 % (v/v) de humidade relativa. Esta tripsina encontra-se modificada geneticamente, sendo menos agressiva para as células e tornando a dissociação das células das paredes do frasco mais eficaz. Esta enzima peptidase vai clivar proteínas membranares na superfície da célula, entre dois resíduos de aminoácidos específicos, responsáveis pela coesão e adesão das células ao fundo do frasco.

Após a incubação de 5 min na estufa, é adicionado 1 ml de meio de cultura completo para inibir a ação da tripsina. De seguida, a suspensão celular é transferida para um falcon de 15 ml (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) e centrifugada a 300 x g, 15°C, durante 5 minutos (Sigma 3-16K 10280, Tuttlingen, Alemanha). Terminada a centrifugação, o sobrenadante é descartado e o sedimento de células ressuspenso em 1 ml de meio completo.

A contagem das células foi realizada através do método de exclusão com *Trypan blue* (Sigma-Aldrich). É feita uma diluição da suspensão celular de 1:10, com a adição de 350 µL de meio completo, 50 µL da suspensão celular e 100 µL de *Trypan blue* 0,4% (v/v), sendo as células contadas ao hemocitômetro (Hirschmann, Eberstadt, Alemanha). Utilizando este método, são apenas contabilizadas as células viáveis, pois o *Trypan blue* é um corante com a capacidade de marcar células que apresentem a sua membrana celular comprometida, ou seja, as células não viáveis vão ficar azuis no seu interior, pois permitem a entrada do corante.

O cálculo do número de células por ml é feito de acordo com a **equação 2.1**, multiplicando o número de células viáveis contadas pelo volume do hemocitômetro (10^4 ml^{-1}) e pelo fator de diluição utilizado (10) e dividindo o valor obtido pelo número de quadrantes utilizados para a contagem.

Equação 3.1

$$n^\circ \text{ células/ml} = \frac{n^\circ \text{ células viáveis contadas} \times 10^4 \times 10}{n^\circ \text{ de quadrantes contabilizados}}$$

Através desta fórmula, é possível estimar o volume de suspensão celular a transferir para um novo frasco de cultura de 25 cm² em 5 ml de meio completo, procedendo-se assim à realização de uma nova subcultura.

Por último, as células foram incubadas numa atmosfera controlada a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ e 99 % (v/v) humidade relativa. A concentração de células semeada foi feita de maneira a que as mesmas demorem cerca de uma semana a atingirem 80% de confluência e ser necessária a realização de uma nova subcultura.

3.2.3 Ensaios de viabilidade celular

Com o objetivo de estudar a atividade antiproliferativa dos compostos em estudo em linhas celulares humanas, tumorais e não tumorais, foram feitos ensaios de MTS, onde a viabilidade celular é avaliada de forma indireta.

Para a realização deste ensaio é utilizado um *Kit CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, Madison, EUA) que é composto por dois reagentes, o MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio] e o PES (etossulfato de fenazina).

Este método baseia-se no princípio de que nas células viáveis, o reagente de MTS, de coloração amarela, vai ser reduzido pelo PES, levando à formação de formazano na mitocôndria. Esta substância apresenta uma coloração acastanhada e absorve a 490 nm, podendo ser quantificada a sua produção através da medição da absorvância nesse comprimento de onda. Esse valor será diretamente proporcional ao metabolismo mitocondrial, sendo em seguida transposto para viabilidade celular (método indireto) [98].

Para este ensaio, as células são semeadas em placas de 96 poços (SPL Life Sciences) com uma densidade celular de $0,75 \times 10^5$ por ml, num volume final por poço de 100 μL ($0,75 \times 10^4$ células por poço). A placa é deixada a incubar na estufa de CO_2 numa atmosfera controlada a 37 °C, 5 % (v/v) CO_2 e 99 % (v/v) humidade relativa durante 24 horas para permitir que as células adiram ao fundo dos poços. Após esse tempo de incubação, o meio em que as células se encontravam é substituído por meio completo contendo os compostos em estudo.

Foram testadas diferentes concentrações de composto para as diferentes linhas celulares (A2789, MCF-7, HCT116, HCT116 resistentes e fibroblastos), tendo estas concentrações sido calculadas de maneira a que a percentagem de DMSO presente em cada poço seja no máximo 0,1% (v/v). Para todos os ensaios foram realizados controlos negativos (meio completo sem células; e meio contendo DMSO numa percentagem correspondente a cada concentração de composto testada), e um controlo positivo (0,4 μM de doxorubicina).

Em seguida, as células com os compostos ficaram a incubar 48 horas na estufa, nas mesmas condições descritas anteriormente. Por fim, o meio foi descartado e substituído por 20 μL do reagente de MTS fornecido pelo *Kit* + 80 μL de meio completo. Após 1 hora de incubação na estufa de CO_2 , a absorvância a 490 nm foi medida num leitor de microplacas (Infinite® M200, Tecan, Suíça).

Foi ainda preparada outra placa sem células, apenas para verificar se os compostos interagem com o reagente de MTS. Nesta placa, os compostos dissolvidos em meio completo foram adicionados e ficaram a incubar 48 horas na estufa de CO_2 . Ao fim desse tempo, foram transferidos 80 μL da solução de composto para os poços do lado, onde em seguida foi adicionado 20 μL do reagente de MTS fornecido pelo *Kit*. O restante meio que ficou nos poços iniciais foi descartado e adicionado 20 μL do reagente de MTS fornecido pelo *Kit* + 80 μL de meio completo, de modo a se medir o composto vestigial que ficou na placa. Após incubação de 1 hora na estufa, procedeu-se

à leitura da absorvância a 490 nm leitor de microplacas (Infinite® M200, Tecan, Suíça). Através da diferença entre os dois valores é possível perceber se existe interação entre os compostos e o reagente de MTS. Caso sejam semelhantes, não existe interação.

A viabilidade celular é calculada de acordo com a **equação 3.2**.

Equação 3.2

$$\begin{aligned} & \text{Viabilidade celular (\%)} \\ &= \frac{\text{Abs amostra (490nm)} - \text{Abs composto vestigial (490nm)}}{\text{Abs DMSO (490nm)} - \text{Abs meio completo sem células (490nm)}} \times 100 \end{aligned}$$

3.2.4 Potencial Apoptótico

3.2.4.1 Marcação com Hoechst 33258

Para avaliar a capacidade dos compostos em estudo de induzirem morte celular por apoptose recorreu-se à microscopia de fluorescência, onde se utilizou uma sonda fluorescente Hoechst 33258 (*Phenol,4-[5-(4-methyl-1-piperaziny)]-[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-yl]-trihydrochloride 23491-45-4*) (Invitrogen) para marcar as células. Esta sonda apresenta um comprimento de onda de excitação de 352 nm e de emissão de 461 nm e possibilita o reconhecimento de células em apoptose [99].

Este ensaio foi realizado na linha celular tumoral HCT116, sendo as células semeadas em placas de 24 poços (SPL Life Sciences) a uma densidade celular de $0,75 \times 10^5$ por ml. De modo a conseguirem aderir aos poços ficaram a incubar 24 horas numa estufa a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ e 99 % (v/v) humidade relativa. Ao fim desse tempo, o meio em que as células se encontravam foi substituído pelo IC₅₀ dos compostos em meio completo. Para todos os ensaios foram realizados controlos com células não marcadas (apenas meio completo), células não tratadas (meio completo + sonda fluorescente), e um controlo negativo em 0,1% (v/v) de DMSO.

Decorridas 48 horas de incubação na estufa de CO₂, nas mesmas condições referidas anteriormente, o meio de cultura foi descartado e as células foram fixadas com paraformaldeído 4 % (v/v) (Sigma-Aldrich) e incubadas durante 15 min à temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas três vezes em 300 µL de PBS 1x (do inglês, *Phosphate Buffer Saline*) e adicionou-se 5µg/ml de Hoechst 33258 em PBS 1x. As

células ficaram a incubar 20 minutos, à temperatura ambiente e na ausência de luz para possibilitar a marcação das células por parte da sonda. Depois a solução de Hoechst 33258 é retirada, sendo as células lavadas novamente três vezes em 300 µL de PBS 1x, e deixadas neste reagente para serem observadas e fotografadas no microscópio de fluorescência invertido (Nikon Eclipse Ti, Nikon Instruments, Tóquio, Japão).

As fotografias foram tiradas com a câmara digital Nikon D5-Qi1Mc (Nikon Instruments), e as imagens obtidas através do *software* NISElements BR (Nikon Instruments).

3.2.4.2 Marcação com Anexina V-FITC e IP

Neste ensaio é realizada uma dupla marcação das células com Anexina V-FITC e IP (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Invitrogen), que permite fazer a distinção e quantificar o número de células viáveis, células em apoptose inicial e tardia e células que entraram em necrose recorrendo à citometria de fluxo. A anexina V-FITC apresenta um comprimento de onda de excitação de fluorescência a 494 nm e um máximo de emissão a 518 nm, enquanto que o IP tem um comprimento de onda máximo de excitação e emissão a 535 e 617 nm, respetivamente.

Este estudo foi realizado na linha tumoral HCT116, tendo as células sido cultivadas em placas de 6 poços (SPL Life Sciences) a uma densidade de 1×10^5 células/ml, durante 24 horas numa estufa a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ e 99 % (v/v) humidade relativa para aderirem à placa. Decorrido esse tempo, o meio foi removido, e procedeu-se ao estímulo das células através da adição de meio completo contendo o IC₅₀ dos compostos em estudo, 0,1% (v/v) de DMSO ou 0,4 µM de doxorrubicina durante 48 horas. O DMSO e a doxorrubicina funcionaram como controlo negativo e positivo, respetivamente, tendo ainda sido feitos controlos com células não marcadas, células marcadas com as duas sondas e células marcadas apenas com uma das sondas.

Após esse tempo, o meio foi removido e foi adicionado 1 ml de tripsina para destacar as células, durante 5 min a 37°C. Em seguida, a ação da tripsina foi inibida com a adição de 500 µL de meio completo e a suspensão celular transferida para um tubo *ependorf*, onde foi centrifugada a 300 x g, 5 minutos, a 15°C (Sigma 3-16K 10280). O sobrenadante é descartado e o sedimento ressuspendido em 1 ml de PBS 1x para lavagem. Realiza-se uma nova centrifugação, desta feita a 800 g, 5 minutos, a 15° (Centrifuge 5424 R, Eppendorf, Alemanha), sendo o sobrenadante novamente

descartado e o sedimento ressuspensionado em 100 μL de tampão de ligação de anexina V 1x em água. Em seguida, é adicionado 5 μL de anexina V-FITC diretamente do *kit* e 1 μL de IP (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em tampão de ligação de anexina V). Após 15 min de incubação, à temperatura ambiente e na ausência de luz são adicionados 500 μL de tampão de ligação de anexina V e as amostras mantidas em gelo até serem quantificadas.

As medições foram realizadas no citómetro de fluxo (Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer, Invitrogen) com a aquisição de 10000 eventos por amostra e o tratamento dos resultados foi feito no programa Attune® Cytometric software (Invitrogen).

3.2.4.3 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Para medir a alteração do potencial mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) recorreu-se à utilização de uma sonda fluorescente, catiónica e lipofílica JC-1 (*5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide* (Abnova Corporation, Walnut, California, EUA), que tem a capacidade de alterar a sua cor mediante o potencial mitocondrial. Em células saudáveis, com elevado potencial mitocondrial, a sonda consegue entrar para o interior da mitocôndria e forma agregados, emitindo fluorescência vermelha. No entanto, quando existe uma perda substancial desse potencial, a mitocôndria fica comprometida e a sonda já não consegue entrar na mitocôndria, acumulando-se no citoplasma na sua forma monomérica e emitindo fluorescência verde. Esta alternância na emissão de fluorescência permite identificar se a via apoptótica envolvida é a intrínseca [100].

Este ensaio foi realizado na linha tumoral HCT116. As células foram cultivadas em placas de 24 poços (SPL Life Sciences) a uma densidade de $0,75 \times 10^5$ células/ml, e incubadas numa estufa a 37 °C, 5 % (v/v) CO_2 e 99 % (v/v) humidade relativa, durante 24 horas para aderirem aos poços. Ao fim desse tempo, o meio foi substituído por meio completo contendo o IC_{50} dos compostos em estudo ou 0,1% (v/v) de DMSO que funcionou como controlo negativo. Incubou-se durante 48 horas na estufa de CO_2 nas mesmas condições descritas anteriormente. Foram também realizados controlos com as células não marcadas (meio completo apenas) e com as células não tratadas (meio completo + JC-1). Após o período de incubação, o meio é removido, e é adicionada uma solução de coloração JC-1, que fica a incubar na estufa de CO_2 , nas condições referidas em cima, durante 20 minutos para marcar as células.

Imediatamente após este tempo, as células são observadas e fotografadas no microscópio de fluorescência invertido (Nikon Eclipse Ti, Nikon Instruments, Tóquio, Japão). As fotografias foram tiradas com a câmara digital Nikon D5-Qi1Mc (Nikon Instruments), e as imagens obtidas através do *software* NISElements BR (Nikon Instruments).

3.2.4.4 Produção de espécies reativas de oxigénio (ROS)

A geração celular de espécies reativas de oxigénio (ROS) foi avaliada utilizando o substrato diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA) (*Molecular Probes: Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents*, Invitrogen). O DCFH-DA é um corante não polar, que penetra facilmente pela membrana celular e é hidrolisado no seu interior no derivado polar DCFH (diclorofluoresceína reduzida), não fluorescente e não permeável, por esterases celulares. Quando na presença de ROS intracelulares e outros peróxidos, a DCFH vai ser oxidada a 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF), um composto altamente fluorescente. Desta forma, é possível correlacionar a fluorescência quantificada com a geração de espécies reativas de oxigénio, sendo esta relação de proporcionalidade direta [101].

Este ensaio foi realizado na linha tumoral HCT116, tendo as células sido cultivadas em placas de 6 poços (SPL Life Sciences) a uma densidade de 1×10^5 células/ml, durante 24 horas numa estufa a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ e 99 % (v/v) humidade relativa para aderirem à placa. Ao fim desse tempo, o meio foi substituído pelo IC₅₀ dos compostos, 0,1 % (v/v) de DMSO ou 25 µM de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em meio completo. Após 48 horas na estufa de CO₂, nas condições acima referidas, as células foram tripsinizadas (1 ml de tripsina), transferidas para um tubo *ependorf* e centrifugadas (Sigma 1-14K, Sigma-Aldrich) a 650 x g, 5 min, a 15°C. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o sedimento de células lavado em 1 ml de PBS 1x e novamente centrifugadas, a 2000 g, 5 min, a 15°C. Imediatamente após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de células ressuscitado numa solução em PBS 1x pré-aquecido (1 hora na estufa de CO₂) de 10 µM de H₂DCF-DA.

Incubou-se 20 minutos na estufa de CO₂, e em seguida as amostras foram medidas no citómetro de fluxo (Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer, Invitrogen) com a aquisição de 10000 eventos por amostra. O tratamento dos resultados foi realizado no programa Attune® Cytometric software (Invitrogen).

3.2.4.5 Expressão de proteínas anti- e pro-apoptóticas por Western blot

3.2.4.5.1 Extração e quantificação das proteínas

Para este ensaio foram cultivadas células HCT116 e HCT116 resistentes à dox em frascos de cultura de 25 cm² e 75 cm², respetivamente. Nos frascos de cultura de 25 cm² a densidade celular cultivada foi de 2 x 10⁶ células/mL, enquanto que nos frascos de 75 cm², as células foram semeadas a uma densidade de 4 x 10⁶ células/ml. Ambos os frascos de cultura foram incubados a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, por 24 horas. Após este período, o meio foi substituído pelo IC₅₀ do composto correspondente a cada linha celular ou 0,1 % (v/v) de DMSO em meio completo durante 48 horas, na estufa de CO₂.

Em seguida, o meio foi removido e as células lavadas em PBS 1x e recolhidas com um raspador em 2 ml de PBS 1x para um tubo *ependorf* em gelo. As amostras são submetidas a centrifugação a 700 x g, 5 min, a 4°C (Sigma 3-16K 10280). Ao fim desse tempo, o sobrenadante é descartado, realizando-se um *spin* final para garantir que todo o PBS é removido.

De seguida, o sedimento é ressuspendido em 30 µL de tampão de lise composto por tampão NaCl-Tris-EDTA (NaCl 150 mM; 50 mM Tris, pH=8; EDTA 5 mM), inibidores de proteases 1x (complete ULTRA Tablets, Mini, EASYpack, Roche, Suíça), inibidores de fosfatase 1x (PhosStop, Roche), 2 % (p/v) de NP-40 (Thermo Scientific, MA, EUA), 0,1 % (p/v) de ditioneitol (DTT; AMRESCO, EUA) e 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF; Sigma, St. Louis, EUA). Até processamento posterior, as amostras foram armazenadas a -80°C.

Após descongelar, as amostras são submetidas a 5 ciclos de pulsos contínuos no banho de ultrassons em gelo ao longo de 2,5 minutos com pausas de 1 minuto em gelo, de forma a evitar o aquecimento da amostra e a desnaturação das proteínas. Em seguida, os lisados celulares são centrifugados a 10000 x g, 5 min, a 4°C, sendo os sobrenadantes recuperados.

Por último, é necessário proceder à quantificação de proteína. Para tal, utilizou-se o *kit Pierce Protein Assay* (Thermo Scientific, MA, EUA) e uma placa de 96 poços

(SPL Life Sciences). Em primeiro lugar é realizada uma reta de calibração com várias soluções padrão de BSA (125, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g/ml}$) e um branco em água ultrapura ($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ a 25°C). Os extratos de proteína são, em seguida, diluídos de 1:10 em água ultrapura ($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ a 25°C) e adiciona-se 150 μL de reagente de Pierce a todos os poços. Após 5 minutos de reação, a absorvância a 660 nm foi quantificada num leitor de microplacas *Tecan Infinite F200* (Tecan, Männedorf, Suíça).

Após a quantificação, foram transferidos 20 μg de proteína para outro tubo *eppendorf*, juntamente com uma solução de *loading buffer* (tampão de dodecilsulfato de Sódio (SDS) a 4x e 3 % (p/v) de DTT) na mesma proporção do volume de proteína adicionado. Os extratos de proteína foram fervidos a 70°C durante 5 minutos e deixados à temperatura ambiente entre 1-2 horas. Imediatamente antes de se colocar as amostras no gel foi adicionado 1 μL de 30 % (p/v) DTT a todas as amostras.

3.2.4.5.2 Transferência para a membrana PVDF e SDS-PAGE

Neste passo foi preparado um gel de SDS-PAGE (10% poliacrilamida) contendo: 4,8 mL de acrilamida/bis-acrilamida 30 % (Merck), 3 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 4,2 mL de água ultrapura ($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ a 25°C), 90 μL de persulfato de amônia a 10% (v/v) (APS, do inglês: Ammonium Persulfate; Biorad, Califórnia, EUA) e 12 μL tetrametiletilenodiamina (TEMED, do inglês *tetramethylethylenediamine*; Sigma, St. Louis, EUA).

O sistema de SDS-PAGE Mini-PROTEAN®3 System (BioRad) foi utilizado para a corrida da eletroforese a 100 V, durante 1 hora. Após esta corrida, realizou-se a transferência para uma membrana PVDF (Amersham™ Hybond™ 0.45PVDF, GE Healthcare, Life Sciences). Para o processo de transferência montou-se um dispositivo, onde o gel esteve em contacto com a membrana e coberto por folhas de papel de filtro e esponjas de acordo com a **figura 3.2**. Após a montagem da sanduiche, o reservatório foi preenchido com tampão de transferência 4°C (25 mM Tris, 192 mM de Glicina, 20 % (v/v) metanol, pH = 8,3) até que o dispositivo de transferência estivesse completamente coberto. A transferência ocorreu durante a noite a 4°C com uma corrente de 90 mA.

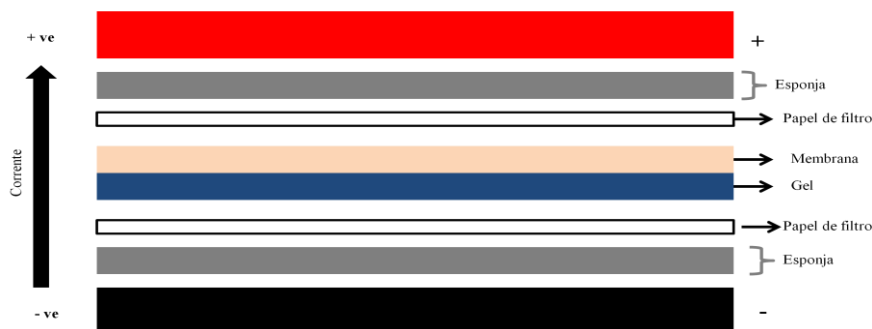


Figura 3.2 – Dispositivo de transferência

Antes de se proceder ao passo de bloqueio, verificou-se se a transferência das proteínas para a membrana ocorreu de forma eficaz mergulhando a membrana 5 minutos em coloração de Ponceau S. Ao fim desse tempo, lavou-se a membrana com água ultrapura ($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ a 25°C) até perder a coloração avermelhada e observou-se a transferência pelo aparecimento de bandas.

3.2.4.5.3 Incubação com o anticorpo primário e secundário

Com o objetivo de se quantificar a expressão de duas proteínas, BAX e BCL-2, foram realizados bloqueios com anticorpos específicos para estas proteínas. Por a membrana possuir alta afinidade por proteínas é necessário bloquear possíveis ligações não específicas. Desta forma é utilizado uma solução de bloqueio com 5 % de leite não gordo, em pó desnatado em tampão TBST 1x (50 mM Tris, 150 mM NaCl e 0,1% (v/v) de Tween 20, pH= 7,5). A membrana é mergulhada nesta solução e incubada durante 1 hora, à temperatura ambiente em constante agitação.

Em seguida, cada membrana foi exposta a diferentes anticorpos primários com as diluições apropriadas em tampão de bloqueio com 5 % de leite não gordo em TBST 1x. Os anticorpos primários utilizados foram o anti-Bax (1:5000; Abcam, Reino Unido) e anti Bcl-2 (1:1000; Sigma, St. Louis, EUA) que ficaram a incubar 1 hora, à temperatura ambiente, em constante agitação. Após esta hora de incubação, a membrana foi lavada três vezes, 5 minutos, com TBST 1x, em agitação.

Ao fim desse tempo, procedeu-se ao bloqueio com o anticorpo secundário específico para cada um dos anticorpos primários. Os anticorpos secundários utilizados foram o *Anti-mouse IgG, horseradish peroxidase (HPR)-linked Antibody* (1:3000), específico para o anti-Bax e o *Anti-rabbit IgG, HPR-linked Antibody* (1:5000), específico para o anti-Bcl-2 (Cell Signalling Technology, EUA), sendo as condições de

incubação iguais às do anticorpo primário. De seguida, as membranas foram reveladas de acordo com o protocolo descrito em **3.2.4.5.4**.

Por último, é necessário realizar um controlo com actina para a normalização dos resultados. As membranas foram incubadas com tampão de *stripping* (0,1 M de glicina, 20 mM de acetato de magnésio e 50 mM de cloreto de potássio), em 3 ciclos de 10 minutos com constante agitação para remover as ligações específicas dos anticorpos. De seguida, foi feito o bloqueio com a solução de leite não gordo a 5%, e com os anticorpos primário e secundário da actina nas mesmas condições mencionadas acima. Os anticorpos da actina utilizados foram Anti β -actina (1:5000; Sigma, St. Louis, EUA) e *Anti-mouse* de actina (1:3000; Sigma, St. Louis, EUA) específicos para BAX; e Anti β -actina (1:5000; Sigma, St. Louis, EUA) e *Anti-mouse* de actina (1:3000; Sigma, St. Louis, EUA) específicos para BCL-2.

3.2.4.5.4 Exposição do filme

Para revelar as bandas de proteínas presentes na membrana, preparou-se o substrato de *WesternBright ECL* (Advansta, EUA). O ECL é utilizado para a deteção de proteínas (western Blot) em membranas de fase sólida, como as PVDF. É um substrato quimioluminescente que deteta a atividade da peroxidase de rabano a partir de anticorpos secundários.

Preparou-se uma solução de 2 ml (1 ml de peróxido de rabano + 1 ml do reagente de ECL), sendo a membrana totalmente coberta pelo substrato durante 5 minutos. Sequencialmente, o filme foi exposto à membrana, numa câmara escuro. A quantificação das bandas de proteínas foi feita através do *software ImageJ*.

3.2.5 Autofagia

Com o objetivo de detetar a morte celular por autofagia na linha celular HCT116 recorreu-se ao *CYTO-ID® Autophagy Detection Kit* (Enzo Life Sciences, Reino Unido). As células foram marcadas com dois fluoróforos distintos, Hoechst 33342 (permite a deteção dos núcleos através da ligação ao DNA) e o *CYTO-ID® Green Detection Reagent* (deteta a presença de vesículas autofágicas). O Hoechst 33342 apresenta um comprimento de onda de excitação e emissão de fluorescência a 361 e 497 nm,

respetivamente, enquanto que, o *CYTO-ID® Green Detection Reagent* apresenta um comprimento de onda de excitação e emissão de fluorescência a 463 e 534 nm.

As células foram semeadas em placas de 24 poços (SPL Life Sciences) a uma densidade celular de $0,75 \times 10^5$ células/ml. De modo a conseguirem aderir aos poços, ficaram a incubar 24 horas numa estufa a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ e 99 % (v/v) humidade relativa. Ao fim desse tempo, o meio em que as células se encontravam foi substituído pelo IC₅₀ dos compostos em meio completo. Foram ainda realizados controlos com células não marcadas (apenas meio completo), células não tratadas (meio completo + sondas fluorescentes), um controlo negativo em 0,1% (v/v) de DMSO e um controlo positivo em 50mM de rapamicina. Para o controlo em rapamicina fez-se 15 horas de incubação pelo que, ao fim das 24 horas, as células foram substituídas apenas por meio completo e mais tarde adicionou-se 5 µL de rapamicina (50 mM) ao poço.

Decorridas 48 horas de incubação na estufa de CO₂, nas mesmas condições referidas anteriormente, o meio de cultura foi removido e as células lavadas três vezes com tampão AB (PBS 10x + água + FBS 5 % (v/v)). De seguida, foi adicionada uma solução com os corantes *CYTO-ID® Green Detection Reagent* e Hoechst 33342 do kit de autofagia. Após 30 minutos de incubação na estufa de CO₂, a solução foi removida, as células lavadas três vezes com tampão AB e fixadas com paraformaldeído 4 % (v/v), deixando-se a incubar, 20 minutos, à temperatura ambiente. Por fim, foi retirado o paraformaldeído e as células novamente lavadas em tampão para serem fotografadas.

As células foram observadas e fotografadas no microscópio de fluorescência invertido (Nikon Eclipse Ti, Nikon Instruments, Tóquio, Japão). As fotografias foram tiradas com a câmara digital Nikon D5-Qi1Mc (Nikon Instruments), e as imagens obtidas através do *software* NISElements BR (Nikon Instruments).

3.2.6 Progressão do ciclo celular

O efeito do composto na progressão do ciclo celular foi analisado por citometria de fluxo com base no conteúdo de DNA das células coradas com IP (iodeto de propídio).

As células foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm² com uma densidade de $0,75 \times 10^5$ células/mL e foram sincronizadas no início da fase S por um duplo

bloqueio com timidina (um bloqueador de fase S). Após 8 horas de incubação na estufa a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, o meio foi removido e adicionada uma solução de meio completo contendo 2 mM de timidina, ficando a incubar 16 horas na estufa nas condições referidas anteriormente. De seguida, o meio com timidina foi retirado e adicionou-se meio completo sem timidina por 8 horas. Posteriormente, foi feito um segundo bloqueio com 2mM em meio completo timidina por 16 horas nas mesmas condições do primeiro bloqueio.

Após este período, removeu-se o meio com timidina e procedeu-se à exposição das células ao IC₅₀ dos compostos em estudo, ou 0,1 % (v/v) de DMSO em meio completo, com tempos de incubação de 5, 9, 24 e 32 horas na estufa de CO₂. No fim de cada tempo de incubação, as células foram tripsinizadas com *TrypLE™ Express* e centrifugadas a 650 x g, 5 minutos a 15 °C. Os sobrenadantes foram descartados e as células foram lavadas com PBS 1x a 4 °C. Em seguida procedeu-se à centrifugação das mesmas a 3000 x g, 5 minutos e 4 °C. O sedimento obtido foi ressuspensionado em 100 µL de PBS 1x, sendo esse volume transferido gota a gota para outro tubo *eppendorf*, composto por 1 ml de uma solução de etanol a 80% (v/v), com agitação suave para fixação das células. Como método de sincronização para a normalização de resultados, após o fim do segundo bloqueio com timidina, foi recolhida uma amostra de células não tratadas (0 horas), sujeita ao mesmo procedimento utilizado para os outros tempos de incubação.

Posteriormente, as amostras foram armazenadas a 4 °C ao longo de 16 horas no mínimo. Em seguida, foram centrifugadas a 5000 x g, 10 min a 4°C, sendo o sobrenadante removido e o sedimento deixado a secar ao ar. Após o sedimento estar bem seco, ressuspende-se em 250 µL de uma solução de RNase (50 µg/ml) em PBS 1x. As amostras foram incubadas durante 30 min, numa estufa a 37°C, e em seguida adicionou-se 25 µg/mL de IP e 650 µL de PBS 1x para perfazer um volume de 1 ml.

A medição das amostras foi realizada no citómetro de fluxo (Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer, Invitrogen) com a aquisição de 10000 eventos por amostra. O tratamento dos resultados foi feito no programa *Attune® Cytometric software* (Invitrogen).

3.2.7 Internalização dos compostos

Com o objetivo de estudar e quantificar a internalização dos compostos em estudo em células HCT116, recorreu-se à técnica de Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivo (ICP-AES, do inglês: *inductively coupled plasma mass spectrometry*).

Para este estudo, as células HCT116 foram cultivadas a uma densidade celular de 5×10^5 células/ml em frasco de cultura de 25 cm^2 , e incubadas 24 horas, numa estufa de CO_2 , a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % (v/v) de CO_2 e 99 % de humidade relativa para aderirem à placa. Após esse tempo, o meio foi substituído por uma solução de meio completo contendo $20 \times \text{IC}_{50}$ dos compostos em estudo ou 0,1 % (v/v) de DMSO em meio completo, ficando a incubar na estufa de CO_2 , nas mesmas condições descritas em cima, durante 6 horas. De seguida, o meio em que se encontravam as células foi retirado e guardado em tubos falcon de 15 ml, enquanto que, as células foram tripsinizadas pela adição de 2 mL de TrypLETM Express (Gibco®, Nova Iorque, EUA), e incubadas cerca de 5 minutos na estufa de CO_2 . Após destacarem, a ação da tripsina foi inibida pela adição de 1 ml de meio de cultura completo, e as células transferidas para tubos falcon de 15 mL, sendo centrifugadas a $700 \times g$, 5 min e $15 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, o sobrenadante, juntamente com o meio já recolhido em tubos falcon de 15 mL, e o sedimento de células foram armazenados a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até posterior processamento. Um dia antes das amostras serem analisadas, é adicionada água-régia preparada de fresco.

Para a quantificação das amostras recorreu-se a um serviço contratado (Laboratório de análises, serviço de espectroscopia de emissão atômica, Departamento de Química, FCT-UNL).

3.2.8 Interação dos compostos com o DNA *in vitro*

Os ensaios de interação dos compostos com o DNA foram realizados pelo aluno de licenciatura Ruben Valente, sempre com a minha ajuda e orientação.

3.2.8.1 Interação dos compostos pela análise do DNA genómico de células HCT116

Com o objetivo de tentar perceber se os compostos em estudo são internalizados pela célula e conseguem chegar ao núcleo, foram efetuados ensaios de interação dos compostos em estudo com o DNA genómico de células HCT116.

3.2.8.1.1 Estímulo das células pelo composto

Para este ensaio, as células HCT116 foram cultivadas a uma densidade celular de 9×10^5 células/ml em frasco de cultura de 25 cm², e incubadas 24 horas, numa estufa de CO₂, a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa para aderirem à placa. Após esse tempo, o meio foi substituído por uma solução de meio completo contendo 20 x IC₅₀ dos compostos ou 0,1 % (v/v) de DMSO em meio completo, ficando a incubar na estufa de CO₂ durante 6 horas. De seguida, o meio em que se encontravam as células foi removido e as células tripsinizadas com a adição de 2 mL de *TrypLETM Express* (Gibco®, Nova Iorque, EUA). Após destacarem, a ação da tripsina foi inibida pela adição de 1 ml de meio de cultura completo, e as células transferidas para tubos falcon de 15 mL, sendo centrifugadas a 700 x g, 5 min e 15 °C. Em seguida, o sobrenadante, foi descartado e os sedimentos de células foram armazenados a -80 °C até posterior processamento. O DNA genómico foi extraído de acordo com o descrito na secção 3.2.8.1.2, e por último fez-se uma eletroforese em gel de agarose 0,7% em tampão TAE 1x (40mM Tris base, 20 mM ácido acético e 1mM EDTA) com Gel *Red* 0,0015% e corrente constante de 90 V, aplicada durante 90 minutos para verificar a integridade das amostras.

3.2.8.1.2 Extração do DNA genómico das células HCT116

Solubilizou-se o sedimento de células em 200 µL de tampão fosfato em PBS 1x (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ e 2mM KH₂PO₄, a pH 6,8). Seguiu-se o protocolo do *Kit High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche), excetuando um passo em que se adicionou 50 µL de *Elution Buffer* e não 200 µL. Em seguida, as amostras foram tratadas com RNase A (1 mg/ml) e incubadas durante 30 minutos a 37°C numa estufa. A quantidade de DNA e o grau de pureza das amostras foi analisada por espectroscopia de UV-Visível no *NanoDrop*.

3.2.8.1.3 Interação dos compostos com o DNA genómico extraído

Incubou-se 200 ng de gDNA extraído de células HCT116, sem exposição prévia aos compostos, com 50 μ M dos compostos em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl a pH= 7,19, num volume total de 20 μ L, durante 24 horas a 37° C. Por último, fez-se uma eletroforese em gel de agarose nas mesmas condições descritas na secção 3.2.8.1.1.

3.2.8.2 Interação dos compostos com o DNA plasmídico

3.2.8.2.1 Cultura de *Escherichia Coli* e extração de DNA plasmídico

Inicialmente, inoculou-se uma amostra de *E. coli* transformada com pUC18 numa placa de meio LB-agar (*Luria-Bertani*) suplementado com ampicilina (100 μ g/mL). O pré-inóculo ficou a incubar durante 24 horas a 37° C. Em seguida, inocularam-se as células de *E. coli* em meio LB líquido, suplementado com ampicilina (100 μ g/mL), durante 24 horas a 37° C. Após o período de incubação, extraiu-se o DNA plasmídico (pDNA) das bactérias recorrendo ao *Kit NZYSpeedy Miniprep*, de acordo com o protocolo do fabricante.

3.2.8.2.2 Interação dos compostos com o DNA plasmídico extraído

Foram realizados dois ensaios independentes com o DNA de pUC18 extraído. Num desses ensaios, o DNA plasmídico foi incubado com concentrações crescentes de composto e tempo de exposição fixo, e noutro ensaio manteve-se a concentração de composto e variou-se o tempo de exposição.

Desta forma, no primeiro ensaio, incubou-se 100 ng de DNA de pUC18 com concentrações crescentes dos compostos (5, 25 e 50 μ M) ou na sua ausência (apenas pUC18 ou 1 % DMSO (v/v), ambos controlos), em tampão Tris-HCl, 50 mM NaCl (pH 7,19). Cada ensaio foi programado para um volume final de 20 μ L e todas as amostras foram incubadas durante 24 horas, a 37 °C.

No segundo ensaio, o DNA de pUC18 foi incubado com 25 μM dos compostos ou na sua ausência (apenas pUC18 ou 1 % DMSO (v/v), ambos controlos), em tampão Tris-HCl, 50 mM NaCl (pH 7,19), num volume total de 20 μL , durante 1, 3, 6, 24 e 48 horas a 37°C.

Em ambos os ensaios, nas amostras incubadas que continham apenas DNA de pUC18 (100 ng), foi adicionada a enzima *HindIII*, na última hora de incubação, para linearizar o plasmídeo

Após os tempos de incubação, foi adicionado a cada amostra 5 μL de *loading buffer* 5x (25 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA (pH 8.0), 50 % glicerol, 0,1 % azul de bromofenol) (Bioline, Londres, Reino Unido). De seguida, as amostras foram aplicadas num gel de agarose 1,0% (p/v) e analisadas por eletroforese em tampão TAE 1x com Gel Red 0,0015% e uma corrente constante de 90 V aplicada durante 60 minutos. Os géis obtidos após cada eletroforese foram analisados e fotografados num sistema GelDoc XR+, usando o *software Quantity One* para aquisição de imagem.

3.2.8.3 Determinação do mecanismo de clivagem do DNA pelos compostos

De modo a determinar o mecanismo pelo qual os compostos conseguem clivar o DNA foi realizado um ensaio em que se expôs o DNA plasmídico aos compostos, juntamente com 3 agentes sequestradores de espécies reativas de oxigénio. Foi também realizado um controlo positivo com H_2O_2 . Assim, espera-se determinar se o mecanismo de clivagem se dá pela via hidrolítica (radicais hidroxilo) ou oxidativa (singletos de oxigénio).

Desta forma, 100 ng de pUC18 foram expostos a: 50 μM de ácido ascórbico; 50 μM de NaN_3 ; 50 μM de L-Histidina; 50 μM de ácido ascórbico e 100 μM de H_2O_2 ; 50 μM de NaN_3 e 100 μM de H_2O_2 ; 50 μM de L-Histidina e 100 μM de H_2O_2 ; 25 μM de JL10; 25 μM de JL10 e 100 μM de H_2O_2 ; 25 μM de JL10, 50 μM de ácido ascórbico e 100 μM de H_2O_2 ; 25 μM de JL10, 50 μM de NaN_3 e 100 μM de H_2O_2 ; 25 μM de JL10, 50 μM de L-Histidina e 100 μM de H_2O_2 . Todas as amostras foram preparadas em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl (pH 7,2). Foram também realizados controlos onde se expôs 100 ng de pUC18 a: tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl (pH 7,2) e

DMSO na maior proporção utilizada (25%); atividade da enzima de restrição HindIII. As amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TAE 1x com *Gel Red* 0,0015% e uma corrente constante de 80 V aplicada durante 90 minutos.

3.2.9 Proteómica

Recorreu-se à técnica de proteómica (electroforese bidimensional - 2-D) para se tentar perceber os tipos de morte celular e as vias celulares afetadas pela ação do composto JL10, através da avaliação da expressão proteica na linhas celular tumoral HCT116 após exposição ao IC₅₀ do composto em cada linha celular às 48 horas.

3.2.9.1 Preparação da amostra, precipitação e purificação das proteínas

As células HCT116 foram cultivadas em frascos de cultura 25 cm² a uma densidade celular de 2×10^6 células/mL, e incubadas durante 24 horas numa estufa a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Após este período o meio foi substituído pelo IC₅₀ do composto para cada linha celular ou 0,1 % (v/v) de DMSO em meio completo. A recolha das amostras foi realizada da mesma maneira que a descrita na secção 3.2.4.5.1, até ao passo em que o lisado celular foi centrifugado a 10000 x g, 5 minutos a 4 °C e os sobrenadantes recuperados. A seguir a este passo de centrifugação é necessário proceder à purificação dos extratos de proteína total.

A precipitação e a purificação foram realizadas com o *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, à exceção do passo de adição do *wash buffer* e do *wash additive*, em que foi efetuada uma incubação *overnight* a -20 °C. Em seguida foi também feita uma lavagem adicional em 25 µL de água ultrapura (18.2 MΩ.cm-1 a 25°C) para dispersar o mais possível o sedimento, de maneira a conseguir lavar o máximo de proteínas presentes no extrato proteico e voltou-se a seguir o protocolo fornecido pelo fabricante.

Após a última centrifugação, o sedimento de proteínas foi ressuspenso em 100 µL de uma solução de reidratação contendo 7 M de Ureia (BDH Prolabo, VWR International), 2 M Tioreia (Merck, Frankfurt, Alemanha), 2 % (p/v) de CHAPS (GE Healthcare, Reino Unido), inibidores de fosfatases 1x, inibidores de proteases 1x, vestígios de azul de bromofenol (Merck, Frankfurt, Alemanha), 0,1 % (p/v) de DTT e 1

mM PMSF. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 48 horas, sendo necessária a sua homogeneização para garantir que não há precipitação das proteínas. Após o tempo de incubação, centrifugou-se as amostras a 12000 x g, 10 minutos, sendo os sobrenadantes recuperando e os extratos de proteínas quantificados recorrendo ao *Pierce Protein Assay Kit*, de acordo com o protocolo descrito na secção **3.2.4.5.1**.

3.2.9.2 Eletroforese bidimensional (2-DE): Focagem isoeétrica e SDS-PAGE

A eletroforese bidimensional é uma técnica que permite a análise e a separação em duas dimensões de uma grande mistura de proteínas, de modo a que as mesmas se espalhem por todo o gel. Assim, numa primeira dimensão as proteínas são separadas de acordo com as diferenças no seu ponto isoeétrico recorrendo à focagem isoeétrica, e numa segunda dimensão separadas com base no seu peso molecular através da realização de um gel SDS-PAGE.

Imediatamente após a quantificação de proteína procedeu-se à realização da focagem isoeétrica (IEF), onde se utilizou 100 µg do extrato proteico total. Ao volume correspondente aos 100 µg de extrato de proteína total foi adicionado tampão de reidratação até perfazer um volume de 125 µL (volume das tiras utilizadas para a focagem isoeétrica). De seguida, a solução de reidratação contendo 100 µg de extrato proteico foi suplementada com 0,5 % de IPG (GE Healthcare, Reino Unido) e 0,5 % de *destreak* (GE Healthcare, Reino Unido) e distribuída de forma homogénea ao longo do sarcófago (suporte de tiras) de 7 cm IPG *strip holder* (GE Healthcare, Reino Unido). Após a distribuição, foi colocada por cima uma tira *Immobiline Dry strip* pH 3-10 NL de 7 cm (GE Healthcare, Reino Unido), de modo a que o gel ficasse em contacto com a amostra e não se formasse bolhas entre os mesmos. Adicionou-se ao sarcófago 750 µL de *Drystrip Cover Fluid* (GE Healthcare, Reino Unido) e colocou-se a respetiva tampa. Os sarcófagos com as tiras foram posteriormente dispostos no sistema de isofocagem ETTAN IPGphor 3 IEF (GE Healthcare, Reino Unido), e a focagem isoeétrica realizada através do programa indicado na **tabela 3.3** a uma temperatura constante de 20 °C.

Tabela 3.3 - Programa utilizado para a focagem isoeletrica

Passo	Voltagem(V)	Duração
1	30	14 horas
2	100	
3	500	
4	1000	
5	5000	

Após o fim do programa, as tiras foram removidas dos suportes e equilibradas, durante 15 minutos com agitação horizontal, em 5 mL de solução de equilíbrio (70 mM de Tris-HCl pH 8,8 (Merck), 6 M de ureia (Scharlau), glicerol 30 % (v/v) (Panreac) e 2 % (p/v) de dodecil-sulfato de sódio) (GE Healthcare, Reino Unido), suplementada com 1 % (p/v) de DTT para quebrar as ligações dissulfureto da proteína. De seguida, as tiras foram transferidas para uma nova solução de equilíbrio suplementada com 2,5 % (p/v) de iodoacetamida (GE Healthcare, Reino Unido) e incubadas 15 minutos com agitação horizontal, para impedir que as ligações dissulfureto quebradas se formem novamente, garantindo assim que as proteínas conseguem entrar no gel de SDS-PAGE.

Enquanto as tiras eram equilibradas com o tampão de equilíbrio em DTT e iodoacetamida, foram preparados géis de poliacrilamida a 12,5 % (v/v). Assim que acabou a incubação das tiras e com os géis SDS-PAGE já polimerizados, as mesmas foram de imediato colocadas por cima destes juntamente com um pequeno papel de filtro contendo 4 µL do marcador de pesos moleculares *NZY Colour Protein Marker II* (NZYTech, Lisboa, Portugal) e 1 gota de agarose 0,5% (p/v). Os géis foram selados com uma solução de agarose 0,5 % (p/v) (Lonza, Basel, Suíça) em tampão de eletroforese (3,79 g/L de Tris-base, 18 g/L de glicina (Panreac), 1,25 g/L SDS e vestígios de azul de bromofenol).

O sistema de SDS-PAGE Mini-PROTEAN®3 System (BioRad) foi utilizado para a corrida da eletroforese, a 30 V durante 30 min, e seguidamente a 120 V até o azul de bromofenol chegar ao fim do gel, mas antes do mesmo começar a sair para o tampão de eletroforese para não se perderem as proteínas de baixo peso molecular.

3.2.9.3 Revelação dos géis

Após o fim da corrida, os géis resultantes foram corados numa solução contendo três pastilhas de PhasTGel™ Blue R (Coomassie R350) (GE Healthcare) dissolvidas em 1 L de ácido acético a 10 % (v/v) (Panreac) em água destilada, durante 30 minutos numa estufa a 50°C. Para a revelação dos géis realizou-se várias lavagens em água ultrapura (18.2 MΩ.cm-1 a 25 °C), nas mesmas condições referidas anteriormente, sendo o gel deixado *overnight* em água ultrapura à temperatura ambiente para descorar totalmente. A digitalização foi feita pelo scanner PIXMA M250 (Canon) e os géis analisados no programa Melanie 7.0 (GeneBio, Genebra, Suíça). A análise foi realizada por deteção automática dos spots, identificação dos spots de proteínas, correspondência dos spots entre os diferentes géis e determinação da intensidade/expressão de cada spot. A variação dos níveis de expressão de cada proteína foi normalizada pela intensidade dos spots dos controlos. As proteínas foram identificadas recorrendo a um gel de referência de células HCT116. Os níveis de expressão <0,7 (sub-expressão da proteína) e >1,5 (sobre-expressão da proteína) foram considerados significativos.

3.2.10 Estatística

Todos os resultados foram expressos como média ± SD de dois ensaios biológicos independentes. Cada um dos ensaios biológicos foi obtido através de duplicados técnicos. O programa *GraphPadPrism 6 software* foi utilizado na análise dos resultados e o tratamento estatístico obtido pelo one--way ANOVA de forma a comparar o grupo de controlo com os grupos tratados para a significância estatística. Resultados com um $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Solubilidade e estabilidade dos compostos

A maior parte dos compostos sintetizados e utilizados na investigação em ensaios biológicos apresentam problemas de baixa solubilidade. Esta é uma questão crítica neste tipo de ensaios, uma vez que uma baixa solubilidade do composto pode conduzir a resultados subestimados e variáveis. Torna-se assim necessário arranjar um método eficaz de dissolução do composto, ao mesmo tempo que se garante a sua estabilidade, antes de se avançar para os ensaios biológicos [102].

Desta forma, foi analisada a solubilidade e estabilidade dos compostos em diferentes soluções, como o DMSO, o PBS e o DMEM. Esta análise foi feita por espectroscopia de UV-Visível, numa gama de comprimentos de onda de 250 a 700 nm, encontrando-se os espectros obtidos para cada um dos compostos em anexo (7.1)

A estabilidade é avaliada pelo aparecimento de alterações em bandas características do composto ao longo do tempo. Os espectros foram traçados com uma concentração de composto de 25 μM , e obtidos para diferentes tempos de incubação (0, 24, 48 e 72 h). O armazenamento durante o período de incubação foi realizado a 4°C.

Em primeiro lugar, é preciso ter em conta as características espectrais dos compostos obtidos para o tempo zero. Em termos gerais, os compostos em estudo JL7, JL10, JL12 e JL14, apresentam 2 zonas características, uma banda de máxima absorção a cerca de 280-290 nm e uma banda ligeira na zona dos 400-450 nm. Pela análise espectral (anexo 7.1) é possível verificar que os compostos perdem alguma estabilidade ao longo do tempo nas diferentes soluções estudadas. O desaparecimento da banda a cerca de 450 nm (JL7 e JL14) e o aparecimento de uma banda a 300 nm, às 48 horas, no composto JL14 dissolvido indicam isso mesmo (figuras no anexo 7.1).

Verificou-se também que ao fim de 24 horas, nos compostos em PBS e DMEM armazenados a 4°C, ocorria o aparecimento de um ligeiro precipitado no fundo do *eppendorf*.

Assim, com estes dados optou-se por solubilizar os compostos em DMSO ao longo dos ensaios biológicos realizados, visto ser o solvente que melhor solubiliza os compostos e aparentemente mais estável para os mesmos. O DMSO é um solvente

universal, utilizado para dissolver a maior parte dos compostos hidrofóbicos sintetizados devido às suas características polares e apróticas [97].

Ainda assim, nos espectros em DMSO, é possível verificar a existência de variações espectrais, pelo que se optou por preparar as soluções de composto sempre de fresco, evitando qualquer tipo de armazenamento que possa comprometer a solubilidade e estabilidade dos compostos. Contudo, este solvente também possui alguma toxicidade inerente para as células, pelo que é preciso limitar a % (v/v) de DMSO utilizada nos ensaios biológicos, tendo a percentagem máxima utilizada sido de 0.1 % (v/v)

Também não é aconselhável fazer ensaios às 72 horas, pois é quando existem maiores variações na estabilidade dos compostos.

4.2 Ensaios de viabilidade celular

Como forma de avaliar o potencial citotóxico *in vitro* dos compostos de Cu(I) em estudo, foi estimada a viabilidade celular em linhas celulares tumorais (HCT116, HCT116 resistentes à doxorubicina, A2780 e MCF-7), e em células saudáveis (fibroblastos), recorrendo ao reagente de MTS. Este método permite-nos determinar de forma indireta a viabilidade celular pela quantificação espectrofotométrica de formazano a 490 nm, produzido através da redução do reagente de MTS por células com desidrogenases mitocondriais ativas. O valor de absorvância medido será diretamente proporcional à quantidade de células viáveis em cultura [98].

Em última instância, este ensaio permite determinar o IC₅₀ relativo de cada composto para as linhas celulares estudadas, o que é um indicador da potência do composto para estas linhas, correspondendo à concentração de composto capaz de reduzir a viabilidade celular em 50%. A linha celular tumoral que for mais sensível aos compostos em estudo, apresentará um valor de IC₅₀ mais baixo, e será a selecionada para prosseguir os restantes estudos biológicos.

Foram testadas diferentes gamas de concentrações de composto para as diferentes linhas celulares, sendo em baixo apresentados resultados de viabilidade celular obtidos para cada um dos compostos para as linhas tumorais HCT116 (figura 4.1) e HCT 116 resistentes à dox (figura 4.2).

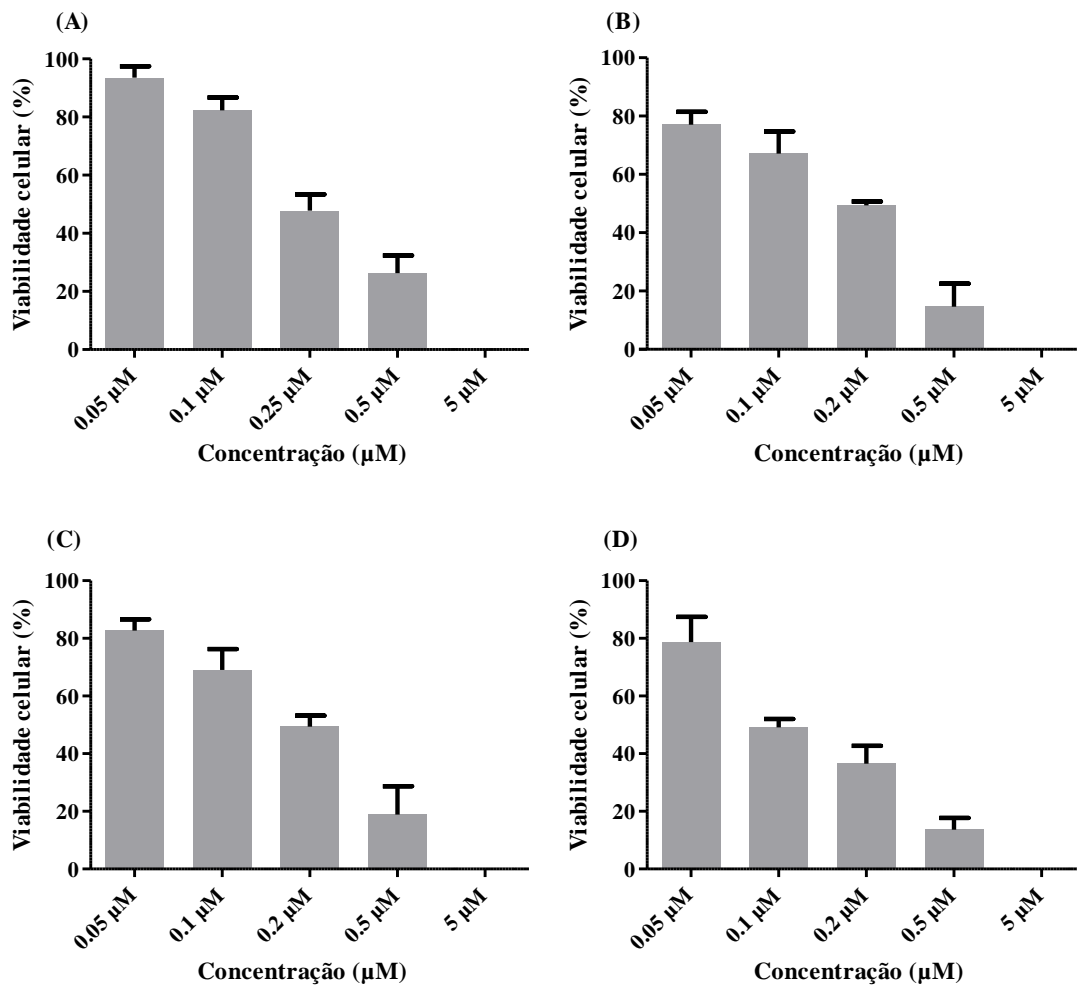


Figura 4.1 - % de viabilidade celular da linha celular tumoral HCT116 após 48 horas de exposição aos compostos em estudo (A – JL7; B – JL10; C – JL12; D – JL14). Os valores de viabilidade celular foram normalizados em relação ao controle em DMSO, correspondente a cada concentração de composto testada. Os valores apresentados correspondem dois replicados biológicos independentes e as barras de erro ao desvio padrão entre esses replicados.

Para todos os compostos verifica-se uma diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração de composto, sendo os valores de IC_{50} calculados bastante promissores para esta linha celular. O composto mais citotóxico é o JL14 (figura 4.1 (D)), com um valor de IC_{50} de 0,15 μ M, seguido do JL10 e JL12 (figura 4.1 (B) e (C)), com um IC_{50} de 0,20 μ M. O composto JL7 é o menos sensível para a linha tumoral HCT116, apresentando um valor de IC_{50} de 0,25 μ M (figura 4.1 (A)), que ainda assim continua a ser bastante promissor, pois todos estes valores são mais baixos do que o

IC₅₀ da doxorubicina para esta linha (0,4 μ M), que é um dos agentes quimioterapêuticos mais utilizado no tratamento do cancro.

Também em células HCT116 resistentes à doxorubicina, (para concentrações maiores que 6 μ M), os valores de IC₅₀ relativos calculados, embora ligeiramente superiores aos das células HCT116 sensíveis, foram bastante promissores sendo aproximadamente de 1 μ M para todos os compostos testados tornando estes compostos promissores para a aplicação em cancro colorectal sensível e resistente à doxorubicina (HCT116 DOX R) (figura 4.2).

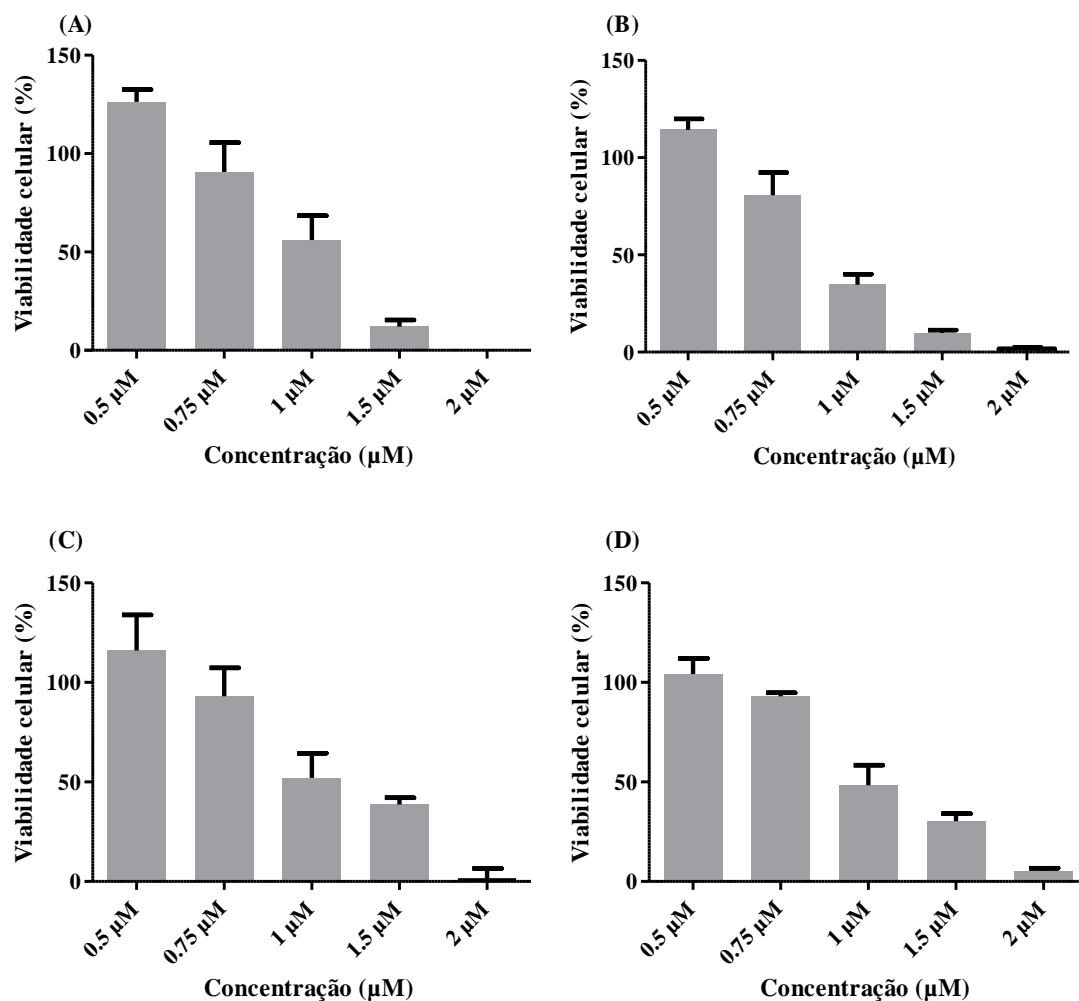


Figura 4.2 - % de viabilidade celular da linhar celular tumoral HCT116 resistente à doxorubicina após 48 horas de exposição aos compostos em estudo (A – JL7; B – JL10; C – JL12; D – JL14). Os valores de viabilidade celular foram normalizados em relação ao controlo em DMSO, correspondente a cada concentração de composto testada. Os valores apresentados correspondem a dois replicados biológicos independentes e as barras de erro ao desvio padrão entre esses replicados.

Os gráficos obtidos para as restantes linhas (A2780 e MCF-7) encontram-se em anexo (anexo 7.2, **fig. 7.13 e 7.14**), sendo os valores obtidos menos promissores do que os calculados para as linhas celulares referidas em cima. Os valores de IC₅₀ obtidos para cada linha celular são apresentados na **tabela 4.1**.

Tabela 4.1 - Valores de IC₅₀ de cada um dos compostos em estudo obtidos para as diferentes linhas tumorais

Compostos cobre(I)	IC ₅₀ HCT116	IC ₅₀ HCT116 DOX R	IC ₅₀ MCF7	IC ₅₀ A2780	IC ₅₀ fibroblastos
JL7	0,25 µM	≈ 1 µM	≈ 0,51 µM	0,7 µM	≈ 50µM
JL10	0,20 µM	0,75 – 1 µM	≈ 0,8 µM	1,3 µM	> 50µM
JL12	0,20 µM	1 µM	> 0,48 µM	0,6 µM	10 - 50µM
JL14	0,15 µM	1 µM	> 0,86 µM	0,4 µM	<10µM

Pela análise da tabela, verifica-se que a linha tumoral para a qual os compostos apresentam maior efeito citotóxico, isto é, valores de IC₅₀ mais baixos, é a HCT116. Desta forma, esta será a linha celular em que irão ser realizados a maioria dos restantes estudos biológicos (alguns serão igualmente comparados em HCT116 DOX R).

Contudo, é preciso ter em atenção os valores de IC₅₀ dos compostos calculados em células saudáveis, pois dão-nos a indicação do potencial dos compostos em poderem vir a ser utilizados para tratamentos futuros. Se forem menos citotóxicos do que os compostos utilizados nos tratamentos atuais, pode permitir uma redução dos efeitos secundários observados atualmente.

No entanto, verifica-se que o composto mais citotóxico nas células HCT116, o JL14, apresenta também uma elevada toxicidade para os fibroblastos, com um valor de IC₅₀ menor que 10 µM, sendo o composto JL10, o mais promissor deste ponto de vista ao apresentar um IC₅₀ maior que 50 µM (**tabela 4.1**).

Como é necessário arranjar um equilíbrio entre o potencial antiproliferativo em células tumorais e saudáveis, o composto JL14 não será bom, apresentando-se o composto JL10, entre os 4 estudados, como o mais promissor em termos terapêuticos.

Para verificar, se a toxicidade dos compostos provinha do composto de partida, dos ligandos, ou dos dois em conjunto, realizaram-se também ensaios de MTS com os

ligandos e o composto de partida individualmente em células HCT116 e fibroblastos. Os valores de IC_{50} estimados para as duas linhas celulares encontram-se na **tabela 4.2**, e os gráficos com a gama de concentrações testadas em anexo (anexo 7.2, **fig. 7.15 e 7.16**).

Tabela 4.2 - Valores de IC_{50} de cada um dos ligandos e do composto de partida individualmente obtidos para a linha tumoral HCT116 e para os fibroblastos.

	IC_{50} HCT116	IC_{50} fibroblastos
Composto de partida	0,05 – 0,1 μ M	10 μ M
Dptyz (ligando JL7)	2,5 - 25 μ M	25 - 50 μ M
Dpp (ligando JL10)	> 20 μ M	> 70 μ M
2,2'-bipy (ligando JL12)	2,5 - 25 μ M	> 70 μ M
Me2bpy (ligando JL14)	1,5 - 15 μ M	> 50 μ M

Pela análise da **tabela 4.2**, observa-se que os ligandos livres são menos citotóxicos para as células tumorais HCT116 do que quando coordenados aos compostos de Cu(I), sendo que o ligando do composto JL10 (dpp) livre apresenta uma citotoxicidade especialmente baixa em comparação com os restantes (anexo 7.2, **fig. 7.15 (B)**). Verifica-se também que o composto de partida (percursor) apesar de apresentar uma citotoxicidade superior para as células HCT116 do que os compostos, também possui uma toxicidade para os fibroblastos mais elevada ($IC_{50} = 10 \mu$ M) (anexo 7.2, **fig. 7.15 (E) e 7.16 (E)**).

Pode-se concluir que a toxicidade dos compostos se deve essencialmente ao fragmento $[Cu(dppe)]^+$, sendo que, a posterior coordenação dos ligandos heteroaromáticos leva a uma diminuição da citotoxicidade nos fibroblastos (**tabela 4.1**). Desta forma, pretende-se ultrapassar um dos problemas decorrentes da quimioterapia atual que se prende com um número indesejável de efeitos secundários que afetam a eficácia do tratamento.

4.3 Avaliação dos mecanismos de morte celular

4.3.1 Marcação com Hoechst 33258

A marcação das células com a sonda Hoechst 33258 permite a identificação de células em apoptose, através da técnica de microscopia de fluorescência. Esta sonda é sensível à conformação do DNA e ao estado da cromatina, possuindo uma grande afinidade para o DNA, nomeadamente para zonas ricas em adeninas e timinas, permitindo a deteção de alterações nucleares. O Hoechst 33258 marca tanto os núcleos de células em apoptose, como de células normais, sendo possível a sua distinção pela identificação de fenómenos característicos de apoptose como a condensação da cromatina, fragmentação nuclear ou a formação de corpos apoptóticos [81, 103]. A análise foi realizada por microscopia de fluorescência após exposição das células HCT116 a 0,1% (v/v) de DMSO ou ao IC₅₀ dos compostos em estudo. Na **Figura 4.3** observam-se as imagens obtidas para o composto JL10. As fotos para os restantes compostos são apresentadas em anexo (anexo 7.3.1 – **fig. 7.17**).

Analisando as imagens da figura, observa-se que nas células expostas ao DMSO (controlo negativo), existe uma distribuição homogénea da fluorescência azul, dado pelo corante Hoechst 33258, pelos núcleos, indicando a presença de cromatina não condensada e dispersa por todo o núcleo. Desta forma, pode-se inferir que a ocorrência de apoptose não é significativa após a exposição das células ao DMSO como era esperado, visto a citotoxicidade do mesmo ser baixa. Ainda assim, é possível a observação de fenómenos isolados de cromatina condensada e formação de corpos apoptóticos, identificados pelas setas na imagem, pois existe sempre alguma toxicidade inerente ao DMSO.

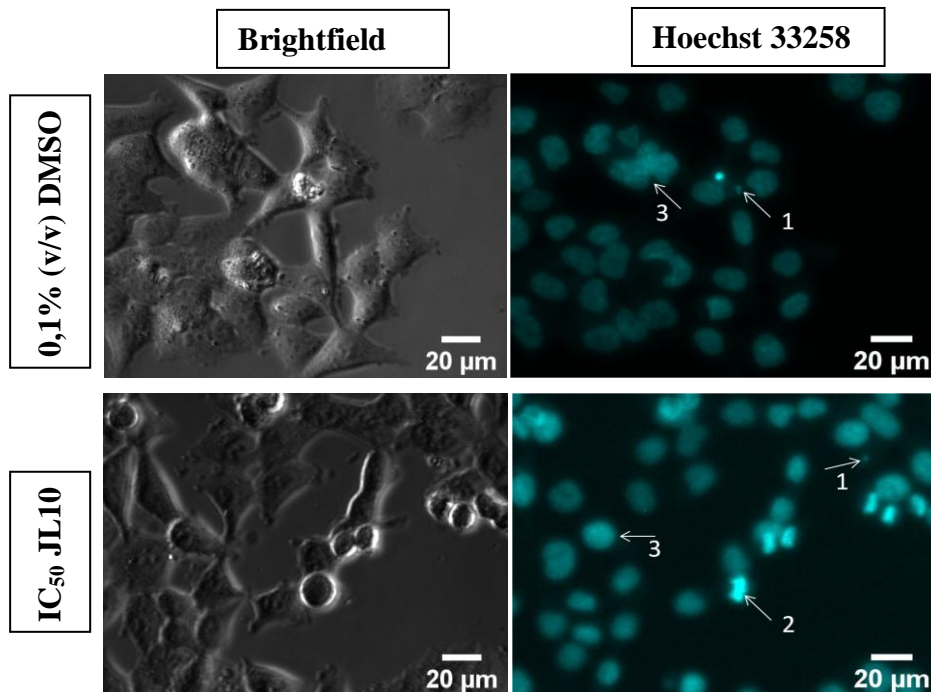


Figura 4.3- Visualização da apoptose de células HCT116 na presença do composto JL10 em campo claro (*brighfield*) e marcadas com Hoechst 33258. As células da linha tumoral HCT116 cresceram na presença de 0,1 % (v/v) de DMSO ou numa concentração correspondente ao IC₅₀ do composto JL10 durante 48 horas. As setas indicam o aparecimento de corpos apoptóticos (1), fragmentação nuclear (2) ou condensação da cromatina (3). Estes resultados correspondem a dois replicados biológicos independentes onde foram analisadas 5 imagens para cada condição em estudo. A título representativo apenas são mostradas as fotos para um dos compostos, sendo que as fotos com os restantes, JL7, JL12 e JL14 estão presentes nos anexos (anexo 7.3.1).

Em relação às imagens dos compostos em *brighfield*, observa-se que as células estão sujeitas a um maior *stress* pelas suas formas mais irregulares. É também visível nas imagens com a marcação do Hoechst 33258, um aumento na intensidade da fluorescência, estando a mesma distribuída de forma heterogénea, sendo observados com maior frequência fenómenos apoptóticos, indicados pelas setas na imagem (figuras 4.3 e 7.17). No entanto, a incidência destes acontecimentos continua a não ser muito alta.

A quantificação de fenómenos apoptóticos realizou-se através da contagem dos núcleos de células em apoptose pelo número total de núcleos marcados na imagem. Os resultados são apresentados na **figura 4.4**.

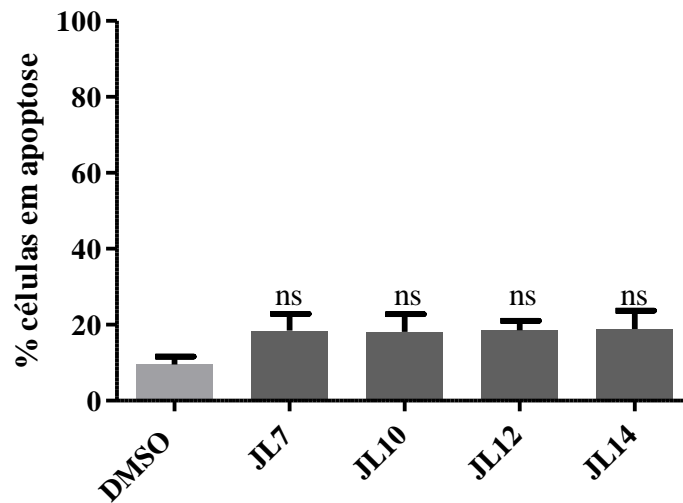


Figura 4.4 - Quantificação de células da linha celular tumoral HCT116 em apoptose após exposição a uma concentração correspondente ao IC₅₀ de cada composto (JL7, JL10, JL12, JL14) ou 0,1 % (v/v) DMSO (controlo negativo) durante 48 horas. Os valores apresentados correspondem à média \pm SD de dois replicados biológicos independentes. A significância estatística foi avaliada em relação ao controlo (DMSO) pelo método one-way ANOVA (ns- estatisticamente não significativo).

A análise da figura 4.4 indica-nos que, a % de apoptose induzida pelos compostos em células HCT116, é pouco maior que a % de apoptose das células controlo (DMSO). Estes dados sugerem que pode haver indução de outros tipos de morte celular por parte dos compostos (necrose ou autofagia, por exemplo), ou que as células podem estar em apoptose tardia, o que dificulta a visualização deste fenómeno ao microscópio.

Desta forma, prosseguimos com o estudo de apoptose por citometria de fluxo, onde é possível quantificar as células viáveis e células que estão em apoptose inicial, apoptose tardia ou necrose.

4.3.2 Marcação com AnexinaV-FITC e IP por citometria de fluxo

Como os resultados do ensaio anterior não evidenciaram de forma clara a indução de apoptose por parte dos compostos, procedeu-se à dupla marcação das células, com dois fluoróforos diferentes, a anexinaV-FITC e o iodeto de propídeo. Neste ensaio recorreu-se à técnica de citometria de fluxo que é quantitativa e específica, ao contrário do método da microscopia de fluorescência, que é de certa forma qualitativa, sendo a sua quantificação algo subjetiva, esperando-se por isso resultados mais precisos e fidedignos.

A dupla marcação permite distinguir e quantificar diferentes tipos de morte celular, apoptose e necrose, bem como diferenciar entre apoptose inicial e tardia pelas diferenças na integridade da membrana plasmática. Uma das mudanças que ocorre no estágio inicial da apoptose, antes da perda da integridade membranar, é a translocação da fosfatidilserina (PS) do lado interno da membrana plasmática para a camada externa, ficando exposta na superfície externa da célula. A anexinaV é uma proteína de ligação a fosfolípídios com uma grande afinidade pela fosfatidilserina, e sendo conjugada com o fluoróforo FITC (anexinaV-FITC) funciona como uma sonda sensível a esta ligação, emitindo fluorescência verde [104]. Contudo, a anexinaV também tem a capacidade de se ligar à face interna da membrana plasmática, após a perda da integridade membranar que só acontece numa fase mais tardia da apoptose. Por outro lado, o IP é uma sonda intercalante com capacidade de ligação ao DNA, sendo que só consegue entrar na célula quando a membrana está permeável e comprometida, devido ao seu elevado peso molecular. A perda da integridade da membrana acontece numa fase tardia da apoptose e durante a necrose, sendo que nestes casos, o IP consegue entrar e ligar-se ao DNA, emitindo assim fluorescência vermelha [105].

Assim, esta dupla marcação permite identificar células viáveis (FITC - e IP -), em apoptose inicial (FITC + e IP -), em apoptose tardia (FITC + e IP +) ou em necrose (FITC - PI +) [104, 105].

Neste ensaio, células da linha tumoral HCT116 foram expostas ao IC₅₀ dos compostos, a 0,1 % (v/v) DMSO (controlo negativo) ou a 0,4 µM de doxorrubicina (dox) (controlo positivo) durante 48 horas, tendo sido posteriormente marcadas com os dois fluoróforos mencionados em cima e medida a sua fluorescência por citometria de fluxo (**figura 4.5**).

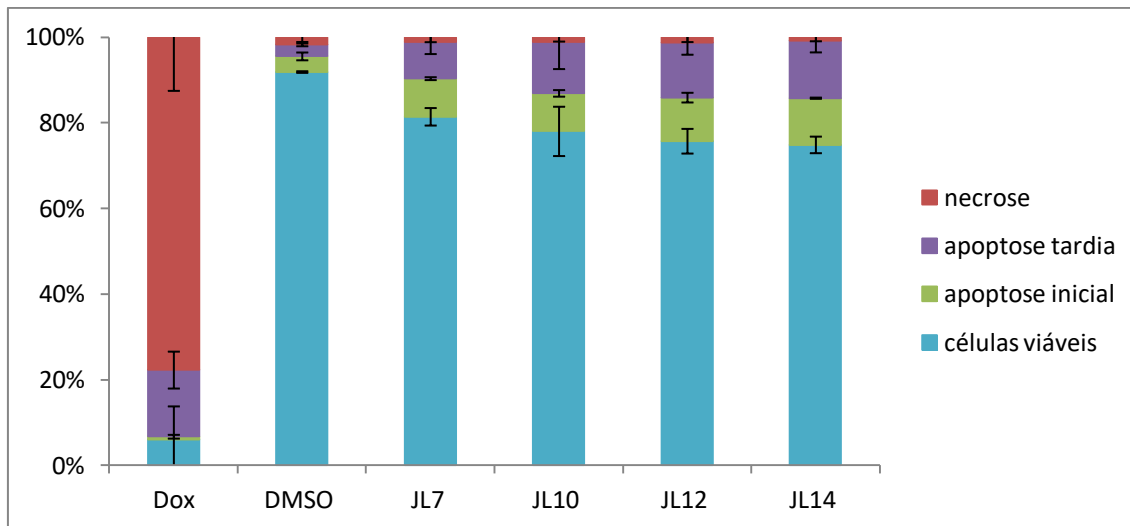


Figura 4.5 - Quantificação de células da linha tumoral HCT116 viáveis, em apoptose inicial e tardia, e em necrose por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação com anexina V-FITC e IP, após exposição durante 48 horas a uma concentração correspondente ao IC_{50} dos compostos (JL7, JL10, JL12 e JL14), 0,1 % (v/v) DMSO ou 0,4 μ M DOX. Os valores apresentados correspondem à média \pm SD de dois replicados biológicos independentes.

Pela análise dos resultados, é possível ver um aumento mais significativo de apoptose induzida pelos compostos em células HCT116. A existência de apoptose tardia pode ter dificultado a visualização de alterações morfológicas características da apoptose nos núcleos das células no ensaio anterior.

O composto JL14 mostrou ser o que induz apoptose em maior quantidade, com 10,9% das células em apoptose inicial e 13,4% em apoptose tardia, sendo que o composto com maior potencial terapêutico, o JL10, também tem capacidade de induzir apoptose, com 8,9% de células em apoptose inicial e 11,9% em apoptose tardia. Também se verifica a indução de necrose por parte dos compostos, mas em muito pouca quantidade, não sendo um tipo de morte significativo induzida por estes compostos.

Em relação aos controlos, o DMSO como seria de esperar induz pouca quantidade de apoptose e necrose, apresentado 92% de células viáveis, enquanto que, a doxorubicina apresenta níveis de morte por necrose excessivamente altos (77,7%). Embora seja normal este composto causar morte por necrose às células, o valor está mais alto que o normal, o que pode dever-se a algum tempo de espera no gelo antes da medição, o que também explicaria o baixo número de células viáveis (6,1%).

Estes resultados são promissores na medida em que a proporção de morte por apoptose em relação à morte por necrose é bastante maior. Sendo a morte por apoptose um mecanismo programado pela célula, é um tipo de morte mais favorável do que a

necrose. A morte por necrose é um mecanismo indesejável, pois resulta no “colapso” da célula que liberta o seu conteúdo para o exterior podendo levar à contaminação de células vizinhas e processos de inflamação na zona tumoral.

Embora a concentração de compostos utilizada para este estudo seja a do IC_{50} , a viabilidade das células expostas aos compostos está entre os 75% - 80%. Este facto pode dever-se a este ensaio ser específico para a apoptose e necrose, podendo existir outros tipos de morte celular que não estejam a ser contabilizados (ex: autofagia).

4.3.3 Avaliação da morte celular por autofagia

Devido à necessidade de confirmar a existência de outros mecanismos de morte celular pelos resultados obtidos na secção 4.3.2, realizou-se um ensaio para avaliar a morte celular por autofagia induzida pelos compostos.

Para tal, recorreu-se à técnica de microscopia de fluorescência, tendo as células sido marcadas com dois fluoróforos diferentes, o Hoechst 33342, que é um corante de ácidos nucleicos que se liga ao DNA e permite identificar a condensação da cromatina e a fragmentação nuclear, e o *CYTO-ID® Green Detection Reagent* Cyto-ID, uma sonda que se torna fluorescente na presença específica de vesículas autofágicas, como os autofagossomas e autolisossomas, com a vantagem de a marcação em lisossomas e endossomas ser muito baixa, o que não acontece com outras sondas para deteção de autofagia [106].

Assim, mais uma vez as células HCT116 foram expostas ao IC_{50} dos compostos, a 0,1% (v/v) de DMSO, ou a 500 μ M de rapamicina (controlo positivo) durante 48 horas, e em seguida marcadas com estes fluoróforos para deteção da autofagia. As imagens obtidas por microscopia de fluorescência encontram-se na **figura 4.6**.

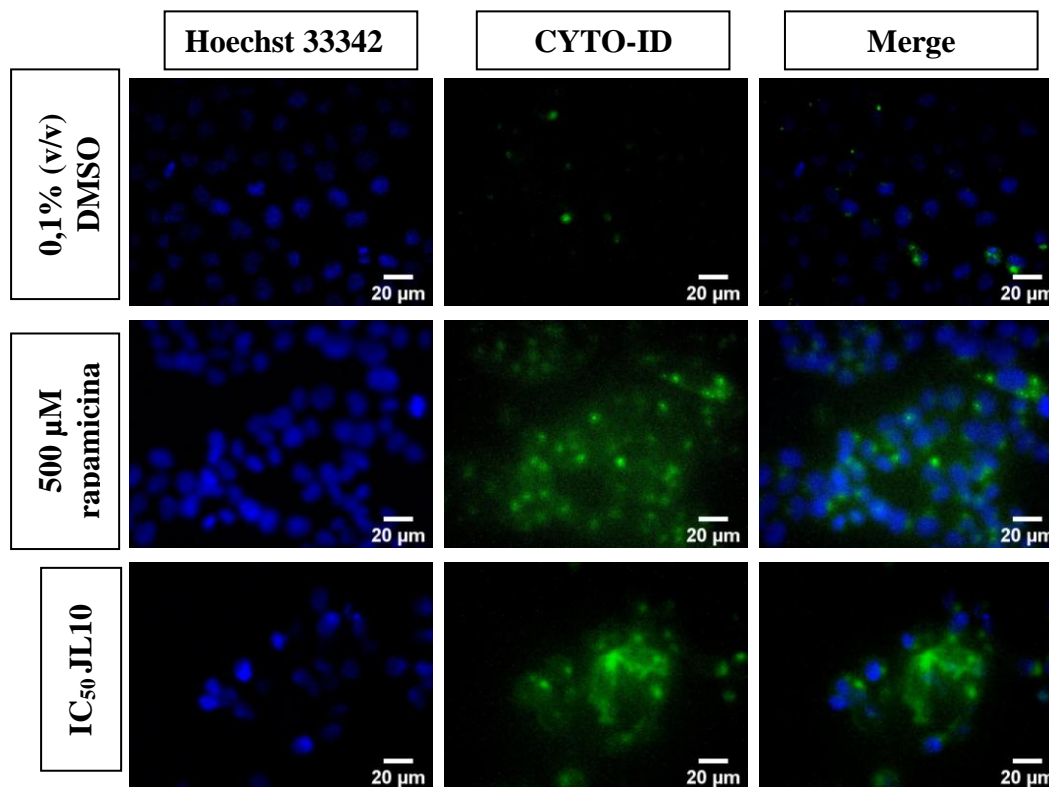


Figura 4.6 – Imagens captadas ao microscópio de células da linha tumoral HCT116 marcadas com Hoechst 33342 e CYTO-ID para avaliação do potencial autofágico dos compostos em estudo, através da observação de vesículas autofágicas. As células cresceram na presença de 0,1 % DMSO, 500 µM rapamicina ou numa concentração correspondente ao IC₅₀ de cada composto durante 48 horas. Estes resultados correspondem a dois replicados biológicos independentes, tendo sido analisadas 5 imagens para cada condição em estudo. As imagens obtidas nos ensaios com os restantes compostos JL7, JL12 e JL14 encontram-se em anexo (Anexo 7.3.2, **fig. 7.18**).

A rapamicina funciona como um controlo positivo, sendo um indutor de autofagia, pois tem como principal alvo o TOR, que em situações normais funciona como um sinal inibitório, bloqueando o processo autofágico. A rapamicina ao ligar-se, impede a ativação do TOR, despoletando o processo autofágico pela interação com proteínas de autofagia. Desta forma, é possível observar o aparecimento de vesículas autofágicas pelo aumento da fluorescência verde nas células que foram sujeitas a um estímulo com rapamicina (figura 4.6)

Também nas células que foram expostas aos compostos se verifica esse aumento de fluorescência, mostrando que os compostos têm a capacidade de induzir autofagia.

Relativamente ao DMSO não se verificam aumentos consideráveis na fluorescência verde, como era expectável por ser o controlo negativo (figura 4.6).

De forma a avaliar com mais precisão estes resultados, procedeu-se à quantificação das vesículas autofágicas, através da razão entre o número de vesículas autofágicas contabilizadas pelo número de núcleos presentes marcados pelo Hoechst 33342. Os resultados encontram-se na **figura 4.7**.

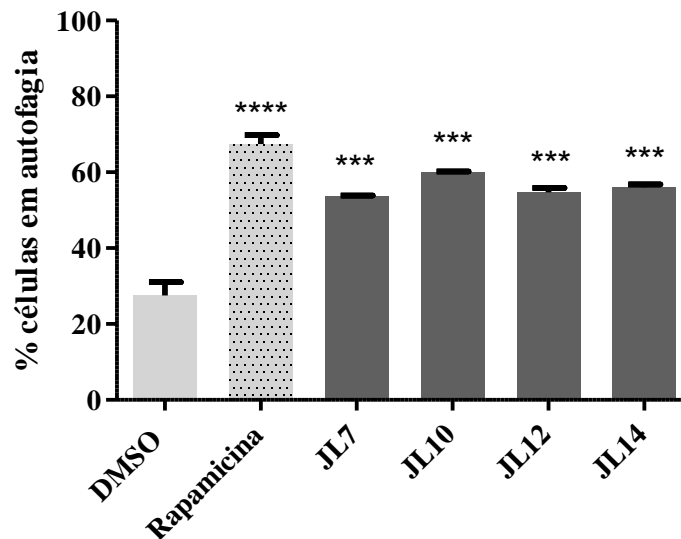


Figura 4.7 – Quantificação de células da linha celular tumoral HCT116 em autofagia após exposição a uma concentração correspondente ao IC_{50} dos compostos (JL7, JL10, JL12, JL14), ou 0,1 % (v/v) DMSO durante 48 horas, ou ainda a 500 μ M de rapamicina *overnight*. Os valores apresentados correspondem à média \pm SD de dois replicados biológicos independentes. A significância estatística foi avaliada em relação ao controlo (DMSO) pelo método one-way ANOVA (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$).

Tal como se observou pela análise qualitativa das imagens, as células HCT116 na presença de rapamicina e dos compostos em estudo sofrem autofagia, sendo este um dos principais mecanismos de morte celular, a par da apoptose, induzido pelos compostos (figura 4.7). A rapamicina induz uma percentagem de células em autofagia de 67,47%, enquanto que, dos compostos em estudo, o JL10 apresenta-se como o maior indutor deste processo com 60,05% de células em autofagia.

Esta evidência vai de encontro aos resultados obtidos para o ensaio de apoptose por citometria de fluxo que mostraram que podiam existir outros tipos de morte celular induzida pelos compostos.

Neste momento ainda não se sabe ao certo qual o papel que a autofagia desempenha, visto que pode ser responsável pela ativação da morte de células tumorais, que numa primeira instância apresentam alguma resistência à apoptose, podendo estes dois mecanismos estar correlacionados, mas também pode ser responsável pela

promoção e sobrevivência de tumores. No entanto, sabe-se que a maior parte dos compostos metálicos desenvolvidos para fins terapêuticos conduzem principalmente à ativação de mecanismos apoptóticos, mas também autofágicos, pelo que estes são resultados interessantes [107].

4.3.4 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é fundamental para manter a cadeia respiratória, que culmina com a síntese de ATP para as células, a funcionar normalmente. Uma perda significativa do potencial mitocondrial pode comprometer essas funcionalidades, levando à morte celular. Desta forma, a avaliação do potencial mitocondrial das células fornece dados importantes sobre a viabilidade celular [108].

A sonda fluorescente JC-1 é sensível à alteração do $\Delta\Psi_m$, alterando a sua cor mediante o potencial mitocondrial. As células saudáveis exibem um elevado potencial mitocondrial, e neste caso, a sonda entra para o interior da mitocôndria e forma agregados, emitindo fluorescência vermelha. Em casos em que há uma perda desse potencial, dada pela permeabilização da membrana mitocondrial com a entrada de proteínas pró-apoptóticas (apoptose intrínseca), a mitocôndria fica comprometida e a sonda acumula-se no citoplasma na sua forma monomérica, emitindo fluorescência verde. Desta forma a medição da alteração do potencial mitocondrial permite identificar especificamente se a via apoptótica envolvida é a via intrínseca [109].

Neste ensaio, as células HCT116 foram expostas ao IC_{50} dos compostos ou a 0,1% (v/v) de DMSO durante 48 horas. Foi também realizado um controlo com células não tratadas em que não ocorreu qualquer exposição. Em seguida as células foram marcadas com a sonda JC-1 e utilizou-se o microscópio para a medição do potencial mitocondrial. As imagens obtidas encontram-se na figura **4.8**.

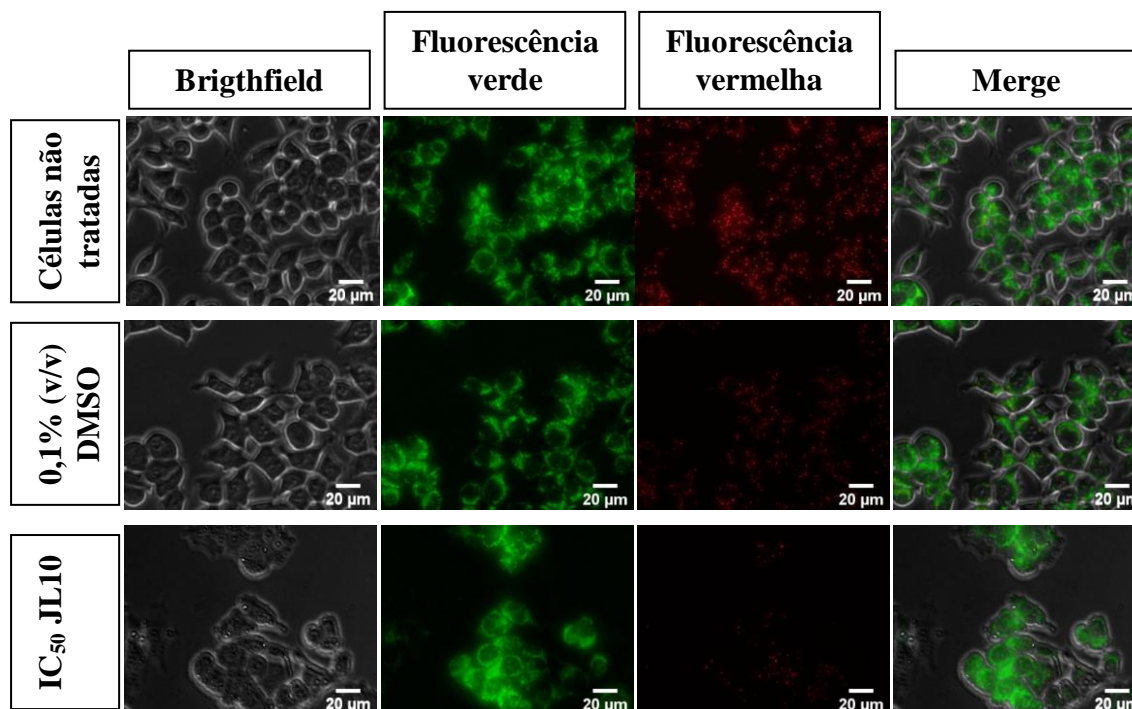


Figura 4.8 - Imagens captadas ao microscópio de células da linha tumoral HCT116 marcadas com a sonda JC-1 para medição da alteração do potencial mitocondrial. As células cresceram na presença de 0,1 % DMSO ou numa concentração correspondente ao IC₅₀ de cada composto durante 48 horas. Estes resultados correspondem a dois replicados biológicos independentes, tendo sido analisadas 5 imagens para cada condição em estudo. As imagens obtidas nos ensaios com os restantes compostos JL7, JL12 e JL14 encontram-se em anexo (anexo 7.3.3).

Através da análise das imagens em *brighfield*, observa-se pela morfologia das células que as expostas aos compostos estão sujeitas a muito mais *stress* do que as células não tratadas e as expostas ao DMSO, para além de que o número de células por campo é muito mais reduzido, o que é um indicador da citotoxicidade do composto (figura 4.9 e anexo 7.3.3). Relativamente às imagens de fluorescência verifica-se uma clara diminuição na emissão de fluorescência vermelha nas células expostas aos compostos, relativamente às restantes e um ligeiro aumento na intensidade da fluorescência verde, o que revela alterações no potencial mitocondrial. Apenas no composto JL14, a diminuição na emissão de fluorescência vermelha parece não ser muito acentuada em relação aos controlos (anexo 7.3.3, fig. 7.19).

De forma, para avaliar com mais precisão estes resultados, procedeu-se à quantificação de fluorescência e à determinação da razão entre a fluorescência verde e vermelha, através do programa *ImageJ* (figura 4.9).

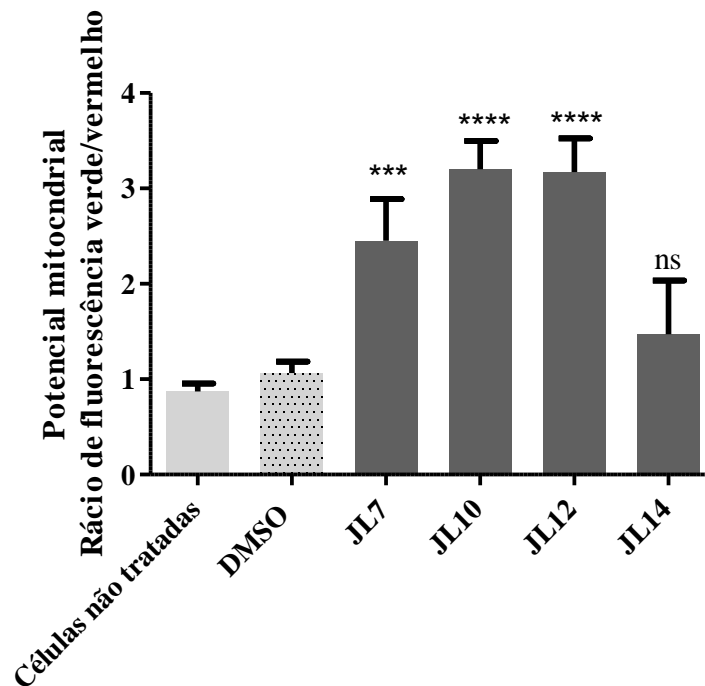


Figura 4.9 – Avaliação da alteração no potencial mitocondrial em células da linha tumoral HCT116, após exposição a uma concentração correspondente ao IC₅₀ de cada um dos compostos (JL7, JL10, JL12, JL14), 0,1 % (v/v) DMSO ou sem exposição (células não tratadas) durante 48 horas monitorizada pelo rácio de fluorescência verde/vermelha. Os valores apresentados correspondem à média \pm SD de dois replicados biológicos independentes. A significância estatística foi avaliada em relação ao controlo (DMSO) pelo método one-way ANOVA (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ns - estatisticamente não significativo).

Analisando a figura 4.9 observa-se que os rácios de fluorescência verde/vermelho aumentam consideravelmente nas células expostas aos compostos em relação aos controlos, à excepção do composto JL14 em que esse aumento não é significativo.

Desta forma, é possível inferir que os compostos parecem induzir apoptose pela via intrínseca. A exposição das células aos compostos leva a uma diminuição da fluorescência vermelha e aumento da fluorescência verde, devido à disrupção da membrana mitocondrial. Para confirmar que esta perda de $\Delta\Psi_m$ se deve ao aumento da permeabilização da membrana mitocondrial, com a libertação do citocromo-c levando à apoptose via intrínseca, a expressão das proteínas BAX e BCL-2 foi avaliada pela técnica de western blot, na secção 4.3.6. Não se pode, contudo, descartar a existência de apoptose extrínseca, porque este ensaio apenas permite avaliar a apoptose intrínseca.

4.3.5 Efeitos do composto JL10 nos níveis de expressão de BAX e BCL-2

A expressão de proteínas anti e pro-apoptóticas, BCL-2 e BAX, respetivamente, determinam o destino da célula, ou seja, um aumento da expressão da proteína BCL-2 contribui para a sobrevivência celular pela inibição da via apoptótica, enquanto que a expressão aumentada da proteína BAX está relacionada com a indução da apoptose [110].

A via intrínseca da apoptose está diretamente relacionada, com os níveis de expressão destas proteínas e a permeabilização da membrana mitocondrial através da libertação do citocromo c, sendo que a entrada na membrana de proteínas pro-apoptóticas como a BAX vai despoletar a ativação desta via. Deste modo, para confirmar os resultados obtidos na secção 4.3.5, recorreu-se à técnica de western blot que permite avaliar os níveis de expressão destas proteínas.

Neste ensaio, as células HCT116 foram expostas ao IC₅₀ do composto JL10 ou a 0,1% (v/v) de DMSO durante 48 horas. Após as incubações com os anticorpos primário e secundário específicos para BAX e BCL-2, e a exposição da membrana ao *kit ECL* na câmara escura, obtiveram-se os níveis de expressão representados na figura 4.10. Os níveis de expressão de cada uma das proteínas foram normalizados em relação a um controlo realizado com β -actina, sendo apresentados na figura 4.11.





	BAX	BCL-2
DMSO		
JL10		

Figura 4.10 – Imagens da revelação das bandas de BAX e BCL-2 ilustrativa dos níveis de expressão destas proteínas após exposição das células HCT116 a uma concentração correspondente ao IC₅₀ do composto JL10 ou a 0,1% (v/v) de DMSO.

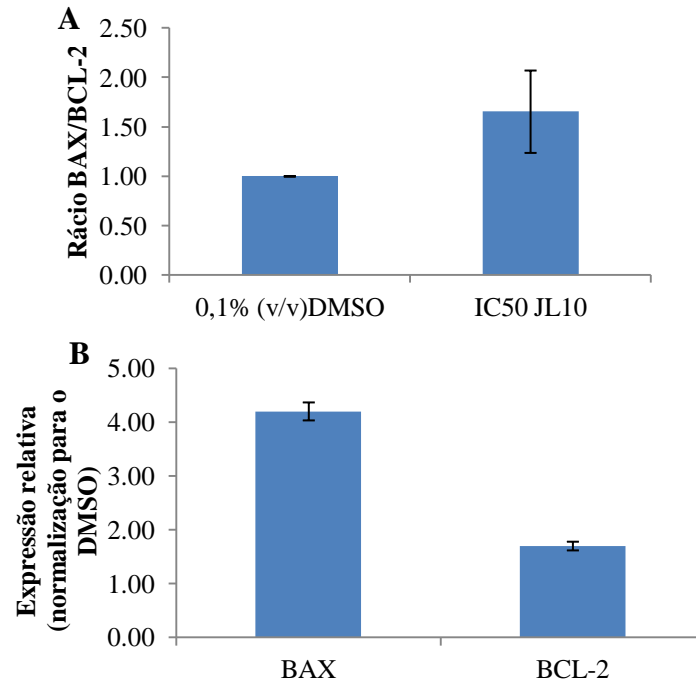


Figura 4.11 - A) Rácio da expressão BAX/BCL-2 após exposição de células HCT116 ao IC₅₀ do JL10 ou a 0,1 % (v/v) DMSO durante 48 horas. (B) Níveis de expressão relativa das proteínas BAX e BCL-2 em células HCT116 expostas ao IC₅₀ do JL10 durante 48 horas. Estes resultados foram normalizados em relação aos níveis de expressão obtidos para o controlo negativo DMSO. Ambos os gráficos A e B foram tratados após normalização em relação ao western blot da β -actina. Os valores apresentados correspondem à média \pm SD de dois replicados biológicos independentes.

Como é possível observar pelas bandas obtidas na figura 4.10 e pelos gráficos apresentados na figura 4.11, a exposição das células HCT116 ao composto JL10 aumentou significativamente o nível de expressão de BAX relativamente ao nível de expressão de BCL-2 em comparação com o controlo em DMSO. Este aumento no rácio BAX/BCL-2 permite confirmar os resultados obtidos na secção 4.3.5, que indicavam a ativação da via intrínseca da apoptose por parte do JL10 nesta linha celular.

Este ensaio também foi realizado em células HCT DOX R, tendo-se obtido os resultados ilustrados nas figuras 4.12 e 4.13.





	BAX	BCL-2
DMSO		
JL10		

Figura 4.12 - Imagens da revelação das bandas de BAX e BCL-2 ilustrativa dos níveis de expressão destas proteínas após exposição das células HCT116 DOX R a uma concentração correspondente ao IC₅₀ do composto JL10 ou a 0,1% (v/v) de DMSO.

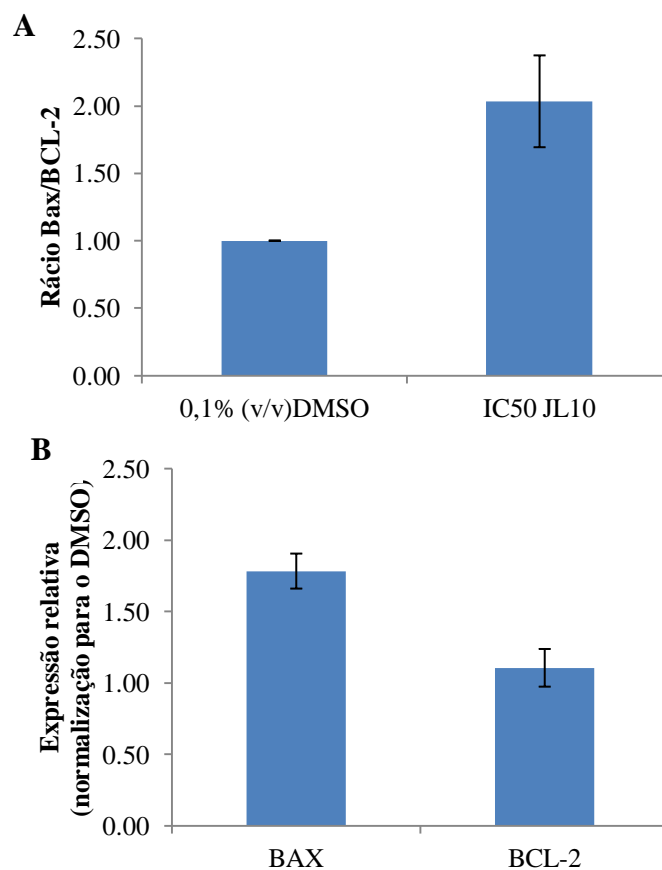


Figura 4.13 - A) Rácio da expressão BAX/BCL-2 após exposição de células HCT116 DOX R ao IC₅₀ do JL10 ou a 0,1 % (v/v) DMSO durante 48 horas. (B) Níveis de expressão relativa das proteínas BAX e BCL-2 em células HCT116 DOX R expostas ao IC₅₀ do JL10 durante 48 horas. Estes resultados foram normalizados em relação aos níveis de expressão obtidos para o controlo negativo DMSO. Ambos os gráficos A e B foram tratados após normalização em relação ao western blot da β -actina. Os valores apresentados correspondem à média \pm SD de dois replicados biológicos independentes.

Pelos resultados obtidos (figuras 4.12 e 4.13) é possível concluir que o composto JL10 em células HCT116 DOX R provoca um aumento do nível de expressão de BAX relativamente ao nível de expressão de BCL-2 em comparação com o controlo em

DMSO. Contudo, este aumento não é tão elevado quanto o observado em células HCT116 sensíveis à dox (figura 4.11 (B) e 4.13 (B)).

Ainda assim, os resultados obtidos para estas duas linhas celulares são semelhantes, e indicam que para além do que já foi observado em células HCT116 sensíveis, também em células HCT116 DOX R o composto JL10 tem a capacidade de induzir apoptose.

4.3.6 Determinação de espécies reativas de oxigénio (ROS)

As espécies reativas de oxigénio (ROS) funcionam como importantes moléculas sinalizadoras em processos como o desenvolvimento, diferenciação, proliferação e morte celular. No entanto, a acumulação de ROS em condições patológicas resulta em *stress* oxidativo para as células, o que pode provocar danos ao nível do DNA, proteínas, membranas, entre outros. A presença de ROS intracelulares em excesso e os danos provocados são um dos principais fatores responsáveis por despoletar a ativação de mecanismos de morte celular, nomeadamente a apoptose pela via intrínseca através do aumento da regulação do gene *TP53* que leva à alteração do potencial de membrana mitocondrial. Sendo a mitocôndria um local de produção de ROS e um dos seus alvos também, a alteração do potencial da membrana mitocondrial e a produção de ROS estão diretamente relacionados [111, 112].

A quantidade de ROS intracelulares foi determinada utilizando H₂DCF-DA, um composto não fluorescente, que quando na presença de ROS intracelulares é oxidado a 2, 7'-diclorofloresceína (DCF), tornando-se altamente fluorescente.

Desta forma, células HCT116 foram expostas ao IC₅₀ dos compostos, 0,1% (v/v) de DMSO, ou a 25 µM de H₂O₂ (peróxido de hidrogénio, controlo positivo) durante 48 horas, sendo de seguida incubadas com o H₂DCF-DA, e a fluorescência medida por citometria de fluxo. Os resultados obtidos estão presentes na figura 4.14.

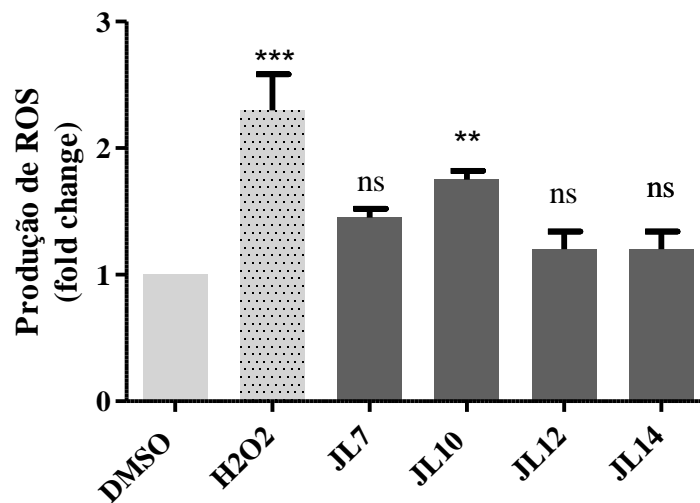


Figura 4.14 - Quantificação do stress oxidativo em células da linha tumoral HCT116 após exposição a uma concentração correspondente ao IC₅₀ de cada um dos compostos (JL7, JL10, JL12, JL14), 0,1 % (v/v) DMSO ou 25 μ M de H₂O₂ durante 48 horas. As medições da fluorescência foram realizadas recorrendo à técnica de citometria de fluxo. Os valores foram normalizados para o controlo em DMSO. Os valores apresentados correspondem à média \pm SD de dois replicados biológicos independentes. A significância estatística foi avaliada em relação ao controlo (DMSO) pelo método one-way ANOVA (*** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, ns – estatisticamente não significativo).

Pela análise dos resultados (figura 4.14) verifica-se que o composto com capacidade para gerar maior *stress* oxidativo às células é o JL10. Todos os outros compostos (JL7, JL12 e JL14) não mostraram um aumento significativo na produção de ROS relativamente ao controlo negativo DMSO. Por outro lado, como era esperado o H₂O₂ mostrou grande capacidade para gerar ROS.

Correlacionando estes resultados, com os já obtidos na secção 4.3.4, onde se observou que os compostos eram capazes de despoletar a apoptose pela via intrínseca é possível concluir que o JL10 pode ativar este mecanismo através da produção de ROS, enquanto que, os restantes compostos possivelmente ativam esta via por outros mecanismos.

4.4 Regulação do ciclo celular

A análise da progressão do ciclo celular assume particular importância neste contexto, pois é sabido que a maior parte dos compostos metálicos anticancerígenos desenvolvidos, incluindo os de cobre, atuam nas células causando danos ao nível do DNA, danos esses que podem levar à inibição do crescimento através da paragem do ciclo celular, sinalizando a célula para morrer [112, 113].

A avaliação do potencial citostático do composto JL10 e a análise do ciclo celular foram feitas através da quantificação do conteúdo de DNA em cada fase do ciclo celular (G1/G0, S, G2/M) por citometria de fluxo. Para tal, as células HCT116, após um duplo bloqueio com timidina e exposição ao IC₅₀ do JL10, a 0,1% (v/v) DMSO ou a 0,4 μM de doxorrubicina durante 5, 9, 24 e 32 horas, foram marcadas com iodeto de propídio, um corante fluorescente. O duplo bloqueio com timidina, um bloqueador de fase S, é feito para garantir que todas as células se encontram na mesma fase do ciclo celular quando se dá o início da exposição [81].

Os resultados obtidos estão presentes na figura 4.15.

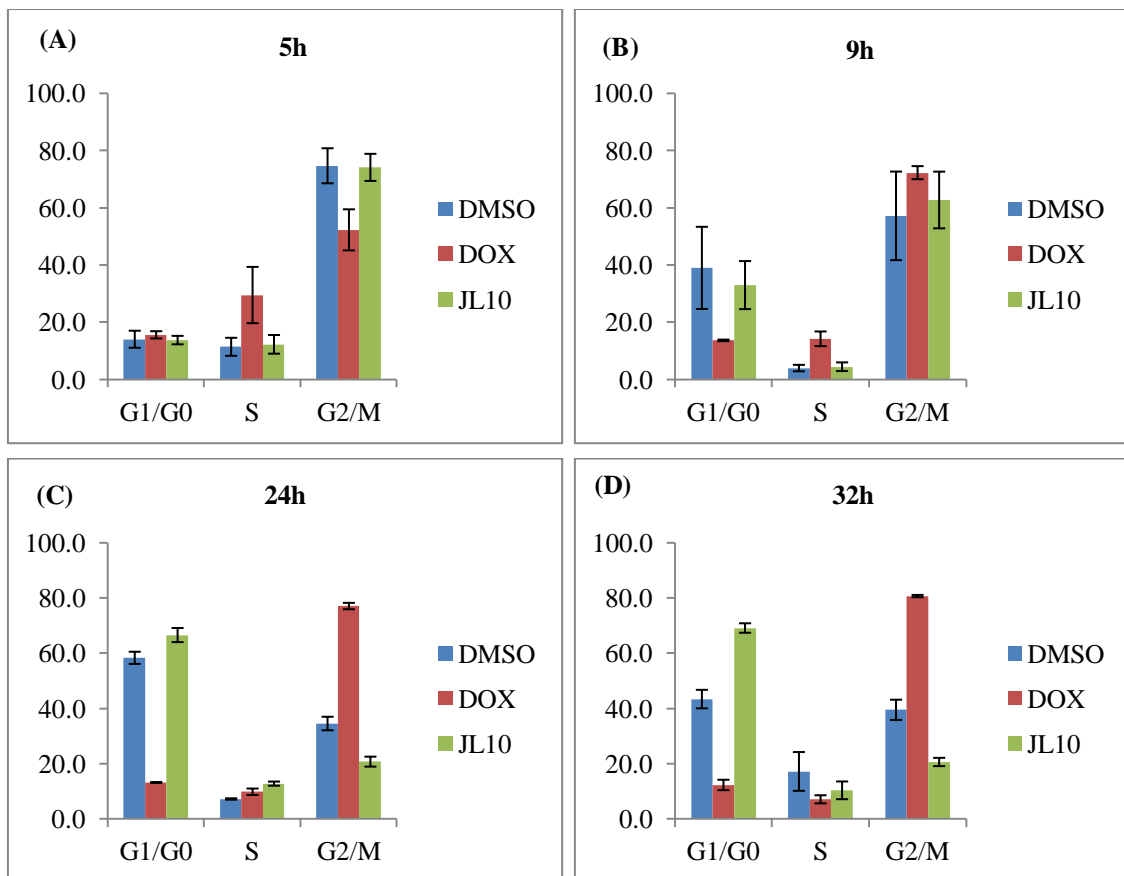


Figura 4.15 - Análise da progressão do ciclo celular em células da linha tumoral HCT116 após exposição ao IC₅₀ de cada um dos compostos (JL7, JL10, JL12 e JL14), ou a 0,1 % (v/v) de DMSO, durante 5 horas (A), 9 horas (B), 24 horas (C), ou 32 horas (D). As células foram analisadas por citometria de fluxo após marcação com IP. Os dados estão representados como a média ± SD de dois ensaios independentes biológicos independentes.

A doxorrubicina funcionou como um controlo positivo, pois sabe-se que este agente bloqueia o ciclo celular na fase S, logo ao fim das 5h como foi possível observar

análise da figura **4.15** que mostrou a paragem do ciclo celular se deu entre o final da fase S e o início da fase G2.

Pela análise da figura **4.15** para as células expostas ao DMSO e ao composto, que inicialmente se encontravam na fase S (5 horas), é possível observar que estas conseguiram progredir normalmente para a fase G2/M às 9 horas. Das 9 às 24 horas, estas células terminaram o seu ciclo de divisão com a fase M e iniciaram um novo ciclo. No entanto, enquanto que, as células sujeitas ao DMSO das 24 às 32 horas são capazes de progredir da fase G1 para a fase S, as células sujeitas ao composto não conseguem, ficando bloqueadas no início do ciclo celular.

Assim sendo, o composto JL10 parece ter potencial citostático, interferindo com a progressão do ciclo celular na fase G1.

4.5 Internalização dos compostos

De maneira a avaliar a internalização dos compostos em estudo em células HCT116, recorreu-se à técnica de ICP-AES, uma técnica de espectrometria de emissão atómica que faz uma análise química quantitativa de cada amostra, permitindo determinar constituição da amostra [113].

Desta forma, pela quantificação do metal pretendido, neste caso o cobre, foi possível avaliar a quantidade de cobre internalizado pelas células HCT116 após exposição de 6 horas a $20 \times IC_{50}$ dos compostos em estudo.

Os resultados mostram que os 4 compostos estudados internalizam em células HCT116, encontrando-se cerca de 20% do cobre quantificado nas células HCT116 e 80% no sobrenadante. Estes dados corroboram os resultados obtidos nas secções **4.3.6** e **4.4** que demonstraram a existência de apoptose intrínseca e a capacidade do composto JL10 em interferir com o ciclo celular, respetivamente.

4.6 Estudos de interação dos compostos de Cu(I) com o DNA

Os estudos de interação com o DNA assumem particular importância pelo facto da maioria dos compostos quimioterapêuticos sintetizados terem como alvo o DNA, permitindo a regulação da expressão genética [114]. Estes ensaios foram realizados com a ajuda do aluno Rúben Valente, aquando da realização do seu projeto de licenciatura.

4.6.1 Interação dos compostos de Cu(I) pela análise do DNA genómico

4.6.1.1 Interação dos compostos com o DNA genómico em células crescidas na presença dos compostos

Com o objetivo de avaliar a interação dos compostos com o DNA genómico em células HCT116, procedeu-se à exposição desta linha celular a uma concentração de 20 x IC₅₀ dos compostos ou a 0,1 % (v/v) de DMSO durante 8 horas, sendo em seguida extraído o DNA genómico e realizada uma corrida de eletroforese (figura 4.16).

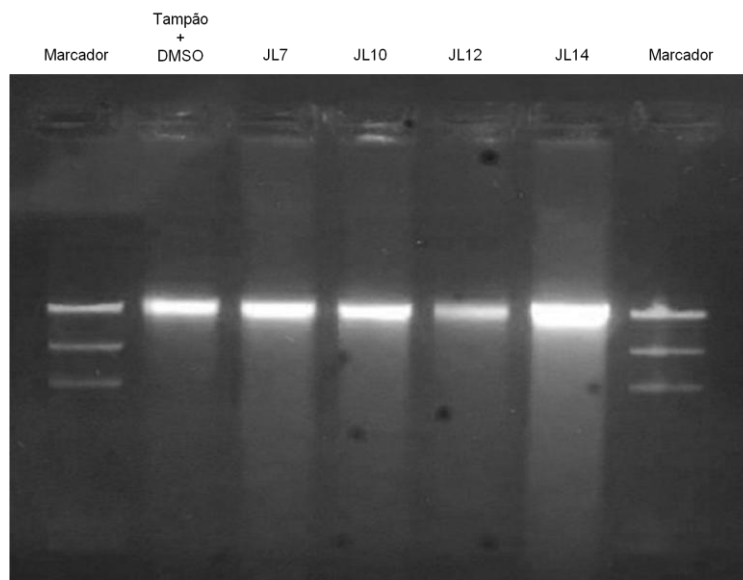


Figura 4.16 - Eletroforese em gel de agarose para verificação da integridade das amostras expostas aos compostos. As condições da eletroforese foram: gel de agarose 0,7% em TAE 1x com Gel Red 0,0015%, corrente de 90 V aplicada durante 90 minutos. Cada uma das amostras contém 200 ng de gDNA de células HCT116. Legenda: M - Marcador de pesos moleculares Lambda HindIII; 1 - Amostra de gDNA purificado de células de HCT116 expostas a DMSO 0,1% (v/v); 2 - Amostra de gDNA purificado de células de HCT116 expostas a 5 µM de JL7; 3 - Amostra de gDNA purificado de células de HCT116 expostas a 4 µM de JL10; 4 - Amostra de gDNA purificado de células de HCT116 expostas a 5 µM de JL12; 5 - Amostra de gDNA purificado de células de HCT116 expostas a 3 µM de JL14.

Pela análise do gel de eletroforese (figura 4.16), e pela comparação com o controlo (células expostas ao DMSO), verifica-se que os compostos parecem não ter capacidade de clivar o gDNA pela ausência de um perfil de bandas com diferentes pesos moleculares ao longo da *lane* ou algum tipo de arrastamento nas amostras expostas aos compostos, com exceção do composto JL14 em que existe aparentemente uma maior degradação do gDNA dada pela maior intensidade da banda.

A incapacidade dos compostos em clivarem o gDNA de células HCT116, não significa obrigatoriamente que estes não sejam internalizados. Os compostos podem ser internalizados pelas células HCT116, tal como demonstrado na secção 4.5, mas não conseguem aceder ao núcleo, ou podem ser internalizados e entrarem no núcleo mas não terem a capacidade de interagir com o DNA.

4.6.1.2 Interação dos compostos de Cu(I) com o DNA genómico

Como não se conseguiu observar interação entre os compostos e o gDNA, e a consequente internalização na secção 4.6.1.1, avaliou-se a interação por um método ligeiramente diferente, em que se extraiu o gDNA de células HCT 116 que não tinham sido previamente expostas aos compostos, e onde se aumentou a concentração de composto utilizada (50 μM). Assim, depois da interação de 50 μM dos compostos com 200 ng de gDNA durante 24 horas, e após a corrida do gel de eletroforese obteve-se os resultados apresentados na figura 4.17.

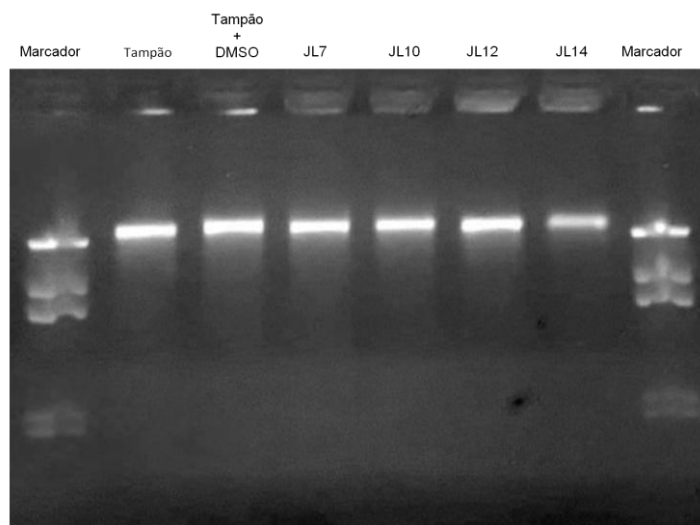


Figura 4.17 - Eletroforese em gel de agarose para verificação da interação dos compostos com o gDNA de células HCT116. As condições da eletroforese foram: gel de agarose 0,7% em TAE 1x com Gel Red 0,0015%, corrente de 90 V aplicada durante 90 minutos. Cada uma das amostras contém 200 ng de gDNA de células HCT116. Legenda: M- marcador de pesos moleculares lambda HindIII; 1 – Amostra de gDNA exposto à solução tampão 5 mM Tris-HCl e 50 mM NaCl pH=7,2 durante 24 horas; 2 - Amostra de gDNA exposto à solução tampão 5 mM Tris-HCl e 50 mM NaCl pH=7,2 e a DMSO a 50% (v/v) durante 24 horas; 3 - Amostra de gDNA exposto a 50 μM de JL7 durante 24 horas; 4 - Amostra de gDNA exposto a 50 μM de JL10 durante 24 horas; 5 - Amostra de gDNA exposto a 50 μM de JL12 durante 24 horas; 6 - Amostra de gDNA exposto a 50 μM de JL14 durante 24 horas

Pela análise do gel e do perfil das bandas (figura 4.17) não existem diferenças entre os controlos e as amostras de DNA genómico expostas aos compostos. Este facto pode dever-se a este DNA ser de elevado peso molecular e poder encontrar-se em estruturas pouco acessíveis para os compostos. Desta forma, na secção seguinte foi avaliada a interação dos compostos com um DNA de peso molecular mais baixo, o DNA plasmídico.

4.6.2 Interação dos compostos de Cu(I) com o DNA plasmídico

Com o objetivo de testar a interação dos compostos de Cu(I) com um DNA de menor peso molecular que se encontre em estruturas mais acessíveis, estudou-se a interação dos compostos com o DNA plasmídico. Desta forma, 100 ng de pUC18 foram expostos a concentrações crescentes dos compostos (5, 25 e 50 μM) durante 24 horas ou a diferentes tempos de exposição (1, 3, 6, 24 e 48 horas) com a mesma concentração de composto (25 μM). Realizaram-se ainda controlos com o pUC18 em tampão Tris-HCl, em 50% (v/v) de DMSO e incubado com a enzima de restrição HindIII durante 2 horas. Em seguida, correu-se uma eletroforese em gel de agarose para cada um dos ensaios (figura 4.18 e 4.19).

Normalmente, o DNA plasmídico apresenta-se numa conformação superenrolada, sendo que em caso de clivagem numa cadeia simples adopta uma conformação circular e quando ambas as cadeias são clivadas, o pDNA é convertido na sua conformação linear.

A amostra com a HindIII vai funcionar como um controlo positivo, pois a HindIII é uma endonuclease de restrição que possui um local de corte no DNA de cadeia dupla, cuja sequência de reconhecimento é 5' A-AGCTT e está presente no pUC18 (o local do corte está representado pelo traço na sequência nucleotídica). Desta forma, o plasmídeo exposto a esta enzima de restrição fica na sua forma linear pela hidrólise da ligação fosfodiéster.

4.6.2.1 Exposição de pUC18 a concentrações crescentes dos compostos de Cu(I)

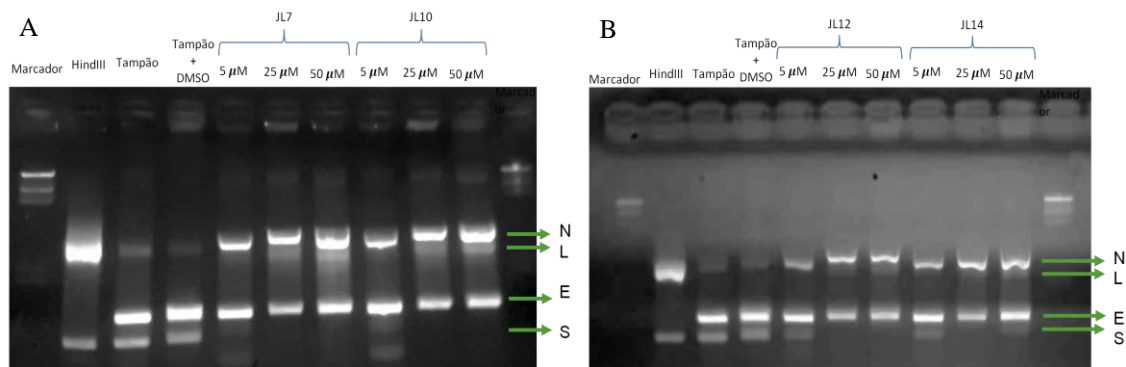


Figura 4.18 - Eletroforese em gel de agarose das amostras do ensaio de interação dos compostos de Cu(I) com o DNA plasmídico. O DNA plasmídico (100 ng pUC18) foi exposto a concentrações crescentes dos compostos como indicado na parte de cima da figura, durante 24 horas. As condições da eletroforese foram: gel de agarose 1,0% em TAE 1x com Gel Red 0,0015%, corrente de 40 V aplicada durante 3 horas. Legenda geral das figuras: M - marcador de pesos moleculares lambda HindIII; 1 – Amostra de pUC18 incubado com HindIII durante 2 horas; 2 – Amostra de pUC18 exposto à solução tampão 5 mM Tris-HCl e 50 mM NaCl pH=7,2 durante 24 horas; 3 - Amostra de pUC18 exposto à solução tampão 5 mM Tris-HCl e 50 mM NaCl pH=7,2 e a DMSO a 50% (v/v) durante 24 horas; 4 - Amostra de pUC18 exposto a 5 μ M do composto indicado durante 24 horas; 5 - Amostra de pUC18 exposto a 25 μ M do composto indicado durante 24 horas; 6 - Amostra de pUC18 exposto a 50 μ M do composto indicado durante 24 horas; 7 - Amostra de pUC18 exposto a 5 μ M do composto indicado durante 24 horas; 8 - Amostra de pUC18 exposto a 25 μ M do composto indicado durante 24 horas; 9 - Amostra de pUC18 exposto a 50 μ M do composto indicado durante 24 horas. As setas a verde correspondem às isoformas do plasmídeo pUC18, N – isoforma nicked; L – isoforma linear; E – isoforma enrolada SE – isoformas super-enroladas.

Pela análise da figura 4.18, é possível identificar 3/4 bandas correspondentes às isoformas do plasmídeo pUC18 no gel. A banda mais a cima corresponde à isoforma *nicked* (N), a banda do meio corresponde à forma do plasmídeo linearizado (L), e as bandas mais a baixo no gel que sofreram maior migração durante a eletroforese correspondem a formas enroladas e super-enroladas do plasmídeo (E e SE).

Para as amostras controlo observam-se a presença de 3 bandas (N, E e SE), enquanto que, a amostra do DNA plasmídico que foi exposta à atividade da HindIII apresenta 2 bandas, uma correspondente à forma linear como era esperado e ao desaparecimento das formas N e E.

Por outro lado, nas amostras expostas a diferentes concentrações de composto é possível visualizar algumas alterações nos perfis de migração. Com uma concentração de 5 μ M dos compostos começa-se a observar um decréscimo na intensidade das bandas SE e E, e um aumento de intensidade na banda correspondente à forma *nicked* do plasmídeo. Quando se aumenta a concentração dos compostos para 25 μ M, observa-se o

desaparecimento da forma SE e o aparecimento da forma linear do plasmídeo, tendência que se verifica também para as amostras expostas a 50 μM de composto

Desta forma, este ensaio mostrou que os compostos de Cu(I) conseguem interagir com o pDNA e clivá-lo em cadeia dupla, sendo que aos 25 μM de composto essa interação atinge a sua saturação, verificando-se perfis eletroforéticos semelhantes para concentrações superiores.

4.6.2.2 Variação do tempo de exposição de pUC a uma concentração fixa de composto

Após determinada a concentração a partir da qual os compostos conseguem interagir e clivar o pDNA de pUC18 (25 μM), pretende-se descobrir quanto tempo demora essa interação a ser estabelecida.

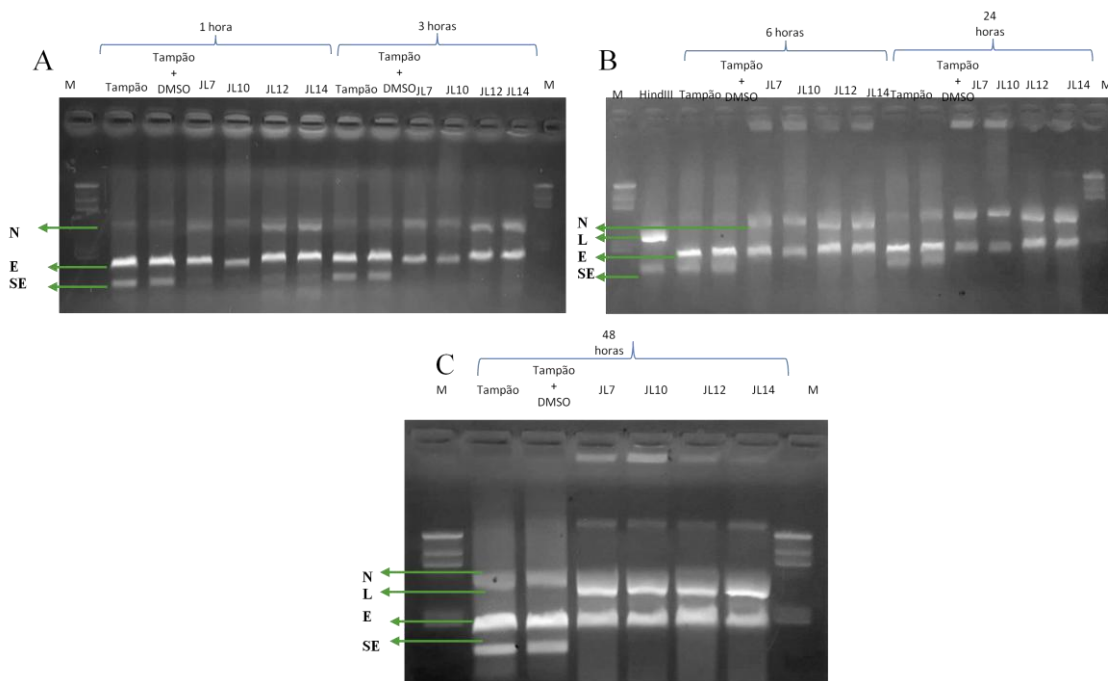


Figura 4.19 - Eletroforese em gel de agarose das amostras do ensaio de interação dos compostos de Cu(I) com o DNA plasmídico. O DNA plasmídico (100 ng pUC18) foi exposto a uma concentração fixa de composto (25 μM) com variação do tempo de exposição (1, 3, 6 e 24 horas). As condições da eletroforese foram: gel de agarose 1,0% em TAE 1x com Gel Red 0,0015%, corrente de 90 V aplicada durante 3 horas. O marcador de pesos moleculares utilizado foi o λ HindIII; e a legenda das imagens A, B e C encontra-se por cima dos poços. As setas a verde correspondem às isoformas do plasmídeo pUC18, N – isoforma nicked; L – isoforma linear; E – isoforma enrolada SE – isoformas super-enroladas.

Através da observação da figura 4.19 (A), verifica-se que logo na primeira hora de exposição aos compostos a forma SE começa a desaparecer, ao mesmo tempo que ocorre um aumento de intensidade da forma *nicked* relativamente aos controlos. Esta

tendência mantém-se às 3 horas de exposição, desta feita com uma perda de intensidade da banda SE do pUC18. Na figura **4.19 (B)**, observa-se que após 6 e as 24 horas de exposição aos compostos continua a existir um aumento da isoforma *nicked* e também o aparecimento da forma linear do plasmídeo. Entre as 24 e as 48 horas de exposição (figura **4.19 (C)**), observa-se um aumento de intensidade da forma linear do plasmídeo. Assim, o perfil eletroforético observado indica que possivelmente são necessárias mais do que 24 horas para que a interação entre os compostos e o pDNA de pUC18 se dê na sua totalidade.

4.6.2.3 Determinação dos mecanismos de clivagem do DNA pelos compostos de Cu(I)

Como já foi demonstrado que os compostos em estudo eram capazes de clivar o pDNA, neste ensaio pretende-se determinar o mecanismo pelo qual a clivagem ocorre. Para tal, foram utilizados 3 agentes sequestradores de espécies reativas de oxigénio, entre os quais, o ácido ascórbico (sequestrador de aniões superóxido), a azida de sódio (NaN_3) (sequestrador de singletos de oxigénio), e a L-histidina (sequestrador de singletos de oxigénio e radicais hidroxilo).

Vários compostos de cobre já mostraram capacidade de provocar danos ao DNA pela formação de radicais livre de oxigénio, tais como os radicais superóxido e hidroxilo, através da reacções de Fenton, pretendendo-se determinar se neste caso a via é de clivagem é oxidativa ou hidrolítica.

Este ensaio foi realizado apenas para o composto JL10, uma vez que este composto é o que apresenta maior potencial antiproliferativo, com uma elevada citotoxicidade para células tumorais e efeitos secundários reduzidos comparados com os restantes, sendo também o composto que foi capaz de produzir ROS em maior escala e de maneira significativa (**secção 4.3.6**). Utilizou-se também o H_2O_2 , que se sabe que tem a capacidade de interagir com o DNA e clivá-lo por mecanismos oxidativos, através da formação de radicais livres de oxigénio, funcionando como um controlo positivo.

O gel obtido após a corrida da eletroforese está representado na figura **4.20**.

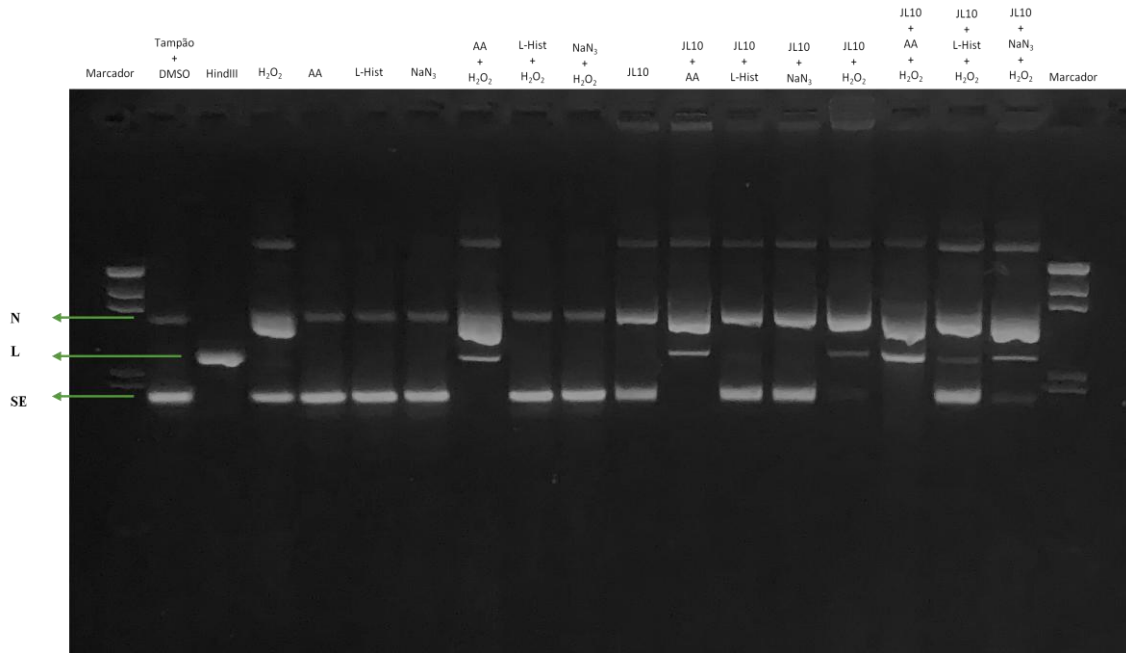


Figura 4.20 - Eletroforese em gel de agarose para determinação dos mecanismos de clivagem de DNA pelo composto JL10. As condições da eletroforese foram: gel de agarose 1,0% em TAE 1x com Gel Red 0,0015%, corrente de 80 V aplicada durante 90 minutos. Legenda: M- marcador de pesos moleculares lambda HindIII; 1- Amostra de pUC18 exposto a 5 mM Tris-HCl e 50 mM NaCl e 25% (v/v) DMSO; 2- Amostra de pUC18 exposto à atividade da HindIII; 3- Amostra de pUC18 exposto a 100 μ M de H₂O₂; 4- Amostra de pUC18 exposto a 50 μ M de ácido ascórbico; 5- Amostra de pUC18 exposto a 50 μ M de NaN₃; 6- Amostra de pUC18 exposto a 50 μ M de L-Histidina; 7- Amostra de pUC18 exposto a 50 μ M de ácido ascórbico e 100 μ M de H₂O₂; 8- Amostra de pUC18 exposto a 50 μ M de NaN₃ e 100 μ M de H₂O₂; 9- Amostra de pUC18 exposto a 50 μ M de L-histidina e 100 μ M de H₂O₂; 10- Amostra de pUC18 exposto a 25 μ M de JL10; 11- Amostra de pUC18 exposto a 25 μ M de JL10 e 50 μ M de ácido ascórbico; 12- Amostra de pUC18 exposto a 25 μ M de JL10 e 50 μ M de NaN₃; 13- Amostra de pUC18 exposto a 25 μ M de JL10 e 50 μ M de L-Histidina; 14- Amostra de pUC18 exposto a 25 μ M de JL10 e 100 μ M de H₂O₂; 15- Amostra de pUC18 exposto a 25 μ M de JL10, 50 μ M de ácido ascórbico e 100 μ M de H₂O₂; 16- Amostra de pUC18 exposto a 25 μ M de JL10, 50 μ M de NaN₃ e 100 μ M de H₂O₂; 17- Amostra de pUC18 exposto a 25 μ M de JL10, 50 μ M de L-histidina e 100 μ M de H₂O₂. As setas a verde representam aos isoformas de pUC18 identificadas no gel: N- isoforma nicked; L- isoforma linear do pUC18; SE- isoforma super-enrolada.

Foi possível identificar 3 bandas correspondentes a 3 isoformas do plasmídeo pUC18, a banda com menor migração no gel correspondente à forma *nicked*, a banda correspondente à forma linear do plasmídeo identificada pela amostra em que se utilizou a HindIII, e a banda de maior migração que corresponde à forma superenrolada do plasmídeo.

Analisando a figura 4.20, observa-se, como esperado, que o H₂O₂ tem a capacidade de hidrolisar o pDNA, observando-se uma diminuição da forma superenrolada do plasmídeo e um aumento na intensidade da forma linear. Também se verifica que nenhum dos agentes sequestradores sozinho foi capaz de clivar o DNA, apresentando perfis eletroforéticos semelhantes ao do controlo. Relativamente às

amostras em que se utilizou o H_2O_2 juntamente com estes agentes, observa-se que com a azida de sódio e a L-Histidina, a hidrólise do pDNA é inibida, enquanto que com o ácido ascórbico continua a existir, o que seria de esperar, pois tanto a azida de sódio, como a L-Histidina sequestram radicais livre de oxigénio e a clivagem do pDNA pelo H_2O_2 dá-se por mecanismos oxidativos, através da formação destes radicais.

Da mesma forma, também nas amostras do composto JL10 com os agentes sequestradores se verifica um perfil semelhante, só existindo hidrólise do DNA na presença do ácido ascórbico com o desaparecimento da forma superenrolada e o aparecimento da banda correspondente ao plasmídeo linearizado. Sendo a azida de sódio, sequestrador de singletos de oxigénio, e a L-histidina, responsável por sequestrar singletos de oxigénio e radicais hidroxilo, conclui-se que a clivagem de DNA pelo JL10 dá-se pela via oxidativa, dependente de radicais de oxigénio. Este resultado vai ao encontro do resultado obtido no ensaio da produção de ROS, onde ficou demonstrada a propensão destes compostos para produzir espécies reativas de oxigénio.

Por outro lado, nas amostras em que se utilizou o JL10 com o H_2O_2 e os agentes sequestradores observam-se em todas as amostras clivagem do DNA, sendo que a mesma acontece em maior proporção no ensaio com o ácido ascórbico, em que a forma superenrolada desaparece completamente e a forma linear se torna mais intensa. Supostamente, sendo ambos os compostos (JL10 e H_2O_2), agentes capazes de interagir com o DNA e clivá-lo pela formação de radicais de oxigénio, quando se utilizam a azida de sódio e a L-Histidina não seria de esperar que houvesse hidrólise do DNA, ainda que a mesma seja em pouca quantidade. Contudo, pode existir um efeito de potenciação na ação destes compostos quando adicionados em conjunto, provocando uma produção em maior escala de radicais de oxigénio, sendo que, os agentes sequestradores na concentração utilizada neste ensaio podem não ter a capacidade de sequestrar todos os radicais produzidos.

4.7 Análise proteómica

Na tentativa de confirmar alguns dos resultados obtidos e perceber as vias celulares maioritariamente afetadas pela ação do composto JL10, procedeu-se à análise proteómica em células HCT116 após exposição das mesmas ao IC_{50} do composto. Esta análise permite identificar e quantificar a expressão proteica, bem como potenciais modificações pós-traducionais das proteínas.

As proteínas são separadas de acordo com o seu ponto isoeletrico e massa molecular após a realização de uma eletroforese bidimensional. Os géis 2D obtidos foram analisados no programa Melanie 7.0 para determinação de variações nos níveis de expressão das proteínas, e comparados relativamente a um gel de referência de células HCT116 [115], presente em anexo (anexo 7.4) para identificação das mesmas. Valores de expressão acima de 1,5 e abaixo de 0,7, foram considerados como significativamente diferentes a nível biológico, correspondendo a proteínas sobre-expressas e sub-expressas, respetivamente. Os níveis de expressão de cada proteína foram calculados através da razão entre a intensidade do spot do composto e do controlo em DMSO.

Foram observadas um total de 328 proteínas expressas em células HCT116, das quais 44 % não sofreram variações ao nível da expressão, 24 % encontram-se sub-expressas, e 32 % sobre-expressas (figura 4.21).

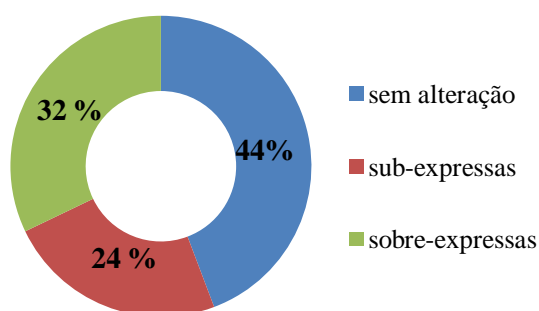


Figura 4.21 – Análise de alterações nos níveis de expressão de proteínas na linha tumoral HCT116 após exposição ao JL10. São apresentadas a % de proteínas sub-expressas ($< 0,7$), sobre-expressas ($> 1,5$) e sem alterações significativas nos níveis de expressão ($0,7 \leq \text{fold} \leq 1,5$).

Através da comparação dos géis obtidos (figura 4.22) com o gel de referência de células HCT116 foi possível identificar algumas proteínas, sendo que, as mais relevantes e que sofreram alterações ao nível da sua expressão encontram-se representadas na tabela 4.3. A classificação das proteínas quanto às suas funções foi feita recorrendo à plataforma STRING 11.0 (*Search Tool for the Retrieval of interacting genes/proteins*) e ao UniProt (*Universal Protein Resource*).

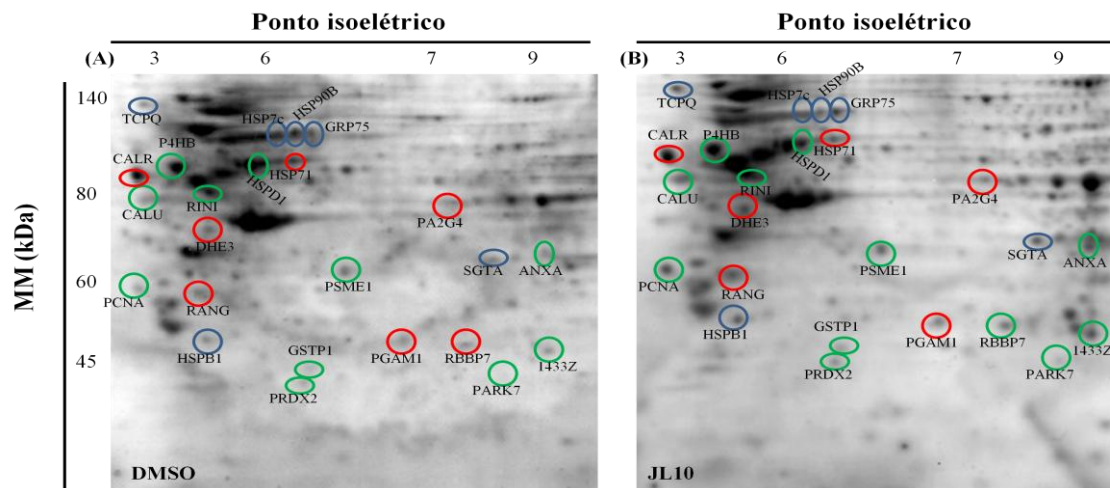


Figura 4.22 – Eletrofore bidimensional (2D) de extratos totais de proteínas da linha celular HCT116. As células foram expostas a (A) 0,1 % (v/v) de DMSO ou (B) IC₅₀ do JL10 durante 48 horas. Os géis foram analisados no programa Melanie 7.0, e os spots de proteínas identificados. As proteínas que não sofreram alterações na expressão estão identificadas a azul, as sobre-expressas a verde e as sub-expressas a vermelho.

Tabela 4.3- Proteínas identificadas nos géis com recurso à comparação com um gel de referência de células HCT116 (anexo 7.4), tal como os seus níveis de expressão calculados relativamente ao controlo em DMSO e a sua função molecular. Os valores de expressão inferiores a 0,7 (vermelho) e superiores a 1,5 (verde) foram considerados como proteínas sub-expressas e sobre-expressas, respetivamente, enquanto que os valores compreendidos entre 0,7 e 1,5 não representam alterações significativas nos níveis de expressão.

Identificação da proteína	Nível de expressão	Função molecular
CALU_HUMAN- <i>Calumenin</i>	4,18	Processos metabólicos das proteínas celulares
P4HB_HUMAN <i>Protein disulfide-isomerase</i>	1,70	Ligação e <i>fold</i> ing de proteínas
PCNA_HUMAN- <i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	1.60	Regulação do crescimento
PA2G4_HUMAN <i>Proliferation-associated protein 2G4</i>	0,35	Regulação do crescimento
RINI_HUMAN <i>Ribonuclease inhibitor</i>	1,53	Regulação do crescimento
RANG_HUMAN <i>Ran specific GTPase activating protein</i>	0,68	Regulação do ciclo celular
PSME1_HUMAN <i>Proteasome activator complex subunit 1</i>	2.60	Ativador do proteossoma
RBBP7_HUMAN <i>Histone-binding protein</i>	2.22	Fator de remodelação da cromatina

PGAM1_HUMAN <i>Phosphoglycerate Mutase 1</i>	0,65	Glicólise
PARK7_HUMAN <i>Protein DJ-1</i>	2,58	Autofagia / Resposta a <i>stress</i>
PRDX2_HUMAN <i>Peroxiredoxin-2</i>	2,18	Componente <i>turnover</i> / Desintoxificação
GSTP1_HUMAN <i>Glutathione S-transferase P 1</i>	1,72	Desintoxificação
ANXA_HUMAN <i>Annexin</i>	3,99	Resposta a <i>stress</i>
CALR_HUMAN- <i>Calreticulin</i>	0,66	<i>Chaperone</i>
TCPQ_HUMAN <i>T-complex protein 1 subunit theta</i>	1,36	<i>Chaperone</i> / Resposta a <i>stress</i>
HSP7C_HUMAN <i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	0,81	<i>Chaperone</i> / Resposta a <i>stress</i>
HSP71_HUMAN <i>Heat shock 70 kDa protein 1A/1B</i>	0,66	<i>Chaperone</i> /Resposta a <i>stress</i>
HSPD1_HUMAN <i>Heat shock 60kDa protein 1</i>	1,51	<i>Chaperone</i> /Resposta a <i>stress</i>
HSP90B_HUMAN <i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	0,78	<i>Chaperone</i> /Resposta a <i>stress</i>
HSBP1_HUMAN <i>Heat shock protein beta-1</i>	1,00	<i>Chaperone</i> /Resposta a <i>stress</i>
GRP75_HUMAN <i>Heat shock 70 kDa protein</i>	0,70	<i>Chaperone</i> /Resposta a <i>stress</i>
SGTA_HUMAN <i>Small glutamine-rich tetratricopeptide repeatcontaining protein alpha</i>	1,26	<i>Chaperone</i> /Resposta a <i>stress</i>
(1433Z)_HUMAN <i>14-3-3 protein zeta/delta</i>	3,48	Tradução de sinal
DHE3_HUMAN <i>Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial</i>	0,54	Síntese de glutamato

Pela análise da figura 4.22 e da tabela 4.3 é possível observar diferenças na expressão de algumas proteínas após a exposição das células HCT116 ao composto JL10, nomeadamente em proteínas reguladoras do crescimento celular, de resposta ao *stress* e *chaperones*. A maior parte das proteínas apresentam níveis de sobre-expressão.

A proteína CALU é uma das que se encontra sobre-expressa, e tem como principal função o *folding* e separação de proteínas no retículo endoplasmático (RE). É uma proteína de ligação ao cálcio, que em condições normais se encontra no RE, sendo que em situações de paragem do ciclo celular ou de apoptose tardia é transportada para o citoplasma. Nas fases iniciais da apoptose, esta proteína encontra-se reduzida no citoplasma [116, 117]. Desta forma, a sobre-expressão da mesma corrobora os resultados obtidos no ensaio da regulação do ciclo celular, que demonstrou o potencial citostático do JL10 pela paragem do ciclo na fase G1 (secção 4.4), e no estudo da apoptose pela dupla marcação com AnexinaV – FITC e IP que mostrou que o composto induz maioritariamente apoptose tardia (secção 4.3.2). Outro indício do potencial apoptótico do composto em células HCT116, é a sobre-expressão de ANXA1, uma proteína que regula processos anti-inflamatórios através da ligação a fosfolípidos e cálcio, e que foi demonstrado que pode intervir no processo apoptótico pela ativação da caspase-3 [118]. Da mesma forma, outro dado demonstrativo do potencial citostático do composto é a sub-expressão da proteína RANG. Esta proteína atua numa via de sinalização intracelular que controla a progressão do ciclo celular e ainda o transporte de proteínas e ácidos nucleicos através da membrana nuclear. É responsável por manter a RAN (GTPase) na sua forma ativa pela ligação ao GTP, permitindo o transporte de moléculas para dentro e fora do núcleo, com a consequente progressão do ciclo celular, pelo que a sua sub-expressão vai interferir com a progressão do ciclo celular [119, 120].

Observou-se também alterações de expressão em proteínas reguladoras do crescimento, como a PCNA, a RINI e a PA2G4. A PCNA está envolvida no controlo da replicação do DNA, auxiliando a DNA polimerase durante a fase de alongação da cadeia, e desempenha um papel crítico na resposta a danos provocados no DNA, aumentando a sua concentração nestas situações [121, 122]. Assim, a sua sobre-expressão mostra que o composto é capaz de interagir e induzir danos no DNA, tal como ficou demonstrado nos ensaios de interação com o DNA (secção 4.6). Outra proteína que se encontra sobre-expressa é a RINI, uma proteína que inibe a clivagem do RNA, através da inibição de ribonucleases, como a RNASE1 e RNASE2, desempenhando um papel importante na homeostase redox do organismo [123, 124]. A sua sobre-expressão aponta para uma interrupção na síntese de proteínas. Por outro lado, a PA2G4, uma proteína que participa numa via de transdução de sinal regulada por ERBB3 (um membro da família do receptor do fator de crescimento epidérmico), encontra-se sub-expressa [125]. A ativação constitutiva desta via pela sobre-expressão

de algum dos seus componentes está relacionada com o crescimento e proliferação celular em tumores, bem como, com a aquisição de resistência a fármacos [126], pelo que a sub-expressão de PA2G4 é um indicador da capacidade antiproliferativa do composto, demonstrada pelos ensaios de apoptose realizados.

A ação do composto também parece inibir a transcrição do DNA, pela sobre-expressão da proteína RBBP7, que possui uma subunidade de ligação a histonas nucleares, e geralmente tem como alvo fatores de remodelação da cromatina. Esta proteína participa em processos como a deacetilação de histonas pelo complexo histona deacetilase (HDAC), conduzindo à inibição da transcrição. Apresenta-se geralmente bastante expressa em alguns tipos de cancro [127].

Diversas proteínas *chaperones* e de resposta ao *stress* apresentaram alterações nos seus níveis de expressão pela análise proteómica. A proteína CALR, uma *chaperone* de ligação ao Ca^{2+} que promove o *folding* correto das proteínas, fazendo o controlo de qualidade no retículo endoplasmático [128], encontra-se sub-expressa, podendo levar à ocorrência de erros nos processos de síntese de proteínas. A HSPD1, outra proteína *chaperone* de choque térmico envolvida na ativação da caspase-3 [129] também é sobre-expressa. Por outro lado, outra proteína HSP identificada, HSP71, é sub-expressa, enquanto que as restantes não viram a sua expressão alterada (HSP7C, HSP90B, HSPB1 e GRP75). Estas proteínas de choque térmico são ativadas em resposta ao *stress* protegendo as células contra danos causados por estímulos exteriores estando presentes em diversos compartimentos celulares e são altamente expressas em tumores [129]. Os baixos níveis de expressão de HSP71 podem estar relacionados com mecanismos de morte celular apoptóticos [130], pelo que está de acordo com os resultados obtidos na secção 4.3.2. Os níveis de expressão inalterados de SGTA, uma *co-chaperone*, podem se dever ao facto dos níveis de expressão de HSP7C e HSP90 também se manterem constantes, uma vez que SGTA se liga a estas duas proteínas, ajudando-as ao seu *folding* correto [131].

Para além disso, a sobre-expressão da proteína P4HB, que catalisa a formação, a dissociação ou o rearranjo de pontes dissulfureto, é uma resposta das células ao *stress* causado pela exposição ao composto [132]. Esta proteína intervém em vias de sinalização de resposta ao *stress* no RE, e em concentrações elevadas, funciona como uma *chaperone*, impedindo a agregação de proteínas com o *folding* incorreto. Por outro lado, estudos recentes indicam que esta proteína sobre-expressa contribui para o desenvolvimento e resistência adquirida pelos tumores [133].

O PSME1 corresponde a uma subunidade do complexo ativador do proteossoma, e é necessário para a montagem do complexo e processamento eficiente do antígeno. Após a montagem do complexo do proteossoma, dá-se a degradação de proteínas intracelulares marcadas pela ubiquitina. A análise proteômica revelou que após exposição das células HCT116 ao composto, a atividade do proteossoma é aumentada pela sobre-expressão de PSME1, sendo que esta sobre-expressão também está relacionada com a indução de apoptose e autofagia [134].

Diferentes proteínas de resposta ao *stress* oxidativo, como o PARK7 [135], o PRDX2 [136] e a GSTP-1 [137], também mostraram sobre-expressão após a exposição das células ao composto, corroborando os ensaios obtidos no ensaio de ROS, onde se verificou a formação de espécies reativas de oxigênio pela ação do composto. Para além disso, o PARK7 também é uma proteína que participa no processo autofágico, tipo de morte celular induzida pelo composto (secção 4.4.3) [135].

A sub-expressão da proteína DHE3, envolvida indiretamente no processo de respiração aeróbia para obtenção de ATP através da síntese de glutamato [138], pode indicar uma diminuição da atividade metabólica da célula em resposta à citotoxicidade do composto. Da mesma forma, a proteína PGAM1, envolvida na glicólise [139] também se encontra sub-expressa, indicando uma baixa atividade metabólica.

Por último, verificou-se a sobre-expressão da proteína 1433Z. Esta proteína participa na regulação de várias vias de sinalização, incluindo a proliferação celular e a apoptose. No entanto, a expressão aumentada da mesma tem sido associada ao desenvolvimento de tumores, com formação de metástases, e à resistência das células à morte celular induzida (quimioterapia) [140]. Este resultado não é consistente com os resultados obtidos anteriormente, pois verificou-se a indução de diferentes tipos de morte celular pelo composto.

Ainda assim, através da análise proteômica foi possível confirmar alguns dos resultados obtidos anteriormente, nomeadamente o potencial apoptótico do composto JL10, demonstrado pela sobre-expressão de proteínas como a CALU, ANXA, PA2G4 e HSPD1, e a sub-expressão de HSP71. A sobre-expressão de proteínas de resposta ao *stress* oxidativo, como PARK7, o PRDX2 e a GSTP-1, também permitiu corroborar os resultados obtidos nos ensaios de ROS e de interação com o DNA, onde se verificou a capacidade do JL10 em formar espécies reativas de oxigênio, sendo a maior expressão destas proteínas uma tentativa de combater o dano oxidativo causado. A expressão

aumentada de PARK7 também pode ser um indicador da existência de autofagia, tal como os resultados anteriores indicavam. O potencial citostático do JL10 foi confirmado pelo aumento de expressão da proteína CALU e a uma expressão diminuída de RANG.

O folding e síntese de proteínas também é afetado pela ação do composto, levando a alterações nos níveis de expressão de diversas proteínas *chaperones*, e a um aumento da atividade proteolítica pela sobre-expressão de PSME1.

Verificou-se ainda que o composto interfere com outras vias celulares, nomeadamente ao nível da glicólise e da obtenção de ATP, reduzindo a atividade metabólica da célula com a sub-expressão de PGAM1 e DH3B.

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

5. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

O cancro apresenta-se como uma das grandes ameaças para a saúde da população a nível mundial. O número de novos casos diagnosticados tem aumentado de ano para ano, e espera-se que continue a aumentar dado o crescimento em número e o envelhecimento da população mundial com o aumento da esperança média de vida. Esta patologia tem sido uma das principais causas de morte a nível global, pelo que é imperioso investir no desenvolvimento de novas técnicas que possam tornar mais eficaz o tratamento desta doença.

Sendo a quimioterapia uma das técnicas maioritariamente utilizadas no combate ao cancro, neste trabalho estudou-se o potencial quimioterapêutico de novos compostos de cobre(I) em células HCT116 de cancro colorretal, com vista a poderem substituir os compostos utilizados atualmente, ultrapassando as suas principais lacunas, que se prendem com a baixa especificidade dos mesmos para o local do tumor, o que conduz à necessidade de aumentar a dose, produzindo um aumento de efeitos secundários que diminuem a qualidade de vida do paciente e a possibilidade de uma aquisição de resistências das células cancerígenas à ação dos compostos. O desenvolvimento de complexos metálicos como possíveis agentes quimioterapêuticos tem sido um dos principais focos na área da investigação ao nível da quimioterapia.

Pelos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade, ficou demonstrado que dos 4 compostos de cobre estudados, o JL10 é o que apresenta maior potencial citotóxico para o tratamento do cancro colorretal, pela sua elevada citotoxicidade para as células HCT116, e por apresentar uma sensibilidade reduzida para células saudáveis (fibroblastos). O IC_{50} deste composto calculado para a linha tumoral HCT116 é mais baixo que o dos compostos utilizados no tratamento atual. Também em células HCT116 resistentes à doxorubicina, o IC_{50} calculado revelou-se bastante promissor.

Na tentativa de entender os mecanismos de ação destes compostos, realizaram-se diversos ensaios biológicos, onde se concluiu, através de um ensaio de dupla marcação com anexina V-FITC e IP, que estes têm a capacidade de induzir apoptose, sendo a morte por necrose não significativa para estes compostos. Para se perceber qual a via apoptótica maioritariamente ativada foi feito um estudo do potencial mitocondrial, onde ficou demonstrado que é a via intrínseca, nomeadamente nos compostos JL7, JL10 e JL12. A ativação desta via para o composto JL10 pode estar relacionada com a

produção de ROS, pois este composto mostrou capacidade de despoletar a produção de espécies reativas de oxigénio, enquanto que, os restantes compostos não mostraram essa capacidade, pelo que a ativação desta via será por outro mecanismo. A expressão aumentada da proteína BAX (proteína pro-apoptótica) relativamente a BCL-2 (proteína anti-apoptótica) obtida no ensaio de western blot para o composto JL10, é mais um facto ilustrativo da indução de apoptose pela via intrínseca.

No entanto, estes compostos induzem outros tipos de morte celular para além da apoptose, como a autofagia. Este tipo de morte celular é importante em células que apresentam resistência a mecanismos apoptóticos, mas também tem sido associado à promoção e sobrevivência de tumores, sendo importante clarificar melhor o seu papel.

A maioria dos compostos quimioterapêuticos sintetizados têm como alvo o DNA, permitindo a regulação da expressão genética. Assim foi avaliado o potencial citostático dos compostos na regulação do ciclo celular, e em seguida foram feitos ensaios de interação dos mesmos com o DNA para avaliar a sua internalização em células HCT116 e os mecanismos de clivagem. Ficou demonstrado que o composto JL10 tem a capacidade de bloquear o ciclo celular na fase G1, exibindo potencial citostático. Estes compostos não mostraram ter a capacidade de interagir o DNA genómico de células HCT116, possivelmente pelo seu elevado peso molecular, pelo que não se conseguiu demonstrar por este ensaio a capacidade dos compostos em chegar ao núcleo. No entanto, os compostos evidenciaram capacidade de interagir e clivar o DNA plasmídico, sendo que, para o JL10 ficou ainda demonstrado que essa clivagem ocorre por mecanismos oxidativos pela formação de radicais livres de oxigénio, o que corrobora os resultados obtidos no ensaio da produção de ROS para este composto.

Através dos resultados obtidos pela técnica de ICP-AES, ficou ainda demonstrada a capacidade dos compostos estudados internalizarem em células HCT116, o que vai de encontro à existência de apoptose intrínseca e à interferência do JL10 com o ciclo celular.

A análise proteómica, corroborou alguns resultados obtidos anteriormente, como o potencial apoptótico, autofágico e citostático do composto, bem como a sua capacidade em produzir espécies reativas de oxigénio e provocar danos no DNA. Por outro lado, também se verificou a interferência do composto no folding e síntese de proteínas, e a sua capacidade em provocar modificações pós-traducionais. Por último, observou-se que o composto provoca uma redução no metabolismo celular, diminuindo a obtenção de energia por parte da célula.

Assim sendo, os objetivos propostos foram alcançados, tendo-se verificado um enorme potencial destes complexos metálicos de Cu(I), nomeadamente o composto JL10, para poderem vir a ser utilizados futuramente na quimioterapia. No entanto, para que isso aconteça ainda há um longo caminho a percorrer e a necessidade de realizar mais ensaios adicionais *in vitro*. Calcular a constante de afinidade do composto para o DNA e estudar a interação do composto com outras biomoléculas, como a BSA (albumina de soro bovino) que apresenta uma homologia estrutural à albumina sérica humana (HSA) poderão fornecer outros dados adicionais importantes, nomeadamente ao nível da distribuição, concentração livre e metabolismo da droga no organismo.

Como abordagem futura seria interessante, procurar modificar a estrutura do composto para perceber se é possível aumentar ainda mais a citotoxicidade para as células tumorais HCT116 ou reduzi-la em células saudáveis. Outra hipótese será tentar desenvolver um sistema de entrega mais eficaz que permita aumentar a eficácia do tratamento e reduzir os efeitos secundários, nomeadamente através da incorporação do composto em nanopartículas.

Por fim, será necessário proceder a ensaios experimentais *in vivo*, em ratinhos numa primeira instância, e se o composto permanecer promissor, em humanos. Só depois de passar por todos estes testes, o mesmo poderá ser aceite pela FDA (do inglês, *food and drug administration*) e incorporado no mercado.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] “All cancer types factsheet,” *International Agency for Research on Cancer. Globocan.*, 2018. [Online, accessed a 15-07-2019]. Available: <http://gco.iarc.fr/today>.
- [2] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, pp. 394–424, 2018.
- [3] “Cancer Facts & Figures 2018,” *Am Cancer Soc*, 2018.
- [4] C. Marant-Micallef, D. K. Shield, J. Vignat, E. Cléro, A. Kesminiene, C. Hill, A. Rogel, B. Vacquier, F. Bray, D. Laurier, and I. Soerjomataram, “The risk of cancer attributable to diagnostic medical radiation: Estimation for France in 2015,” *Int. J. Cancer.*, vol. 144, pp. 2954–2963, 2019.
- [5] M. M. Fidler, F. Bray, and I. Soerjomataram, “The global cancer burden and human development: A review,” *Scand. J. Public Health*, vol. 46, pp. 27–36, 2018.
- [6] J. L. Bishop, T. T. Pham, E. J. Kruse, A. G. Lawson, A. M. Talukder, A. J. Jones, and N. J. Walsh, “Clinical and epidemiological factors associated with suicide in colorectal cancer,” *Support. Care Cancer*, vol. 27, pp. 617–621, 2018.
- [7] F. A. Hagggar and R. P. Boushey, “Colorectal cancer epidemiology: Incidence, mortality, survival, and risk factors,” *Clin. Colon Rectal Surg.*, vol. 22, pp. 191–197, 2009.
- [8] M. Glover, E. Mansoor, M. Panhwar, S. Parasa, and G. S. Cooper, “Epidemiology of Colorectal Cancer in Average Risk Adults 20–39 Years of Age: A Population-Based National Study,” *Dig. Dis. Sci.*, [impress doi: 10.1007/s10620-019-05690-8], 2019. [Epub ahead of print]
- [9] “Colorectal Cancer Facts&Figures 2017-2019,” *Am. Cancer Soc.*, pp. 1–40, 2017.
- [10] D. L. Worthley and B. A. Leggett, “Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities,” *Clin. Biochem. Rev.*, vol. 31, pp. 31–8, 2010.
- [11] T. Flisikowska, C. Merkl, M. Landmann, S. Eser, N. Rezaei, X. Cui, M. Kurome, V. Zakhartchenko, B. Kessler, H. Wieland, O. Rottmann, R. M. Schmid, G. Schneider, A. Kind, E. Wolf, D. Saur, and A. Schmieke, “A porcine model of familial adenomatous polyposis,” *Gastroenterology*, vol. 143, pp. 1173-1175, 2012.
- [12] M. F. Clarke and A. T. Hass, “Cancer Stem Cells Keywords,” in *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, 2004, pp. 221–242.
- [13] D. Hanahan, R. A. Weinberg, and S. Francisco, “The Hallmarks of Cancer,” *Cell*, vol. 100, pp. 57–70, 2000.
- [14] L. B. Alexandrov, S. Nik-Zainal, D. C. Wedge, S. Behjati, A. V. Biankin, G. R. Bignell, N. Bolli, A. Borg, A. L. Børresen-Dale, S. Boyault, B. Burkhardt, A. P. Butler, C. Caldas, H. R. Davies, C. Desmedt, R. Eils, J. E. Eyfjörd, J. A. Foekens, M. Greaves, F. Hosoda, B. Hutter, T. Ilicic, S. Imbeaud, M. Imielinsk, N. Jäger, and M. R. Stratton, “Signatures of mutational processes in human cancer,” *Nature*, vol. 500, pp. 415–421, 2013.
- [15] D. Ziech, R. Franco, A. Pappa, and M. I. Panayiotidis, “Reactive Oxygen Species (ROS)--Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis,” *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 711, pp. 167–173, 2011.
- [16] V. Ganapathy, M. Thangaraju, and P. D. Prasad, “Nutrient transporters in cancer: Relevance to Warburg hypothesis and beyond,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 121, pp. 29–40, 2009.

- [17] N. N. Pavlova and C. B. Thompson, "The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism," *Cell Metab.*, vol. 23, pp. 27–47, 2016.
- [18] S. Biswas, J. Lunec, and K. Bartlett, "Non-glucose metabolism in cancer cells-is it all in the fat?," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 31, pp. 689–698, 2012.
- [19] L. M. R. Ferreira, "Cancer metabolism: The Warburg effect today," *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 89, pp. 372–380, 2010.
- [20] P. S. Ward and C. B. Thompson, "Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate," *Cancer Cell*, vol. 21, pp. 297–308, 2012.
- [21] A. Annibaldi and C. Widmann, "Glucose metabolism in cancer cells," *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol. 13, pp. 466–470, 2010.
- [22] M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, and C. B. Thompson, "Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation," *Science.*, vol. 324, pp. 1029–1033, 2009.
- [23] A. Fadaka, B. Ajiboye, O. Ojo, O. Adewale, I. Olayide, and R. Emuowhochere, "Biology of glucose metabolization in cancer cells," *J. Oncol. Sci.*, vol. 3, pp. 45–51, 2017.
- [24] A. Carracedo, L. C. Cantley, and P. P. Pandolfi, "Cancer metabolism: Fatty acid oxidation in the limelight," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, pp. 227–232, 2013.
- [25] T. K. Kelly, P. A. Jones, and S. Sharma, "Epigenetics in cancer," *Carcinogenesis*, vol. 31, pp. 27–36, 2009.
- [26] M. Esteller and J. G. Herman, "Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours," *J. Pathol.*, vol. 196, pp. 1–7, 2002.
- [27] D. Hanahan and L. M. Coussens, "Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment," *Cancer Cell*, vol. 21, pp. 309–322, 2012.
- [28] J. Bartkova, N. Rezaei, M. Liontos, P. Karakaidos, D. Kletsas, N. Issaeva, L. V. F. Vassiliou, E. Kolettas, K. Niforou, V. C. Zoumpourlis, M. Takaoka, H. Nakagawa, F. Tort, K. Fugger, F. Johansson, M. Sehested, C. L. Andersen, L. Dyrskjot, T. Ørntoft, J. Lukas, C. Kittas, T. Helleday, T. D. Halazonetis, J. Bartek, and V. G. Gorgoulis, "Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints," *Nature*, vol. 444, pp. 633–637, 2006.
- [29] L. Chin, R. A. De Pinho, A. Tam, J. Pomerantz, M. Wong, J. Holash, N. Bardeesy, Q. Shen, R. O'Hagan, J. Pantginis, H. Zhou, J. W. Horner, C. Cordon-Cardo, and G. D. Yancopoulos, "Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance.," *Nature*, vol. 400, pp. 468–472, 1999.
- [30] O. Kranenburg, "The KRAS oncogene: Past, present, and future," *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1756, pp. 81–82, 2005.
- [31] S. Schubert, K. Shannon, and G. Bollag, "Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, pp. 295–308, 2007.
- [32] L. B. Johannes, "ras Oncogenes in human cancer: A review," *Cancer Res.*, vol. 49, pp. 4682–4689, 1989.
- [33] M. S. Greenblatt, W. P. Bennett, M. Hollstein, and C. C. Harris, "Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis," *Cancer Res.*, vol. 54, pp. 4855–4878, 1994.
- [34] J. Szeberenyi, "The Regulation of the Function of the Tumor Suppressor Protein p53," *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, vol. 31, pp. 435–436, 2003.

- [35] S. Kato, S. Han, W. Liu, K. Otsuka, H. Shibata, R. Kanamaru, and C. Ishioka, "Understanding the function–structure and function–mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 100, pp. 8424–8429, 2003.
- [36] M. A. Ali and T. Sjöblom, "Molecular pathways in tumor progression: From discovery to functional understanding," *Mol. Biosyst.*, vol. 5, pp. 902–908, 2009.
- [37] F. Mariani, P. Sena, and L. Roncucci, "Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development," *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, pp. 9716–9731, 2014.
- [38] O. R. F. Mook, W. M. Frederiks, and C. J. F. Van Noorden, "The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis," *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1705, pp. 69–89, 2004.
- [39] L. E. Dow, K. P. O'Rourke, J. Simon, D. F. Tschaharganeh, J. H. Van Es, H. Clevers, and S. W. Lowe, "Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer," *Cell*, vol. 161, pp. 1539–1552, 2015.
- [40] B. Leggett and V. Whitehall, "Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis," *Gastroenterology*, vol. 138, pp. 2088–2100, 2010.
- [41] T. Morikawa, A. Kuchiba, M. Yamauchi, J. A. Meyerhardt, K. Shima, K. Nosho, A. T. Chan, E. Giovannucci, and S. Ogino, "Association of CTNNB1 (β -Catenin) Alterations, Body Mass Index, and Physical Activity With Survival in Patients With Colorectal Cancer," *Jama*, vol. 305, pp. 1685–1694, 2011.
- [42] R. H. Wilson, M. C. Whiteside, and S. E. Russell, "Molecular genetics of colorectal cancer," *Clin. Oncol.*, vol. 9, pp. 79–82, 1997.
- [43] W. De Roock, B. Claes, D. Bernasconi, J. De Schutter, B. Biesmans, G. Fountzilas, K. T. Kalogerias, V. Kotoula, D. Papamichael, P. Laurent-Puig, F. Penault-Llorca, P. Rougier, B. Vincenzi, D. Santini, G. Tonini, F. Cappuzzo, M. Frattini, F. Molinari, P. Saletti, S. De Dosso, M. Martini, A. Bardelli, S. Siena, A. Sartore-Bianchi, J. Tabernero, T. Macarulla, F. Di Fiore, A. O. Gangloff, F. Ciardiello, P. Pfeiffer, C. Qvortrup, T. P. Hansen, E. Van Cutsem, H. Piessevaux, D. Lambrechts, M. Delorenzi, and S. Tejpar, "Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: A retrospective consortium analysis," *Lancet Oncol.*, vol. 11, pp. 753–762, 2010.
- [44] L. Moreira, F. Balaguer, N. Lindor, A. De La Chapelle, H. Hampel, L. A. Aaltonen, J. L. Hopper, L. Le Marchand, S. Gallinger, P. A. Newcomb, R. Haile, S. N. Thibodeau, S. Gunawardena, M. A. Jenkins, D. D. Buchanan, J. D. Potter, J. A. Baron, D. J. Ahnen, V. Moreno, M. Andreu, M. P. De Leon, A. K. Rustgi, and A. Castells, "Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer," *J. Am. Med. Assoc.*, vol. 308, pp. 1555–1565, 2012.
- [45] C. C. Pritchard and W. M. Grady, "Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice," *Gut*, vol. 60, pp. 116–129, 2011.
- [46] M. P. Swaffer, A. W. Jones, H. R. Flynn, A. P. Snijders, and P. Nurse, "CDK Substrate Phosphorylation and Ordering the Cell Cycle," *Cell*, vol. 167, pp. 1750–1761, 2016.
- [47] P. Hydbring, M. Malumbres, and P. Sicinski, "Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 17, pp. 280–292, 2016.
- [48] N. Hustedt and D. Durocher, "The control of DNA repair by the cell cycle," *Nat. Cell Biol.*, vol. 19, pp. 1–9, 2017.
- [49] J. Zhao, B. K. Kennedy, B. D. Lawrence, D. A. Barbie, A. Gregory Matera, J. A. Fletcher, and E. Harlow, "NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription," *Genes Dev.*, vol. 14, pp. 2283–2297, 2000.

- [50] K. Vermeulen, D. R. Van Bockstaele, and Z. N. Berneman, "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer," *Cell Prolif.*, vol. 36, pp. 131–149, 2003.
- [51] A. Karimian, Y. Ahmadi, and B. Yousefi, "Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage," *DNA Repair*, vol. 42, pp. 63–71, 2016.
- [52] H. Goto, T. Natsume, M. T. Kanemaki, A. Kaito, S. Wang, E. C. Gabazza, M. Inagaki, and A. Mizoguchi, "Chk1-mediated Cdc25A degradation as a critical mechanism for normal cell cycle progression," *J. Cell Sci.*, vol. 132, [impress doi: 10.1242/jcs.223123], 2019.
- [53] K. S. Lawrence, T. Chau, and J. A. Engebrecht, "DNA Damage Response and Spindle Assembly Checkpoint Function throughout the Cell Cycle to Ensure Genomic Integrity," *PLoS Genet.*, vol. 11, pp. 1–29, 2015.
- [54] V. Nikolettou, M. Markaki, K. Palikaras, and N. Tavernarakis, "Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1833, pp. 3448–3459, 2013.
- [55] J. L. Koff, S. Ramachandiran, and L. Bernal-Mizrachi, "A time to kill: Targeting apoptosis in cancer," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, pp. 2942–2955, 2015.
- [56] K. M. Wright and M. Deshmukh, "Restricting apoptosis for postmitotic cell survival and its relevance to cancer," *Cell Cycle*, vol. 5, pp. 1616–1620, 2006.
- [57] R. Caltabiano, G. Musumeci, D. Basic, S. Giunta, S. Cellek, D. J. Ralph, S. Sansalone, C. Loreto, G. La Rocca, S. Castorina, R. Anzalone, G. Vespasiani, and R. Djinovic, "The Role of Intrinsic Pathway in Apoptosis Activation and Progression in Peyronie's Disease," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, pp. 1–10, 2014.
- [58] F. Guo, W. Zhao, Y. Lin, Y. Yang, W. Saiqi, W. Yingjun, Z. Li, and W. Jiayang, "Truncated apolipoprotein C-I induces apoptosis in neuroblastoma by activating caspases in the extrinsic and intrinsic pathways," *Oncol. Rep.*, vol. 38, pp. 1797–1805, 2017.
- [59] M. Redza-Dutordoir and D. A. Averill-Bates, "Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1863, pp. 2977–2992, 2016.
- [60] J. Chai, J. W. Wu, S. Kyin, Y. Shi, C. Du, and X. Wang, "Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO," *Nature*, vol. 406, pp. 855–862, 2000.
- [61] E. B. Svandova, B. Vesela, H. Lesot, A. Poliard, and E. Matalova, "Expression of Fas, FasL, caspase-8 and other factors of the extrinsic apoptotic pathway during the onset of interdigital tissue elimination," *Histochem. Cell Biol.*, vol. 147, pp. 497–510, 2017.
- [62] T. Kataoka, M. Schröter, M. Hahne, P. Schneider, M. Irmeler, M. Thome, C. J. Froelich, and J. Tschopp, "FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation.," *J. Immunol.*, vol. 161, pp. 3936–42, 1998.
- [63] L. Hu, C. Su, X. Song, Q. Shi, J. Fu, X. Xia, D. Xu, E. Song, and Y. Song, "Tetrachlorobenzoquinone triggers the cleavage of Bid and promotes the cross-talk of extrinsic and intrinsic apoptotic signalings in pheochromocytoma (PC) 12 cells," *Neurotoxicology*, vol. 49, pp. 149–157, 2015.
- [64] M. Henriquez, R. Armisen, A. Stutzin, and A. Quest, "Cell Death by Necrosis, a Regulated Way to Go," *Curr. Mol. Med.*, vol. 8, pp. 187–206, 2008.
- [65] P. Golstein and G. Kroemer, "Cell death by necrosis: towards a molecular definition," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 32, pp. 37–43, 2007.
- [66] N. Mizushima, "Autophagy: Process and function," *Genes Dev.*, vol. 21, pp. 2861–2873, 2007.

- [67] B. Levine and G. Kroemer, "Autophagy in the Pathogenesis of Disease," *Cell*, vol. 132, pp. 27–42, 2008.
- [68] N. Mizushima, B. Levine, A. M. Cuervo, and D. J. Klionsky, "Autophagy fights disease through cellular self-digestion," *Nature*, vol. 451, pp. 1069–1075, 2008.
- [69] G. N. Marta, R. Riera, P. Bossi, L. P. Zhong, L. Licitra, C. R. Macedo, G. De Castro, A. L. Carvalho, W. N. William, and L. P. Kowalski, "Induction chemotherapy prior to surgery with or without postoperative radiotherapy for oral cavity cancer patients: Systematic review and meta-analysis," *Eur. J. Cancer*, vol. 51, pp. 2596–2603, 2015.
- [70] A. J. Breugom, M. Swets, J. F. Bosset, L. Collette, A. Sainato, L. Cionini, R. Glynne-Jones, N. Counsell, E. Bastiaannet, C. B. M. Van den Broek, G. J. Liefers, H. Putter, and C. J. H. Van de Velde, "Adjuvant chemotherapy after preoperative (chemo)radiotherapy and surgery for patients with rectal cancer: A systematic review and meta-analysis of individual patient data," *Lancet Oncol.*, vol. 16, pp. 200–207, 2015.
- [71] T. A. King and M. Morrow, "Surgical issues in patients with breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 12, pp. 335–343, 2015.
- [72] A. J. Moy and J. W. Tunnell, "Combinatorial immunotherapy and nanoparticle mediated hyperthermia," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 114, pp. 175–183, 2017.
- [73] K. Sak, "Chemotherapy and Dietary Phytochemical Agents," *Chemother. Res. Pract.*, vol. 2012, pp. 1–11, 2012.
- [74] R. W. Johnstone, A. A. Ruefli, S. W. Lowe, and E. M. Victoria, "Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy," *Cell*, vol. 108, pp. 153–164, 2002.
- [75] Y. A. Luqmani, "Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy," *Med. Princ. Pract.*, vol. 14, pp. 35–48, 2005.
- [76] S. Nussbaumer, P. Bonnabry, J. L. Veuthey, and S. Fleury-Souverain, "Analysis of anticancer drugs: A review," *Talanta*, vol. 85, pp. 2265–2289, 2011.
- [77] T. Iwamoto, "Current Topics Challenges of Drug Delivery Systems That Contribute to Cancer Chemotherapy Clinical Application of Drug Delivery Systems in Cancer Chemotherapy: Review of the Efficacy and Side Effects of Approved Drugs," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 36, pp. 715–718, 2013.
- [78] C. M. Bender, R. W. McDaniel, K. Murphy-Ende, M. Pickett, C. N. Rittenberg, M. P. Rogers, S. M. Schneider, and R. N. Schwartz, "Chemotherapy-induced nausea and vomiting," *Clin. J. Oncol. Nurs.*, vol. 6, pp. 94–102, 2002.
- [79] P. Pedrosa, R. Mendes, R. Cabral, L. M. D. R. S. Martins, P. V. Baptista, and A. R. Fernandes, "Combination of chemotherapy and Au-nanoparticle phototherapy in the visible light to tackle doxorubicin resistance in cancer cells," *Sci. Rep.*, vol. 8, pp. 1–8, 2018.
- [80] J. Coimbra, C. Mota, S. Santos, P. Viana Batista, and A. R. Fernandes, "Inorganic Compounds Going NANO," *Ann. Med. Chem. Res.*, vol. 1, pp. 1010–1015, 2015.
- [81] A. Silva, D. Luís, S. Santos, J. Silva, A. S. Mendo, L. Coito, T. F. S. Silva, M. F. C. Guedes Da Silva, L. M. D. R. S. Martins, A. J. L. Pombeiro, P. M. Borralho, C. M. P. Rodrigues, M. G. Cabral, P. A. Videira, C. Monteiro, and A. R. Fernandes, "Biological characterization of the antiproliferative potential of Co(II) and Sn(IV) coordination compounds in human cancer cell lines: A comparative proteomic approach," *Drug Metabol. Drug Interact.*, vol. 28, pp. 167–176, 2013.
- [82] A. P. Neves and M. D. Vargas, "Platinum(II) complexes in cancer therapy," *Rev. Virtual Quim.*, vol. 3, pp. 196–209, 2011.

- [83] H. A. Wee and P. J. Dyson, "Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: Towards targeted chemotherapy," *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2006, pp. 4003–4018, 2006.
- [84] C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato, and C. Santini, "Copper Complexes as Anticancer Agents," *Anticancer. Agents Med. Chem.*, vol. 9, pp. 185–211, 2009.
- [85] M. D. Harrison, C. E. Jones, and C. T. Dameron, "Copper chaperones: Function, structure and copper-binding properties," *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 4, pp. 145–153, 1999.
- [86] S. R. B. Devi, A. Dhivya M, and K. N. Sulochana, "Copper transporters and chaperones: Their function on angiogenesis and cellular signalling," *J. Biosci.*, vol. 41, pp. 487–496, 2016.
- [87] J. R. Prohaska, "Role of copper transporters in copper homeostasis," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 88, pp. 826–829, 2008.
- [88] M. M. O. Peña, J. Lee, and D. J. Thiele, "A Delicate Balance: Homeostatic Control of Copper Uptake and Distribution," *J. Nutr.*, vol. 129, pp. 1251–1260, 2018.
- [89] A. N. Pham, G. Xing, C. J. Miller, and T. D. Waite, "Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production," *J. Catal.*, vol. 301, pp. 54–64, 2013.
- [90] D. Strausak, J. F. B. Mercer, H. H. Dieter, W. Stremmel, and G. Multhaup, "Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases," *Brain Res. Bull.*, vol. 55, pp. 175–185, 2001.
- [91] M. Bost, S. Houdart, M. Oberli, E. Kalonji, J. F. Huneau, and I. Margaritis, "Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues," *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 35, pp. 107–115, 2016.
- [92] T. S. Morais, Y. Jousseau, M. F. M. Piedade, C. Roma-Rodrigues, A. R. Fernandes, F. Marques, M. J. Villa de Brito and M. Helena Garcia "Important cytotoxic and cytostatic effects of new copper(i)-phosphane compounds with N,N, N,O and N,S bidentate ligands," *Dalt. Trans.*, vol. 47, pp. 7819–7829, 2018.
- [93] K. Czerwińska, B. Machura, S. Kula, S. Krompiec, K. Erfurt, C. Roma-Rodrigues, A. R. Fernandes, L. S. Shul'Pina, N. S. Ikonnikov, and G. B. Shul'Pin, "Copper(II) complexes of functionalized 2,2':6',2''-terpyridines and 2,6-di(thiazol-2-yl)pyridine: Structure, spectroscopy, cytotoxicity and catalytic activity," *Dalt. Trans.*, vol. 46, pp. 9591–9604, 2017.
- [94] J. Lopes, D. Alves, T. S. Morais, P. J. Costa, M. F. M. Piedade, F. Marques, M. J. Villa de Brito, and M. Helena Garcia "New copper(I) and heteronuclear copper(I)–ruthenium(II) complexes: Synthesis, structural characterization and cytotoxicity," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 169, pp. 68–78, 2017.
- [95] M. T. Kuo, H. H. W. Chen, I. S. Song, N. Savaraj, and T. Ishikawa, "The roles of copper transporters in cisplatin resistance," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 26, pp. 71–83, 2007.
- [96] W. S. MacGregor, "THE CHEMICAL AND PHYSICAL PROPERTIES OF DMSO," *Ann. New York Acad. Sci.*, vol. 141, pp. 3–12, 1967.
- [97] K. Balakin, N. Savchuk, and I. Tetko, "In Silico Approaches to Prediction of Aqueous and DMSO Solubility of Drug-Like Compounds: Trends, Problems and Solutions," *Curr. Med. Chem.*, vol. 13, pp. 223–241, 2005.
- [98] J. C. Stockert, R. W. Horobin, L. L. Colombo, and A. Blázquez-Castro, "Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives," *Acta Histochem.*, vol. 120, pp. 159–167, 2018.
- [99] Z. Yang, J. Yang, P. Li, and C. Sun, "Adriamycin increased apoptosis sensitivity study of TRAIL

gene on human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells,” *Cancer cell research*, vol. 17, pp. 427–431, 2018.

- [100] A. Perelman, C. Wachtel, M. Cohen, S. Haupt, H. Shapiro, and A. Tzur, “JC-1: Alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry,” *Cell Death Dis.*, vol. 3, pp. 1–7, 2012.
- [101] W. Jakubowski and G. Bartosz, “2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: What does it measure?,” *Cell Biol. Int.*, vol. 24, pp. 757–760, 2000.
- [102] C. A. Lipinski, “Poor aqueous solubility: An industry wide problem in drug delivery Discovery,” *Am. Pharm. Rev.*, vol. 5, pp. 82–85, 2002.
- [103] L. C. Crowley, B. J. Marfell, and N. J. Waterhouse, “Analyzing cell death by nuclear staining with Hoechst 33342,” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2016, pp. 778–781, 2016.
- [104] P. Jeannin, J. Bonnefoy, S. Lecoanet-Henchoz, G. Caron, V. Moine, J. Aubry, A. Blaecke, and N. Herbault, “Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity,” *J. Quant. Cell Sci.*, vol. 37, no. 3, pp. 197–204, 2002.
- [105] S. Chen, A. C. Cheng, M. S. Wang, and X. Peng, “Detection of apoptosis induced by new type gosling viral enteritis virus in vitro through fluorescein annexin V-FITC/PI double labeling,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 14, pp. 2174–2178, 2008.
- [106] S. Guo, Y. Liang, S. F. Murphy, A. Huang, H. Shen, D. F. Kelly, P. Sobrado, and Z. Sheng, “A rapid and high content assay that measures cyto-ID-stained autophagic compartments and estimates autophagy flux with potential clinical applications,” *Autophagy*, vol. 11, pp. 560–572, 2015.
- [107] C. P. Tan, Y. Y. Lu, L. N. Ji, and Z. W. Mao, “Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds,” *Metallomics*, vol. 6, pp. 978–995, 2014.
- [108] J. D. Ly, D. R. Grubb, and A. Lawen, “The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update,” *Kluwer Acad. Publ.*, vol. 8, pp. 115–128, 2003.
- [109] P. Elumalai, D. N. Gunadharini, K. Senthilkumar, S. Banudevi, R. Arunkumar, C. S. Benson, G. Sharmila, and J. Arunakaran, “Induction of apoptosis in human breast cancer cells by nimbolide through extrinsic and intrinsic pathway,” *Toxicol. Lett.*, vol. 215, pp. 131–142, 2012.
- [110] J. C. De Vicente, S. Olay, P. Lequerica-Fernandez, J. Sánchez-Mayoral, L. M. Junquera, and M. F. Fresno, “Expression of Bcl-2 but not Bax has a prognostic significance in tongue carcinoma,” *J. Oral Pathol. Med.*, vol. 35, pp. 140–145, 2006.
- [111] D. C. Joshi and J. C. Bakowska, “Determination of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in live rat cortical neurons,” *J. Vis. Exp.*, vol. 51, pp. 2–5, 2011.
- [112] J. Chen, “The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic and Progression,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 6, pp. 1–16, 2016.
- [113] D. Alexander, R. Ellerby, A. Hernandez, F. Wu, and D. Amarasiriwardena, “Investigation of simultaneous adsorption properties of Cd, Cu, Pb and Zn by pristine rice husks using ICP-AES and LA-ICP-MS analysis,” *Microchem. J.*, vol. 135, pp. 129–139, 2017.
- [114] J. Buolamwini, “Cell Cycle Molecular Targets in Novel Anticancer Drug Discovery,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 6, pp. 379–392, 2005.
- [115] S. E. Gomes, D. M. Pereira, C. Roma-Rodrigues, A. R. Fernandes, P. M. Borralho, and C. M. P. Rodrigues, “Convergence of MIR-143 overexpression, oxidative stress and cell death in HCT116 human colon cancer cells,” *PLoS One*, vol. 13, pp. 1–19, 2018.

- [116] V. H. Bull, E. M. Fargestad, M. Strozynski, and B. Thiede, "Temporal proteome profiling of taxol-induced mitotic arrest and apoptosis," *Electrophoresis*, vol. 31, pp. 1873–1885, 2010.
- [117] M. Vasiljevic, F. F. Heisler, T. J. Hausrat, S. Fehr, I. Milenkovic, M. Kneussel, W. Sieghart, "Spatio-temporal expression analysis of the calcium-binding protein calumenin in the rodent brain," *Neuroscience*, vol. 202, pp. 29–41, 2012.
- [118] J. P. Vago, C. R. C. Nogueira, L. P. Tavares, F. M. Soriani, F. Lopes, R. C. Russo, V. Pinho, M. M. Teixeira, and L. P. Sousa, "Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 92, pp. 249–258, 2012.
- [119] P. Lavia, "The GTPase RAN regulates multiple steps of the centrosome life cycle," *Chromosom. Res.*, vol. 24, pp. 53–65, 2016.
- [120] C. W. Phang, N. A. Gandah, S. N. Abd Malek, and S. A. Karsani, "Proteomic analysis of flavokawain C-induced cell death in HCT 116 colon carcinoma cell line," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 853, pp. 388–399, 2019.
- [121] S. Y. Park, M. S. Jeong, C. W. Han, H. S. Yu, and S. B. Jang, "Structural and functional insight into proliferating cell nuclear antigen," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 26, pp. 637–647, 2016.
- [122] E. M. Boehm, K. T. Powers, C. M. Kondratick, M. Spies, J. C. D. Houtman, and M. T. Washington, "The proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-interacting Protein (PIP) motif of DNA polymerase η mediates its interaction with the C-terminal domain of Rev1," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, pp. 8735–8744, 2016.
- [123] X. Yao, D. Li, D. M. Xiong, L. Li, R. Jiang, and J. X. Chen, "A novel role of ribonuclease inhibitor in regulation of epithelial-to-mesenchymal transition and ILK signaling pathway in bladder cancer cells," *Cell Tissue Res.*, vol. 353, no. 3, pp. 409–423, 2013.
- [124] P. Koczera, L. Martin, G. Marx, and T. Schuerholz, "The ribonuclease a superfamily in humans: Canonical RNases as the buttress of innate immunity," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, pp. 1–16, 2016.
- [125] K. L. Keene, A. R. Quinlan, X. Hou, I. M. Hall, J. C. Mychaleckyj, S. Onengut-Gumuscu, and P. Concannon, "Evidence for two independent associations with type 1 diabetes at the 12q13 locus," *Genes Immun.*, vol. 13, pp. 66–70, 2012.
- [126] J. J. Lu, D. Z. Lu, Y. F. Chen, Y. T. Dong, J. R. Zhang, T. Li, Z. H. Tang, and Z. Yang, "Proteomic analysis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells treated with platycodin D," *Chin. J. Nat. Med.*, vol. 13, pp. 673–679, 2015.
- [127] N. Yu, P. Zhang, L. Wang, X. He, S. Yang, and H. Lu, "RBBP7 is a prognostic biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma," *Oncol. Lett.*, vol. 16, pp. 7204–7211, 2018.
- [128] L. Varricchio, M. Falchi, M. Dall'Ora, C. De Benedittis, A. Ruggeri, V. N. Uversky, and A. R. Migliaccio, "Calreticulin: Challenges posed by the intrinsically disordered nature of calreticulin to the study of its function," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 5, pp. 1–19, 2017.
- [129] S. K. Calderwood and J. Gong, "Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 41, no. 4, pp. 311–323, 2016.
- [130] C. Sarto, P. A. Binz, and P. Mocarelli, "Heat shock proteins in human cancer," *Electrophoresis*, vol. 21, pp. 1218–1226, 2000.
- [131] A. Paul, Y. A. Garcia, B. Zierer, C. Patwardhan, O. Gutierrez, Z. Hildenbrand, D. C. Harris, H. A. Balsiger, J. C. Sivils, J. L. Johnson, J. Buchner, A. Chadli, and M. B. Cox, "The cochaperone SGTA (small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha) demonstrates regulatory specificity for the androgen, glucocorticoid, and progesterone receptors," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, pp. 15297–15308, 2014.

- [132] M. A. Pierrard, P. Kestemont, N. T. Phuong, M. P. Tran, E. Delaive, M. L. Thezenas, M. Dieu, M. Raes, and F. Silvestre, "Proteomic analysis of blood cells in fish exposed to chemotherapeutics: Evidence for long term effects," *J. Proteomics*, vol. 75, pp. 2454–2467, 2012.
- [133] S. Sun, K. M. Y. Kiang, A. S. W. Ho, D. Lee, M. Poon, F. Xu, J. K. S. Pu, A. N. C. Kan, N. P. Y. Lee, X. Liu, K. Man, P. J. R. Day, W. Lui, C. Fung, and G. K. K. Leung, "Endoplasmic reticulum chaperone prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide (P4HB) promotes malignant phenotypes in glioma via MAPK signaling," *Oncotarget*, vol. 8, pp. 71911–71923, 2017.
- [134] Q. Wang, F. Pan, S. Li, R. Huang, X. Wang, S. Wang, X. Liao, D. Li, and L. Zhang, "The prognostic value of the proteasome activator subunit gene family in skin cutaneous melanoma," *J. Cancer*, vol. 10, pp. 2205–2219, 2019.
- [135] B. Wang, Z. Cai, K. Tao, W. Zeng, F. Lu, R. Yang, D. Feng, G. Gao, and Q. Yang, "Essential control of mitochondrial morphology and function by chaperone-mediated autophagy through degradation of PARK7," *Autophagy*, vol. 12, pp. 1215–1228, 2016.
- [136] S. Zhou, Q. Han, R. Wang, X. Li, Q. Wang, H. Wang, J. Wang, and Y. Ma, "PRDX2 protects hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells from oxidative stress," *Oncol. Lett.*, vol. 12, pp. 2217–2221, 2016.
- [137] Y. A. Larasati, N. Yoneda-Kato, I. Nakamae, T. Yokoyama, E. Meiyanto, and J. Y. Kato, "Curcumin targets multiple enzymes involved in the ROS metabolic pathway to suppress tumor cell growth," *Sci. Rep.*, vol. 8, pp. 1–13, 2018.
- [138] H. Y. Yang and T. H. Lee, "Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: A brief review," *BMB Rep.*, vol. 48, pp. 200–208, 2015.
- [139] G. Huasong, Y. Bin, Y. Yaohua, S. Jianhong, Z. Sanhu, Z. Jianhong, Q. Wenxin, and G. Yilu, "Correlation of expression levels of ANXA2, PGAM1, and CALR with glioma grade and prognosis," *J. Neurosurg.*, vol. 118, pp. 846–853, 2013.
- [140] H. C. Kuo, Y. R. Kuo, K. M. Lee, M. C. Hsieh, C. Y. Huang, Y. Y. Hsieh, K. C. Lee, H. L. Kuo, L. Y. Lee, W. P. Chen, C. C. Chen, and S. Y. Tung, "A Comparative Proteomic Analysis of Erinacine A's Inhibition of Gastric Cancer Cell Viability and Invasiveness," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 43, pp. 195–208, 2017.

7. ANEXOS

7.1 Espectros de estabilidade

7.1.1 Anexo A

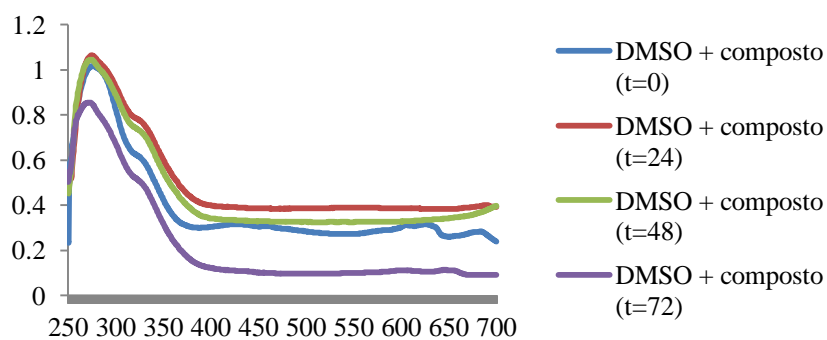


Figura 7.1 - Espectros de absorção representativos da estabilidade do composto JL7 (0,25 µM) em DMSO. Os espectros foram obtidos para diferentes tempos de incubação (0, 24, 48, 72 h), sendo o armazenamento feito a 4°C.

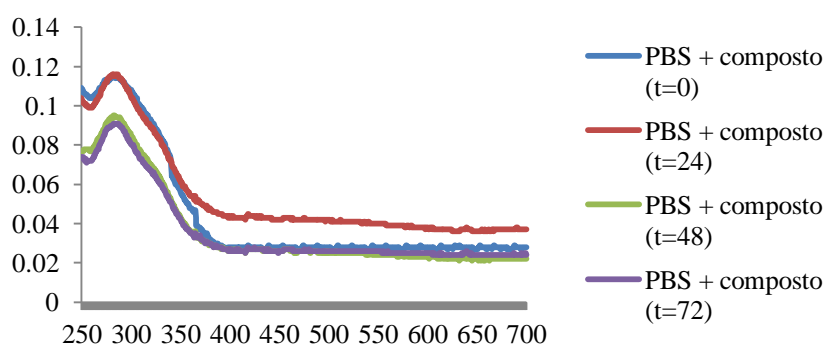


Figura 7.2 - Espectros de absorção representativos da estabilidade do composto JL7 (0,25 µM) em PBS. Os espectros foram obtidos para diferentes tempos de incubação (0, 24, 48, 72 h), sendo o armazenamento feito a 4°C.

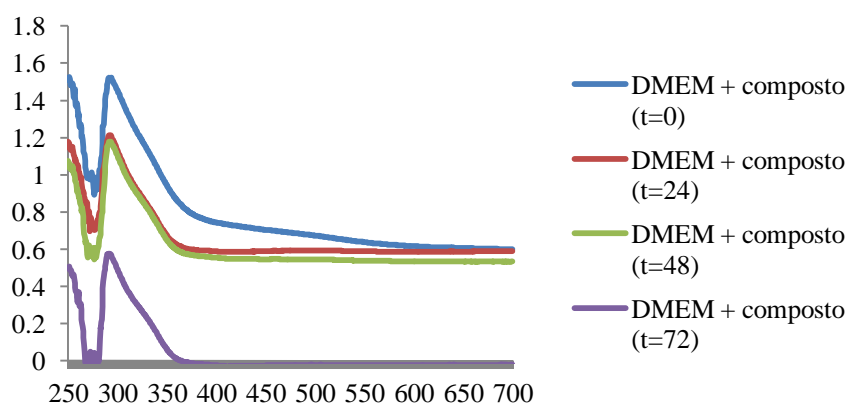


Figura 7.3 - Espectros de absorção representativos da estabilidade do composto JL7 (0,25 μM) em DMEM. Os espectros foram obtidos para diferentes tempos de incubação (0, 24, 48, 72 h), sendo o armazenamento feito a 4°C.

7.1.2 Anexo B

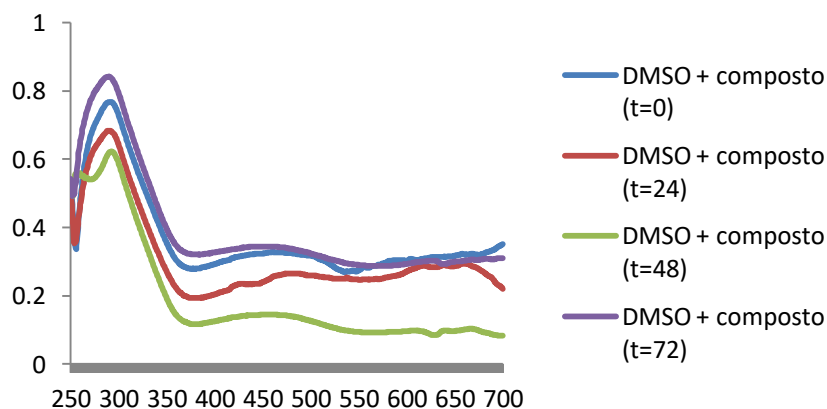


Figura 7.4 - Espectros de absorção representativos da estabilidade do composto JL10 (0,25 μM) em DMSO. Os espectros foram obtidos a diferentes tempos de incubação (0, 24, 48, 72 h), sendo o armazenamento feito a 4°C.

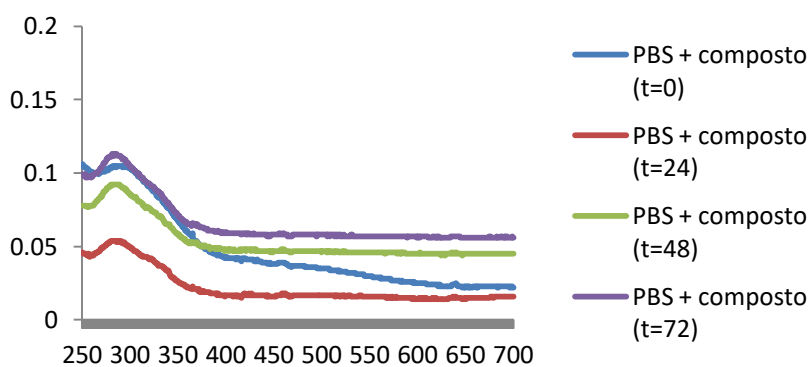


Figura 7.5 - Espectros de absorção representativos da estabilidade do composto JL10 (0,25 μM) em PBS. Os espectros foram obtidos a diferentes tempos de incubação (0, 24, 48, 72 h), sendo o armazenamento feito a 4°C.

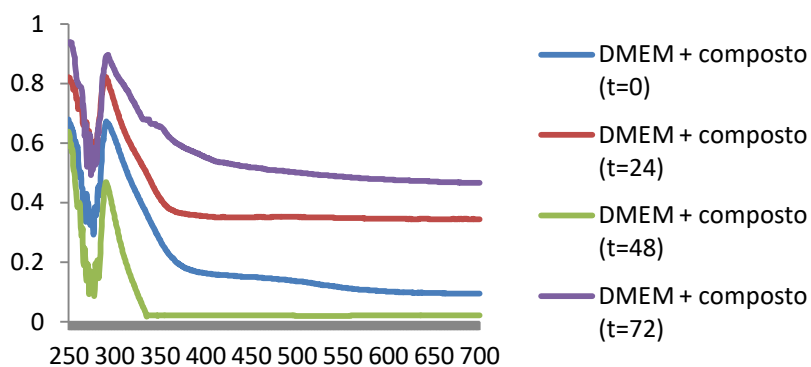


Figura 7.6 - Espectros de absorção representativos da estabilidade do composto JL10 (0,25 μM) em PBS. Os espectros foram obtidos a diferentes tempos de incubação (0, 24, 48, 72 h), sendo o armazenamento feito a 4°C.

7.1.3 Anexo C

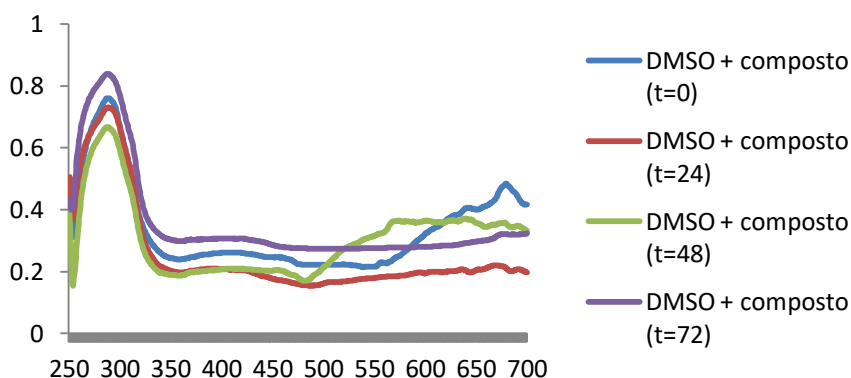


Figura 7.7 - Espectros de absorção representativos da estabilidade do composto JL12 (0,25 μM) em DMSO. Os espectros foram obtidos a diferentes tempos de incubação (0, 24, 48, 72 h), sendo o armazenamento feito a 4°C.

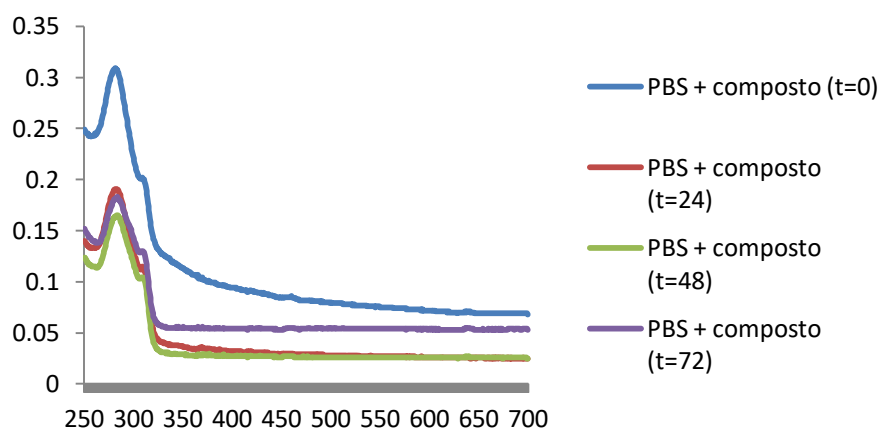


Figura 7.8 - Espectros de absorção representativos da estabilidade do composto JL12 (0,25 µM) em PBS. Os espectros foram obtidos a diferentes tempos de incubação (0, 24, 48, 72 h), sendo o armazenamento feito a 4°C.

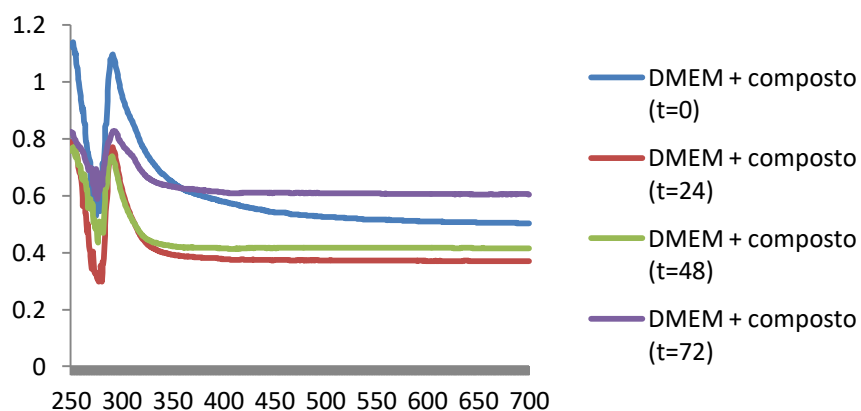


Figura 7.9 - Espectros de absorção representativos da estabilidade do composto JL12 (0,25 µM) em DMEM. Os espectros foram obtidos a diferentes tempos de incubação (0, 24, 48, 72 h), sendo o armazenamento feito a 4°C.

7.1.4 Anexo D

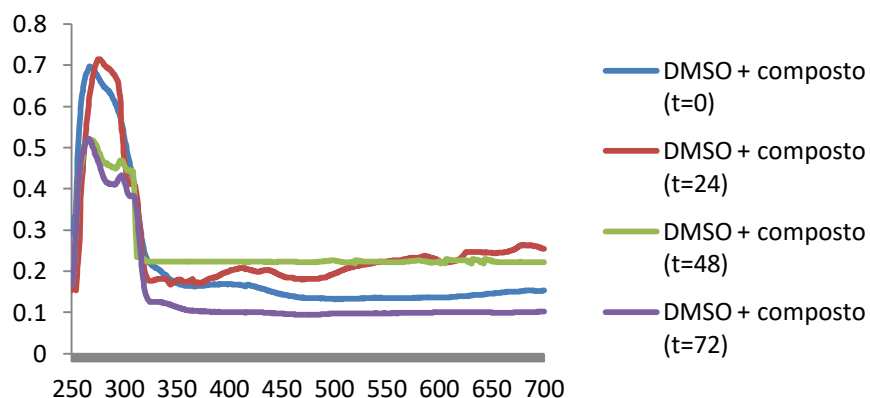


Figura 7.10 - Espectros de absorção representativos da estabilidade do composto JL14 (0,25 µM) em DMSO. Os espectros foram obtidos a diferentes tempos de incubação (0, 24, 48, 72 h), sendo o armazenamento feito a 4°C.

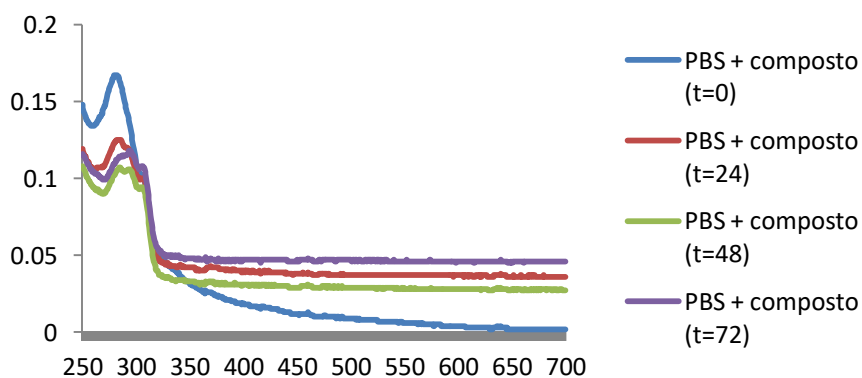


Figura 7.11 - Espectros de absorção representativos da estabilidade do composto JL14 (0,25 µM) em PBS. Os espectros foram obtidos a diferentes tempos de incubação (0, 24, 48, 72 h), sendo o armazenamento feito a 4°C.

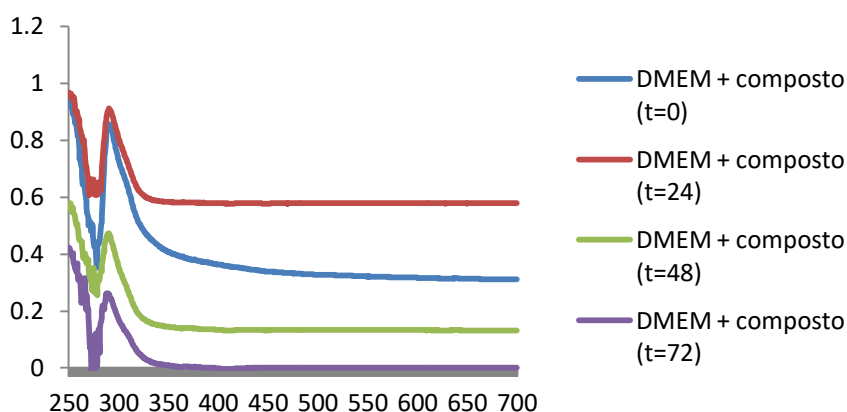


Figura 7.12 - Espectros de absorção representativos da estabilidade do composto JL14 (0,25 μM) em DMEM. Os espectros foram obtidos a diferentes tempos de incubação (0, 24, 48, 72 h), sendo o armazenamento feito a 4°C.

7.2 Ensaios de viabilidade celular

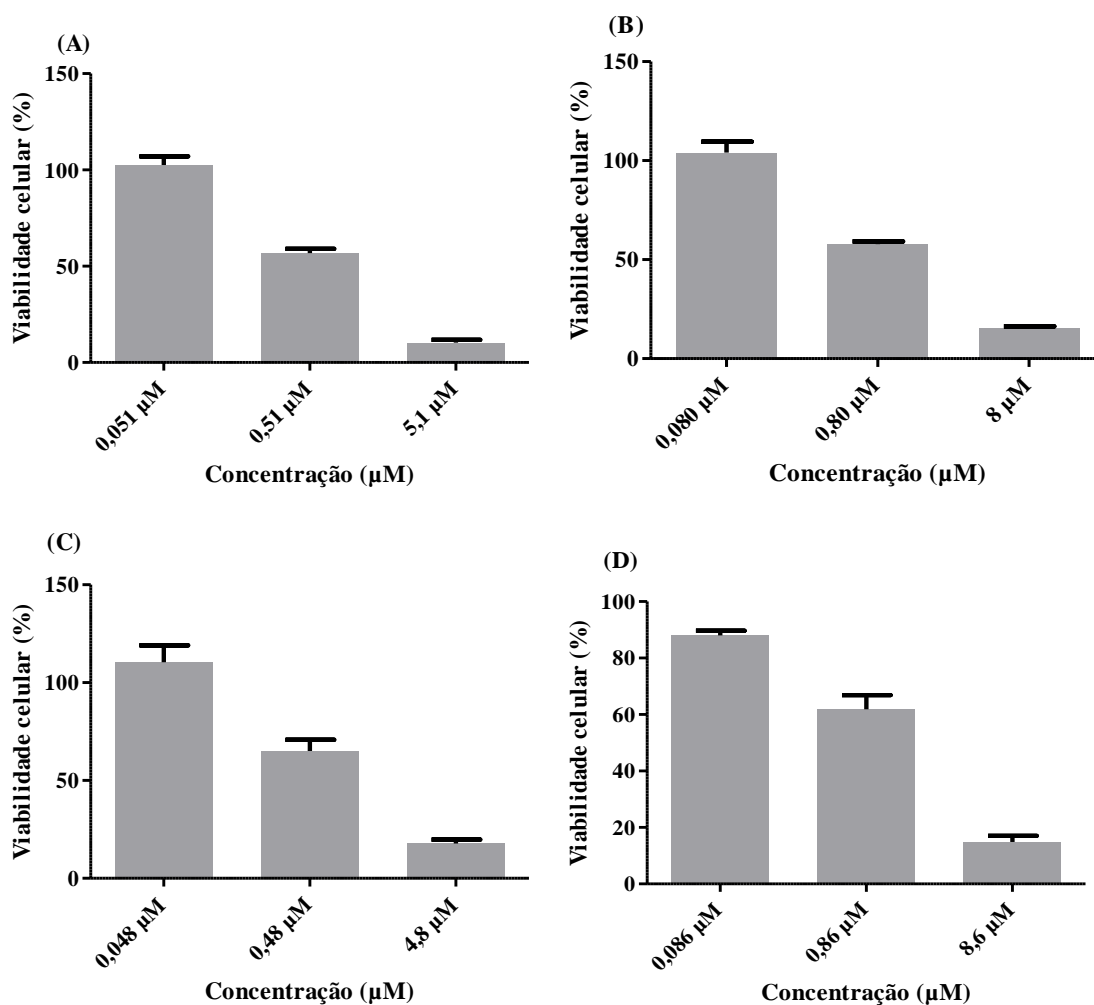


Figura 7.13 - % de viabilidade celular da linhagem celular tumoral MCF-7 após 48 horas de exposição aos compostos em estudo (A – JL7; B – JL10; C – JL12; D – JL14). Os valores de viabilidade celular foram

normalizados em relação ao controlo em DMSO, correspondente a cada concentração de composto testada. Os valores apresentados correspondem dois replicados biológicos independentes e as barras de erro ao desvio padrão entre esses replicados.

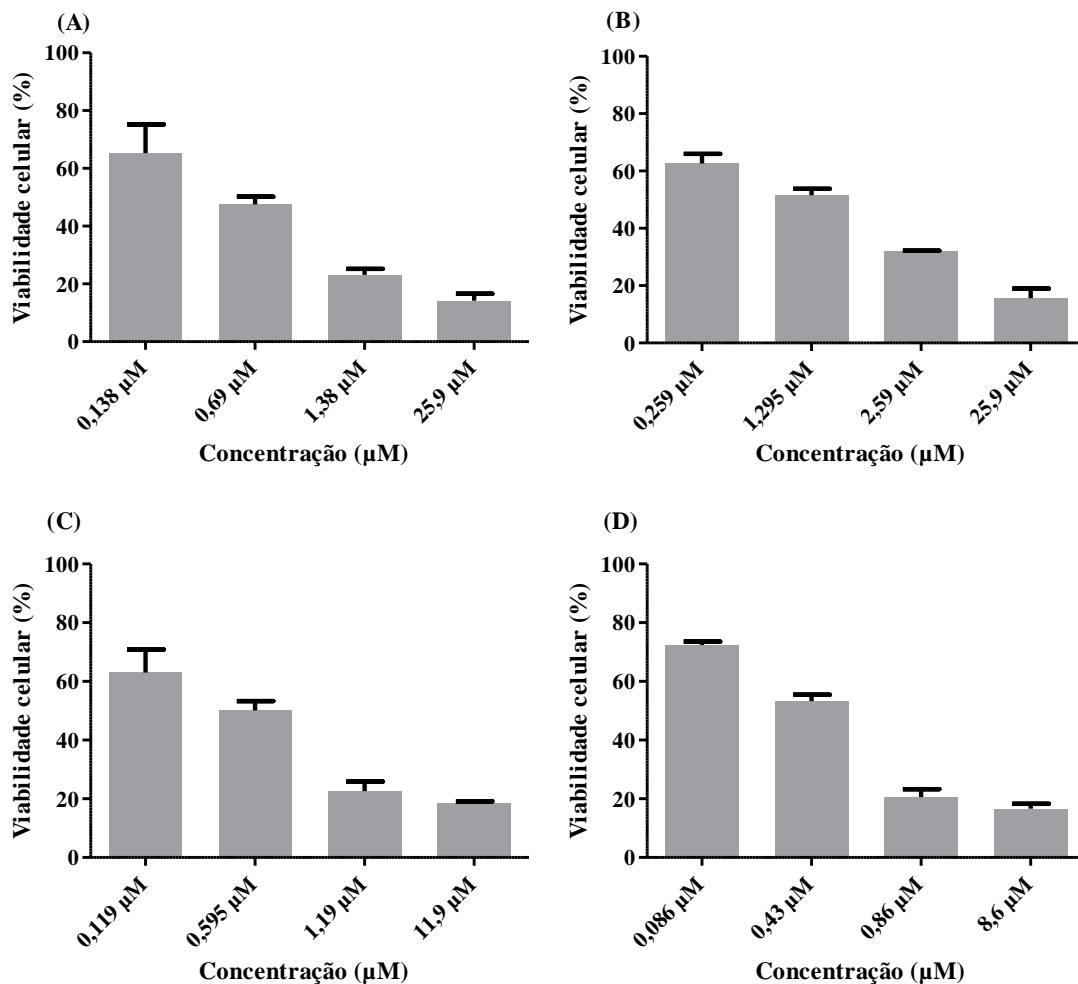


Figura 7.14 - % de viabilidade celular da linhagem celular tumoral A2780 após 48 horas de exposição aos compostos em estudo (A – JL7; B – JL10; C – JL12; D – JL14). Os valores de viabilidade celular foram normalizados em relação ao controlo em DMSO, correspondente a cada concentração de composto testada. Os valores apresentados correspondem dois replicados biológicos independentes e as barras de erro ao desvio padrão entre esses replicados.

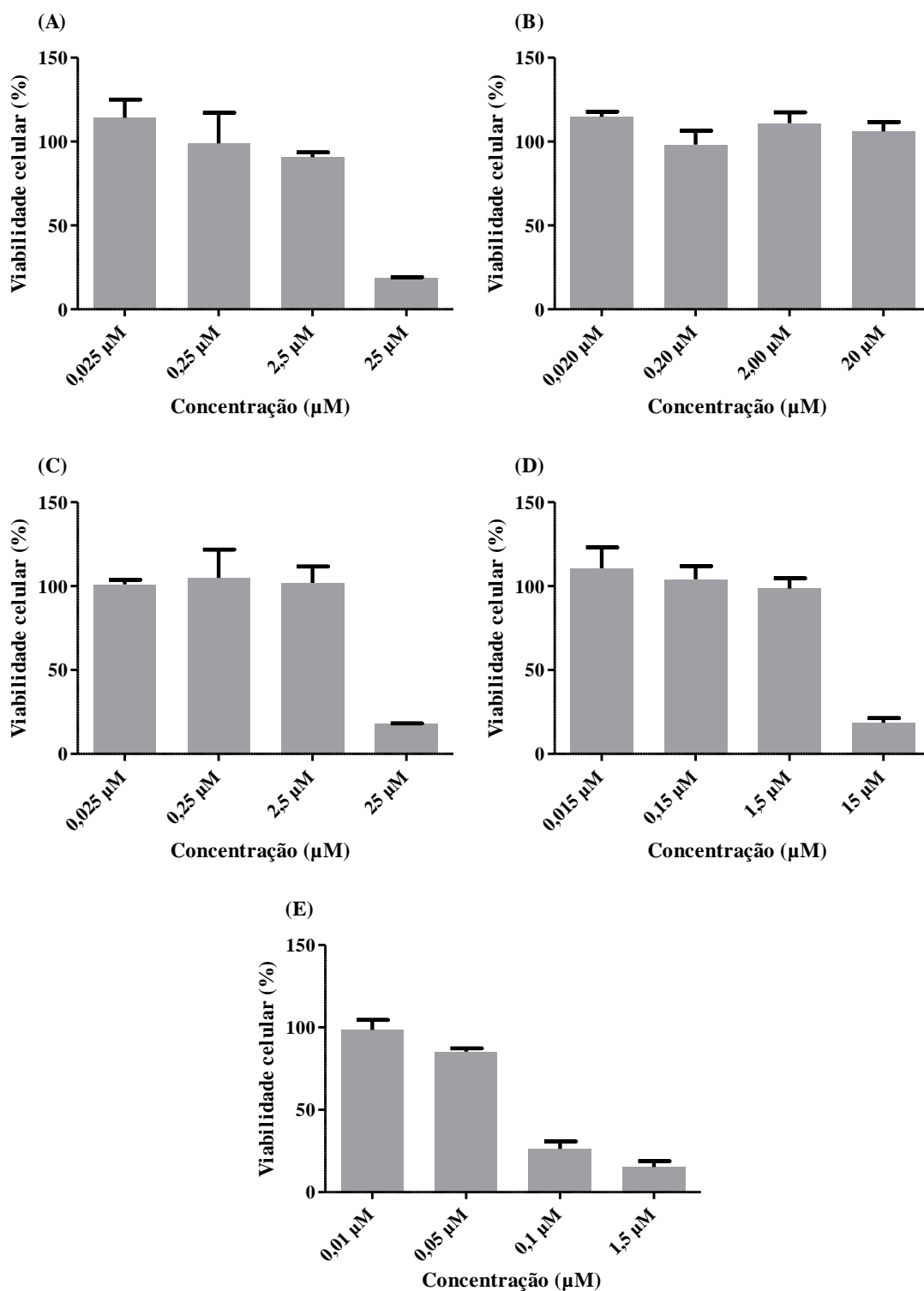


Figura 7.15 - % de viabilidade celular da linhagem tumoral HCT116 após 48 horas de exposição aos ligandos e composto de partida (CP) individualmente (A – dptyz (JL7); B – dpp (JL10); C – bipy (JL12); D – Me₂bpy (JL14); E – CP). Os valores de viabilidade celular foram normalizados em relação ao controle em DMSO, correspondente a cada concentração de composto testada. Os valores apresentados correspondem dois replicados biológicos independentes e as barras de erro ao desvio padrão entre esses replicados.

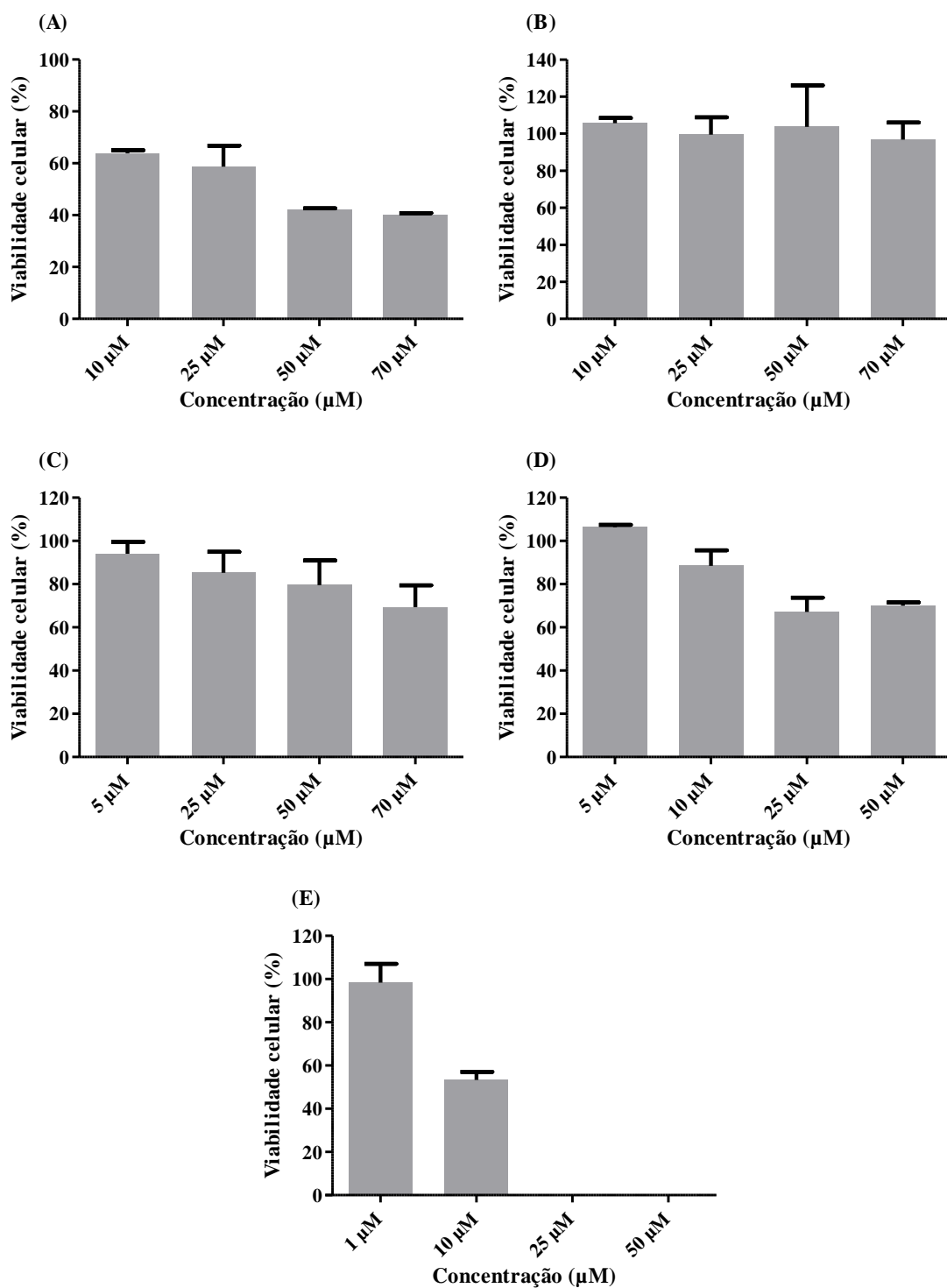


Figura 7.16 - % de viabilidade celular da linhagem celular fibroblastos após 48 horas de exposição aos ligandos e composto de partida (CP) individualmente (A – dptyz (JL7); B – dpp (JL10); C – bipy (JL12); D – Me₂bpy (JL14); E – CP) . Os valores de viabilidade celular foram normalizados em relação ao controle em DMSO, correspondente a cada concentração de composto testada. Os valores apresentados correspondem dois replicados biológicos independentes e as barras de erro ao desvio padrão entre esses replicados.

7.3 Mecanismos de morte celular

7.3.1 Marcação com Hoechst 33258

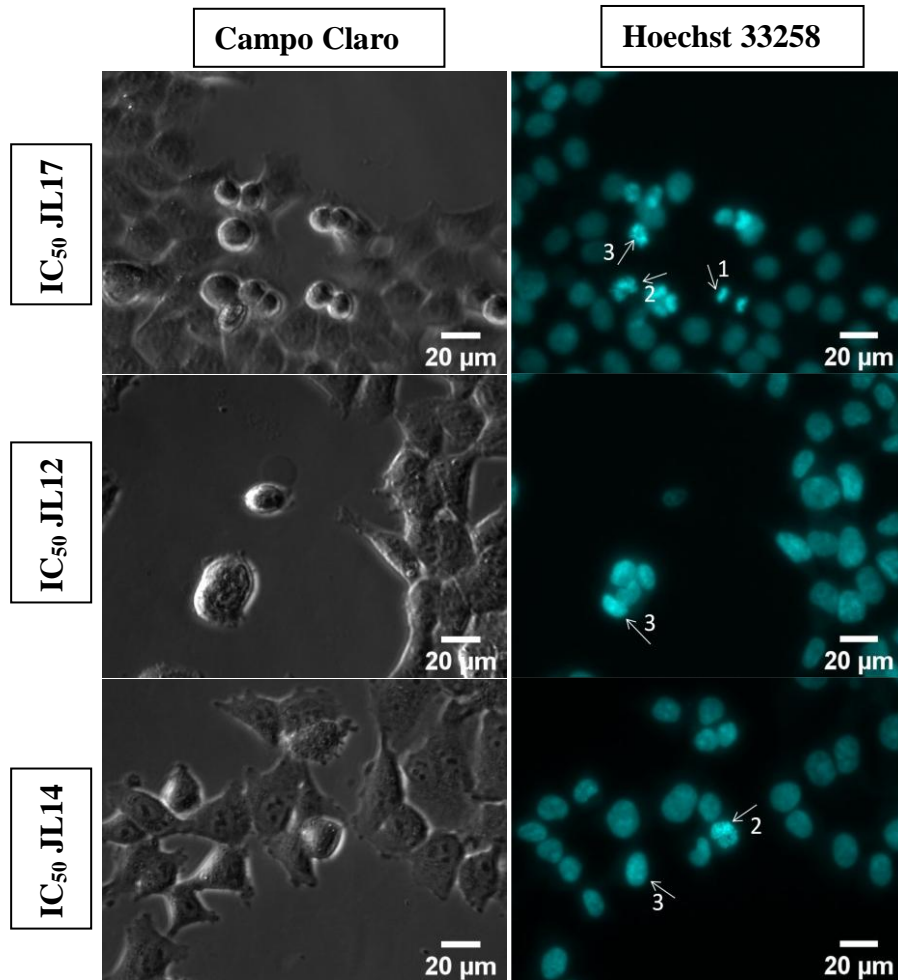


Figura 7.17- Células da linha tumoral HCT116 em campo claro e marcadas com Hoechst 33258 para marcação dos núcleos e visualização de células em apoptose. As células foram expostas a uma concentração correspondente ao IC₅₀ de cada composto durante 48 horas. As setas indicam o aparecimento de corpos apoptóticos (1), fragmentação nuclear (2) ou condensação da cromatina (3). Estes resultados correspondem a dois replicados biológicos independentes onde foram analisadas 5 imagens para cada condição em estudo.

7.3.2 Avaliação da morte celular por autofagia

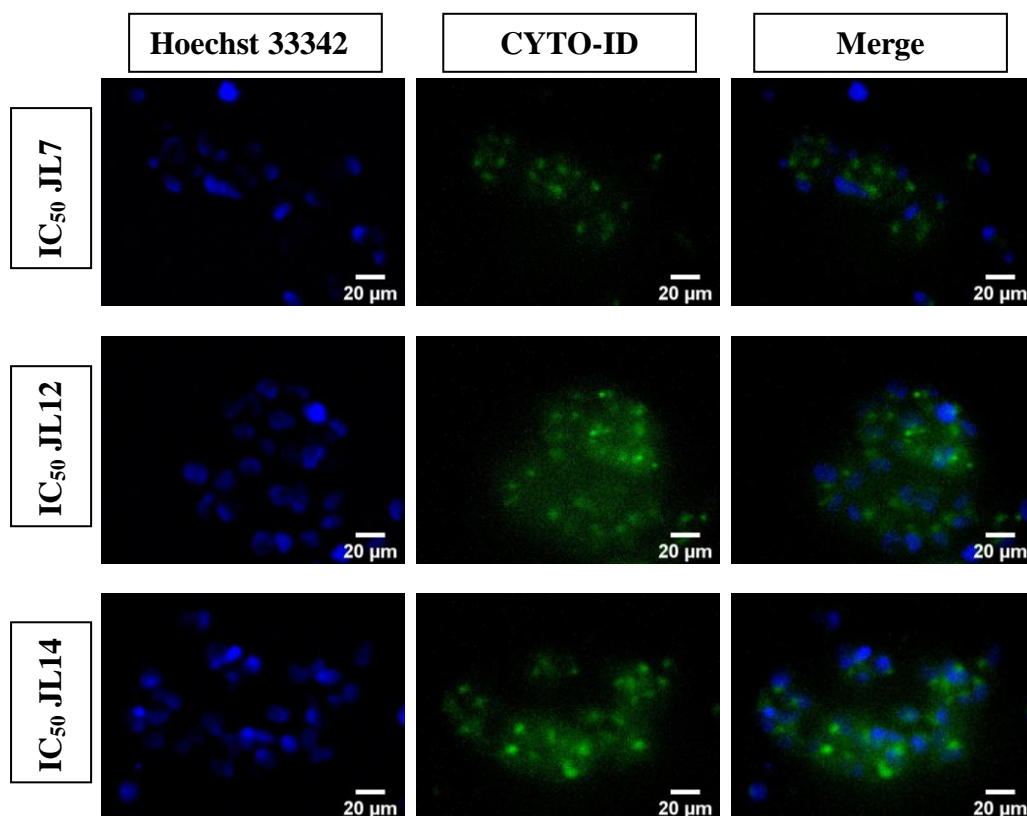


Figura 7.18 - Imagens captadas ao microscópio de células da linha tumoral HCT116 marcadas com Hoechst 33342 e CYTO-ID para avaliação do potencial autofágico dos compostos em estudo, através da observação de vesículas autofágicas. As células foram expostas ao IC₅₀ de cada composto durante 48 horas. Estes resultados correspondem a dois replicados biológicos independentes, tendo sido analisadas 5 imagens para cada condição em estudo.

7.3.3 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

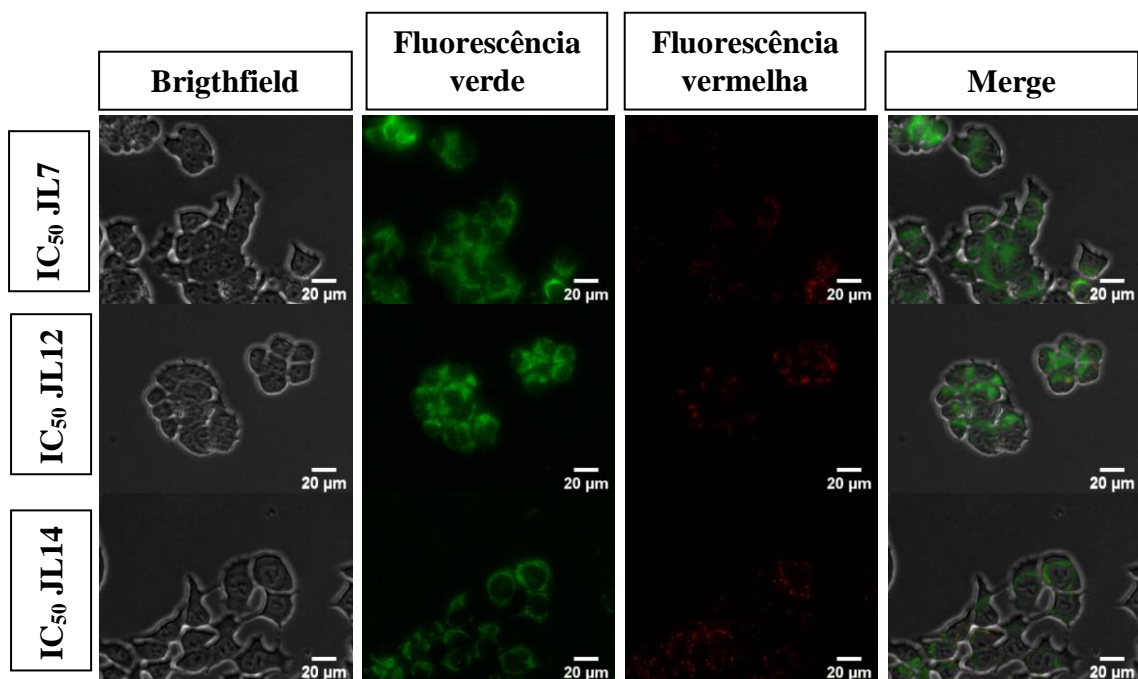


Figura 7.19 - Imagens captadas ao microscópio de células da linha tumoral HCT116 marcadas com a sonda JC-1 para medição da alteração do potencial mitocondrial. As células cresceram na presença de uma concentração correspondente ao IC₅₀ de cada composto durante 48 horas. Estes resultados correspondem a dois replicados biológicos independentes, tendo sido analisadas 5 imagens para cada condição em estudo.

7.4 Análise proteômica

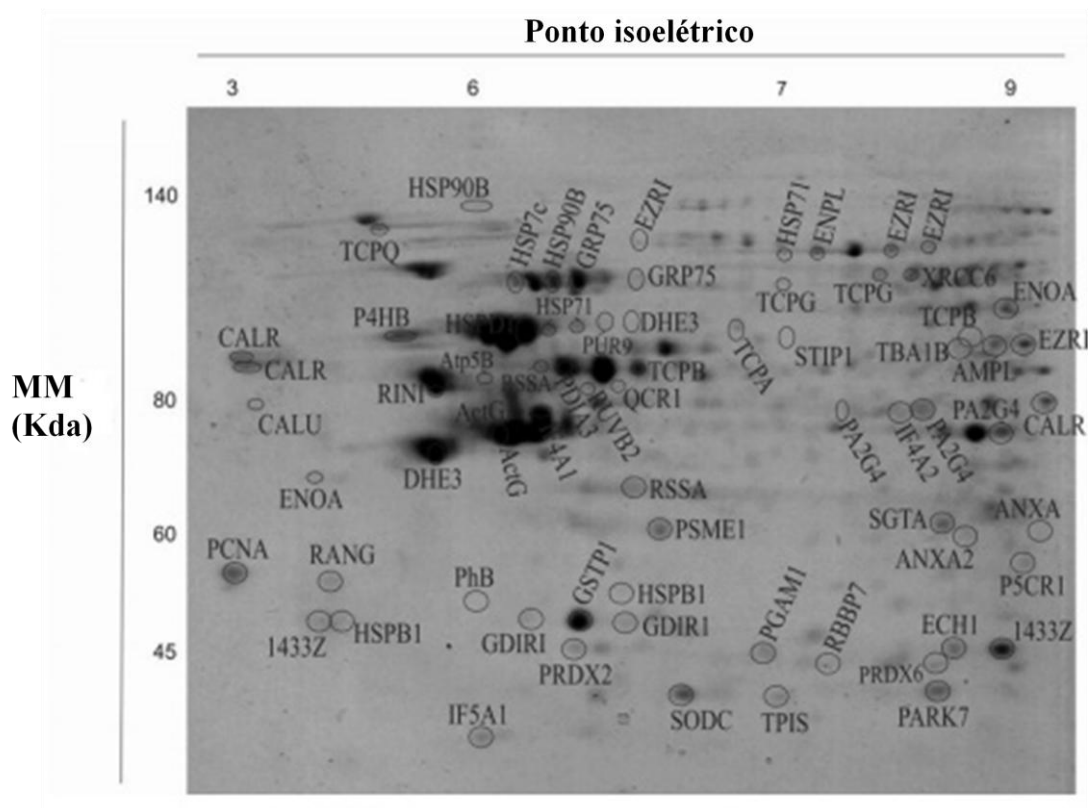


Figura 7.20 – Mapa representativo do gel de referência de células HCT116 utilizado para comparação dos níveis de expressão [115].