

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

"If you're going to go into research science, you really have to love it. It's not a job, it's an entire obsession."

Ethan Garner

Resumo

A quimioterapia é uma importante componente do tratamento do cancro da mama. As mostardas nitrogenadas, que têm o DNA como alvo farmacológico, são agentes antineoplásicos particularmente eficazes, e entre eles incluem-se os compostos 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis.

Os objectivos do trabalho passam pela avaliação da citotoxicidade de novos compostos 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis quirais, nomeadamente o ASRO-13, ASRO-15, ASRO-17, MIS1707, MIS1786 e MIS1787, nas linhas celulares de adenocarcinoma da mama positivas para RE, MCF7, positivas para HER2/neu, HCC1954, e tripla negativa, HCC1806.

Também se avaliou o efeito dos compostos ASRO-13 e ASRO-17 na viabilidade e tipos de morte celular, ciclo celular e expressão das proteínas Bax e Bcl-2 por citometria de fluxo, na produção total de proteína pelo ensaio do SRB, na alteração do perfil proteico através de géis 2-D e os efeitos no DNA celular, avaliado pelo ensaio do cometa.

Todos os compostos inibem a proliferação celular e, os compostos MSI1786 e MSI1787 são particularmente promissores. Verificou-se que as modificações na estrutura dos compostos influenciam a actividade anti-proliferativa o que se torna importante para a consideração de futuras modificações estruturais.

Em relação ao ASRO-13 e ASRO-17, os compostos induzem morte celular principalmente por apoptose tardia e por necrose e interferem preferencialmente com a fase S do ciclo celular. Verificou-se que a produção total de proteínas é afectada e o ensaio clonogénico indica que a duas linhas celulares são sensíveis aos compostos sendo a linha tripla negativa, HCC1806, particularmente sensível. Apesar de não se ter verificado, pelo ensaio cometa, a existência de danos ao nível do DNA com nenhum dos compostos testados, verificou-se que o tratamento com o ASRO-13 influencia o proteoma da linha celular MCF7 com repercussões quer em termos de aumento como de diminuição da expressão de proteínas.

Assim, conclui-se que esta família de compostos é promissora no tratamento do cancro da mama, particularmente o triplo negativo, e que, apesar do seu

mecanismo de actuação não estar ainda esclarecido, interessa continuar os estudos pré-clínicos.

Abstract

Chemotherapy has an important role in the management of breast cancer. Nitrogen mustards, which have DNA as pharmacological target, are particularly effective against cancer cells and among this class of compounds are chiral 6,7-bis(hydroxymethyl)-1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*]thiazoles.

The objectives for this work are to evaluate cytotoxicity of new chiral 6,7-bis(hydroxymethyl)-1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*]thiazoles, namely ASRO-13, ASRO-15, ASRO-17, MIS1707, MIS1786 and MIS1787, in breast cancer cell line positive for estrogen receptor, MCF7, positive for HER2/neu, HCC1954 and triple negative, HCC1806.

It was also evaluated the effect of ASRO-13 and ASRO-17 in cell viability and types of cell death, cell cycle and the expression of Bax and Bcl-2 proteins by flow cytometry, in the total protein production by SBR assay, in the alterations of the protein profile through 2-D gel and in the nuclear DNA by the comet assay.

All compounds inhibited cell proliferation and compounds MIS1786 and MIS1787 are particularly promising. We verified that some of the changes in the structure of the compounds influencing the anti-proliferative activity, which is important for future consideration on the structural modifications.

Compounds ASRO-13 and ASRO-17 induced cell death mainly by late apoptosis and necrosis and interfered with S phase of cell cycle. We verified that total protein production is affected and clonogenic assay indicates that both cell lines are sensitive to the compounds, in which triple negative cell line, HCC1806, is particularly sensitive. Although it was not verified the DNA damage by comet assay with any of the compounds, it was possible to verify that ASRO-13 alters the proteome of MCF7 cell line, in which some proteins are underexpressed and others are overexpressed.

Therefore, it is possible to conclude that this family of compounds is very promising in the therapeutic of breast cancer, particularly in the triple negative and, despite their unclear mechanism of action, it is interesting to continue with pre-clinic studies.

Agradecimientos

Este trabalho marca o fim de uma importante etapa no meu percurso académico e pessoal e, por isso, não posso deixar de agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram no meu percurso até aqui.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, directora do Instituto de Biofísica e Biomatemática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, por proporcionar as condições necessárias à realização deste trabalho científico. Agradeço a sua orientação científica e transmissão de conhecimentos que tanto enriqueceram o meu conhecimento pessoal.

À Mestre Mafalda Laranjo o meu sincero agradecimento por ter sido uma verdadeira mentora neste intenso ano de trabalho. Agradeço pela sua orientação e apoio crítico na realização de tarefas e discussão de resultados, pelos seus conselhos e transmissão de conhecimentos que contribuíram fortemente para o meu desenvolvimento pessoal e académico. Agradeço ainda pelos momentos altos e baixos que fizeram de mim uma pessoa mais forte e mais capaz.

À Professora Doutora Anabela Sarmento e à Mestre Cristina Gonçalves pelo auxílio prestado na realização dos estudos de citometria de fluxo.

Um agradecimento especial à Mestre Margarida Abrantes pela simpatia, momentos de descontração e opinião sincera sobre o meu desempenho no trabalho laboratorial, que também fizeram de mim uma pessoa mais forte e determinada.

A todos os elementos do Instituto de Biofísica e Biomatemática, a quem eu tantas vezes recorri para me ajudar e para passar momentos mais descontraídos. Obrigada aos Mestres Ana Brito, Salomé Pires, Sara Ferreira, Siri Paulo e Fernando Mendes. Um obrigado especial à Mestre Catarina Mamede pelas horas de qualidade a debater sobre a proteómica e à Mestre Maria João Carvalho pelo apoio científico imprescindível na realização deste trabalho.

Ao Mestre João Casalta um grandessíssimo obrigada pelo trabalho estatístico imaculado, mas principalmente por todas as horas de companhia em momentos difíceis e pelas palavras amigas que me ajudaram a crescer como pessoa.

Às meninas Patrícia Cordeiro, Rita Silva e Filomena Botas pelos belos momentos de descontração e amizade ao longo de todo o ano. Às minhas colegas de curso e percurso Marina Ribeiro e Raquel Marques pela ajuda e amizade constantes. Ao meu colega Ricardo Teixo também pela ajuda e amizade, pela paciência e perseverança que foi imprescindível ao longo deste ano.

Não há palavras suficientes para expressar o meu agradecimento à Raquel Boia e à Vera Silva. Vocês me acompanharam desde sempre até aqui e sorriram, choraram e cresceram comigo na batalha diária em busca do conhecimento científico.

À minha família, de sangue ou não, pelo apoio, carinho e confiança no meu trabalho e na minha competência. Às minhas irmãs pela amizade e certeza de que tudo se resolve.

Aos meus pais que me acompanharam e me deram apoio, mesmo a quilômetros de distância, que viram sempre o meu valor mesmo quando eu própria não o conseguia ver. Não há palavras que expressem o amor que tenho por vocês e o orgulho que sinto em ser vossa filha.

Ao Bruno Melo pelo amor, carinho, dedicação, palavras sábias, apoio diário e paciência inesgotáveis.

Um muito obrigada a todos!

Abreviaturas

ABFP	Agarose de baixo ponto de fusão
AD	Domínio de automodificação
ADP	Ribose de adenosina difosfato, do inglês <i>Adenosine diphosphate</i>
Akt	Proteína cinase B, do inglês <i>Protein Kinase B</i>
An-V	Anexina V
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Proteína ataxia telangiectasia mutada, do inglês <i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
APFN	Agarose de ponto de fusão normal
ATR	Proteína da ataxia telangiectasia relaciona com Rad3, do inglês <i>Ataxia Telangiectasia and Rad3-related Protein</i>
Bax	Proteína X associada a Bcl-2, do inglês <i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	Proteína de leucemia/linfoma de células B, do inglês <i>B cell leukemia/lymphoma</i>
BER	Reparação do DNA por excisão de bases, do inglês <i>Base excision repair</i>
BL	Cancro da mama <i>basal-like</i>
BRCA	Gene de susceptibilidade ao cancro da mama, do inglês <i>Breast Cancer Susceptibility Gene</i>
BRCT	Sequência do terminal carboxílico da proteína BRCA1, do inglês <i>BRCA1 carboxy-terminal repeat motif</i>
Cdc	Fosfatases da divisão do ciclo celular, do inglês <i>cell division cycle phosphatase</i>
CDI	Carcinoma ductal invasivo
Cdk	Cinase dependente de ciclina, do inglês <i>cyclin-dependent kinase</i>
CHK1	Proteínas cinases de checkpoint do ciclo celular, do inglês <i>Cell Cycle-</i>

	<i>Checkpoint Kinase</i>
CHK-P	CHK fosforilada
CQ	Citoqueratinas
DBD	Domínios de ligação ao DNA, do inglês <i>DNA-binding domain</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DSB	Quebras em ambas as cadeias do DNA, do inglês <i>Duble-strand breaks</i>
EGFR	Receptor do factor de crescimento epidérmico, do inglês <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EP	Eficiência da placa
FBS	Soro bovino fetal, do inglês <i>fetal bovine serum</i>
FS	Factor de sobrevivência
GRB7	Receptor de ligação 7 de factores de crescimento, do inglês <i>Growth factor receptor-bound protein 7</i>
HER2⁺	Cancro da mama do grupo HER2/neu positivo
HER2/neu	Receptor 2 do factor de crescimento epidérmico humano, do inglês <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HSP90	Proteína de choque térmico 90, do inglês <i>Heat Shock Protein 90</i>
IC₅₀	Concentração de composto/fármaco que inibe a proliferação celular em 50%
IP	Iodeto de propídio
LC-TN	Linha celular tripla negativa
LC-HER2⁺	Linha celular positiva para HER2/neu
LC-RE⁺	Linha celular positiva para receptores de estrogénio

MAPK	Proteína cinase activada por mitogénio, do inglês <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
mTOR	Alvo da rapamicina, do inglês <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina, do inglês <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
p21^{Waf1}	Proteína 21
p53	Proteína 53
PAR	Polímeros de ADP-ribose
PARP	Poli-(ADP-ribose)-polimerase
Rb	Proteína do retinoblastoma
PBS	Tampão fosfato, do inglês <i>phosphate saline buffer</i>
PI	Ponto isoeléctrico
PI3K	Proteína fosfatidilinositol 3-cinase, do inglês <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PJ34	Hidrocloreto de N-(5,6-dihidro-6-oxo-2-fenanthridinil)-2-acetamida
PTEN	Proteína fosfatase homóloga a tensina, do inglês <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RAS	Proteínas do sarcoma de ratazana, do inglês <i>Rat sarcoma</i>
RE	Receptores de estrogénio
RE⁺	Cancro da mama positivo para receptores de estrogénio
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
RP	Receptores de progesterona
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulfate</i>

SRB	Sulforrodamina B
SSB	Quebra em uma das cadeias do DNA, do inglês <i>Single strand breaks</i>
STK11	Proteína serina-treonina cinase 11, do inglês <i>Serine/threonine kinase 11</i>
TCA	Ácido tricloroacético, do inglês <i>trichloroacetic acid</i>
TN	Cancro da mama triplo negativo
VEGF	Factor de crescimento endotelial vascular, do inglês <i>Vascular endothelial growth factor</i>
WB	<i>Western blot</i>
Zn	Proteínas dedos de zinco, do inglês <i>Zinc fingers</i>

Índice

RESUMO	5
ABSTRACT	9
AGRADECIMENTOS	13
ABREVIATURAS	17
ÍNDICE.....	23
INTRODUÇÃO.....	27
CANCRO DA MAMA	29
Classificação molecular	34
TRATAMENTO DO CANCRO DA MAMA.....	37
Cirurgia	37
Hormonoterapia.....	38
Radioterapia	39
Quimioterapia	39
Terapêuticas dirigidas	43
OBJECTIVOS	49
MATERIAIS E MÉTODOS	53
CULTURAS CELULARES	55
ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE.....	57
Química	57
Avaliação da actividade metabólica	58
Avaliação da viabilidade e vias de morte celular	60
Avaliação do ciclo celular	63
Avaliação da relação Bax/Bcl-2	63
Avaliação da sobrevivência celular - Ensaio clonogénico.....	64
Avaliação da produção de proteínas totais.....	65
ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO DAS LINHAS CELULARES DE CANCRO DA MAMA	67
Preparação de extractos de proteínas	68
Quantificação de proteína.....	69
Gel 2-D.....	70
ANÁLISE DA EXTENSÃO DE DANOS NO DNA.....	72
Ensaio cometa	72
ANÁLISE ESTATÍSTICA	74
RESULTADOS.....	77

ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE	79
Avaliação da actividade metabólica – Ensaio do MTT	79
Avaliação da viabilidade e vias de morte celular	90
Avaliação do ciclo celular	91
Avaliação da relação Bax/Bcl-2.....	92
Avaliação da sobrevivência celular - Ensaio clonogénico	93
Avaliação da produção de proteínas totais	94
ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO DAS LINHAS CELULARES DE CANCRO DA MAMA.....	95
Gel 2-D.....	95
ANÁLISE DA EXTENSÃO DE DANOS NO DNA	96
Ensaio cometa	96
DISCUSSÃO	99
CONCLUSÃO	117
BIBLIOGRAFIA.....	121

Introdução

Cancro da mama

As mais recentes fontes de informação permitem descrever o cancro como uma doença caracterizada pelo descontrolo da divisão celular, que se torna muito mais rápida, comparativamente à das células normais, e ilimitada.

A divisão e diferenciação celular são processos altamente regulados. No entanto, quando os processos de controlo estão comprometidos, originam erros que podem comprometer várias células num único tecido. Estes erros normalmente têm origem no ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *Deoxyribonucleic acid*) que pode ter sido sintetizado de forma incorrecta durante a divisão celular ou ter sofrido uma alteração devido a um ou mais factores externos à célula. Assim, o cancro, incluindo o cancro da mama, pode surgir de um processo cumulativo de mutações¹.

As células que acumulam alterações genéticas ao longo do tempo podem originar um nicho de células com processos metabólicos desregulados, que se tornam numa lesão pré-neoplásica. Ao longo do tempo estas mesmas células adquirem características fenotípicas que lhes permitem proliferar mais agressivamente originando um tumor maligno com características morfológicas e moleculares próprias. As células cancerígenas podem utilizar a circulação sanguínea e linfática para migrar para outros locais além do foco primário e formar novas colónias, constituindo-se assim metástases, como representado no esquema da Figura 1¹.

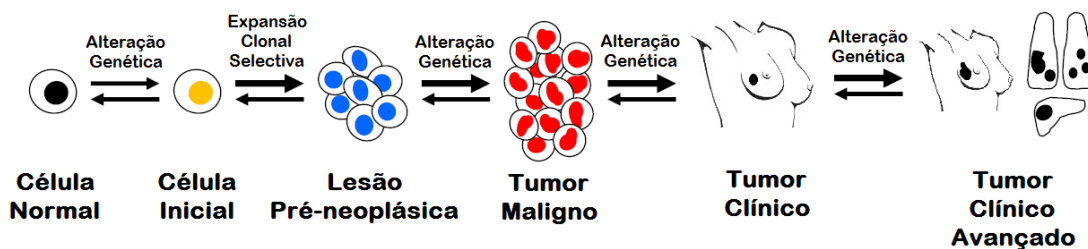


Figura 1- Desenvolvimento do tumor e metástases através do processo cumulativo de alterações genéticas que influenciam a divisão e sobrevivência celular. Uma célula normal sofre alterações genéticas e divide-se, formando uma lesão pré-neoplásica que com mais alterações no genoma pode tornar-se um tumor maligno. O tumor maligno torna-se um tumor clínico e pode metastatizar para outros órgãos do corpo, passando a ser designado como um tumor clínico avançado. Adaptado de Rivenbark *et al.* (2012).

A velocidade deste processo depende de muitos factores nomeadamente do género, idade, raça e também a região do globo em que se encontra, que se pode relacionar com o estilo de vida¹.

A predisposição individual para o desenvolvimento do cancro pode depender de mutações herdadas e é necessário um menor período de tempo para que uma pequena massa pré-neoplásica apareça, comparativamente aos indivíduos que não herdaram mutações. Por isso, em famílias com casos de cancro hereditário, a doença atinge indivíduos mais jovens. Vários factores genéticos associados ao aparecimento da doença estão bem caracterizados hoje em dia, sendo que mutações em oncogenes ou genes supressores tumorais são os mais evidentes nos doentes com cancro¹.

A exposição a certos agentes químicos está na origem de muitas alterações genéticas. Ao longo da vida os indivíduos são expostos a carcinogénios que são a principal fonte de alterações genéticas relacionadas com os tipos de cancro esporádico que surgem, normalmente, numa fase mais tardia da vida dos indivíduos afectados¹. O consumo de tabaco e falta de exercício físico aliados aos maus hábitos alimentares parecem ser os grandes responsáveis pela alta incidência de cancro em países desenvolvidos, como os Estados Unidos da América e países da Europa. A incidência nestes países chega a ser cerca do dobro comparativamente aos países em desenvolvimento, apesar da mortalidade causada pela doença ser relativamente igual em ambas as regiões^{2,3}.

No cancro da mama os factores de risco supracitado são igualmente válidos. No entanto, há outros factores de risco intrínsecos a esse tipo de cancro entre a população feminina como a menarca precoce, a primeira gravidez tardia, a menopausa tardia ou a terapêutica hormonal de substituição na menopausa⁴.

Em 2008, no mundo, foram estimados 12,7 milhões de novos casos de cancro e 7,6 milhões de mortes devido à doença, o que corresponde a cerca de 13% das mortes totais estimadas nesse ano². O cancro da mama é o segundo mais incidente, compreendendo 10,9% da totalidade de casos de cancro e, o que possui a quinta maior taxa de mortalidade com 6,0% das mortes totais causadas por cancro. Na população feminina o cancro da mama é o tipo de cancro mais incidente, com cerca de

22,9% de todos os tipos de cancro diagnosticados e é responsável por cerca de 13,7% das mortes por cancro, mundialmente³.

Em 2008 foram diagnosticados 5333 novos casos de cancro da mama na população feminina em Portugal, 27,6% de todos os casos de cancro, e 1537 mulheres portuguesas morreram devido ao cancro da mama, o que corresponde a 16,0% das mortes causadas pelo cancro⁵. Estes resultados mostram que os métodos de diagnóstico e tratamento para o cancro da mama devem ser melhorados para que no futuro estas percentagens sejam cada vez menores.

De todos os factores genéticos associados ao cancro da mama, os genes de susceptibilidade ao cancro da mama 1 e 2 (BRCA1 e BRCA2, do inglês *Breast Cancer Susceptibility Gene 1 e 2*, respectivamente) estão directamente relacionados a uma probabilidade de 60 a 85% de um indivíduo desenvolver a doença ao longo da vida⁶.

O gene BRCA1 é importante no desenvolvimento normal do tecido mamário, uma vez que promove a expressão de receptores de estrogénio (RE) nas células mamárias. Estas passam a ser sensíveis a hormonas⁷, promovendo assim o desenvolvimento e diferenciação das células do tecido mamário na puberdade. O gene BRCA1 também codifica proteínas responsáveis pela manutenção da integridade do DNA, pela remodelação da cromatina e, conseqüentemente, regulação da transcrição de certos genes, assim como pelo controlo de pontos-chave no ciclo celular.

O gene BRCA2 codifica proteínas responsáveis pela recombinação e reparação do DNA. Assim, deleções ou mutações nos genes BRCA resultam numa deficiente manutenção e reparação do DNA através da recombinação homóloga⁸.

Quando a reparação do DNA por recombinação homóloga falha, as células utilizam outros mecanismos de reparação que são mais susceptíveis a erros⁸, podendo originar novas alterações genéticas e eventual alteração do fenótipo das células tumorais ao longo do tempo¹. As deleções ou mutações nos genes BRCA resultam num fenótipo tumoral que normalmente é mais agressivo e metastiza mais frequentemente. Contudo, os cancros com os sistemas de reparação do DNA comprometida são mais susceptíveis ao tratamento com pequenas moléculas que

induzem danos no DNA e através da inibição de outros mecanismos de reparação, que serão discutidos mais a frente⁸.

A proteína 53 (p53) é uma proteína responsável pela verificação da progressão do ciclo celular e detecção de erros no DNA no processo da divisão celular. Quando os danos detectados não são muito extensos, a p53 activa genes envolvidos na paragem do ciclo celular para permitir a reparação do DNA. Por outro lado, quando os danos são excessivos para a célula recuperar, a p53 activa genes envolvidos no processo da apoptose e senescência celular⁹.

Mutações nos genes que codificam a p53 estão associados à sobrevivência celular em situações onde, normalmente, a célula activaria mecanismos moleculares para um fim apoptótico. Este tipo de mutações estão presentes na maior parte dos cancros, incluindo o cancro da mama⁸⁻¹⁰, principalmente nos casos de cancro da mama que sobreexpressam o receptor 2 do factor de crescimento epidérmico humano (HER2/neu, do inglês *Human Epidermal growth factor Receptor 2*), ou seja, os HER2/neu positivos (HER2⁺), e os *basal-like* (BL) e triplo-negativos (TN), que serão descritos mais à frente¹⁰.

As proteínas cinases de checkpoint do ciclo celular 1 e 2 (CHK1 e CHK2, do inglês *Cell Cycle–Checkpoint Kinase 1 e 2*, respectivamente) também desempenham um papel importante no controlo do ciclo celular. Como tal, qualquer alteração nesta proteína desregula a correcta divisão celular, contribuindo para a acumulação de alterações genéticas passíveis de originar neoplasias⁸. Existem ainda duas importantes supressoras tumorais, a fosfatase homóloga a tensina (PTEN, do inglês *Phosphatase and tensin homolog*) e a serina-treonina cinase 11 (STK11, do inglês *Serine/threonine kinase 11*), nas quais também podem conter mutações que contribuem para o desenvolvimento do cancro da mama⁶.

Mutações nas proteínas a montante das cascatas de sinalização que convergem para a p53, BRCA1, CHK1 e CHK2 também influenciam a sua actividade, podendo também promover a sobrevivência celular em casos em que a célula deveria iniciar o processo de apoptose. Este é o caso da proteína ataxia telangiectasia mutada (ATM, do inglês *Ataxia telangiectasia mutated*) e da proteína da ataxia telangiectasia relaciona

com Rad3 (ATR, do inglês *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related Protein*). Estas duas proteínas também detectam vários tipos de danos no DNA, promovendo a activação de cascatas de sinalização envolvendo as proteínas supracitadas, levando as células a entrar num processo de reparação do DNA ou morte celular, como esquematizado na Figura 2¹¹.

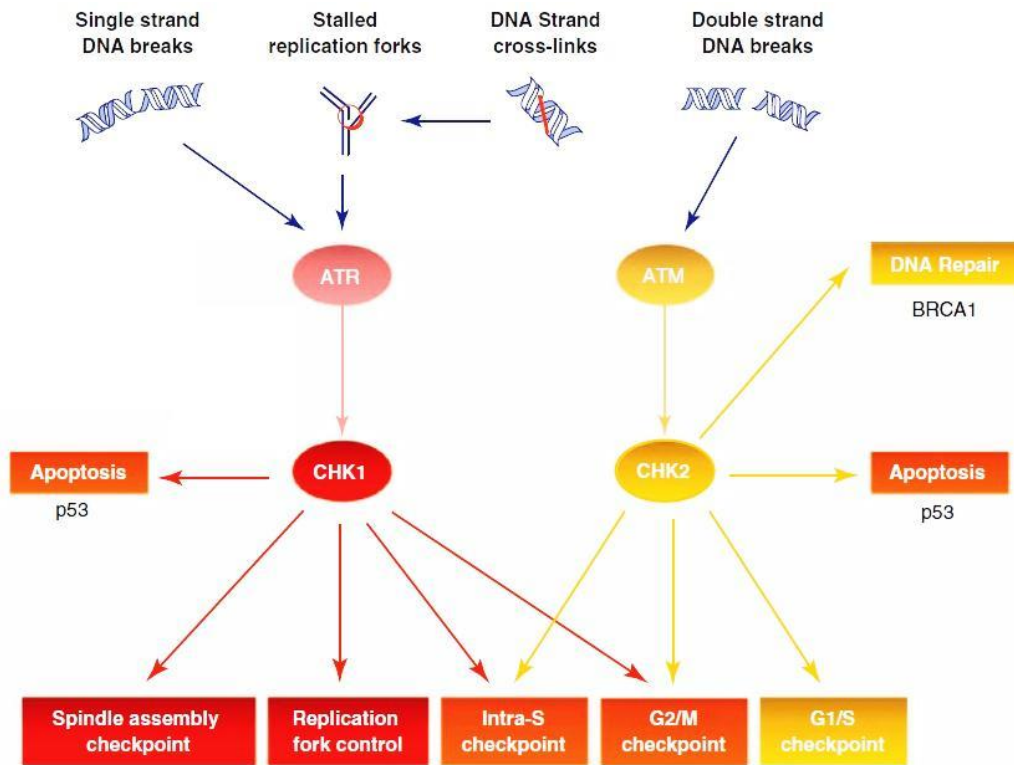


Figura 2 – O papel das proteínas CHK1 e CHK2 em resposta a danos do DNA que desencadeiam respostas distintas, mas que se sobrepõem, incluindo a activação da reparação do DNA, a paragem do ciclo celular, senescência ou apoptose. Adaptado de Garrett *et. al.*(2011).

Classificação histológica

O carcinoma *in situ* pode ter origem ductal e origem lobular, designando-se carcinoma ductal *in situ* e carcinoma lobular *in situ*, respectivamente. Na Figura 3 estão representadas as várias estruturas morfológicas da mama feminina¹². O carcinoma invasivo tem uma classificação histológica mais minuciosa, dividindo-se em 7 subgrupos: ductal invasivo (CDI), lobular, misto, mucinoso, tubular, medular e papilar. Destes, CDI é o mais frequente (70-80%). De acordo com o grau de diferenciação pode ser dividido em grau 1, bem diferenciados, grau 2, moderadamente diferenciados e,

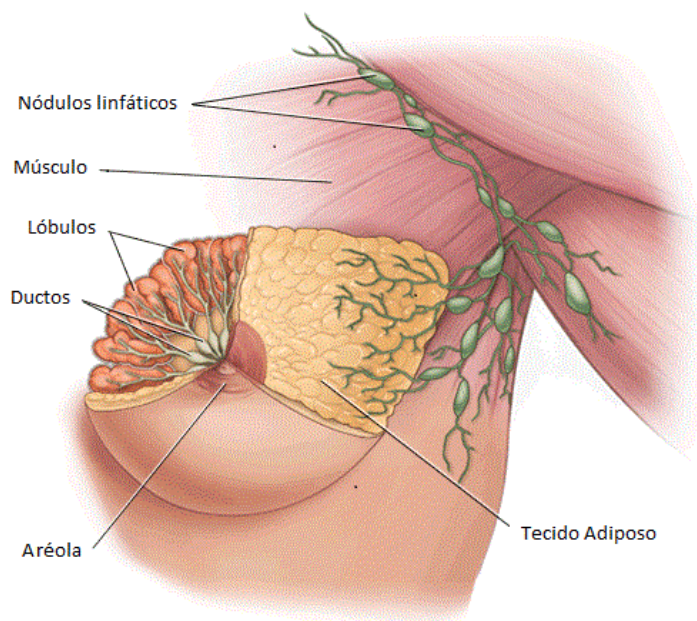


Figura 3 - Visão frontal do tecido mamário e das suas principais estruturas. Adaptado da página web da *Yale School of Medicine*¹².

grau 3, pouco diferenciados, com base nos pleomorfismos nucleares e índice mitótico das células¹³, que se pode relacionar com resposta à terapêutica adjuvante.

Classificação molecular

Apesar da caracterização e classificação histológica do cancro ser uma ferramenta útil no diagnóstico e tratamento do cancro da mama, os marcadores moleculares são mais específicos na classificação dos vários tipos de cancro e determinantes na escolha do tipo de tratamento mais adequado para cada caso¹³.

Os receptores de progesterona (RP), os RE e o HER2/neu são frequentemente utilizados para distinguir os vários tipos de cancro da mama, sendo importantes para determinar a terapêutica que melhor se adequa ao doente e ao estadio da doença, e ainda para estimar riscos de recorrência após o tratamento¹³. Outros marcadores moleculares complementam a informação fornecida pelos marcadores supracitados permitindo distinguir 5 grupos principais de cancro da mama: luminal A e B, HER2⁺, normal mama *like* e BL⁴. Na Figura 4 estão representados os 5 grupos supracitados, assim como algumas características moleculares^{4,13}.

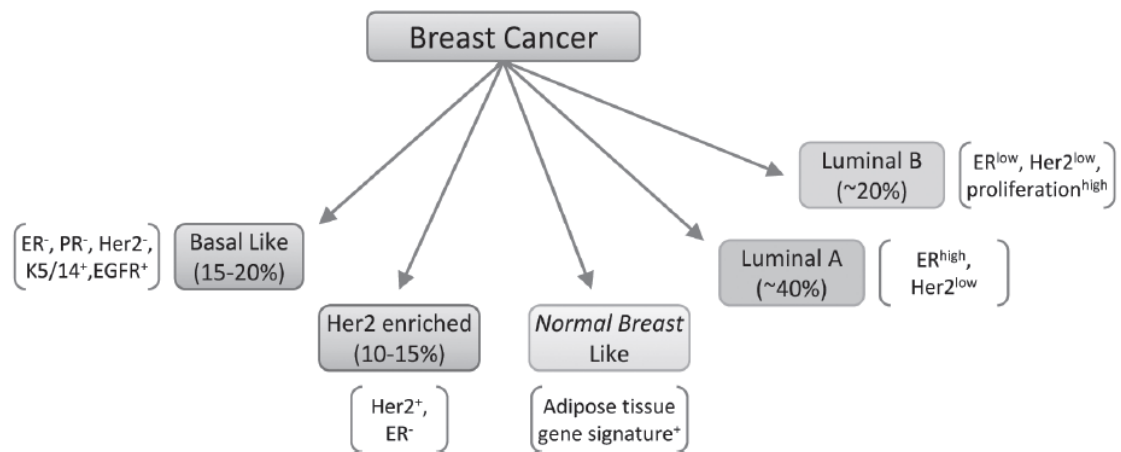


Figura 4 - Classificação molecular do cancro da mama e principais características e marcadores moleculares dos grupos luminal A e B, HER2/neu positivo, normal mama like e basal-like. Adaptado de Malhotra *et. al.*(2010).

O subtipo luminal caracteriza-se por uma sobrepressão de genes como os das citoqueratinas (CQ) 8/18^{7,14} e baixa expressão de HER2/neu⁷, e divide-se em duas populações, os grupos luminal A e luminal B, que compreendem cerca de 40 e 20% dos casos de cancro da mama, respectivamente¹³. Estes dois grupos distinguem-se um do outro quanto à capacidade proliferativa das células cancerígenas, que é maior no grupo luminal B do que no luminal A, e na expressão do RE, que é relativamente alta no grupo luminal A e baixa no grupo luminal B¹³.

O HER2⁺ representa cerca de 10-15% dos casos de cancro e caracteriza-se pela sobreexpressão do gene que codifica o HER2/neu e outros receptores relacionados com este, como o que expressa o receptor de ligação 7 de factores de crescimento (GRB7, do inglês *Growth factor receptor-bound protein 7*), sendo que também se caracteriza pela baixa expressão de RE^{7,13}. É de notar que este tipo de cancro é tratável com trastuzumab, um anticorpo monoclonal humanizado que se liga a porção extracelular dos receptores HER2/neu promovendo uma acção anti-proliferativa nas células e estimulação do sistema imunitário contra as mesmas. Porém, o tratamento com lapatinib é mais eficaz contra cancros da mama metastáticos e é adequado para o tratamento dos casos de cancro HER2⁺ resistentes ao trastuzumab¹⁵.

O grupo normal mama *like* tem baixa expressão dos genes expressos nas células luminais e expressão semelhante às células da mama basais e aos adipócitos, sendo que representa a minoria dos casos de cancro da mama^{7,13}.

Por fim, BL, que afecta cerca de 15 a 20% das mulheres diagnosticadas com cancro, tem elevada expressão de CQ 5/6 e 17 e do receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*)¹³ e normalmente não expressa o HER2/neu, RP nem RE ou os genes associados ao último receptor citado⁷.

Os casos de BL têm sido os mais desafiantes em termos de prognóstico e tratamento e, por isso, começaram a atrair atenções para o facto de não terem expressão de receptores hormonais e HER2/neu, sendo por isso normalmente conhecido como TN. Um estudo recente explica que os BL e TN são distintos em termos moleculares, embora o termo TN seja utilizado em ambos os casos de cancro⁷.

Segundo a literatura, o BL tem bases genéticas que assim o classificam enquanto o TN tem por base a confirmação imuno-histoquímica negativa para os RE, RP e HER2/neu. Apesar das divergências, estes tipos de cancro partilham muitas características (cerca de 70-80%) quer a nível molecular como a nível clínico, como indica a Figura 5¹⁰, sendo que o que mais os distingue é o perfil genético onde, por exemplo, a presença de aneuploidias é superior no BL comparativamente ao TN^{7,16}.

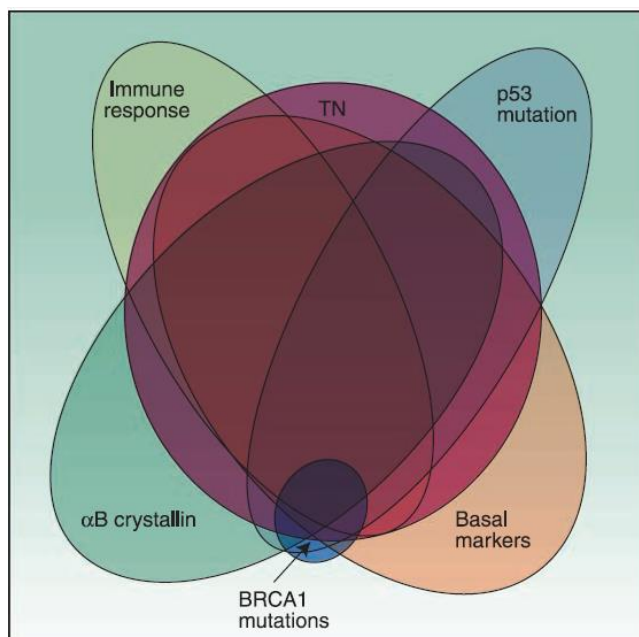


Figura 5 - Relação e sobreposição entre os grupos do cancro da mama que têm características semelhantes. O grupo do cancro da mama triplo negativo está representado a rosa com a sigla TN. Os cancros que expressam marcadores basais como o EGFR, por exemplo, estão representados a bege e, como se pode observar, partilham muitas características com os cancros triplo negativos. Retirado de Schneider *et. al.* (2008).

Tratamento do cancro da mama

Actualmente os tratamentos disponíveis para o cancro da mama são a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia e a hormonoterapia.

Cirurgia

A cirurgia normalmente é opção em casos de cancro da mama em estadio inicial, pois nestes casos a massa tumoral está confinada num espaço que é bem definido e identificável, podendo ser completamente removida. A cirurgia conservadora tem sido adoptada perante a exérese de tecido tumoral com margem de segurança de tecido mamário sem doença. A cirurgia conservadora depende da localização e tamanho do tumor, tamanho da mama e implicações do resultado estético pretendido para cada doente. A radioterapia pós operatória é aplicada como parte integrante do tratamento conservador¹⁷.

Contudo, quando os condicionalismos não permitem a cirurgia conservadora é adoptada a cirurgia radical. Neste tipo de procedimento é retirado todo o tecido mamário e, obviamente, o tumor que o integra. Existem opções técnicas que permitem conservação de pele, mastectomia subcutânea, permitindo a reconstrução estética da mama¹⁷.

Após a cirurgia primária pode ser necessário instituir tratamento adjuvante que deve ser iniciado o mais cedo possível, e que tem por objectivo reduzir a probabilidade de recorrência da doença e aumento da sobrevida da paciente a longo prazo¹⁸.

A metastização dos tumores é algo que ocorre devido a separação de células do tumor inicial e posterior infiltração na corrente sanguínea ou sistema linfático. Actualmente, o diagnóstico mais comum para verificar a metastização de um tumor é a biopsia do gânglio sentinela, que é o primeiro gânglio linfático responsável pela filtração do sistema circulatório da massa tumoral. Se forem encontradas células neste gânglio linfático, a probabilidade dos outros gânglios terem células neoplásicas é alta e procede-se ao esvaziamento axilar. Este procedimento consiste na remoção da rede

linfática na zona da axila que pode ser associada à mastectomia ou à cirurgia conservadora com posterior tratamento sistémico como a quimioterapia¹⁹.

Hormonoterapia

Este tipo de terapia baseia-se no facto de muitos tumores da mama serem sensíveis às hormonas e necessitarem destas para diferenciação e proliferação. O bloqueio de receptores hormonais é uma das estratégias mais utilizadas na hormonoterapia e o fármaco mais utilizado neste caso é o tamoxifeno²⁰.

A aromatase, uma enzima responsável pela conversão do estradiol, é alvo de fármacos inibidores da sua acção e estes têm sido amplamente utilizados como terapia para o tipo de cancro com expressão de receptores hormonais, uma vez que há o impedimento da formação de hormonas através desta enzima. Porém, tem-se verificado que a resposta a esta terapêutica diminuiu por resistência ao tratamento, uma vez que as células cancerígenas conseguem proliferar mesmo com baixos níveis locais de estrogénios. Vários mecanismos foram propostos no sentido de explicar o que pode causar a resistência neste tipo de cancro, incluindo uma activação independente de estrogénios devido a mutações no receptor desta hormona²¹. Também se põe a hipótese de que os RE deixem de ser expressos devido a uma sobreactivação do gene que codifica a proteína cinase activada por mitogénio (MAPK, do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinase*), uma proteína capaz de inactivar reversivelmente a expressão do gene do RE. Neste sentido, têm sido feitos muitos estudos de combinação de fármacos de modo a diminuir a resistência à terapêutica hormonal e actuar de um modo mais específico em termos de vias de sinalização para que alguns dos problemas actuais desta terapêutica sejam diminuídos²⁰.

O maior problema associado à hormonoterapia são os efeitos secundários relacionados com a ausência dos efeitos hormonais, como a osteoporose²² e a redistribuição da gordura corporal, aumentando o risco de doenças cardiovasculares²³, por exemplo.

Radioterapia

A radioterapia utiliza a radiação ionizante para eliminar as células malignas do tumor sem causar graves danos nas células dos tecidos normais envolventes. Esta é uma terapêutica que pode ser utilizada em regime neo-adjuvante ou adjuvante do tratamento cirúrgico, como já foi dito, para minimizar a probabilidade de recidiva do cancro da mama.

A radioterapia não é uma terapia selectiva, ou seja, afecta todas as células induzindo danos no seu DNA e estresse oxidativo nas células, contudo a maior parte das células saudáveis são capazes de reparar estes danos enquanto as células cancerígenas não, acabando por haver morte celular no tecido tumoral. No entanto, a radiação ionizante é aplicada num volume que engloba o tumor e uma margem de segurança, parte de tecido normal.

A eficácia da radioterapia depende de muitas variáveis como a sensibilidade à radiação, o número de células estaminais cancerígenas presentes na massa tumoral, a capacidade de reoxigenação do tecido, presença de ambientes em hipoxia e a capacidade de reparação do DNA das células cancerígenas, por exemplo. Alguns destes factores podem contribuir para a radioresistência dos tumores e, por isso, é uma terapia frequentemente combinada com outras²⁴.

Quimioterapia

A quimioterapia é uma terapêutica que utiliza compostos químicos que interferem com o funcionamento das células tumorais, induzindo a morte celular, podendo ser aplicada isoladamente ou em combinação, em regime adjuvante ou neo-adjuvante²⁵. Muitos dos compostos utilizados actualmente têm como função provocar danos no DNA das células, inibir a reparação do DNA, ou ainda as duas abordagens em conjunto, uma vez que, normalmente, os mecanismos de reparação do DNA estão comprometidos nas células cancerígenas sendo por isso difícil a recuperação e sobrevivência celular^{8,26,27}.

Ao contrário da cirurgia e da radioterapia, a quimioterapia é um tipo de tratamento sistémico, em que todas as células do organismo entram em contacto com

os compostos administrados. Assim, são necessárias concentrações relativamente elevadas dos compostos químicos para que estes sejam eficazes contra as células cancerígenas, o que contribui em grande parte para os efeitos adversos. Apesar disso, a grande vascularização do tecido tumoral cria um microambiente favorável ao maior aporte de agentes químicos em circulação que, devido ao gradiente químico formado entre a corrente sanguínea e as células tumorais, se deslocam em direcção ao tecido tumoral mais facilmente do que no tecido normal^{28,29}.

Os agentes quimioterapêuticos são classificados de acordo com o seu mecanismo de acção, e dentro deles podemos encontrar agentes que interferem especificamente com o ciclo celular que incluem os antimetabolitos, os alcalóides da vinca, os taxanos, as epipodofilotoxinas e os análogos de camptotecinas, ou ainda os que não são específicos para o ciclo celular, nomeadamente os agentes alquilantes, as nitrosuréias e os antibióticos anti-tumorais^{28,29}.

Os antimetabolitos incluem toda a classe de moléculas que são estruturalmente muito semelhantes aos metabolitos envolvidos na síntese de DNA e de o ácido ribonucleico (RNA, do inglês *Ribonucleic Acid*), mas que não têm absolutamente nenhuma função biológica. Deste modo as células incorporam estes metabolitos no seu DNA e RNA e a sua estrutura como um todo não é capaz de exercer a sua função biológica correctamente²⁵.

Os alcalóides da vinca, os taxanos, as epipodofilotoxinas e os análogos de camptotecina são compostos derivados de produtos naturais^{25,28,29}. Os alcalóides da vinca exercem a sua função ao ligarem-se rapidamente à tubulina, aquando da sua entrada na célula, impedindo a polimerização dos microtúbulos e, conseqüentemente, a formação do fuso mitótico.

Os taxanos, como o paclitaxel ou o docetaxel, bloqueiam o ciclo celular na mitose através da interacção com os microtúbulos, as epipodofilotoxinas impedem a síntese de DNA pela inibição da enzima topoisomerase II e, finalmente, os análogos de camptotecina impedem o alongamento do DNA através da inibição da enzima topoisomerase²⁵.

Os agentes alquilantes interferem com as várias funções celulares através da formação de ligações covalentes com moléculas biologicamente importantes como o DNA, RNA e com proteínas²⁵. As mostardas nitrogenadas, nomeadamente a mecloretamina, são muito solúveis e reactivas em ambiente aquoso e ligam-se directamente ao DNA induzindo danos permanentes³⁰.

As nitrosuréias são compostos lipossolúveis com grande capacidade para atravessar membranas plasmáticas e por isso são muito utilizadas nos cancros cerebrais. Outra grande classe de agentes alquilantes são os derivados do platinum, como a cisplatina ou a carboplatina, que se ligam covalentemente ao DNA induzindo a formação de aductos intra e inter-cadeia no DNA, impedindo a síntese do mesmo na divisão celular²⁵.

Os antibióticos tumorais como a doxorrubicina e a mitomicina C intercalam-se no DNA e geram radicais livres de oxigénio, que promovem a clivagem do DNA ao formar quebras numa só cadeia ou em ambas as cadeias do DNA^{25,29}.

Na prática clínica direccionada para o cancro da mama, poucos são os agentes quimioterapêuticos que induzem danos no DNA por ligações entre cadeias derivadas de alquilações. Para o cancro da mama, apenas a satraplatina está aprovada e mais recentemente as pirrolo-benzodiazepinas entraram em ensaios clínicos de fase II para tumores sólidos³¹. No entanto, os agentes alquilantes hidroximetil-pirrolo-tiazóis, da família das mostardas nitrogenadas, têm mostrado uma excelente actividade antitumoral em linhas celulares de cancro da mama^{30,32}.

6,7-bis(hidroximetil)-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazóis quirais

Recentemente, estudos conduzidos por Soares *et. al.* levaram ao desenvolvimento de novos compostos com potencial terapêutico anti-tumor direccionado para o adenocarcinoma da mama^{30,32}.

Os primeiros compostos estudados continham apenas um grupo funcional que seria capaz de interagir com a macromolécula em questão, como exemplifica o esquema da Figura 6³⁰.

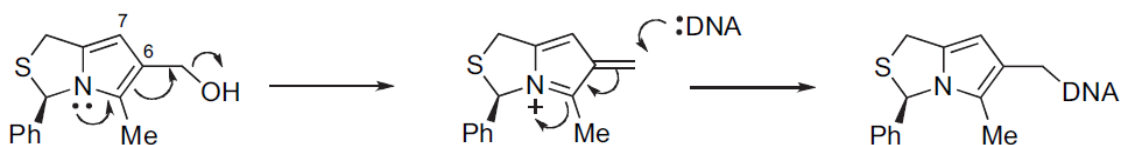


Figura 6 - Esquema representativo do proposto mecanismo de mono-alkilação do DNA promovido por compostos 6-hidroximetil-1H,3H-pirrólo[1,2-c]tiazóis quirais. O par de electrões no átomo de azoto ataca o carbono C-5 promovendo a formação de uma ligação dupla no carbono C-6. Para restabelecer a nuvem electrónica do azoto, o DNA, com excesso de carga negativa e abundante em ligações duplas, ataca o carbono C-1 da ligação dupla ficando ligado covalentemente ao composto químico. Retirado de Soares *et. al.* (2010).

No entanto, uma das moléculas sintetizadas com um grande potencial anti-tumoral - (3R)-6,7-bis(hidroximetil)-5-metil-3-fenil-1H,3H-pirrólo[1,2-c]tiazol - devido à presença de dois grupos hidroximetil nos carbonos C-6 e C-7, como mostra a Figura 7. Contudo, este composto não apresentou valores da concentração que inibe a proliferação celular em 50% (IC₅₀) significativamente mais baixos relativamente ao correspondente composto monoalquilante mais eficaz estudado - (3R)-6-hidroximetil-5-metil-3-fenil-1H,3H-pirrólo[1,2-c]tiazol. Não obstante, este composto seria um dos mais eficazes na acção anti-tumoral e isso conduziu a mais estudos com os seus derivados³⁰.

Os estudos realizados posteriormente a partir dos conhecimentos do trabalho de Soares *et. al.* em 2010³⁰ levaram a concluir que o grupo metilo no carbono C-5 nos compostos 6,7-bis(hidroximetil)-1H,3H-pirrólo[1,2-c]tiazóis seria fundamental para a selectividade e eficácia antitumoral na linha celular de adenocarcinoma da mama MCF7. O mesmo estudo levou a concluir que o grupo fenilo no carbono C-3 também parecia ser fundamental para a actividade antitumoral na mesma linha celular.

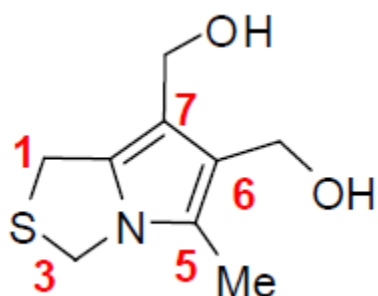


Figura 7 - Estrutura química base dos compostos 6,7-bis(hidroximetil)-1H,3H-pirrólo[1,2-c]tiazóis.

Os compostos estudados por Soares *et. al.* em 2013³² mostraram-se muito promissores no seu efeito anti-proliferativo na linha celular MCF7. No entanto os resultados observados são preliminares e ainda há estudos fundamentais a realizar para que, no futuro, algum destes compostos passe para estudos *in vivo* e para ensaios clínicos.

Terapêuticas dirigidas

As novas abordagens terapêuticas, contrariamente às terapias convencionais, surgiram devido às novas descobertas nas áreas da biologia molecular, genómica, proteómica e, mais recentemente, a metabolómica/metabonómica que estuda os metabolitos dos vários processos celulares. Estas abordagens pretendem ser direccionadas e propõem-se tratar cada caso específico com uma estratégia diferente, individualizando os tratamentos pois, deste modo, a eficácia do tratamento é potenciada e os efeitos secundários diminutos³³.

Novas estratégias direccionadas ao cancro da mama positivo para RE (RE⁺)

Como já foi referido, os RE⁺ tendem a perder sensibilidade à terapia hormonal e, recentemente foi estabelecida uma relação entre os RE⁺ resistentes ao tamoxifen e vias de sinalização de factores de crescimento, como as vias MAPK e fosfatidilinositol 3-cinase/proteína cinase B (PI3K e Akt, do inglês *Phosphatidylinositol 3-kinase* e *Protein Kinase B*), activadas pela activação do EGFR, entre outros receptores. Neste sentido, algumas moléculas inibidoras dos receptores de factores de crescimento têm sido utilizadas para vários tipos de cancro, como o gefitinib e o erlotinib, e muitas outras estão em ensaios clínicos. Outras vias de sinalização sobreexpressas nos RE⁺ como a família de proteínas de sarcoma de ratazanas (RAS, do inglês *Rat Sarcoma*, relacionada à descoberta histórica desta família de proteínas) também promovem a proliferação celular e, uma vez que essa via está dependente de uma pequena proteína denominada de farnesiltransferase, os inibidores dessa proteína têm grande potencial antitumoral³³.

O alvo da rapamicina (mTOR, do inglês *Mammalian Target of Rapamycin*) a é um alvo da via PI3K/Akt que é regulada pela PTEN, e o bloqueio do complexo mTOR

também mostrou ser uma boa estratégia terapêutica através da rapamicina. No entanto este fármaco possui alguns problemas de estabilidade e de solubilidade em água que levaram ao desenvolvimento de análogos que ainda estão em ensaios clínicos. Essa estratégia terapêutica aplica-se basicamente em todos os tipos de cancro, incluindo os HER2⁺ e os TN, em que outras terapias, novas e convencionais, não eliminam o tumor³³.

Novas estratégias direccionadas ao HER2⁺

A activação do HER2/neu também resulta na activação das vias de sinalização RAS-MAPK e PI3K/Akt/mTOR, sendo que algumas estratégias referidas acima também se aplicam ao HER2⁺. Neste tipo de cancro também se aplicam outras terapias como a degradação do HER2/neu e o bloqueio simultâneo de várias vias de sinalização pró-proliferativas através da inibição da proteína de choque térmico 90 (HSP90, do inglês *Heat Shock Protein 90*). Há ainda uma outra estratégia que utiliza anticorpos contra o HER2/neu que activam o sistema imunitário no sentido de eliminar as células com os anticorpos, ou ainda no sentido de direccionar outras moléculas citotóxicas às células tumorais, o que se define como *drug targeting*³³.

Novas estratégias direccionadas aos BL e TN

Muitos dos novos tratamentos surgem devido à dificuldade no tratamento do BL e TN pois, como já foi referido, estes tipos de cancro não respondem à terapia hormonal nem aos tratamentos direccionados ao HER2/neu³⁴. Apesar de não haver uma terapia específica para o TN, este tipo de cancro é muito sensível à quimioterapia sendo, por isso, o tipo de tratamento mais recomendado em casos de TN em conjunto com a cirurgia³³⁻³⁶.

Nestes tipos de cancro, a inibição de vias de sinalização específicas é uma das novas abordagens com maior taxa de sucesso em testes clínicos. Esta abordagem terapêutica tira partido do número limitado de vias de sinalização que estão hiper-activadas nas células cancerígenas. Por isso, as células onde estas vias são inactivadas não são capazes de utilizar mecanismos de compensação que promovam a sobrevivência e a proliferação celular⁹.

Dentro da vasta gama de inibidores sob investigação e em testes clínicos, como os inibidores do EGRF, do factor de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *Vascular endothelial growth factor*), PI3K/Akt/mTOR e MAPK, os inibidores das poli-(ADP-ribose)-polimerase (PARP) são a mais promissora gama de compostos com actividade anticancerígena^{7,8,33,34,37,38}.

PARP e Inibidores das PARP

As PARP são uma família de proteínas transferases que estão envolvidas na detecção e sinalização de quebras nas cadeias do DNA, quer por radiação ionizante e stress oxidativo, quer por agentes citotóxicos³⁹.

Mais especificamente, a PARP-1 é uma proteína de extrema importância pois reconhece quebras de uma única ou de ambas as cadeias no DNA e é responsável pela reparação e manutenção da integridade do DNA³⁸, pela regulação da diferenciação e divisão celular, pela transcrição de várias proteínas, pela morte celular por necrose, apoptose³⁹ e por partanato, um tipo de morte celular independente de caspases e que depende do tamanho e complexidade dos polímeros de ribose de adenosina difosfato (ADP, do inglês *Adenosine diphosphate*)⁴⁰.

A PARP-1 é uma proteína com 116kDa com um domínio de ligação do DNA no terminal amina, do aminoácido 2 ao 372^{41,42}, que possui um sinal de localização nuclear e 3 *zinc fingers*, embora apenas dois sejam importantes para o reconhecimento e ligação ao DNA⁴³, o primeiro para o reconhecimento de quebras numa só cadeia e, o segundo para o reconhecimento de quebras em ambas as cadeias³⁹, como mostra a Figura 8⁴³.

O domínio de auto-modificação, que inclui os aminoácidos 373 até ao 524^{41,42}, é rico em resíduos de glutamato e lisina, necessários para que a PARP-1 se consiga auto polimerizar com resíduos de ADP-ribose. Este domínio contém ainda uma sequência do terminal carboxílico da proteína BRCA1 (BRCT, do inglês *BRCA1 carboxy-terminal repeat motif*) que se pensa ser um local de interacção com essa proteína⁴³.

Por fim, o domínio catalítico, compreendido entre os aminoácidos 525 e 1014^{41,42}, é responsável pela polimerização de grupos ADP-ribose e contém um

domínio rico em triptofano, glicina e arginina, representado na Figura 8 pela sigla WGR, cuja função ainda não é conhecida⁴². No domínio catalítico destacam-se os 2 aminoácidos do local catalítico: a histidina, o H na Figura 8, e a tirosina, o Y na Figura 8, que têm a função de ligação ao dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*) oxidado, NAD⁺, e o ácido glutâmico, representado pela letra E na Figura 8, que tem actividade catalítica propriamente dita^{42,43}.

Ao detectar algum tipo de dano, a PARP-1 liga-se às cadeias do DNA com terminal *nick* e promove a hidrólise do NAD⁺ em nicotinamida e grupos ADP-ribose,

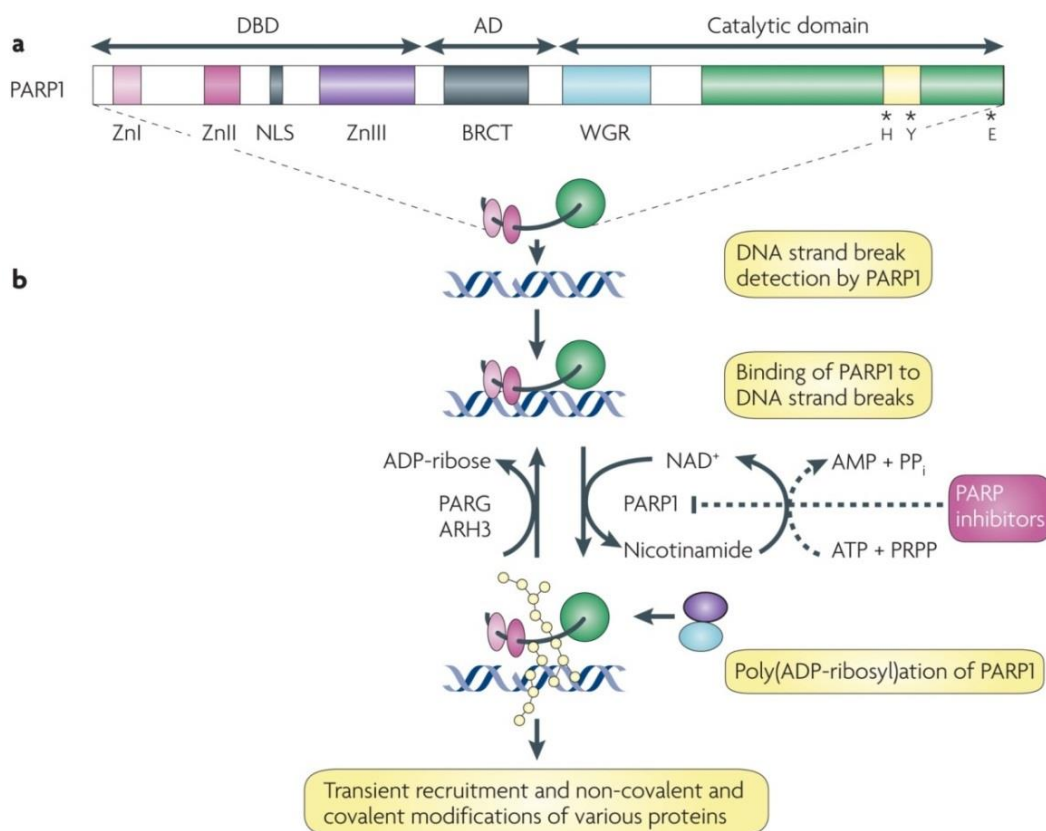


Figura 8 – Características estruturais e funcionais da PARP-1. a: Domínios de ligação ao DNA (DBD, do inglês DNA-binding domain), de automodificação (AD) e catalítico. b: Consequências da activação das PARP-1 pelos danos no DNA. A PARP-1 reconhece o dano do DNA e liga-se à ele através do DBD e começa a sintetizar o polímero de ADP-ribose (bolas amarelas). Devido à densa carga negativa do polímero de ADP-ribose a PARP-1 perde afinidade ao DNA e dá lugar à outras proteínas de reparação (formas ovais azul e roxa) que são atraídas por essa carga. ZnI: *Zinc finger I*; ZnII: *Zinc finger II*; ZnIII: *Zinc finger III*. BRCT: Sigla para a sequência do terminal carboxílico da proteína BRCA1; WGR: Domínio rico em triptofano, glicina e arginina; H: Histidina; Y: Tirosina; E: Ácido glutâmico. Adaptado de Rouleau *et. al.*(2010).

sendo que estes grupos podem ser sucessivamente ligados, formando polímeros compostos por unidades de ADP-ribose^{39,43}. São esses polímeros os responsáveis pela recruta e modificação de outras proteínas e complexos de proteínas que irão actuar na reparação do DNA⁴³, como está representado na Figura 8.

Os inibidores das PARP actuam no sentido de impedir a reparação do DNA por mecanismos de compensação quando os mecanismos principais estão debilitados ou mesmo ausentes, potenciando assim a acção de outras terapias que induzem danos no DNA^{31,36,37} como a quimioterapia com agentes alquilantes⁴⁴. A Figura 9 mostra um esquema representativo de células normais, cancerosas com origem em cancros esporádicos ou associados a mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 e a terapêutica com inibidores das PARP e com agentes que danificam o DNA.

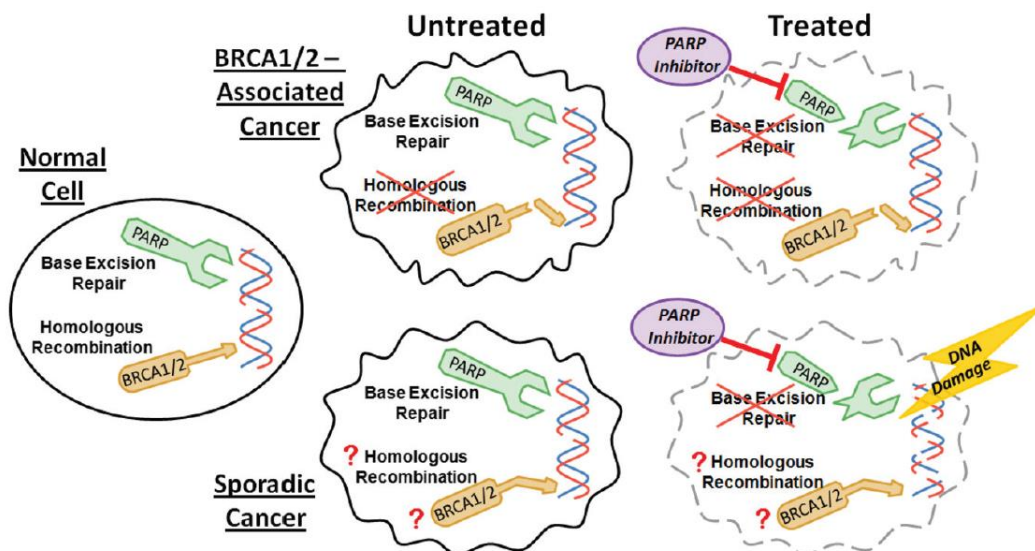


Figura 9 – Estratégia terapêutica direcionada para cancros associados a mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 e cancros esporádicos com inibidores das PARP. Retirado de Ellisen *et. al.*(2011).

Actualmente há vários inibidores das PARP em ensaios clínicos de fase I e II, quer em regime isolado como em terapia combinada com quimioterapia e radioterapia, cujos resultados são bastante promissores^{38,45,46}. Os estudos para o cancro TN mostram que a utilização do inibidor das PARP **iniparib** em combinação com a gemcitabina, carboplatina ou o agente monoalquilante temozolomide, melhoram significativamente a resposta ao tratamento das mono-terapias e as três combinações estão em fase clínica III^{38,45}. O inibidor das PARP **veliparib**, também em combinação

com o temozolomide, mostraram resultados muito positivos para os casos de cancro da mama associados a mutações nos genes BRCA1 e BRCA2^{38,47}.

No futuro prevê-se avaliar o potencial preventivo dos inibidores das PARP⁴⁴, no sentido em que se pode actuar em nichos específicos de células mais propensas a adquirirem mutações e iniciarem as transformações malignas que originam os tumores, as chamadas “células tumorais estaminais”⁴⁸.

De um modo geral, as terapias actuais não são suficientemente eficazes no tratamento e erradicação permanentemente de tumores, por isso é essencial desenvolver novas terapias e regimes de combinação de terapias bem estabelecidas no sentido de encontrar tratamentos mais eficazes comparativamente aos presentes na prática clínica, independentemente do tipo de cancro e estadio.

Objetivos

A quimioterapia como terapêutica no cancro da mama é uma ferramenta muito útil tanto em regime neo-adjuvante e em adjuvante. Os grandes obstáculos associados à terapêutica com citostáticos são a aquisição de resistências aos fármacos e a elevada citotoxicidade sistémica que estes apresentam, que está inversamente relacionada à selectividade para o tecido tumoral.

Assim, o principal objectivo deste trabalho é avaliar o efeito citotóxico de novos compostos com a estrutura química base 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis quirais nas linhas celulares de adenocarcinoma da mama RE⁺, representado pela linha celular MCF7, o HER2⁺, representado pela linha celular HCC1954 e o TN, representado pela linha celular HCC1806.

Constitui ainda objectivo deste trabalho aprofundar o efeito de dois destes compostos, ASRO-13 e ASRO-17, nas mesmas linhas celulares ao nível da viabilidade e tipos de morte celular, do ciclo celular, do perfil proteico das células e os efeitos no DNA das mesmas de modo a explorar os seus mecanismos de acção.

Com este trabalho também se pretende estabelecer relações entre a estrutura e actividade dos novos compostos nas linhas celulares em estudo para que, no futuro, se possam planear novas modificações estruturais que resultem em compostos mais eficientes no tratamento do cancro da mama.

Materiais e métodos

De modo a atingir os objectivos propostos neste trabalho, foram realizadas várias experiências utilizando os métodos descritos abaixo.

Culturas celulares

Para a realização deste trabalho foram utilizadas três linhas celulares humanas de cancro da mama, a HCC1806, a HCC1954 e a MFC7.

A linha celular HCC1806 (LC-TN, referente a linha celular tripla negativa), cancro da mama triplo negativo, foi iniciada em 31 de Julho de 1955 e estabelecida 10 meses após, a partir de células isoladas de uma doente de 65 anos e de raça negra. A massa tumoral foi caracterizada como carcinoma celular escamoso em estadio IIB de grau 2, sem metástases nos gânglios linfáticos ou na glândula mamária. A linha celular caracteriza-se, do ponto de vista bioquímico, por se mostrar positiva para o marcador 2 da glicoproteína epitelial e para a citoqueratina 19, no entanto não expressa os receptores de estrogénio, progesterona ou o HER2/neu.

A linha celular HCC1954 (LC-HER2⁺, referente a linha celular positiva para HER2/neu), foi iniciada a 30 de Outubro em 1995 e estabelecida 4 meses após a recolha de células de uma doente indiana de 61 anos. Esta doente tinha um carcinoma invasivo ductal em estadio IIA, de grau 3, com metástases linfáticas. O seu perfil bioquímico indica expressão negativa de receptores hormonais e uma expressão muito acentuada de Her-2/neu e de citoqueratina 19.

A linha celular MCF7 (LC-RE⁺, referente a linha celular positiva para RE), foi iniciada e estabelecida por McGrath a partir de células de uma metástase pulmonar de uma doente caucasiana com 69 anos. Essa linha celular é diferenciada, expressa o oncogene WNT7B e sobrepresa o receptor de estrogénio, tem entre 66 a 87 cromossomas, sendo que o cromossoma 20 é nulissómico e o X é dissómico.

Todas as linhas celulares foram cultivadas em atmosfera húmida com 5% de CO₂, de acordo com as instruções da *American Type Culture Collection* (ATCC), à qual foram adquiridas

As linhas celulares HCC1806 e HCC1954 foram propagadas em meio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI-1640, R-4130, Sigma Aldrich®, EUA), suplementado com 5% soro bovino fetal (FBS, do inglês *fetal bovine serum*, F-7524, Sigma Aldrich®, EUA) no caso da linha HCC1806 e com 10% de FBS no caso da linha HCC1954, 2,5g/L de D-(+)-glicose (G-7021, Sigma Aldrich®, EUA), 400mM de piruvato de sódio (11360, Gibco®, UK) e 1% de antibiótico (100U/mL de penicilina e 10mg/mL de estreptomicina; 15240, Gibco®, UK).

A linha celular MCF7 foi propagada em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (D-5648, Sigma Aldrich®, EUA) suplementado com 10% de FBS, 2 g/L de bicarbonato de sódio (S-5761, Sigma Aldrich®, EUA), 100mM de piruvato de sódio, e 1% de antibiótico.

As subculturas de todas as linhas celulares foram realizadas quando os frascos de cultura atingiram os 90% de confluência, sendo que a cada frasco de 75cm² se adicionaram 2mL de tripsina-EDTA a 0,25% (25200, Gibco®, UK) e a cada frasco de 175cm² se adicionaram 3mL de tripsina-EDTA para que as células se destacassem dos mesmos. A tripsina foi inativada com meio de cultura num volume três vezes superior ao volume adicionado de tripsina. As suspensões celulares foram divididas por 2 a 3 novos frascos de cultura, conforme necessário.

Para a realização dos estudos *in vitro* destacaram-se as células dos frascos para preparar suspensões celulares e, para isso, retirou-se o meio de cultura dos frascos e procedeu-se à lavagem das células com tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate saline buffer*). Posteriormente adicionaram-se aos frascos de cultura 2mL da solução tripsina-EDTA a 0,25% durante alguns minutos a 37°C até que ocorresse a separação celular das linhas celulares HCC1954, MCF7 e HCC1806. Após a inativação da tripsina como descrito acima, procedeu-se à contagem de uma alíquota da suspensão celular corada com azul de tripano (302643, Sigma Aldrich®, EUA), com o auxílio da câmara de *neubauer* e do microscópio invertido (Nikon, Eclipse TS 100), com ampliação de 100 vezes. Após a contagem, o volume das suspensões celulares foi ajustado com meio de cultura de forma a obter a concentração celular pretendida para cada estudo.

Estudos de citotoxicidade

Os estudos de citotoxicidade realizaram-se *in vitro* com a administração dos compostos em estudo – ASRO-13, ASRO-15, ASRO-17, MIS1707, MIS1786 e MIS1787 – em regime único ou em terapia combinada com um potente inibidor das PARP, o hidrocloreto de N-(5,6-dihidro-6-oxo-2-fenanthridinil)-2-acetamida (PJ34, 3255, Tocris Bioscience, EUA).

Química

Os compostos estudados na presente dissertação foram cedidos pelo Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e têm as estruturas químicas apresentadas na Figura 10.

Como se pode ver pela Figura 10, os seis compostos estudados têm uma estrutura base comum, já mostrada na Figura 7, 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]-tiazóis quirais. Os compostos têm dois grupos hidroxilo nos carbonos C-6 e C-7 um grupo metilo no carbono C-5 e os anéis no centro da estrutura, um com um

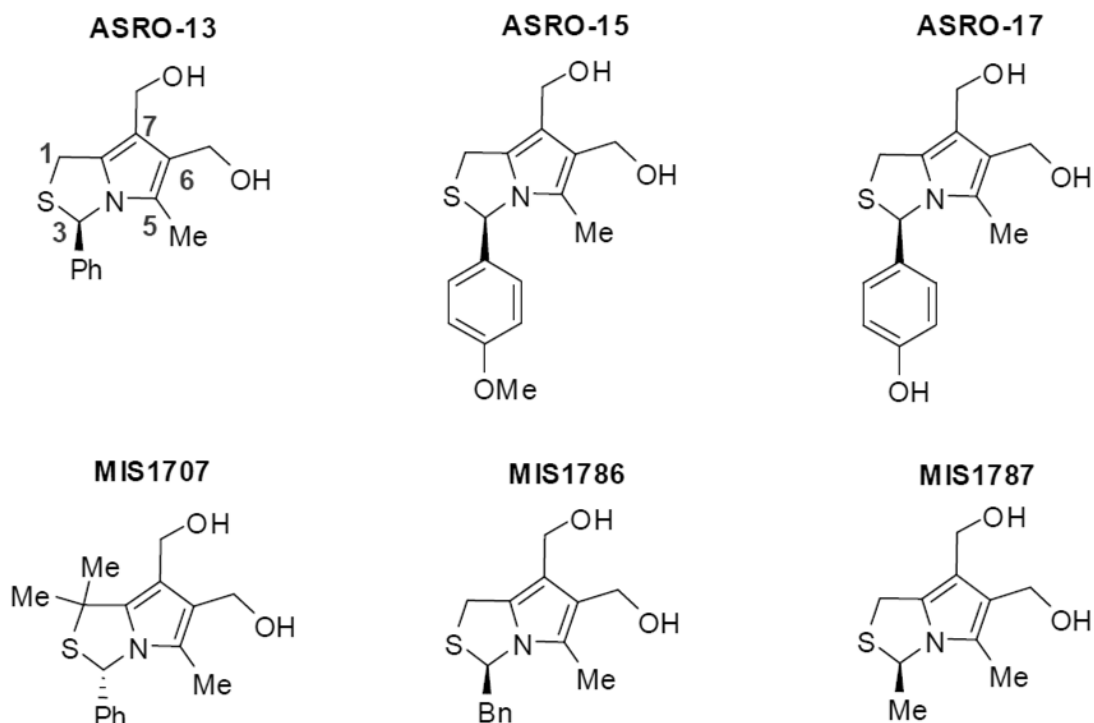


Figura 10 - Estrutura química dos compostos ASRO-13, ASRO-15, ASRO-17, MIS1707, MIS1786 e MIS1787. A imagem da estrutura química dos compostos encontra-se também em anexo extensível no final do manuscrito.

átomo de azoto – anel pirrol – e o outro com um enxofre – anel tiazol.

Os compostos ASRO-13, ASRO-15, ASRO-17, MIS1786 e MIS1787 não possuem qualquer ligando no C-1, enquanto o composto MIS1707 tem dois grupos metilo. Os compostos ASRO-13 e MIS1707 têm um grupo fenilo no carbono C-3, enquanto o ASRO-15 tem um grupo *para*-metoxifenilo no C-3 e o ASRO-17 um grupo *para*-hidroxifenilo mesmo carbono. O composto MIS1786 tem um grupo benzilo ligado a C-3 através de uma ponte metileno (carbonos não-aromáticos) e o MIS1787 tem apenas um grupo metilo. Os compostos ASRO-13, ASRO-15 e ASRO-17 têm massa molecular de 275,37g/mol, 305,39g/mol e 291,37g/mol, respectivamente, e os compostos MIS1707, MIS1786 e MIS1787 têm massa molecular de 303,42, 289,39 e 213,30g/mol, respectivamente.

Os compostos estudados nesta dissertação têm todos a configuração absoluta *R* em C-3, com exceção do composto MIS1707 que tem a configuração absoluta *S*.

Para a realização das experiências descritas neste capítulo os compostos utilizados foram reconstituídos e solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO, D-8418, Sigma Aldrich®, EUA) e utilizados no mesmo dia para todos os estudos realizados, à exceção da avaliação da actividade metabólica pelo ensaio do MTT, em que os compostos foram reconstituídos e utilizados nos 7 dias seguintes. Os compostos foram mantidos a -20°C até à sua utilização.

Avaliação da actividade metabólica

Para realizar os estudos de citotoxicidade recorreu-se ao ensaio do MTT, descrito abaixo, que permite a avaliação da actividade metabólica e proliferação celular. Para tal, foram preparadas placas de 96 poços (SARSTEDT AG & Co., DE) com 300µL de volume final por poço, de acordo com o procedimento descrito acima. Utilizaram-se suspensões celulares de 80.000 células/mL independentemente da linha celular utilizada. As placas foram incubadas durante a noite de modo a permitir a adesão das células.

Para a administração dos compostos químicos em estudo foram preparadas 6 soluções com concentrações diferentes, permitindo assim a aplicação de um volume

constante de 1% do volume total de cada poço, de modo a obter as concentrações finais de 0,1µM a 200µM. Cada placa continha poços controlo sem a adição de qualquer composto ou solvente e ainda poços onde foram aplicados 1% do volume do poço do solvente dos compostos, o DMSO. Estes poços serviram como controlo, o que nos permite avaliar os efeitos dos compostos utilizados eliminando o efeito do próprio solvente. Após a aplicação dos compostos, as placas foram incubadas durante 24, 48, 72 e 96 horas.

Na terapia combinada dos compostos com o inibidor das PARP, o PJ34, foi adicionado aos poços em estudo de modo a obter as concentrações finais de 0,5µM, 2µM, 10µM e 25µM. Após meia hora de incubação das células com o PJ34, foram administrados os compostos com as mesmas concentrações utilizadas na terapia única.

Ensaio do MTT

De modo a avaliar a actividade metabólica na presença dos compostos utilizados no presente estudo, foi utilizado um método colorimétrico conhecido como ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). O sal tetrazólio - MTT - é internalizado pelas células por endocitose e é reduzido a cristais de formazano pelas enzimas desidrogenases, principalmente pelo complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, a succinato desidrogenase. Os cristais de formazano apresentam cor violeta e são formados proporcionalmente à actividade enzimática das células em estudo.

No contexto desta dissertação o ensaio do MTT tem como objectivo avaliar o efeito dos compostos químicos nas linhas celulares HCC1954, HCC1806 e MCF7, tanto em terapia única como em terapia combinada com o inibidor das PARP, o PJ34.

Protocolo experimental

O meio de cultura das placas em estudo foi aspirado e as células foram lavadas com 300µL de tampão PBS. De seguida, foram adicionados a cada poço 50µL de uma solução de MTT (M-2128, Sigma Aldrich®, EUA) a 0,5mg/mL em PBS, pH 7,4. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera controlada, no escuro, durante 3-4 horas.

Os cristais de formazano foram posteriormente solubilizados com isopropanol ácido (solução de 0,04M de ácido clorídrico 37% fumante (258148, Sigma Aldrich®, EUA) em isopropanol (278475, Sigma Aldrich®, EUA)) com agitação suave, o que permite a detecção pelo leitor de ELISA (*Biotek® Synergy HT*). As placas em estudo com os cristais de formazano dissolvidos foram lidas no leitor ELISA no comprimento de onda de 570nm com um filtro de referência de 620nm, de acordo com as instruções do fabricante.

Uma vez que o método do MTT é colorimétrico, este obedece a lei de Beer-Lambert, equação 1, que depende da concentração de formazano.

$$A = \epsilon cl \quad (\text{Eq. 1})$$

onde A é a absorvância obtida no leitor ELISA em cada poço, c é a concentração do formazano no poço, l é a espessura da amostra ao qual a luz atravessa e ϵ é o coeficiente de absorção molar do formazan. A actividade mitocondrial e capacidade proliferativa das células, na presença de um certo tratamento, são avaliadas relativamente ao controlo tratado com o DMSO.

Avaliação da viabilidade e vias de morte celular

Os compostos antineoplásicos têm por objectivo induzir morte celular, por apoptose ou necrose, selectivamente em células neoplásicas. A apoptose é descrita como um tipo de morte celular programada e caracterizada pela diminuição de volume celular, formação de protuberâncias na membrana celular, preservação do plasma e manutenção de organelos intactos. Por outro lado, a necrose é caracterizada por uma rápida e violenta degeneração celular que afecta uma extensa população de células. Este tipo de morte celular é caracterizado pela perda e destruição do conteúdo celular e pela disrupção membranar, que resulta na libertação do conteúdo celular o que, por sua vez, desencadeia uma resposta imunitária.

Assim, para distinguir o tipo de morte celular induzido pelo tratamento com os compostos químicos, recorreu-se à citometria de fluxo com a dupla marcação anexina-V (An-V) e iodeto de propídio (IP).

Citometria de fluxo com a marcação anexina-V e iodeto de propídeo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar células e partículas biológicas microscópicas em suspensão num meio líquido.

O aparelho de detecção óptico-electrónico consiste num feixe de luz, de comprimento de onda único, que é direccionado para o meio líquido em fluxo. Vários detectores são apontados ao local onde o fluxo passa através do feixe de luz: um na linha do feixe de luz (*forward scatter*) e vários perpendiculares a este (*side scatter*), além de um ou mais detectores fluorescentes. As células em suspensão são aspiradas e separadas para que passem uma a uma através do feixe, dispersando a luz incidente de uma forma específica. Os corantes químicos fluorescentes encontrados na célula ou a ela ligados podem ser excitados, emitindo fluorescência. Esta combinação de luz dispersa e fluorescente é captada pelos detectores e, por análise das flutuações de brilho de cada detector é possível explorar vários tipos de informação sobre a estrutura física e química de cada célula individualmente.

Assim, a citometria de fluxo é aplicada na determinação de parâmetros celulares como o tamanho celular, a sua complexidade, e a marcação com fluoróforos específicos permite a detecção de estruturas celulares específicas como membranas e ácidos nucleicos, por exemplo.

A dupla marcação com An-V e IP permite quantificar a viabilidade celular e distinguir os diferentes tipos de morte celular: apoptose e necrose, pois a An-V liga-se especificamente ao fosfolípido membranar fosfatidiserina que, nas células viáveis, está presente apenas no folheto interno das membranas celulares mas que, nas células apoptóticas, se transloca para o folheto externo. Por sua vez, o IP é um composto que se intercala na dupla hélice de DNA marcando assim células que se encontrem em necrose.

Deste modo, a dupla marcação com An-V e IP permite distinguir quatro populações de células: as vivas (An-V⁻/IP⁻); as apoptóticas (An-V⁺/IP⁻); as necróticas (An-V/IP⁺); e as que se encontram em apoptose tardia/necrose (An-V⁺/IP⁺). A marcação dos fluorocromos conforme a condição celular está esquematizada na tabela 1.

Tabela 1 - Padrão de marcação com An-V/IP para as diferentes condições celulares.

Condição celular	Anexina-V	Iodeto de Propídio
Células vivas	-	-
Células em apoptose	+	-
Células em necrose	-	+
Células em apoptose tardia/necrose	+	+

Protocolo Experimental

O procedimento experimental para a avaliação do tipo de morte celular causada pelos compostos em estudo passou pela preparação de frascos de cultura com 2×10^6 células, nas quais foram submetidas ao tratamento com o IC_{50} correspondente de cada composto de interesse, nomeadamente do ASRO-13 e do ASRO-17, durante 48h. Os compostos foram diluídos em DMSO de modo a que se aplicasse 0,1% do volume total dos frascos da solução com o composto. Deste modo o efeito do solvente nas células é minimizado.

Após o período de tratamento, utilizou-se o protocolo descrito acima, no sentido de destacar as células dos frascos. Centrifugou-se a suspensão celular a 300G durante 5 minutos, retirou-se o sobrenadante e de seguida lavou-se o *pellet* com PBS. Posteriormente, o *pellet* foi incubado com 100 μ L de tampão de ligação (kit *Immunotech*), 2,5 μ L de An-V marcada com isotiocianato de fluoresceína (An-V-FITC, kit *Immunotech*) e 1 μ L de IP (kit *Immunotech*), durante 15 minutos a 4°C, no escuro. Após este período, adicionaram-se 400 μ L de PBS e efectuou-se a análise no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences, EUA) utilizando os comprimentos de onda de excitação de 525nm para a An-V-FITC e 640nm para o IP. Os resultados apresentam-se em percentagem de células presentes em cada condição celular.

Avaliação do ciclo celular

A avaliação do ciclo celular, no contexto desta dissertação, permite inferir se os compostos utilizados impedem a replicação celular e assim como em que fase do ciclo celular são introduzidas alterações.

O IP, o corante mais comumente utilizado para a análise de DNA, intercala-se na dupla cadeia de DNA, proporcionalmente à quantidade desta macromolécula. Como o IP também se pode intercalar com o RNA, torna-se necessário removê-lo através da acção de nucleases (RNAses). Assim, a quantificação do conteúdo de DNA permite-nos conhecer a distribuição de uma população de células ao longo das diferentes fases do ciclo celular, as fases S, G₀/G₁, G₂/M.

Protocolo experimental

Para a avaliação do ciclo celular, as células foram preparadas exactamente como o descrito no protocolo experimental para a avaliação da morte celular até ao ponto em que se obtém o *pellet* após a centrifugação a 300G durante 5 minutos. Neste ponto retirou-se o sobrenadante e adicionaram-se às células 200µL de etanol (24105, Sigma Aldrich®, EUA) a 70% com o tubo em agitação constante no vortéx (modelo ZX³, VELP Scientifica, IT). Após este procedimento, as células foram incubadas a 4°C no escuro durante 30 minutos. De seguida lavaram-se as células com 2mL de PBS e centrifugaram-se novamente a 300G durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e incubaram-se as células com 200µL de uma solução de IP com RNAses (Immunostep, PI/*RNase solution*) no escuro e à temperatura ambiente durante 15 minutos. A detecção do IP foi feita utilizando o comprimento de onda de excitação de 488nm no mesmo citómetro referido anteriormente.

Avaliação da relação Bax/Bcl-2

As proteínas de leucemia/linfoma de células B (Bcl-2, do inglês, *B cell leukemia/lymphoma*) e proteína X associada a Bcl-2 (Bax, do inglês *Bcl-2-associated X protein*) estão envolvidas na regulação da activação da via intrínseca que conduz a apoptose celular. A Bax é uma proteína regulada pela p53 com funções pró-apoptóticas que leva à perda do potencial de membrana mitocondrial e activa

indirectamente as caspase 9, 3 e 7. A Bcl-2 é uma proteína que impede a acção da Bax e, portanto, tem funções anti-apoptóticas. Assim, a análise da relação entre os níveis de expressão das proteínas Bax e Bcl-2, em conjunto com os resultados da avaliação da morte celular, permite perceber de um modo mais completo a acção dos compostos em estudo.

Protocolo experimental

Para a avaliação da relação entre a expressão de Bax e de Bcl-2, as células foram preparadas como descrito nos procedimentos anteriores para a citometria até ao ponto em que se obtém as células centrifugadas a 300G durante 5 minutos. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 100µL de solução fixante (Immunostep, *Intracell Kit*), homogeneizaram-se no vortéx para incubar durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente.

Posteriormente à incubação adicionaram-se 2mL de PBS, centrifugou-se novamente a 300G durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. De seguida adicionaram-se 100µL de solução permeabilizante (Immunostep, *Intracell Kit*), 3µL de anticorpo contra a Bax marcado com ficoeritrina (Bax-PE (Santa Cruz, sc-20067PE)) e a mesma quantidade de anticorpo contra a Bcl-2 marcado com isotiocianato de fluoresceína (Bcl-2-FITC (Santa Cruz, sc-509FITC)). Agitou-se cada tubo suavemente no vortéx e deixaram-se as células a incubar no escuro e à temperatura ambiente durante 15 minutos. Após este período de incubação com os anticorpos fez-se uma nova lavagem com 2mL de PBS, centrifugou-se a 300G durante 5 minutos, para no fim descartar o sobrenadante e adicionaram-se 400µL de PBS. Por fim, os tubos foram suavemente agitados no vortéx.

A detecção das sondas fluorescentes foi feita com um comprimento de onda de 575 e de 521nm para a Bax-PE e Bcl-2-FITC, respectivamente.

Avaliação da sobrevivência celular - Ensaio clonogénico

O ensaio clonogénico tem como objectivo determinar a sobrevivência celular após um tratamento. Este ensaio tem por base a capacidade de uma única célula

crescer e formar colónias com, no mínimo, 50 células após um determinado período de tempo.

Protocolo experimental

Neste estudo prepararam-se placas de 6 poços com 500.000 células por poço em 3mL de meio de cultura e, após 24 horas de adesão celular, as células foram submetidas a tratamento com uma concentração correspondente ao IC₅₀ dos compostos ASRO-13 e ASRO-17 para as 48h de tratamento. Após as 48h, o meio foi removido por aspiração aspirado e cada poço foi lavado com PBS, as células foram destacadas com tripsina-EDTA, como descrito anteriormente, contadas com azul de tripano e 1000 células de cada condição foram semeadas novamente em novas placas de 6 poços. Foi adicionado novo meio às células e o meio de cultura foi mudado após cinco dias de experiência, sendo que ao décimo segundo dia de cultura as colónias foram visualizadas.

Nesse sentido, o meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas com 2mL de PBS. De seguida, foram adicionados 2mL de metanol (32213, Sigma Aldrich®, EUA) durante 5 minutos para fixar as células, sendo que este procedimento foi repetido duas vezes. Após as placas estarem completamente secas, foram adicionados 2mL do corante violeta de cristal (M-2128, Sigma Aldrich®, EUA) a 0,5% em metanol, durante 5 minutos. De seguida, o corante foi aspirado e as placas foram lavadas em água tépida e deixadas a secar. Posteriormente, contou-se o número de colónias de modo a calcular a eficiência da placa (EP) e o factor de sobrevivência (FS) através das equações 2 e 3:

$$\text{Eficiência da placa (EP)(\%)} = \frac{\text{Número de colónias contadas}}{\text{Número de colónias semeadas}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{Factor de sobrevivência (FS)(\%)} = \frac{\text{EP da placas tratadas}}{\text{EP das placas controlo}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Avaliação da produção de proteínas totais

O ensaio da sulforrodamina B (SRB) foi desenvolvido no sentido de quantificar a produção de proteínas totais nas células para a aplicação em ensaios de citotoxicidade

induzida. A SRB liga-se electrostaticamente aos resíduos básicos das proteínas celulares em ambiente ácido e dissociam-se das proteínas em ambiente básico, podendo ser dissolvida e quantificada. A ligação da SRB é feita estequiometricamente e pode ser directamente relacionada com a massa celular.

Protocolo experimental

Foram preparadas placas de 24 poços, com 0,5mL cada poço, a partir de uma suspensão celular de 80.000 células/mL, reservando poços controlo, com DMSO e com a concentração correspondente ao IC₅₀ respectivo dos compostos ASRO-13 e ASRO-17 para o tratamento de 48h. Após o período de tratamento o meio de cultura foi cuidadosamente aspirado e as células foram lavadas com PBS e depois com água ultrapura. De seguida, foram adicionados a cada poço 200µL de uma solução a 1% de ácido acético (320099, Sigma Aldrich®, EUA) em metanol a -20°C, e deixou-se repousar à temperatura ambiente durante 30 min. No fim do tempo estipulado, a solução anterior foi aspirada e as placas ficaram abertas ao ar para secarem.

A cada poço adicionaram-se 200µL de SRB (S-1402, Sigma Aldrich®, EUA) a 0,4% em 1% ácido acético em metanol, que ficou a incubar à temperatura ambiente e protegido da luz durante pelo menos 1 hora para que ocorresse a ligação da SRB às proteínas. Ao fim do tempo de incubação com SBR as placas foram gentilmente lavadas com água tépida e foram novamente deixadas abertas ao ar para secarem. Por fim adicionaram-se 200µL de uma solução tris-NaOH (T-6066 e S-5881, Sigma Aldrich®, EUA) numa concentração de 10mM, pH=10 e após uma leve agitação os cristais de cor de rosa estavam completamente dissolvidos. Os resultados foram lidos no leitor ELISA com uma absorvância de 540nm, usando um filtro de referência de 690nm.

Análise do perfil proteico das linhas celulares de cancro da mama

Alguns tipos de cancro estão associados à ausência de certas proteínas, à sobre expressão de outras e nalguns casos à existência de proteínas mutadas. Estes tipos de alterações no perfil proteico de determinados cancros podem ser analisados através da técnica de electroforese em gel. Esta técnica é capaz de separar proteínas consoante o ponto isoeléctrico (PI), a carga eléctrica, o peso molecular, afinidade a um substrato assim como pela combinação destes factores.

A técnica mais comum de separação de proteínas é realizada em condições desnaturantes que, na presença de uma diferença de potencial ao longo do gel, separa proteínas através do seu peso molecular. A desnaturação das proteínas é conseguida pela acção de um detergente que também confere carga negativa uniforme às proteínas, o dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*). Deste modo as proteínas com baixo peso molecular migram mais rapidamente ao longo do gel as proteínas com um maior peso molecular migram mais lentamente, ficando então retidas no início do gel de bis-acrilamida. Esta técnica é universalmente conhecida como SDS-PAGE.

Após o SDS-PAGE surgiu o *western blot* (WB), uma técnica que consiste no mesmo tipo de separação de proteínas através do peso molecular, no entanto adicionou-se ao procedimento a ligação de anticorpos específicos para uma proteína de interesse. O procedimento mais utilizado neste método é a ligação de um anticorpo primário contra a proteína de interesse, ao qual se vai ligar um anticorpo secundário que normalmente tem incorporada uma proteína que, na presença do substrato adequado, emite fluorescência, sendo assim possível a detecção e quantificação da proteína de interesse.

Outra técnica mais sofisticada de separação de proteínas é a electroforese em gel a duas dimensões, ou electroforese 2-D, que consiste na separação de proteínas por PI e por peso molecular. A sofisticação da técnica está na separação inicial das

proteínas pelo seu PI, que é realizado num gel com várias gamas de pH ao qual é aplicado um campo eléctrico que força as proteínas a migrarem até uma zona em que o pH é igual ao seu PI, sendo que nessa fase as proteínas se mantêm estacionárias. Após esse passo, as proteínas são separadas pelo seu peso molecular através de um SDS-PAGE convencional. Esta técnica é extremamente útil para obter perfis do proteoma de um dado tecido ou população celular em diferentes condições fisiológicas e patológicas. Deste modo e, ao contrário da técnica do WB, podem-se observar diferenças na expressão de proteínas que até então não se sabiam estar implicadas numa determinada condição patológica, por exemplo.

De um modo geral, todas estas técnicas implicam a extracção eficiente de proteínas de um determinado tecido ou de uma população celular, sem contaminantes como os ácidos nucleicos, sacáridos e lípidos. Após a extracção, a quantificação proteica das amostras é fundamental para que se padronizem os resultados em termos de quantidade de proteína analisada, o que permite uma análise dos resultados mais simples e fidedigna.

Preparação de extractos de proteínas

Como já foi referido acima, para se proceder a análise de proteínas de uma amostra é necessário proceder-se a sua extracção. A extracção referida abaixo tem como objectivo extrair as proteínas de forma rentável, eliminando contaminantes como material genético, lípidos das membranas plasmáticas e organelos celulares, assim como sacarídeos presentes nas células.

Protocolo experimental

Os extractos preparados para as experiências de electroforese a duas dimensões foram preparados após o meio de cultura ser descartado e depois de lavados os frascos de culturas por três vezes com PBS. Aos frascos de cultura lavados adicionou-se ácido tricloroacético (TCA, do inglês *trichloroacetic acid*, T-8657, Sigma Aldrich®, EUA) a 20% (100µL para os frascos de 25cm² e 300 µL para os frascos de 75cm²) e, com o auxílio de raspadores, destacaram-se as células do frasco de cultura e colocou-se a suspensão celular num *eppendorf*®. De seguida sonicou-se cada amostra

10 vezes por um a dois segundos, com intervalos de 1 segundo de sonicação, no aparelho referido anteriormente, a uma amplitude de 35%.

Após as amostras terem sido sonicadas, procedeu-se a precipitação das proteínas com acetona (537748, Sigma Aldrich®, EUA), de modo a purificar a amostra. Assim, adicionou-se a cada amostra o volume quatro vezes superior ao desta de acetona a -20°C, agitou-se em vórtex e incubou-se a amostra a -80°C durante 30 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 14.000G durante 14 minutos e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado para que o *pellet* puro permanecesse no fundo do *ependorfs*®. A precipitação com acetona e posterior centrifugação foi repetida mais duas vezes no sentido de remover o TCA do *pellet*. Após a última centrifugação e decantação do sobrenadante de acetona, os *ependorfs*® ficaram abertos ao ar livre por cerca de 30 minutos para que a acetona evaporasse completamente e para que depois o *pellet* fosse ressuscitado com 200µL tampão de reidratação *ReadyPrep™ 2-D Starter Kit* (Bio-Rad, EUA).

No fim desse procedimento os *ependorfs*® foram agitados brevemente no vórtex e armazenados a -80°C até se proceder a quantificação da amostra.

Quantificação de proteína

Assim como é necessário extrair as proteínas das amostras, é determinante proceder à quantificação das mesmas, uma vez que as experiências de gel-2D requerem que se utilize uma determinada quantidade de proteína.

O *2-D Quant Kit* (GE Healthcare Life Science, SE) é adequado a quantificação de proteínas entre 1 e 50µg e é compatível com detergentes como o SDS e o CHAPS e com agentes como a ureia e a tioureia, apesar do *kit* se basear no método descrito acima para a quantificação de proteínas para o *WB*. A diferença de um para o outro é que neste caso se procede à precipitação das proteínas, deixando os contaminantes como o DTT, a ureia e a tioureia em solução e que serão descartados após uma centrifugação para a retenção do *pellet* contendo as proteínas. Assim as proteínas são ressuscitadas numa solução alcalina.

Gel 2-D

Protocolo experimental

Após a quantificação das amostras, 75µg de proteína dissolvida em 125µL de *ReadyPrep™ 2-D Starter Kit* que foram aplicadas num corredor de suporte da PROTEAN® i12™ IEF Cell devidamente lavado com a solução de limpeza da Bio-Rad e com água milli-Q. Posteriormente retirou-se a película protectora da *strip* da Bio-Rad de 7cm com gradiente de pH de 3-10 e colocou-se a *strip* de acordo com os respectivos pólos eléctricos e com o gel virado para baixo, em contacto com a amostra. De seguida montaram-se os eléctrodos e o suporte no IEF Cell de acordo com o manual e adicionou-se 1,5mL de óleo mineral em contacto com a *strip* para se evitar a cristalização da ureia.

Com o programa de focagem isoeléctrico já seleccionado para cada corredor com amostra, programou-se a rehidratação durante 12 horas, com 50V e a 20°C. Após a rehidratação estar completa, a *strip* deve ter um gel com cerca de 0,5cm contendo a amostra.

Para iniciar a focagem propriamente dita, desmontou-se o suporte do IEF Cell, e os eléctrodos para virar o gel para cima, de modo a realizar uma focagem isoeléctrica *gel side-up*. Acima de cada extremidade do gel foram colocados dois *electrode wicks* humedecidos com água milli-Q e, de seguida, foram montados os eléctrodos novamente, de acordo com o manual do IEF Cell *gel side-up*.

Com o programa de focagem isoeléctrica que foi seleccionado houve um progressivo aumento do potencial e da corrente eléctrica.

Após a focagem isoeléctrica estar completa, as *strips* foram incubadas com 1,5mL de tampão de equilíbrio (50mM de Tris, 30% de glicerol, 2% de SDS e 0,012% e de azul de bromofenol) com 10mg/mL de DTT durante 15 minutos e, posteriormente, em 1,5mL de tampão de equilíbrio com 25mg/mL de iodocetamida durante 15 minutos. Por fim a *strip* foi mergulhada durante 5 a 10 segundos em tampão de electroforese TGS para ser montada na parte superior do gel de poliacrilamida a 10%. As *strips* foram sempre montadas com a película de plástico encostada ao vidro maior

do sistema de electroforese e para selar o gel com a *strip* foi utilizada uma solução de agarose a 0,5% previamente fervida e arrefecida.

Antes de iniciar o SDS-PAGE, foi adicionado um papel absorvente contendo 0,5µL de padrão de proteína (*Precision Plus Standards*, All blue, Bio-Rad, EUA). A corrida foi realizada em tampão de electroforese TGS (Tris 25mM, glicina 192mM, 0.1% SDS, pH 8.3, Bio-Rad, EUA). O gel foi submetido a um potencial constante de 80V durante 20 minutos, num primeiro passo, e no segundo passo foram aplicados 150V durante 1,5 horas.

Após o SDS-PAGE ter terminado, iniciou-se a detecção de proteínas através da coloração com prata, que segue um procedimento de lavagens sucessivas com várias soluções em agitação leve, sendo que a primeira é com uma solução de 25% metanol e 5% de ácido acético durante toda a noite. Após a fixação das proteínas com a solução anterior, descartou-se a mesma e adicionou-se uma solução de 50% de etanol durante 10 minutos. Descartou-se novamente a solução anterior e adicionou-se uma solução de 30% de etanol, também por 10 minutos.

De seguida, substituiu-se a solução anterior por outra com 0,2g/L de tiosulfato de sódio, deixando esta actuar durante um minuto. Após o passo anterior realizaram-se 3 lavagens do gel com água Milli-Q durante 10 minutos cada. Após as lavagens adicionou-se uma solução de 2,0g/L de nitrato de prata durante 20 minutos e, por fim, substituiu-se a solução anterior por outra com 30g/L de carbonato de sódio anidro, 10 mg/L de tiosulfato de sódio e 0,07% de formaldeído 37% que ficou a actuar até o surgimento de *spots* de proteínas.

No fim, e para parar a reacção de revelação, descartou-se a solução anterior e adicionou-se uma solução com 50g/L de Trisima Base em 2,5% de ácido acético durante 1 minuto. De seguida realizaram-se mais 3 lavagens com água Milli-Q para retirar os resíduos químicos em excesso para que fosse seguro digitalizar os géis.

Análise da extensão de danos no DNA

Ensaio cometa

A electroforese em microgel de agarose ou ensaio cometa, como é mais conhecido devido a aparência do DNA de células individuais, permite avaliar danos nas cadeias do DNA.

No ensaio cometa as células saudáveis e sem danos no seu DNA formam uma esfera densa e compacta sem arrastamento de fragmentos, enquanto células cujo DNA esteja danificado com quebras ao longo das cadeias formam uma cauda menos intensa que o núcleo (que se assemelha a um cometa, daí o nome do ensaio) ao ser aplicada uma diferença de potencial, onde os fragmentos negativamente carregados migram para o ânodo durante a electroforese. Neste ensaio, o tamanho e forma da cauda reflectem a extensão dos danos causados.

Uma das variantes do ensaio cometa original, a alcalina, permite detectar uma combinação de danos em apenas uma das cadeias do DNA (SSB, do inglês *single strand breaks*), danos em ambas as cadeias (DSB, do inglês *double-strand breaks*) e ainda locais lábeis alcalinos, que são o resultado de danos causados pela alquilação de bases do DNA ou dos seus grupos fosfato, respectivamente. Assim, este método permite visualizar todos os tipos de danos que o DNA pode ter sofrido, numa única experiência.

Através deste ensaio também se pode observar a heterogeneidade de uma amostra e perceber se há células resistentes ao tratamento aplicado, pois ao analisar uma amostra de grandes dimensões é possível distinguir se esta é afectada de igual modo ou não pelo tratamento. No caso da existência de células resistentes observam-se células com o seu DNA intacto numa amostra com células cujo DNA está muito danificado.

Protocolo experimental

As culturas celulares foram submetidas ao tratamento com os compostos a concentração correspondente ao IC₅₀, excepto nas células de controlo, as quais não sofreram a adição de qualquer composto ou solvente. Após a conclusão do tratamento

retirou-se o meio de cultura para tubos devidamente identificados, procedeu-se a uma lavagem com PBS, o qual depois de recolhido foi adicionado aos tubos do meio. Posteriormente foi adicionada uma solução de tripsina-EDTA para as células se destacarem dos frascos de cultura. Após as células estarem em suspensão, a tripsina foi inactivada com o meio de cultura e as células foram centrifugadas e adicionadas aos meios de cultura e PBS anteriormente reservados. A suspensão celular foi centrifugada a 300G durante 5 minutos e depois ressuspendidas em PBS de modo a preparar uma suspensão celular com 50.000 células/mL.

O controlo positivo foi preparado a partir da cultura celular controlo as quais não foi adicionado qualquer composto ou solvente. Com este propósito, as células, numa concentração de 50.000/mL foram expostas a 20nM de uma solução de peróxido de hidrogénio, durante 15 minutos a -4°C. Após esse período, as células foram centrifugadas a 300G por 5 minutos e ressuspendidas em PBS num volume igual ao inicial, para que as células se mantivessem na concentração de 50.000/mL.

Lâminas de vidro StarFrost® (26x76mm) foram previamente cobertas com uma fina camada de agarose de ponto de fusão normal (APFN) a 1% (A-2790, Sigma Aldrich®, EUA) em apenas um dos lados e esperou-se que a agarose solidificasse. Posteriormente preparou-se uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (ABPF) a 1% (A-9414, Sigma Aldrich®, EUA) e num *eppendorf*® adicionaram-se iguais proporções da suspensão celular previamente preparada e da agarose ABPF, agitou-se e espalhou-se 1 mL sobre as lâminas pré-cobertas com APFN. Seguidamente cobriu-se a suspensão celular já nas lâminas com uma lamela, deixou-se arrefecer a 4°C e após 30 minutos retirou-se a lamela da agarose.

As lâminas previamente preparadas foram incubadas durante a noite na solução de lise alcalina a 4°C, preparada de fresco, que contém 2,5M de NaCl, 100mM de EDTA, 10mM de Tris, 10% de DMSO e 1% de Triton X-100. Posteriormente as lâminas foram submersas em tampão de electroforese, preparado de fresco, com 300mM de NaOH e 1mM EDTA com o pH>13, e deixou-se durante pelo menos uma hora em equilíbrio.

A electroforese foi realizada num único passo de 15 minutos com uma diferença de potencial de 25V e com corrente de 1A. Terminada a electroforese, as lâminas foram embebidas em solução de neutralização de 0,4M de Tris durante 5 minutos, para depois descartar a solução de neutralização. Este passo foi repetido 3 vezes.

Com o auxílio de uma pipeta, dispensaram-se algumas gotas de brometo de etídio (Bio-Rad) a 25µg/mL sobre as lâminas neutralizadas que ficaram abrigadas da luz durante 20 minutos à temperatura ambiente. Ao fim dos 20 minutos as lâminas foram novamente lavadas em água ultrapura para remover o excesso de brometo de etídio.

A análise e aquisição de imagens foram feitas num microscópio de fluorescência invertido com uma ampliação de 250X e com o filtro de excitação a 546nm com uma lâmpada de mercúrio de 100W, sendo que a emissão de fluorescência é monitorizada a 580nm no reflector com um filtro a 590nm.

A análise dos cometas foi feita com o auxílio do software Motic Images versão 2.0 (Microscope World, EUA).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM® SPSS® v. 20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA). A avaliação da normalidade de distribuição das variáveis quantitativas foi feita de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. Foram utilizados testes paramétricos no caso de se verificar uma distribuição normal e testes não paramétricos no caso contrário.

Na análise de proliferação celular segundo o método de MTT, os valores experimentais obtidos foram ajustados a um modelo sigmoidal de dose-resposta, equação 4, utilizando o *software* OriginLab v. 8.0 (Eq. 4):

$$Proliferação (\%) = \frac{100}{1+10^{p \cdot (\log x_0 - x)}} \quad (\text{Eq.4})$$

onde x_0 corresponde ao valor que inibe a proliferação a 50%, ou seja, o IC₅₀. A comparação dos valores obtidos entre diferentes condições terapêuticas dentro da mesma linha celular e entre linhas celulares para a mesma condição terapêutica foi realizada segundo o teste ANOVA de um factor, com comparações múltiplas de acordo com a correcção de Bonferroni.

Na avaliação de tipo de morte celular, ciclo celular e razão Bax/Bcl-2 a comparação entre diferentes condições terapêuticas para cada linha celular foi efectuada realizando o teste ANOVA de um factor, no caso de existir normalidade da distribuição e homogeneidade das variâncias, ou o teste de Kruskal-Wallis em caso contrário. As comparações múltiplas seguiram a correcção de Bonferroni.

Na comparação entre condições terapêuticas de capacidade clonogénica e de SRB, a comparação com o controlo foi realizada segundo o teste t de Student para uma média, enquanto que nas comparações entre as restantes condições foi utilizado o teste ANOVA de um factor ou o teste de Kruskal-Wallis (selecção do teste segundo os critérios anteriores). As comparações múltiplas foram obtidas segundo a correcção de Bonferroni.

Considerou-se uma significância de 0,05 para todas as comparações.

Resultados¹

¹ Os resultados apresentados ao longo deste capítulo foram obtidos em co-autoria com a Mestre Mafalda Laranjo.

Os métodos referidos no capítulo anterior foram utilizados com o objectivo de estudar o efeito dos compostos ASRO-13, ASRO-15, ASRO-17, MIS1707, MIS1786 e MIS1787 nas linhas celulares humanas de cancro da mama, MCF7, HCC1954 e HCC1806, assim como para compreender alguns dos mecanismos de actuação celulares.

Também se avaliou o efeito da combinação de tratamentos com os compostos ASRO-13 e ASRO-17 com o inibidor das PARP PJ34.

Estudos de citotoxicidade

Avaliação da actividade metabólica – Ensaio do MTT

Terapia única

As percentagens de proliferação celular permitiram traçar curvas de dose-resposta que foram úteis para calcular o IC_{50} para cada condição estudada. Abaixo, na Figura 11, encontram-se os gráficos com as respectivas curvas de dose-resposta para os compostos ASRO-13, ASRO-15, ASRO-17, MIS1707, MIS1786 e MIS1787, para os tempos de incubação de 24h, 48h, 72h e 96h na linha celular MCF7. Nas Figuras 12 e 13 encontram-se os gráficos e respectivas curvas de dose-resposta para as mesmas condições nas linhas celulares HCC1954 e HCC1806.

No geral, verifica-se uma diminuição da actividade metabólica celular à medida que o tempo de incubação aumenta de 24h para 96h, para uma mesma concentração. Do mesmo modo, a diminuição da actividade metabólica correlaciona-se também com o aumento da concentração dos compostos. Porém, a comparação dos valores de IC_{50} permite a avaliação mais simples da inibição da proliferação entre condições.

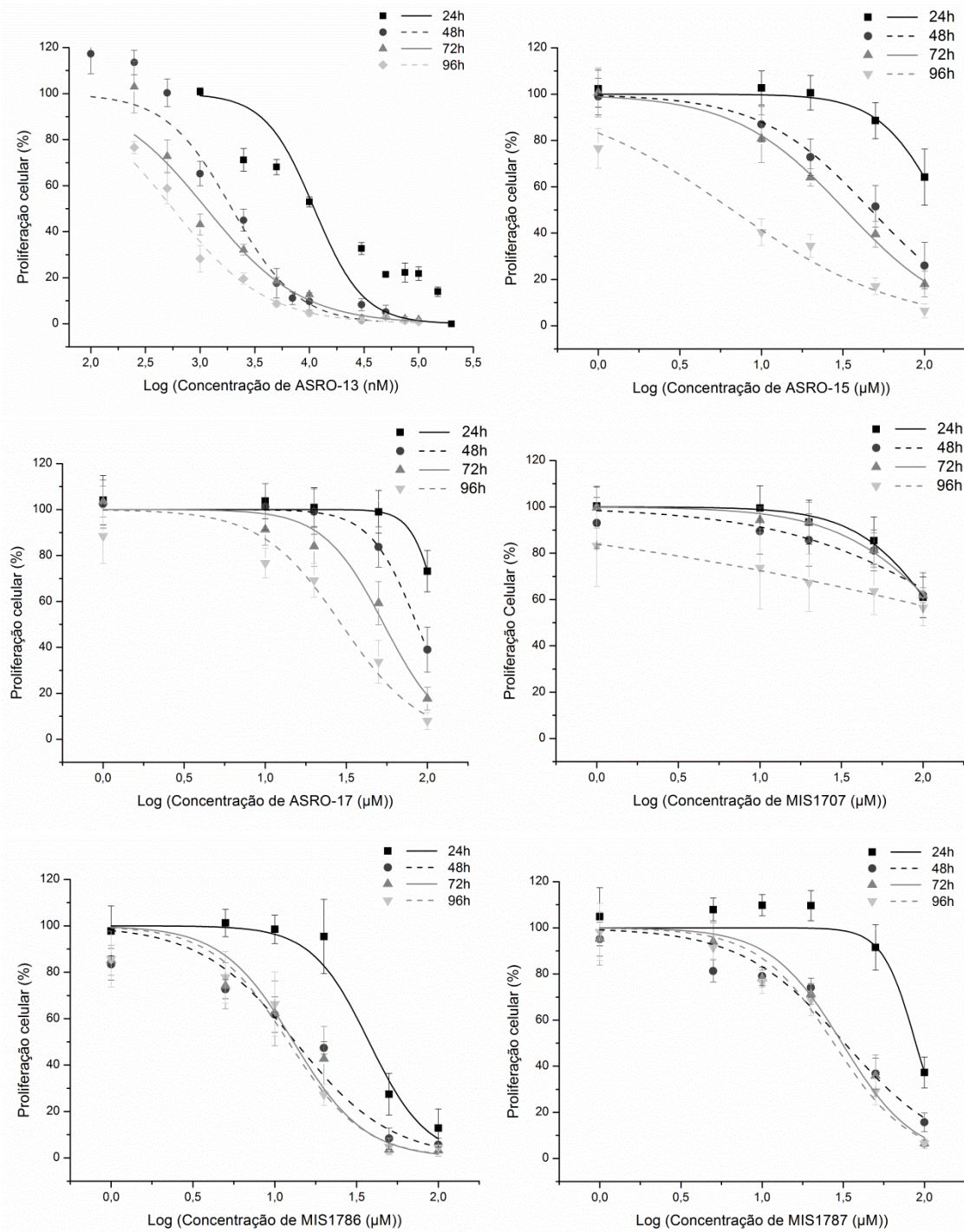


Figura 11 - Gráficos ilustrativos da proliferação celular da linha MCF7 (em %) após incubação com os compostos ASRO-13, ASRO-15, ASRO-17, MIS1707, MIS1786 e MIS1787 durante 24, 48, 72 e 96h. As barras verticais representam o desvio-padrão em cada ponto experimental (em %). Cada ponto do ensaio experimental representa um n≥6 obtido em pelo menos 3 ensaios independentes.

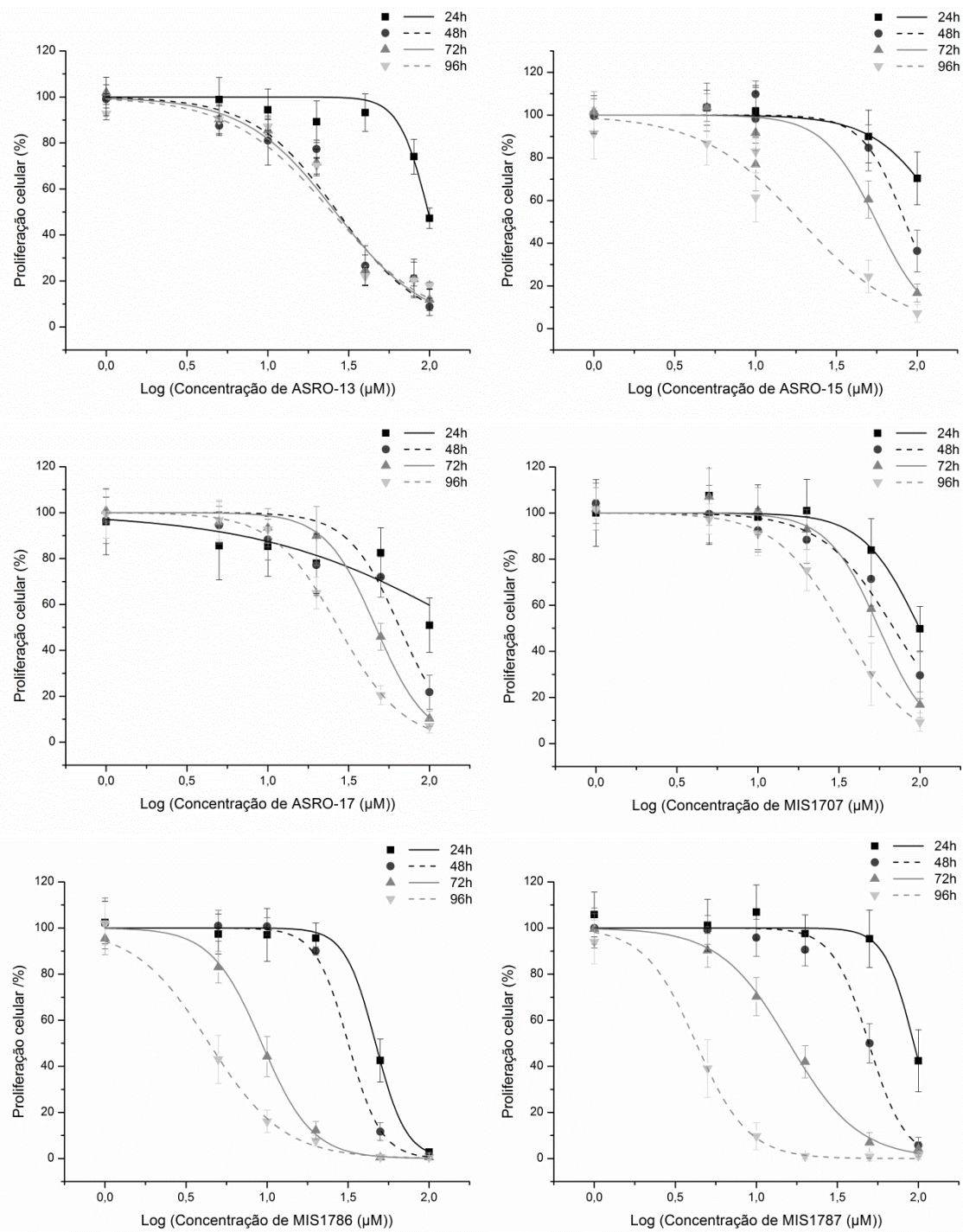


Figura 12 - Gráficos ilustrativos da proliferação celular da linha HCC1954 (em %) após incubação com os compostos ASRO-13, ASRO-15, ASRO-17, MIS1707, MIS1786 e MIS1787 durante 24, 48, 72 e 96h. As barras verticais representam o desvio-padrão em cada ponto experimental (em %). Cada ponto do ensaio experimental representa um $n \geq 6$ obtido em pelo menos 3 ensaios independentes.

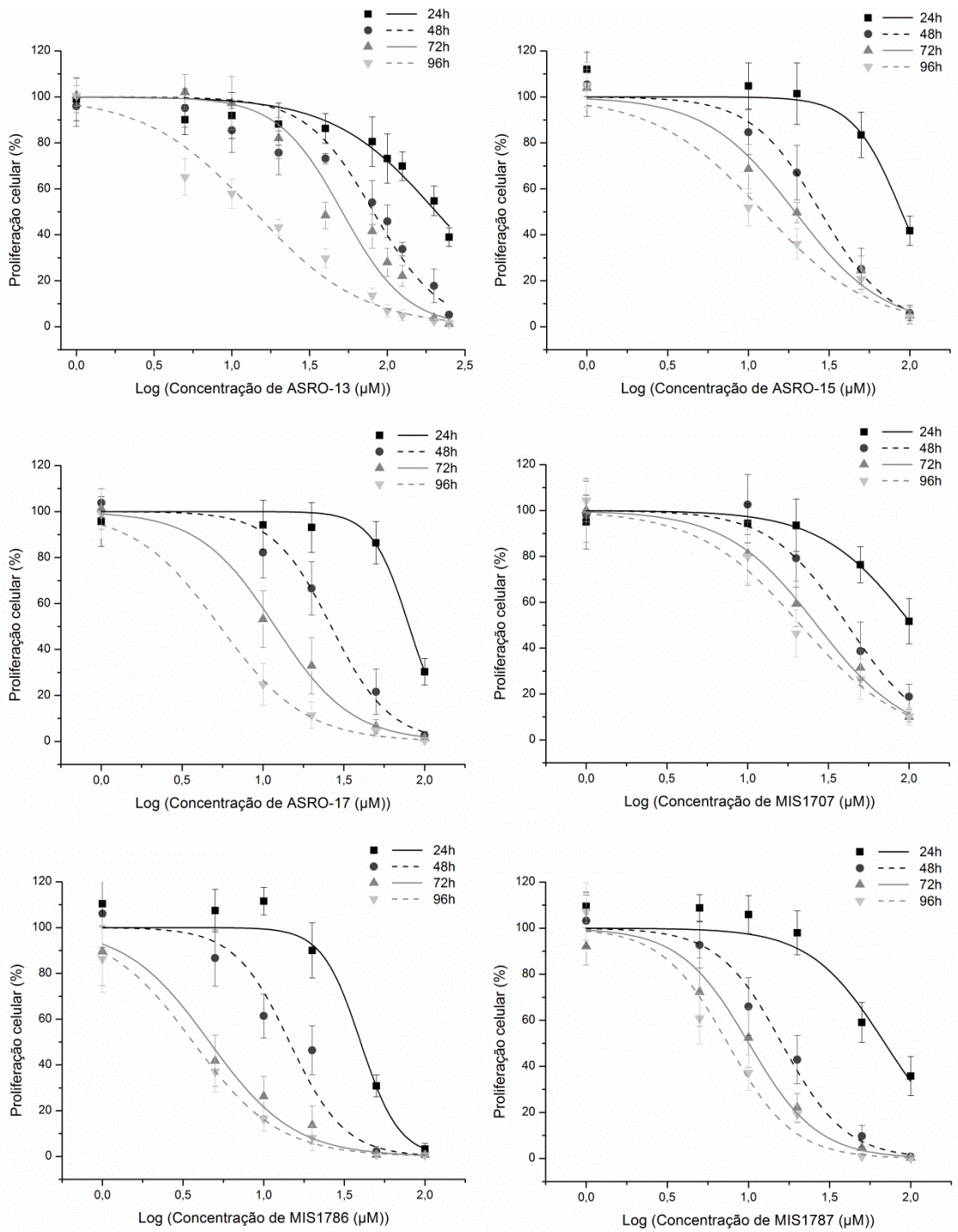


Figura 13 - Gráficos ilustrativos da proliferação celular da linha HCC1806 (em %) após incubação com os compostos ASRO-13, ASRO-15, ASRO-17, MIS1707, MIS1786 e MIS1787 durante 24, 48, 72 e 96h. As barras verticais representam o desvio-padrão em cada ponto experimental (em %). Cada ponto do ensaio experimental representa um n≥6 obtido em pelo menos 3 ensaios independentes.

A tabela 2 resume os valores de IC₅₀ obtidos para os compostos em estudo, para cada tempo de incubação em cada uma das três linhas celulares estudadas, assim como o respectivo intervalo de confiança de 95% calculado pelo teste *t-student*.

Tabela 2 - IC₅₀ dos compostos ASRO-13, ASRO-15, ASRO-17, MIS1707, MIS1786 e MIS1787 para os tempos de incubação de 24h, 48h, 72h, e 96h nas linhas celulares MCF7, HCC1954 e HCC1806. Os resultados do IC₅₀ e intervalos de confiança estão expressos em µM. Para o cálculo do IC₅₀ foram utilizados n≥6 obtido em pelo menos 3 experiências independentes. O R² das curvas de dose-resposta ajustada aos pontos experimentais com assíntotas fixas em 0 e 100, a partir das quais se calcularam os IC₅₀, é igual ou superior a 0,90, à exceção do IC₅₀ do composto ASRO-13 às 24h na linha celular MCF7 (R² > 0,7).

	ASRO-13	ASRO-15	ASRO-17	MIS1707	MIS1786	MIS1787
MCF7	24h 11,1 [4,47; 27,46]	>100	>100	>100	37,7 [27,67;51,38]	88,5 [75,23; 104,2]
	48h 1,9 [1,26; 2,29]	46,9 [39,90; 53,19]	86,2 [82,66; 89,07]	>100	13,4 [7,99; 17,92]	32,2 [23,13; 38,97]
	72h 1,1 [0,79; 1,31]	32,7 [28,01; 36,91]	53,9 [42,07; 65,45]	>100	13,0 [7,86; 17,41]	31,1 [21,84; 38,10]
	96h 0,6 [0,42; 0,63]	6,6 [2,97; 12,40]	29,5 [18,33; 42,74]	>100	12,1 [8,51; 14,85]	27,6 [20,86; 32,49]
HCC1954	24h 98,2 [90,88; 106,1]	>100	>100	99,5 [90,67; 109,2]	46,8 [44,62; 49,00]	93,8 [86,27; 102,0]
	48h 27,0 [19,41; 30,46]	84,4 [75,27; 90,09]	65,6 [47,99; 78,42]	69,0 [54,40; 79,01]	31,7 [28,45; 33,75]	49,5 [45,55; 51,91]
	72h 26,2 [19,03; 29,41]	56,0 [38,48; 69,55]	46,6 [42,31; 49,33]	55,9 [49,56; 59,90]	9,3 [8,13; 10,01]	15,9 [13,27; 17,70]
	96h 24,9 [16,04;29,21]	33,4 [12,72; 24,24]	27,4 [25,10; 28,75]	22,4 [30,50; 35,27]	4,4 [3,47; 5,02]	4,3 [3,39; 4,85]
HCC1806	24h >100	89,0 [72,87; 108,7]	80,3 [69,56; 92,78]	>100	39,9 [32,16; 49,48]	69,4 [51,95; 92,77]
	48h 73,7 [63,67; 89,01]	28,0 [23,29; 32,31]	26,4 [19,71; 33,26]	41,7 [32,58; 50,58]	14,5 [9,63; 18,26]	16,0 [12,55; 18,47]
	72h 51,3 [37,07;57,66]	19,4 [12,83; 26,89]	11,9 [9,04; 14,75]	26,9 [21,88; 31,60]	4,6 [2,95; 5,98]	10,0 [7,79; 11,64]
	96h 13,5 [10,17; 15,61]	12,3 [6,79; 19,87]	5,4 [3,17; 8,23]	21,3 [15,12; 27,89]	3,6 [2,85; 4,20]	7,4 [5,07; 9,29]

O composto que apresenta maior efeito anti proliferativo na linha celular MCF7 é o ASRO-13. O seu IC₅₀ diminui de 11,1µM às 24h para um valor abaixo de 0,6µM às 96h. Esta redução da proliferação celular ao longo do tempo tem significado estatístico das 24h para as 48h ($p=0,005$) e das 72h para 96h ($p=0,017$). Pelo contrário, entre os compostos estudados, o composto MIS1707 é o que apresenta menor actividade na linha celular MCF7, não tendo sido possível obter o IC₅₀ no intervalo de concentrações estudadas, até 100µM, mesmo após 96h de incubação.

Os compostos MIS1786 e MIS1787 na LC-RE⁺, a linha celular MCF7, têm IC₅₀ abaixo de 15 e 30µM, respectivamente, às 48h de incubação, valores significativamente menores que às 24h (MIS1786: $p=0,006$; MIS1787: $p<0,001$). Porém, esta significância não se mantém ao longo do tempo (48h vs. 72h e 72h vs. 96h).

Ainda na LC-RE⁺, MCF7, os valores de IC₅₀ dos compostos ASRO-15 e ASRO-17 diminuem significativamente a medida que se aumenta o período de incubação com os mesmos (24h vs. 48h: $p<0,001$; $p=0,009$ e $0,004$ para ASRO-15 e ASRO-17, respectivamente; 72h vs. 96h: $p=0,003$ e $p=0,050$ para ASRO-15 e ASRO-17, respectivamente).

A proliferação da LC-HER2⁺, HCC1954, é pouco afectada por qualquer um dos compostos às 24h de incubação. No entanto, os compostos têm um efeito anti proliferativo significativamente maior relativamente às 48h do que às 24h (ASRO-13, ASRO-15, ASRO-17, MIS1786 e MIS1787: $p<0,001$ e MIS1707: $p=0,017$).

Na LC-HER2⁺, HCC1954, o composto ASRO-13 tem um IC₅₀ abaixo dos 30µM após 48h de incubação, no entanto, esse valor mantém-se sensivelmente constante até às 96h. Os compostos ASRO-15, ASRO-17 e MIS1707 são os que têm menos efeito na proliferação da LC-HER2⁺, HCC1954, contudo o IC₅₀ às 72h é significativamente mais baixo que às 24h ($p<0,001$).

Os compostos MIS1786 e MIS1797 são os que mais influenciam a taxa metabólica da LC-HER2⁺, HCC1954, como se pode observar pelos valores da tabela 1, sendo que a medida que o tempo de incubação aumenta, os valores do IC₅₀ são significativamente mais baixos ($p<0,001$).

O composto ASRO-13 é o que tem os valores de IC₅₀ relativamente mais altos nesta linha celular, no entanto, observa-se uma redução do IC₅₀ significativa ao longo de todos os períodos de incubação ($p < 0,001$), excepto 48h vs. 72h. O composto ASRO-15 tem um valor de IC₅₀ mais baixo às 48h do que às 24h ($p < 0,001$), no entanto essa tendência não se mantém significativa às 72h comparativamente às 48h, nem às 96h comparativamente às 72h.

O efeito anti proliferativo do composto ASRO-17 na LC-TN, a linha celular HCC1806, também aumenta ao longo dos vários períodos de incubação, e mantém o significado estatístico ao longo dos vários tempos de incubação ($p < 0,001$ IC₅₀ às 48h relativo às 24h; $p = 0,003$ IC₅₀ às 72h relativo às 48h e $p = 0,025$ IC₅₀ às 96 relativo às 72h). O MIS1707 tem IC₅₀ significativamente mais baixo às 72h de incubação, relativamente às 48h ($p = 0,02$), no entanto, o valor de IC₅₀ às 96h é alto relativamente aos outros compostos e perde significado estatístico quando comparado ao IC₅₀ às 72h.

Os compostos MIS1786 e MIS1787 são os que afectam mais a actividade metabólica da LC-TN, HCC1806, como se pode observar pelos baixos valores de IC₅₀ na tabela 1. Há diferenças significativas entre os valores de IC₅₀ às 24h comparativamente às 48h ($p = 0,001$ para MIS1786 e $p < 0,001$ para MIS1787) e às 48h relativamente às 72h ($p = 0,003$ para MIS1786 e $p = 0,028$ para MIS1786).

Terapia combinada com PJ34

Na Figura 14 estão apresentadas as curvas de dose-resposta ao tratamento com o PJ34 na LC-RE⁺, MCF7, (Figura 14, A) e LC-TN, HCC1806, (Figura 14, B).

Como se pode observar pelos gráficos e para o intervalo de concentrações testadas, o PJ34 inibe a proliferação da LC-RE⁺, MCF7, em mais de 50% apenas às 96 de incubação. Na LC-TN, HCC1806, esse efeito é conseguido às 72h, no entanto, a diminuição do valor de IC₅₀ após 96h não tem diferença estatística em relação às 72h.

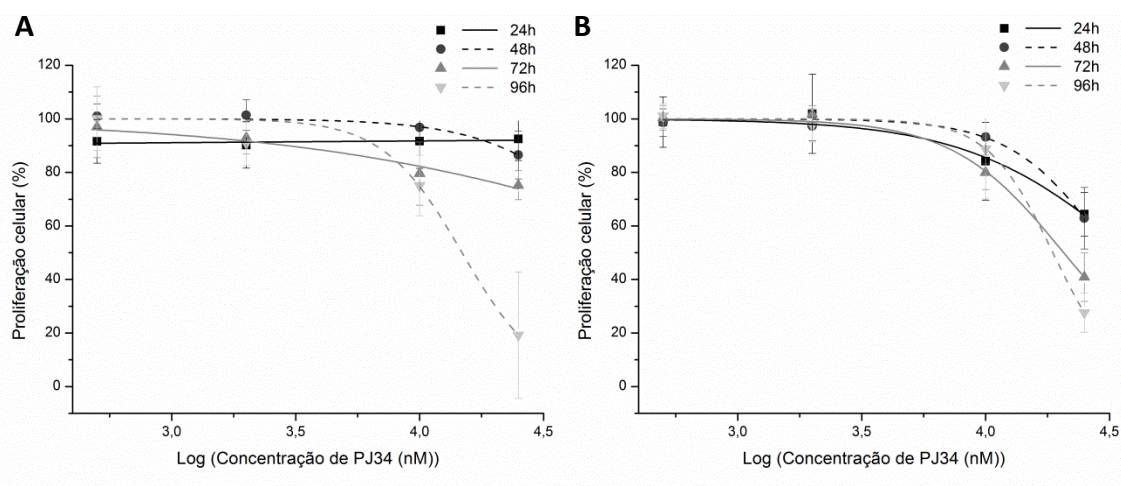


Figura 14 - Gráficos ilustrativos da proliferação celular da linha MCF7 (A) e HCC1806 (B) (em %) após incubação com o PJ34 durante 24, 48, 72 e 96h. As barras verticais representam o desvio-padrão em cada ponto experimental (em %). Cada ponto do ensaio experimental representa um $n \geq 4$ obtido em pelo menos 2 ensaios independentes.

Os gráficos apresentados nas Figuras 15 e 16 correspondem a terapia combinada dos compostos ASRO-13 e ASRO-17 com o PJ34 na LC-RE⁺, MCF7, e LC-TN, HCC1806, respectivamente, após 24h, 48h, 72h e 96h de incubação.

Na LC-RE⁺, MCF7, a terapia combinada do PJ34 com concentrações abaixo de 15 μ M do ASRO-13 inibe a proliferação em 50% a partir das 48h de incubação, Figura 15. A combinação do ASRO-17 com o PJ34 inibe a proliferação celular em pelo menos 50% após as 24h de incubação para as concentrações estudadas.

Pode-se observar no gráfico da Figura 16 que a terapia combinada dos compostos ASRO-13 e ASRO-17 induzem também uma diminuição da proliferação celular que é dependente do tempo de incubação.

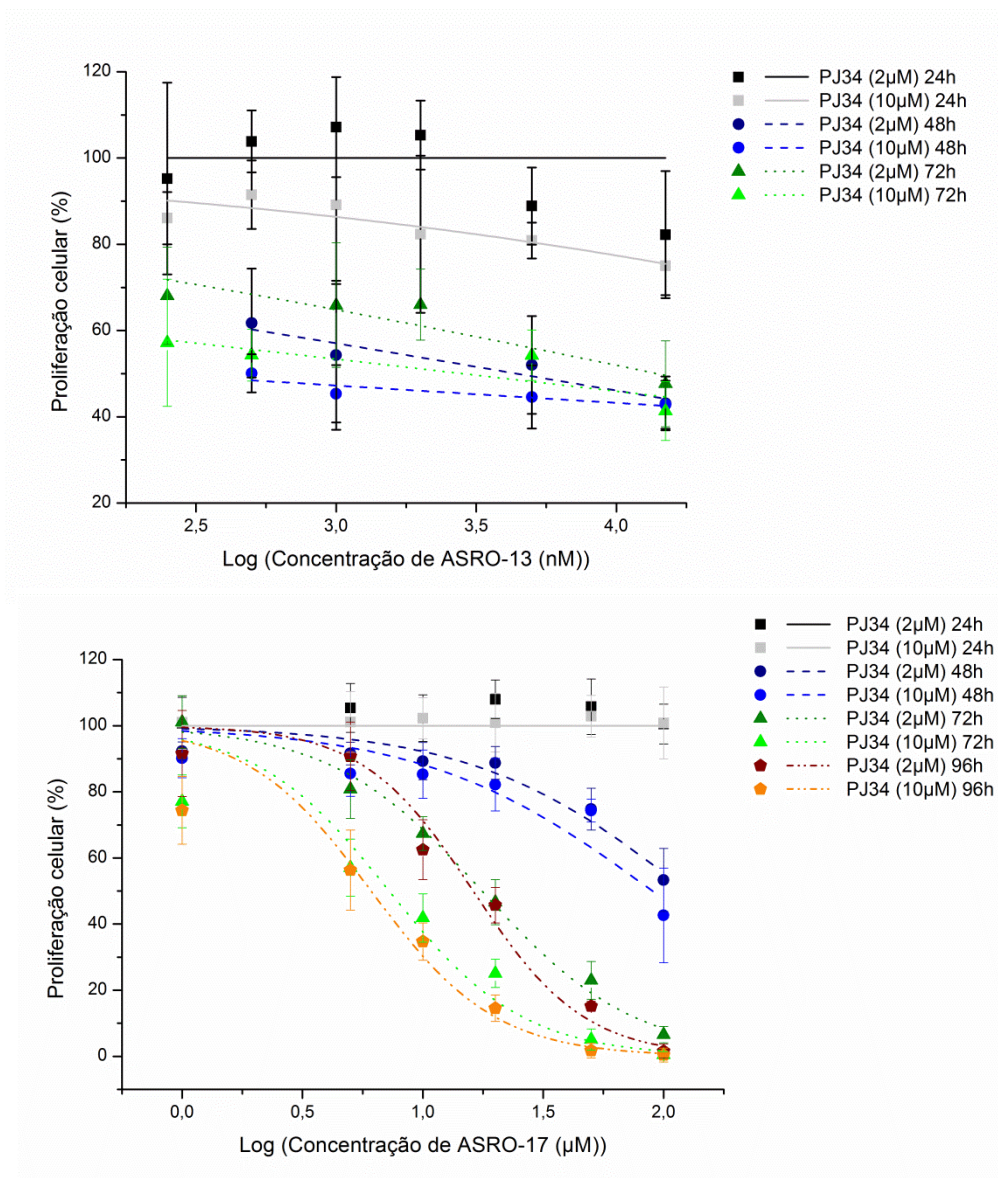


Figura 15 - Gráficos ilustrativos da proliferação celular da linha MCF7 (em %) após incubação com o ASRO-17 em combinação com PJ34 nas concentrações de 2 e 10µM durante 24, 48, 72 e 96h. As barras verticais representam o desvio-padrão em cada ponto experimental (em %). Cada ponto do ensaio experimental representa um n≥5 obtido em pelo menos 2 ensaios independentes.

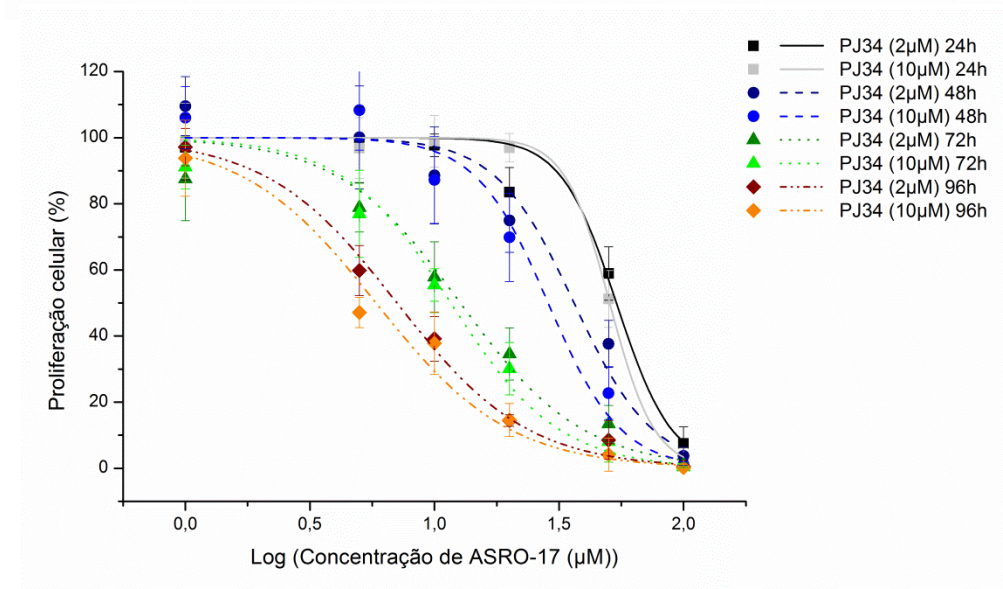
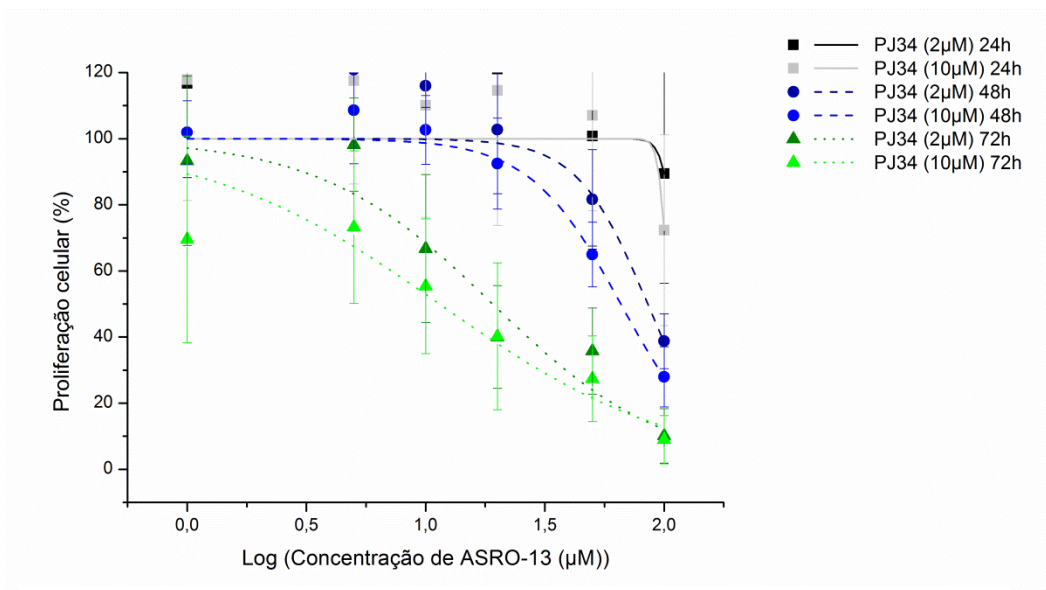


Figura 16 - Gráficos ilustrativos da proliferação celular da linha HCC1806 (em %) após incubação com o ASRO-17 em combinação com PJ34 nas concentrações de 2 e 10 μ M durante 24, 48, 72 e 96h. As barras verticais representam o desvio-padrão em cada ponto experimental (em %). Cada ponto do ensaio experimental representa um n \geq 5 obtido em pelo menos 2 ensaios independentes.

Na tabela 3 estão indicados os valores de IC₅₀ da terapia combinada para as 24, 48, 72 e 96h.

Tabela 3 -- IC₅₀ do inibidor das PARP, PJ34, e da terapia combinada deste com os compostos ASRO-13 e ASRO-17 para os tempos de incubação de 24h, 48h, 72h, e 96h nas linhas celulares MCF7 e HCC1806. Os resultados do IC₅₀ e intervalos de confiança estão expressos em μM . Para o cálculo dos IC₅₀ apresentados foram utilizados $n \geq 4$ e realizados pelo menos 2 ensaios independentes para cada ponto do ensaio experimental. O R² das curvas de dose-resposta ajustada aos pontos experimentais, com assíntotas fixas em 0 e 100, é igual ou superior a 0,90, à exceção do IC₅₀ da combinação do PJ34 com o composto ASRO-13 às 48h e 72h na linha celular MCF7 (PJ34 (2 μM) R² > 0,80; PJ34 (10 μM) R² > 0,55).

	PJ34	PJ34 2 μM ASRO-13	PJ34 10 μM ASRO-13	PJ34 2 μM ASRO-17	PJ34 10 μM ASRO-17	
MCF7	24h	>25	>100	>100	>100	
	48h	>25	4,41 [1,08; 83,07]	0,21 [0,002; >100]	>100	90,0 [61,36; 132,0]
	72h	>25	13,99 [0,93; >100]	2,83 [0,09; >100]	17,6 [15,56; 19,99]	7,3 [5,20; 10,12]
	96h	14,8 [8,07; 27,25]	-	-	16,2 [13,23; 19,81]	6,1 [4,58; 8,12]
HCC1806	24h	>25	>100	>100	53,7 [45,53; 59,04]	50,5 [48,85; 51,42]
	48h	>25	85,4 [58,67; 105,8]	65,9 [57,65; 71,07]	36,3 [25,74; 44,29]	28,6 [20,66; 34,46]
	72h	20,7 [18,52; 23,04]	19,1 [9,98; 31,74]	11,4 [4,70; 22,88]	12,7 [8,61; 15,87]	11,6 [8,38; 14,04]
	96h	18,7 [17,23; 20,25]	-	-	7,1 [5,00; 8,64]	5,8 [3,73; 7,54]

A análise estatística comparativa foi feita tendo em consideração as monoterapias *versus* a respectiva terapia combinada, ou seja, terapia com os compostos ASRO-13 ou ASRO-17 vs ASRO-13 ou ASRO-17 em combinação com o PJ34.

Na LC-RE⁺, MCF7, o valor de IC₅₀ da terapia combinada do ASRO-13 com 10 μM de PJ34 é significativamente mais baixo do que o IC₅₀ da monoterapia ($p=0,015$). No entanto, às 72h de incubação, o aumento do valor de IC₅₀ do ASRO-13 com 2 μM de PJ34 é significativo relativamente à monoterapia ($p<0,001$).

Não se verificam diferenças significativas entre a terapia combinada do ASRO-17 em relação à monoterapia, nem quando são comparadas as duas concentrações utilizadas de PJ34 na terapia combinada ($p>0,05$).

Na LC-TN, HCC1806, a terapia combinada do composto ASRO-13 foi significativamente superior às 72h (PJ34 2 μ M: $p=0,031$; PJ34 10 μ M: $p=0,012$). Por outro lado, o composto ASRO-17 em terapia combinada é significativamente superior à monoterapia às 24h de incubação (PJ34 2 μ M: $p=0,005$; PJ34 10 μ M: $p<0,001$).

Avaliação da viabilidade e vias de morte celular

O estudo mais completo na LC-RE⁺, MCF7, e LC-TN, HCC1806, com os compostos ASRO-13 e ASRO-17 constituiu em administrar as concentrações referentes ao IC₅₀ de cada composto nas respectivas linhas celulares e analisar os resultados após 48h, como descrito no capítulo dos materiais e métodos.

Nos gráficos das Figura 17 estão representadas as populações celulares vivas, em apoptose inicial, em apoptose tardia e em necrose após tratamento com os compostos ASRO-13 e ASRO-17 na LC-RE⁺, MCF7, (Figura 17, A) e LC-TN, HCC1806, (Figura 17, B).

O tratamento da LC-RE⁺, MCF7, com o composto ASRO-13 diminuiu de modo significativo a população de células vivas em relação ao controlo ($p=0,015$) e aumenta significativamente as populações de células em apoptose tardia/necrose ($p=0,048$) e necrose ($p=0,001$). O tratamento com o ASRO-17 diminuiu significativamente a percentagem de células vivas ($p<0,001$) e aumenta as populações de células em morte por apoptose ($p=0,001$), apoptose tardia/necrose ($p<0,001$) e necrose ($p=0,006$), relativamente ao controlo.

Na LC-TN, HCC1806, verifica-se que o tratamento com o composto ASRO-13 induz redução da população de células vivas em cerca de 50% ($p<0,001$) e aumento das populações em apoptose tardia/necrose e necrose ao controlo ($p<0,001$). O composto ASRO-17 produz efeito similar, com redução da população de células vivas ($p=0,022$) e aumento das populações em apoptose tardia/necrose ($p=0,011$) e em necrose ($p=0,019$), como se pode ver na Figura 17.

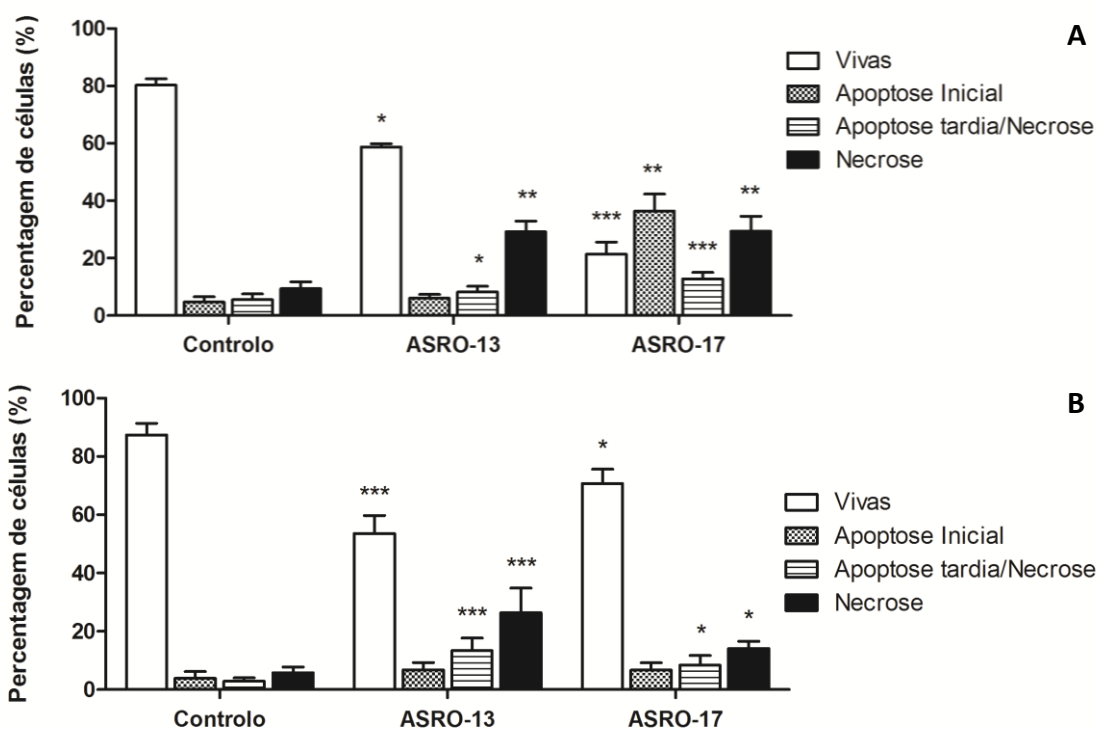


Figura 17 - Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo com a dupla marcação An-V/IP. Os resultados estão representados em percentagem de células viáveis, em apoptose, em apoptose tardia/necrose e necrose, após o tratamento de 48h na linha celular MCF7 (A) e HCC1806 (B) com ASRO-13 ou ASRO-17. Os resultados expressam a média e desvio padrão de pelo menos 5 ensaios ($n \geq 5$) realizados em 2 experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. Apenas um * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$.

Avaliação do ciclo celular

Os gráficos da Figura 18 apresentam as percentagens de células nas fases pré-G0, G0/G1, S ou G2/M, na LC-RE⁺, MCF7, (Figura 18, A) e LC-TN, HCC1806, (Figura 18, B), submetidas ao tratamento com os compostos ASRO-13 e ASRO-17.

O ciclo celular da LC-RE⁺, MCF7, é afectado pelo composto ASRO-13 e observa-se uma diminuição significativa das fases G0/G1 ($p < 0,001$) para dar lugar ao aumento das populações de células nas fases S ($p < 0,001$) e G2/M ($p = 0,001$). O composto ASRO-17, também diminui significativamente a população de células na fase G0/G1 ($p < 0,001$) e aumenta a população de células na fase S ($p < 0,001$), relativamente ao controlo, indicando que nestas condições ocorre paragem do ciclo celular preferencialmente na fase de síntese de DNA.

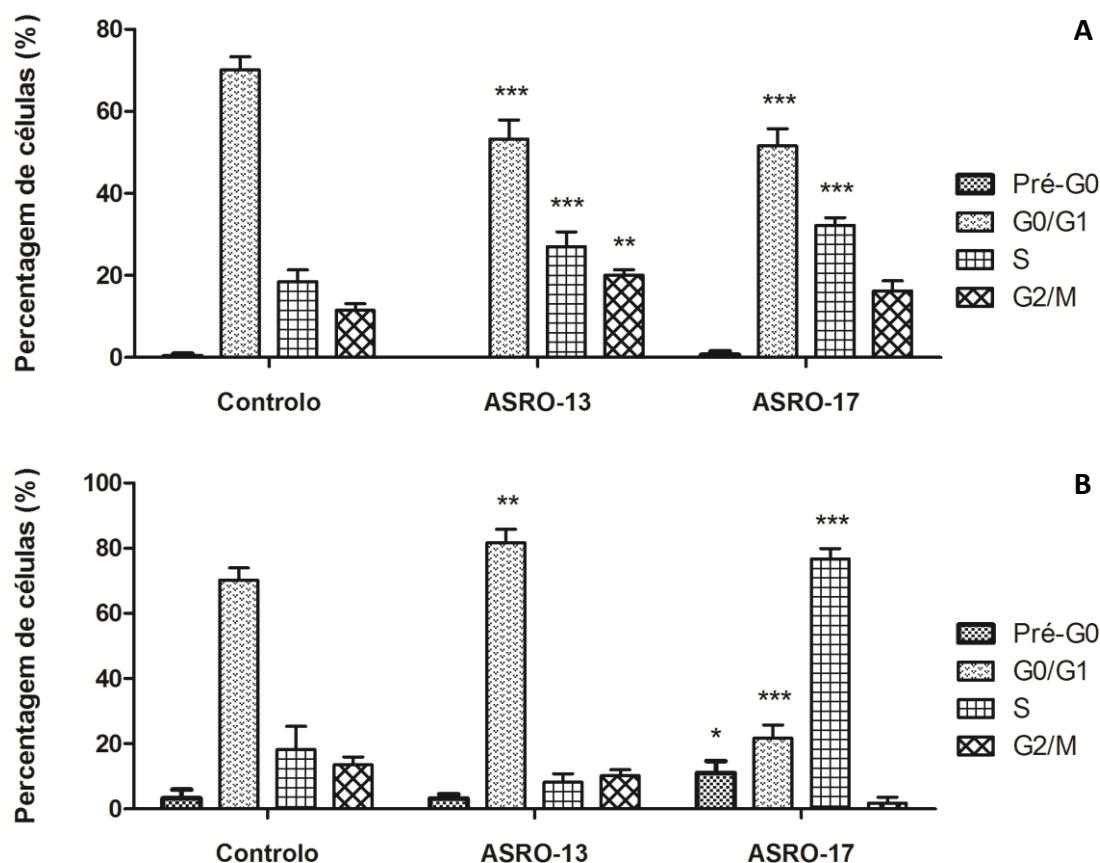


Figura 18 - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo. Os resultados estão representados em percentagem de células em pré-G1, G0/G1, S ou G2/M, após o tratamento de 48h na linha celular MCF7 (A) e HCC1806 (B) com ASRO-13 ou ASRO-17. Os resultados expressam a média de pelo menos 5 ensaios ($n \geq 5$) realizados em 3 experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. Apenas um * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$.

A percentagem de células da LC-TN, HCC1806, aumenta significativamente nas fases G0/G1 ($p=0,001$), no entanto, nenhuma das outras fases do ciclo celular seja significativamente alterada, com a administração de $73,7 \mu\text{M}$ do composto ASRO-13. Por outro lado o IC_{50} do composto ASRO-17 provoca aumento da fase pré-G0 ($p=0,011$), diminuição da fase G0/G1 ($p < 0,001$) e aumento da percentagem de células na fase de síntese de DNA, na fase S ($p < 0,001$).

Avaliação da relação Bax/Bcl-2

A razão das proteínas Bax e Bcl-2 é normalmente avaliada para confirmar os resultados da viabilidade e tipos de morte celular, complementando a informação fornecida pela avaliação dos tipos de morte celular pela marcação com An-V/IP.

Nos gráficos da Figura 19, podemos observar a razão entre as proteínas Bax e Bcl-2, nas linhas celulares MCF7 (Figura 19, A) e HCC1806 (Figura 19, B), submetidas ao tratamento com os compostos ASRO-13 e ASRO-17. Como se pode observar nos gráficos, apenas o tratamento com o composto ASRO-17 é capaz de alterar significativamente a razão Bax/Bcl-2 em ambas as linhas celulares MCF7 ($p=0,003$) e HCC1806 ($p<0,001$).

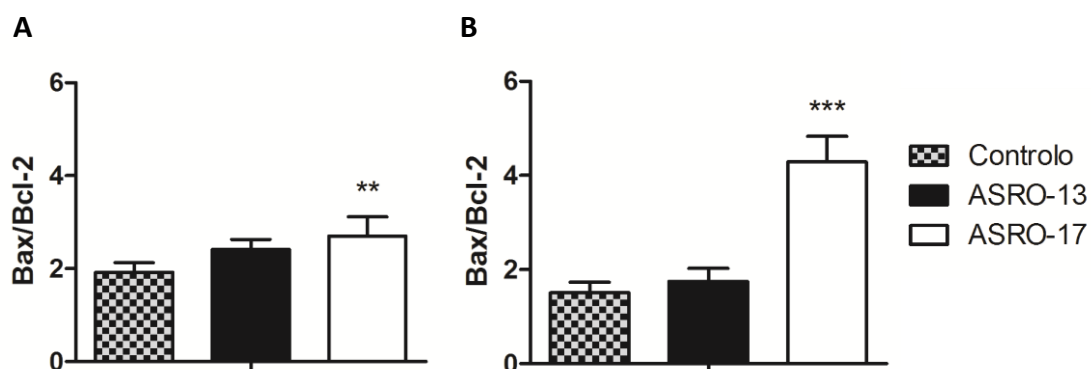


Figura 19 - Análise da razão da expressão das proteínas Bax e Bcl-2. Os resultados representam a expressão de Bax e Bcl-2 após o tratamento de 48h na linha celular MCF7 (A) e HCC1806 (B) com ASRO-13 ou ASRO-17. Os resultados expressam a média e desvio padrão de pelo menos 5 ensaios ($n \geq 5$) realizados em 3 experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$.

Avaliação da sobrevivência celular - Ensaio clonogénico

Os resultados do ensaio clonogénico na LC-RE⁺, MCF7, e LC-TN, HCC1806, tratadas com os compostos ASRO-13 e ASRO-17 estão apresentados nos gráficos da Figura 20. Ambos os compostos reduzem significativamente a sobrevivência celular de ambas as linhas celulares ($p < 0,001$), no entanto a linha celular MCF7 tem um factor de sobrevivência de cerca de 26% quando tratada com o composto ASRO-13, enquanto que com o ASRO-17 o factor de sobrevivência é de apenas 2,6%. O factor de sobrevivência da LC-TN, HCC1806, tratada com qualquer um dos compostos está abaixo dos 2%, como se pode observar pelo gráfico da Figura 20 B, o que é um resultado significativamente baixo em relação ao controlo ($p < 0,001$).

Na linha celular LC-RE⁺, MCF7, o ASRO-17 é significativamente superior em termos de redução da sobrevivência celular em relação ao ASRO-13 ($p < 0,001$). Apesar dos baixos factores de sobrevivência na LC-TN, HCC1806, o ASRO-13 é o composto que mais afecta a sobrevivência celular ($p < 0,001$) por comparação ao ASRO-17, como indica o gráfico na Figura 20, B.

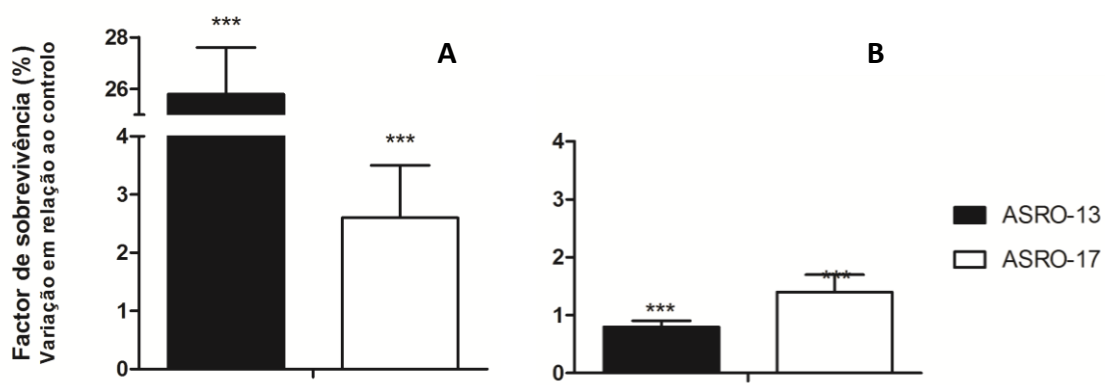


Figura 20 – Avaliação do factor de sobrevivência das linhas celulares MCF7 (A) e HCC1806 (A) após 48h do tratamento com os compostos ASRO-13 e ASRO-17. Os resultados expressam a média e desvio padrão de pelo menos 4 experiências independentes e $n \geq 10$. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * e *** representa $p < 0,001$.

Avaliação da produção de proteínas totais

Na Figura 21 é possível observar os gráficos correspondentes à produção de proteínas totais na LC-RE⁺, MCF7, (Figura 21, A) e LC-TN, HCC1806, (Figura 21, B) após a administração dos compostos ASRO-13 e ASRO-17. A produção total de proteínas na

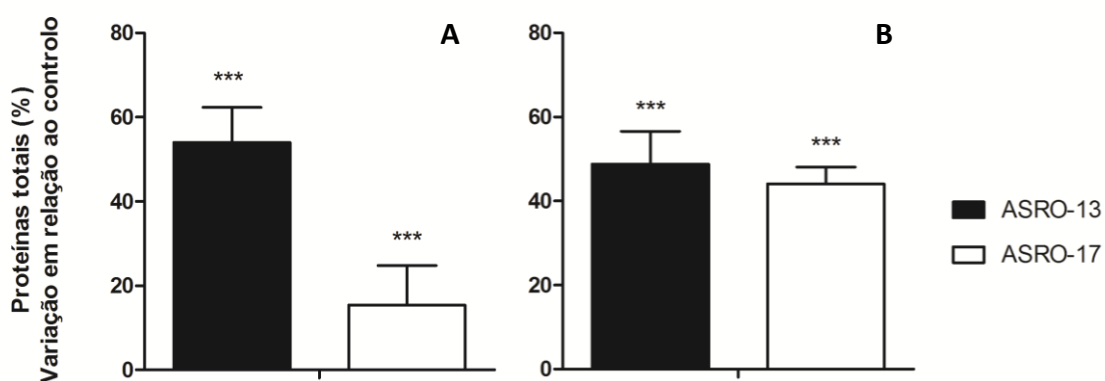


Figura 21 - Avaliação da produção de proteínas totais das linhas celulares MCF7 (A) e HCC1806 (B) após 48h do tratamento com os compostos ASRO-13 e ASRO-17. Os resultados expressam a média e desvio padrão da percentagem de proteínas totais produzidas relativamente ao controlo de pelo menos 3 experiências independentes e $n = 10$. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * e *** representa $p < 0,001$.

LC-TN, HCC1806, é afectada em cerca de 50% relativamente aos controlos ($p < 0,001$). Já a LC-RE⁺, MCF7, é afectada do mesmo modo quando tratada com o composto ASRO-13 ($p < 0,001$) enquanto que quando é administrado o composto ASRO-17 se observa uma redução para 15,4% ($p < 0,001$).

Análise do perfil proteico das linhas celulares de cancro da mama

Gel 2-D

Os resultados obtidos através da técnica de separação de proteínas pelo ponto isoeléctrico e peso molecular estão apresentados na Figura 22. É importante referir que os resultados apresentados são de carácter preliminar uma vez que houve um prévio processo de optimização e que este ainda está em curso. Por este motivo estão apresentados apenas dois géis, um controlo e tratamento com apenas um dos compostos, em apenas um das linhas celulares de interesse, a LC-RE⁺, MCF7.

É possível observar que, de um modo geral, o perfil proteico da LC-RE⁺, MCF7, controlo é similar relativamente ao obtido após tratamento com o ASRO-13. Por exemplo, é evidente a concordância nos grupos de *spots* dentro da caixa laranja e do triângulo verde assinalados na Figura 22.

No entanto, uma observação mais pormenorizada revela diferenças em termos de intensidades de alguns *spots*, nomeadamente, os que estão assinalados pela caixa azul e pela seta amarela, sendo que no gel obtido após tratamento há um aumento de expressão destas proteínas.

O grupo de proteínas realçadas pelo círculo roxo no gel controlo parece deixar de estar expresso como consequência do tratamento. A partir da linha vermelha, que corresponde às proteínas de peso molecular 37kDa, não se fez uma análise comparativa uma vez que no gel controlo os *spots* não estão tão bem definidos como no gel do tratamento com o ASRO-13.

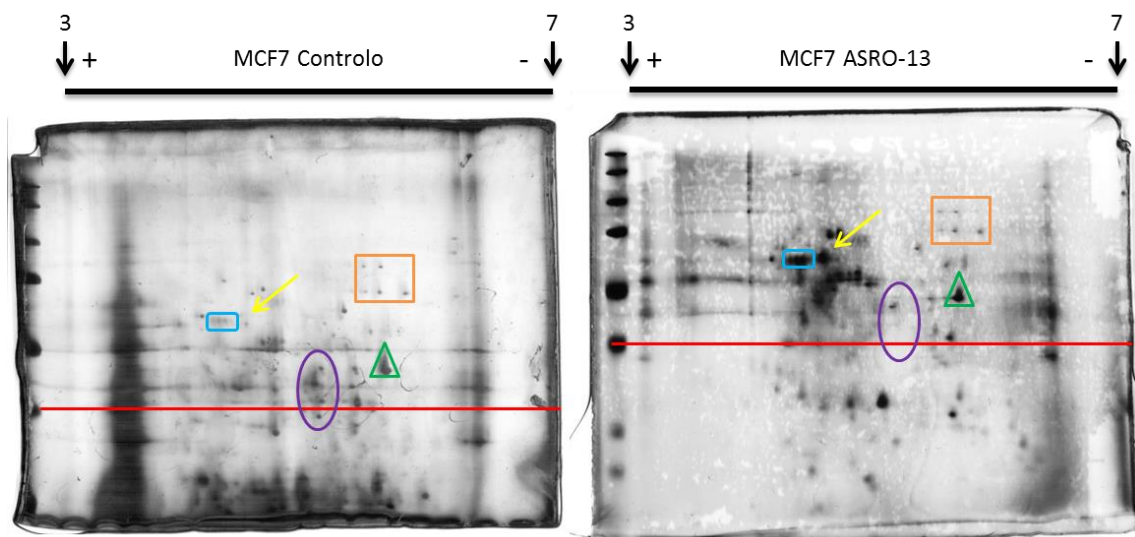


Figura 22 – Géis 2-D obtidos a partir da LC-RE+, MCF7, controlo e após incubação com o composto ASRO-13. Do lado esquerdo dos géis encontra-se o padrão de amostras *Precision Plus Standards, Dual Color, Bio-Rad, EUA*. As setas e os valores acima destas indicam onde se encontram as proteínas mais ácidas (pH=3, +) e do lado direito mais básicas (pH=10, -). A caixa laranja e o triângulo verde indicam *spots* semelhantes nos géis. A caixa azul e a seta amarela indicam *spots* mais intensos e o círculo roxo indica *spots* menos intensos no tratamento com o ASRO-13.

Análise da extensão de danos no DNA

Ensaio cometa

Na Figura 23 podem-se encontrar imagens representativas das várias condições a que as células foram submetidas: controlos sem qualquer tratamento, controlo positivo de células expostas a peróxido de hidrogénio, tratamentos com os compostos ASRO-13 e ASRO-17, tanto na concentração do IC₅₀ como em concentração três vezes superior ao IC₅₀.

Como se pode observar pelas imagens, as culturas celulares incubadas com os compostos ASRO-13 e ASRO-17 não apresentam células em forma de cometas, que se assemelham aos respectivos controlos.

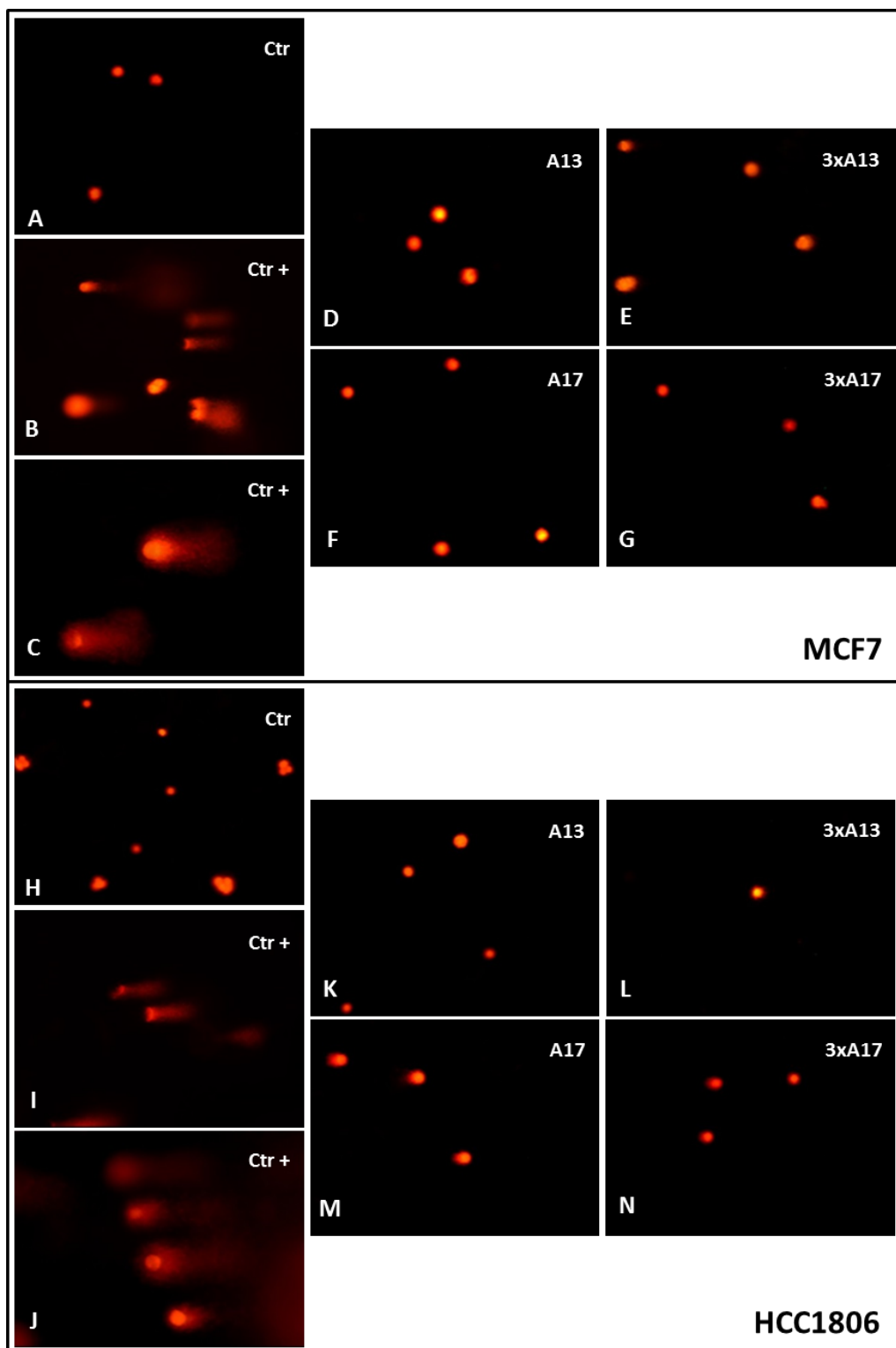


Figura 23 - Imagens dos cometas da linha celular MCF7 obtidas para cada condição a que as células foram sujeitas: A: controlo (100x), B: controlo positivo (100x), C: controlo positivo (400x), D: IC₅₀ às 48h ASRO-13 (100x), E: 3xIC₅₀ às 48h ASRO-13 (100x), F: IC₅₀ às 48h ASRO-17 (100x), G: 3xIC₅₀ às 48h ASRO-17 (100x). **Imagens dos cometas da linha celular HCC1806 obtidas para cada condição a que as células foram sujeitas:** H: controlo (100x), I: controlo positivo (100x), J: controlo positivo (400x), K: IC₅₀ às 48h ASRO-13 (100x), L: 3xIC₅₀ às 48h ASRO-13 (100x), M: IC₅₀ às 48h ASRO-17 (100x), N: 3xIC₅₀ às 48h ASRO-17 (100x).

Discussão

A quimioterapia tem sido, ao longo de várias décadas, imprescindível para o tratamento da maior parte dos casos de cancro da mama.

A quimioterapia na modalidade neo-adjuvante é frequentemente utilizada com o objectivo de reduzir o tamanho do tumor para possibilitar a realização da cirurgia. Com esta abordagem é possível obter-se remissão parcial em cerca de 80% dos casos e no restante dos casos mesmo remissão completa⁴⁹.

A quimioterapia adjuvante pós-cirurgia tem por objectivo erradicar micrometástases e células que possam não ter sido removidas aquando da cirurgia. Pode também ser direccionada ao cancro metastizado, pois a quimioterapia é uma terapêutica sistémica e, por isso, capaz de induzir morte nas células cancerígenas em locais distantes ao tumor primário⁵⁰. Muitos são os estudos decorrentes de combinações de fármacos para minimizar os efeitos adversos da quimioterapia e, actualmente, alguns regimes aplicados com grande eficácia incluem combinações de dois ou três dos seguintes fármacos: doxorrubicina, ciclofosfamida, docetaxel, epirrubicina, 5-fluorouracilo, metotrexato e paclitaxel. Os seus diferentes mecanismos de acção permitem erradicar as células cancerígenas mais rapidamente e com maior taxa de sucesso comparativamente com as respectivas monoterapias⁵¹.

A utilização dos marcadores moleculares para a classificação do cancro da mama constituiu um grande avanço na determinação do tipo de tratamento mais adequado a cada caso. O tratamento dirigido aos tumores HER2⁺ é efectuado com trastuzumab ou lapatinib e os tumores que expressam receptores hormonais são habitualmente tratados com hormonoterapia adjuvante^{49,51,52}. Embora a hormonoterapia adjuvante seja relativamente eficaz em cancros que expressam receptores hormonais, as terapêuticas têm um período de eficácia limitado e as doentes acabam por adquirir resistência aos tratamentos, sendo estes os casos em que a quimioterapia tem um importante papel²⁰.

O maior desafio no tratamento do cancro da mama é o tratamento de tumores TN. Este tipo de tumor está associado a um alto risco de desenvolvimento de metástases e a curtos períodos de recidiva, com uma maior prevalência 3 anos após o diagnóstico seguido de tratamento adequado. O prognóstico associado aos tumores

TN é fraco e a sobrevivência das doentes 5 anos após o diagnóstico é muito baixa^{53,54}. Este cenário é preocupante e carece de atenção na procura de novos fármacos e de novas estratégias terapêuticas.

A quimioterapia é a terapêutica de eleição no tratamento do TN, parcialmente pela falta de terapêuticas direccionadas, como mencionado acima, mas também pela sensibilidade que este tipo de cancro apresenta à mesma⁵³⁻⁵⁵.

Os tumores TN são sensíveis à quimioterapia devido à sua grande capacidade proliferativa⁵⁶, pois os fármacos utilizados em quimioterapia normalmente interferem na divisão celular²⁵. A sensibilidade dos tumores TN à quimioterapia também se deve à deficiente reparação do DNA associada a mutações nos genes BRCA1 e BRCA 2⁵⁵, como já foi referido anteriormente, embora nem todos os cancros TN tenham estas mutações^{7,37}.

Em particular, a classe de citostáticos com capacidade de interagir e danificar o DNA, como é o caso dos agentes alquilantes, tem sido amplamente utilizada na prática clínica para o tratamento dos tumores TN^{26,37,51-55}. Apesar da resposta dos tumores TN ao tratamento com citostáticos, a melhoria dos doentes é limitada e os tratamentos disponíveis actualmente não são suficientes para evitar a mortalidade por cancro da mama^{3,37}. Além disso, a quimiorresistência associada a estes compostos também é uma das grandes motivações para a pesquisa de novos fármacos capazes de induzir danos irreparáveis nas células e de induzir uma rápida morte celular das células cancerígenas^{35,57}.

Com o objectivo de encontrar moléculas capazes de induzir morte celular selectivamente no tecido tumoral numa magnitude que estas não consigam recuperar, a investigação nesta área incide na síntese de estruturas químicas nunca antes estudadas. Associadamente pretende-se reduzir os efeitos secundários da quimioterapia de modo a aumentar a qualidade de vida das doentes durante o tratamento. As mostardas nitrogenadas continuam a ser alvo de pesquisas na área oncológica devido à sua eficácia no tratamento do cancro, mas também pelo seu peso histórico e, recentemente têm sido estudadas estruturas químicas derivadas destas

com grande interesse biológico, como são os 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis quirais^{30,32}.

Os compostos estudados na presente dissertação foram otimizados com base nas relações de estrutura-actividade de outros compostos que lhes deram origem³². O composto ASRO-13, com resultados já publicados^{30,32}, tem grande actividade biológica contra o adenocarcinoma da mama positivo para receptores hormonais, representado neste trabalho pela linha celular MCF7^{30,32}.

Como sabemos, o átomo de carbono é capaz de estabelecer até 4 ligações covalentes com outros átomos devido à sua valência de electrões, formando uma estrutura tridimensional tetraédrica pela existência de 4 orbitais sp^3 . Quando todos os átomos ou grupos de átomos ligados ao mesmo carbono são diferentes entre si tem-se um carbono (centro) quiral. Nesta situação é possível obter 2 moléculas que diferem uma da outra apenas na estrutura tridimensional, são imagem em espelho uma da outra e não se sobrepõem. Estas moléculas são chamadas enantiómeros e têm a configuração *R* ou *S* segundo o sistema Cahn-Ingold-Prelog⁵⁸.

O composto ASRO-13 tem a configuração absoluta (*R*) no carbono quiral 3 e, Soares *et. al.* (2013) sugeriram que, apesar de possuir dois grupos hidroximetilo com potencial para se ligarem ao DNA, o seu mecanismo de acção envolveria apenas um dos grupos, pois o valor do IC₅₀ do ASRO-13 não era significativamente mais baixo que o composto correspondente com apenas um grupo hidroximetilo no C-6³².

A presença do grupo fenilo na posição 3 dos compostos 6,7-bis(hidroximetilo)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole parece ser importante para a actividade biológica. No entanto ainda não tinha sido explorada a possibilidade da actividade biológica dever-se exclusivamente à presença do grupo fenilo ou apenas de um grupo aromático em C-3. Para explorar essa hipótese, foram sintetizados os compostos ASRO-15 e ASRO-17 contendo na posição 3 os grupos *para*-metoxifenilo e *para*-hidroxifenilo, respectivamente. Foi também sintetizado o composto MIS-1786 com o grupo benzilo em C-3. O grupo benzilo é um derivado do tolueno e encontra-se ligado a C-3 através de uma ponte metileno (carbonos não-aromáticos).

O composto MIS1787 tem um substituinte metilo no carbono 3, embora este não seja um grupo aromático e sim um grupo alquilo. Este composto foi sintetizado com o objectivo de perceber a importância de se ter um substituinte aromático no C-3 em detrimento de outros grupos. Conhecer a actividade biológica do composto MIS1787 será muito importante para estabelecer as relações entre estrutura e actividade até aqui estudadas uma vez que em trabalhos anteriores apenas se tinha estudado as diferenças entre a presença e ausência de grupos aromáticos em C-3.

Até aqui, os estudos dos compostos 6-hidroximetil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis vs 6,7-*bis*(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis, têm sugerido que, apesar de haver a estrutura química necessária para os compostos interagirem com o DNA em 2 locais diferentes simultaneamente, a interacção preferencial envolveria apenas um dos grupos hidroximetil^{30,32}. Se fosse esse o caso, o IC₅₀ dos compostos bis-(hidroximetil) seria significativamente menor do que os correspondentes hidroximetil. Além disso, as melhores respostas anti-proliferativas foram obtidas com os hidroximetil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis cujo grupo hidroxilo se encontrava no C-6 e não no C-7³⁰. Assim, outra modificação estrutural pertinente para o estudo foi substituição de dois grupos metilo no carbono 1 do 6,7-*bis*(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole, que dá origem ao composto MIS1707. Pensou-se que essa modificação estrutural poderia potenciar a acção do grupo hidroximetil ligado ao C-7 do 6,7-*bis*(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole, mas de facto a modificação estrutural não melhorou a actividade do composto.

Os estudos de Soares *et. al.* (2013) indicam que a configuração absoluta dos compostos influencia a sua actividade e, na LC-RE⁺, MCF7, os compostos com a configuração absoluta *S* apresentam uma melhor actividade anti-proliferativa comparativamente aos respectivos compostos com a configuração *R*³². Porém, o estudo com os compostos *R* mostrou que esta configuração é mais promissora na LC-TN, HCC1806, avaliado pelo ensaio do MTT (resultados não publicados). Por este motivo, os compostos estudados nesta dissertação têm todos a configuração absoluta *R* em C-3, com excepção do composto MIS-1707 que tem a configuração absoluta *S*.

Testou-se o efeito de todos os compostos na actividade metabólica das três linhas celulares representativas dos grupos de cancro da mama RE⁺, HER2⁺ e TN, com o objectivo de recolher informações sobre a relação entre estrutura e actividade dos compostos. Essa relação permite a reestruturação química de um composto para que os seus derivados tenham uma melhor actividade anti-proliferativa nas linhas celulares de adenocarcinoma da mama neste caso, especialmente na LC-TN, HCC1806, e baixa citotoxicidade para células não cancerígenas.

O composto MIS1707 não mostrou actividade anti-proliferativa promissora em nenhuma das linhas celulares em estudo, nem mesmo na LC-RE⁺, MCF7, cujos resultados anteriores sugeriram que a configuração absoluta *S* seria preferencial na inibição da proliferação nesta linha celular. A partir deste resultado depreende-se que a substituição de um carbono altera substancialmente a actividade anti-proliferativa dos compostos comparativamente a alteração da quiralidade dos mesmos. Além disso, a substituição no carbono C-1 não é vantajosa relativamente aos compostos não substituídos nessa posição. Para confirmar esse resultado poderiam ser testados novos compostos possuindo outros grupos alquilo ou arilo na posição 1. Uma vez que um grupo metilo no carbono C-5 parece ser imprescindível para a funcionalidade dos compostos, a substituição com apenas um grupo metilo em C-1 poderia resultar numa melhor actividade anti-proliferativa comparativamente ao derivado dissustituído.

O grupo *para*-metoxifenilo no C-3 do ASRO-15 não parece melhorar a actividade anti-proliferativa nas LC-RE⁺, MCF7, LC-HER⁺, HCC1954, mas na LC-TN, HCC1806, o efeito é mais acentuado do que o composto ASRO-13. De facto, todos os compostos reestruturados a partir do ASRO-13 têm valores de IC₅₀ mais baixos na LC-TN, HCC1806, indicando que as relações entre a estrutura e actividade são importantes considerações na pesquisa de novos fármacos.

O composto ASRO-17 possui o grupo *para*-hidroxifenilo em C-3, que difere do ASRO-15 apenas pelo facto do substituinte hidroxilo na posição *para* do grupo fenilo não estar metilado, melhora ligeiramente a actividade anti-proliferativa na LC-TN, HCC1806, em relação aos compostos ASRO-13 e ASRO-15.

O composto MIS1787, que possui um grupo metilo no C-3, consegue obter bons resultados nas três linhas celulares em estudo, mas atinge resultados muito promissores na LC-TN, HCC1806. Contudo, o composto MIS1786, que possui um grupo benzilo em C-3, é ainda mais promissor nesta linha celular uma vez que é o composto que mais inibe a actividade metabólica na LC-TN, HCC1806. Estes resultados permitem inferir que a presença do grupo benzilo parece ser importante na actividade dos compostos na LC-TN, HCC1806. Porém os resultados do MIS1787 levantam a questão da necessidade da presença de um sistema aromático estar ligado ao C-3 ou se um grupo alquilo seria capaz de produzir resultados semelhantes nesta linha celular. Esse efeito poderia ser investigado através da substituição do grupo em C-3 por outros grupos alquilo de maiores dimensões relativamente ao metilo.

Além disso, os resultados obtidos com os compostos ASRO-15 e ASRO-17 indicaram que a presença de átomos de oxigénio no sistema aromático não melhora a actividade anti-proliferativa dos compostos. Para confirmar esta hipótese, outros grupos estruturais com o átomo de oxigénio, para além do grupo hidroxilo e metoxilo, poderiam ser introduzidos na estrutura 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis, como os grupos carbonilo, por exemplo.

Há um efeito ligeiramente diferente dos compostos nas linhas celulares HCC1806 e HCC1954 em relação a linha MCF7 e claramente as futuras modificações deverão ter em conta este factor.

Assim, em relação a LC-RE⁺, MCF7, poderá ser interessante testar os compostos utilizados na presente dissertação com a respectiva configuração absoluta *S*, uma vez que já se concluiu que estes têm um maior efeito anti-proliferativo nesta linha celular³². Essa diferença na quiralidade dos compostos deverá produzir excelentes resultados na inibição da proliferação da LC-RE⁺, MCF7.

Tendo em conta os resultados das LC-HER⁺, HCC1954, e LC-TN, HCC1806, serão ainda modificações estruturais pertinentes, a introdução de outros grupos, alquilo e arilo, no carbono C-3, como referido acima. Os 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis quirais substituídos no C-3 com grupos que contenham ligações duplas intercaladas também seriam estruturas químicas interessantes para estabelecer

relações de estrutura-actividade dos compostos. Deste modo, poderia saber-se se a presença de duplas intercaladas, como as presentes nos grupos aromáticos, serão importantes na actividade dos compostos, até porque estes grupos têm coeficientes de partição semelhantes aos grupos aromáticos⁵⁹.

A questão da solubilidade e coeficientes de partição octanol/água também é um assunto de interesse farmacológico. Particularmente, compostos capazes de interferir com o DNA celular, têm de atravessar duas membranas, a plasmática e a nuclear e, por isso, o balanço entre a solubilidade em água e em lípidos é muito importante. Essa informação poderá ser importante para compreender os resultados de citotoxicidade e actividade mitocondrial obtidos.

A citotoxicidade dos compostos, avaliada pelo ensaio do MTT, é muito útil quando se pretende um rápido *screening* de várias estruturas químicas. Contudo, uma técnica como esta não permite avaliar os mecanismos de acção dos compostos a nível molecular. Assim, realizaram-se outros testes *in vitro* que permitissem perceber os efeitos dos compostos a nível celular e molecular. Estes estudos também permitiriam avaliar possíveis mecanismos de acção dos presentes compostos, completando assim a informação da relação entre estrutura e actividade dos mesmos.

Os compostos seleccionados para prosseguir com os estudos foram o ASRO-13, devido ao seu efeito na LC-RE⁺, MCF7, e o ASRO-17, devido ao seu efeito na LC-TN, HCC1806. Apesar dos compostos MIS1786 e MIS1787 serem excelentes candidatos para um estudo mais aprofundado, estes compostos foram sintetizados após a decisão de estudar o ASRO-13 e o ASRO-17.

A concentração do IC₅₀ calculado através das curvas de dose resposta inibe a proliferação celular em 50%. A taxa metabólica celular pode ser correlacionada com a produção total de proteínas, determinada pelo ensaio do SRB. Os resultados obtidos através do ensaio do SRB, presentes na Figura 21, corroboram os resultados obtidos pelo MTT, excepto no caso da linha celular MCF7 tratada com o ASRO-17. O resultado do SBR neste caso indica uma produção total de proteínas de 15,4±9,4% em relação ao controlo, o que é consideravelmente baixo tendo em conta que foi administrado o IC₅₀ do composto ASRO-17. Porém deve-se ter em conta que estes dois ensaios avaliam

parâmetros distintos: o MTT avalia a actividade mitocondrial⁶⁰ e o SBR a produção total de proteínas que está directamente relacionada com a massa celular⁶¹. Assim, estes resultados indicam que o tratamento com o ASRO-17 nas MCF7 induz morte celular em cerca de 80% das células e afecta o metabolismo mitocondrial.

Os resultados obtidos pela avaliação da viabilidade e tipos de morte celular das MCF7 tratadas com o ASRO-17 indicam que a população de células vivas é de 21,4±4,2%, relativo ao número total de células analisadas, confirmando os resultados obtidos pelo SRB.

O facto de não haver mais estudos sobre o efeito destes compostos nas linhas celulares em estudo para além da citotoxicidade, avaliada pelo ensaio do MTT, acrescenta uma nova e valiosa vertente no *screening* de novos compostos. Estes estudos também permitem uma análise mais completa do efeito dos compostos nas linhas celulares de adenocarcinoma da mama assim como a revelação de possíveis mecanismos de acção.

A análise dos resultados de citometria de fluxo com a dupla marcação An-V e IP revelam que o tratamento das duas linhas celulares com o ASRO-13 induz morte celular por apoptose tardia e necrose. Verifica-se também que não há um aumento significativo da razão Bax/Bcl-2 nestas condições e, como a razão da expressão das proteínas Bax e Bcl-2 é normalmente utilizada para complementar os resultados da viabilidade e tipos de morte celular, verificou-se uma forte tendência pela morte necrótica preferencialmente.

Tendo em conta o mecanismo sugerido para o grupo de compostos em estudo, a alquilação de bases do DNA, e sabendo que quando a morte celular é causada por danos no DNA, o balanço entre a morte por apoptose e necrose depende do tipo, extensão e resposta a estes danos^{39,43,62}, normalmente o resultado é a alteração da sua estrutura e função, quebras nas cadeias e morte celular por apoptose⁶². A monoalquilação de bases do DNA pode ser reparada por excisão de bases (BER, do inglês *base excision repair*)^{63,64}, um mecanismo que envolve a remoção da base danificada com o auxílio de glicosilases e a formação de SSB. Neste ponto de situação a PARP-1 reconhece o local de quebra na cadeia, terminal *nick*, e sintetiza os polímeros de ADP-

ribose (PAR), como descrito anteriormente⁶⁴. Estes polímeros causam repulsão electrostática e resultam na remodelação da cromatina para que haja espaço suficiente para que as proteínas envolvidas na reparação possam actuar no local de quebra³⁹.

A síntese de PAR é proporcional à intensidade dos danos provocados e é feita à custa de NAD⁺^{43,65}. Isso traduz-se numa relação proporcional entre os danos causados e a variação de energia celular, pois o consumo de NAD⁺ altera o metabolismo celular que tem como consequência a paragem da glicólise por depleção de ATP e do próprio NAD⁺, como mostram os estudos metabólicos de Berger *et. al.* (1986)⁶⁵.

Os estudos de Zong *et. al.* (2004) com fibroblastos de embriões de murganhos *knockdown* para as proteínas p53, Bax e Bak tratados com agentes alquilantes como a mecloretamina e a metilnitronitrosoguanidina confirmaram que há morte celular por necrose independente das proteínas envolvidas na morte celular por apoptose⁶⁶. Além disso comprovaram que a exposição das células aos agentes alquilantes levava a activação das PARP e depleção de NAD⁺ e ATP, como mostrou o estudo conduzido por Berger *et. al.* (1986)⁶⁵. Além disso, provaram que a morte celular necrótica causada por danos no DNA era dependente da activação da PARP-1 (que detém 90% da expressão do total de proteínas PARP nas células)⁶⁶.

A tendência de morte por necrose também se verificou na LC-TN, HCC1806, tratada com o composto ASRO-17 que, embora tenha a relação Bax/Bcl-2 significativamente aumentada em relação ao controlo, não apresentou um aumento significativo das células em apoptose, como se pode verificar no gráfico da Figura 17.

A população de células marcadas tanto com An-V como com IP encontram-se significativamente aumentadas. Tendo em conta o exposto, hipotetiza-se que a marcação com An-V ocorre muito provavelmente nos primeiros momentos de contacto dos compostos com as células pois, como foi explicado acima, o balanço entre a morte celular por apoptose ou por necrose depende da extensão dos danos causados. Assim, verifica-se que a relação Bax/Bcl-2 encontra-se sempre ligeiramente aumentada em relação aos controlos, embora não o suficiente para ter significado estatístico. Neste sentido, formula-se a hipótese de que numa fase inicial as células

iniciam a apoptose mediada pelos factores apoptóticos clássicos, mas que numa fase seguinte entram rapidamente em necrose. Para confirmar esta hipótese seria interessante realizar a análise de viabilidade e tipos de morte, por citometria de fluxo, em diferentes tempos após o tratamento. Outra possibilidade seria avaliar a evolução morfológica por microscopia óptica das células ao longo do tempo após tratamento. Há características morfológicas que distinguem os tipos de morte por apoptose e por necrose, em que a última se caracteriza pelo aumento de tamanho dos organelos celulares, formação de vacúolos intracelulares, desintegração da membrana e degradação desordenada do DNA⁶⁶.

A LC-RE⁺, MCF7, quando foi administrado o composto ASRO-17 indica um aumento da população de células em apoptose inicial e em fase tardia. A população de células necróticas também está aumentada, indicando um balanço entre os dois tipos de morte celular.

A LC-RE⁺, MCF7, em princípio não apresentam a maquinaria de reparação celular comprometida como a LC-TN, HCC1806⁴⁶. A lesão do DNA pode levar ao desencadeamento de uma resposta de reparação do DNA que controla a paragem do ciclo celular, activa mecanismos de reparação do DNA e induz a morte celular por apoptose²⁷. As proteínas ATM e ATR actuam como sensores e efectoras na activação das proteínas CHK1 e CHK2 em que ambas que são responsáveis pelos *check points* na fase S e G2/M. A CHK2 é responsável pelo *check point* G1/S^{11,27}.

Ao detectar DSB no DNA, a ATM é activada e induz a fosforilação da CHK2 e da p53 que ficam activas. A CHK2-P (CHK2 fosforilada) também promove a fosforilação da p53 que, por sua vez activa a proteína 21 (p21^{WAF1}). A CHK2-P também promove a degradação das fosfatases da divisão do ciclo celular (Cdc, do inglês *cell division cycle*) 25A e 25C, como mostra a Figura 24. A degradação destas fosfatases mantém o complexo de ciclina E/cinase dependente de ciclina 2 (Cdk2, do inglês *cyclin-dependent kinase 2*) inactivo que resulta na paragem do ciclo na fase G1.

O complexo ciclina E/Cdk2 não estando activo, não é capaz de promover a fosforilação da proteína do retinoblastoma (Rb), que reforça a paragem do ciclo em G1²⁷. Como se pode ver através da Figura 24, um processo semelhante ocorre com as

proteínas ATR, CHK1, p53, p21, Cdc25C, Cdk1/Cdc2/ciclina B que provoca a paragem do ciclo celular em G2 por deteção de SSB e obstrução do garfo de replicação²⁷. Embora haja sobreposição de funções das proteínas de *check point* do ciclo celular, a análise das paragens preferenciais do ciclo celular por influência dos compostos em estudo fornecem pistas sobre o tipo de danos que podem causar no DNA.

Como se pode observar na Figura 18, há uma diminuição das fases G0/G1 e um aumento das fases de síntese de DNA, fase S, e no caso do ASRO-13, também um aumento na fase G2/M, o *check point* que ocorre imediatamente antes das células entrarem em mitose. O aumento da fase G2/M, reflete possíveis danos causados por SSB, porém a paragem do ciclo na fase S sugere um decréscimo taxa de síntese de DNA pela geração de DSB⁶⁷. A formação de DSB pode ser originada pelo bloqueio do garfo de replicação pela presença de aductos inter-cadeias do DNA⁶³, que somente é possível ser formado por compostos com capacidade de estabelecer duas ligações em locais distintos do DNA. Os resultados do ciclo celular do composto ASRO-17 também indicam que este é capaz de promover a diminuição da taxa de síntese do DNA em ambas as linhas celulares.

Pelos resultados observados no caso da LC-TN, HCC1806, tratada com o ASRO-13, onde há um aumento da população na fase G0/G1, suspeita-se que o composto ASRO-13 possa estar envolvido na formação de danos celulares que activem a reparação do DNA por via ATM/CHK2/p53 que resulta num fim celular apoptótico, embora os resultados da Figura 17 indiquem que a morte preferencial seja a necrose³².

O mecanismo de ação dos compostos e o seu efeito no ciclo celular poderiam ser melhor compreendidos com a análise do perfil de expressão e estado de fosforilação das proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular. Assim seria interessante proceder a análise de WB para as proteínas ATR, ATM, CHK1 e CHK2, p53 e p21 assim como para as mesmas no seu estado fosforilado.

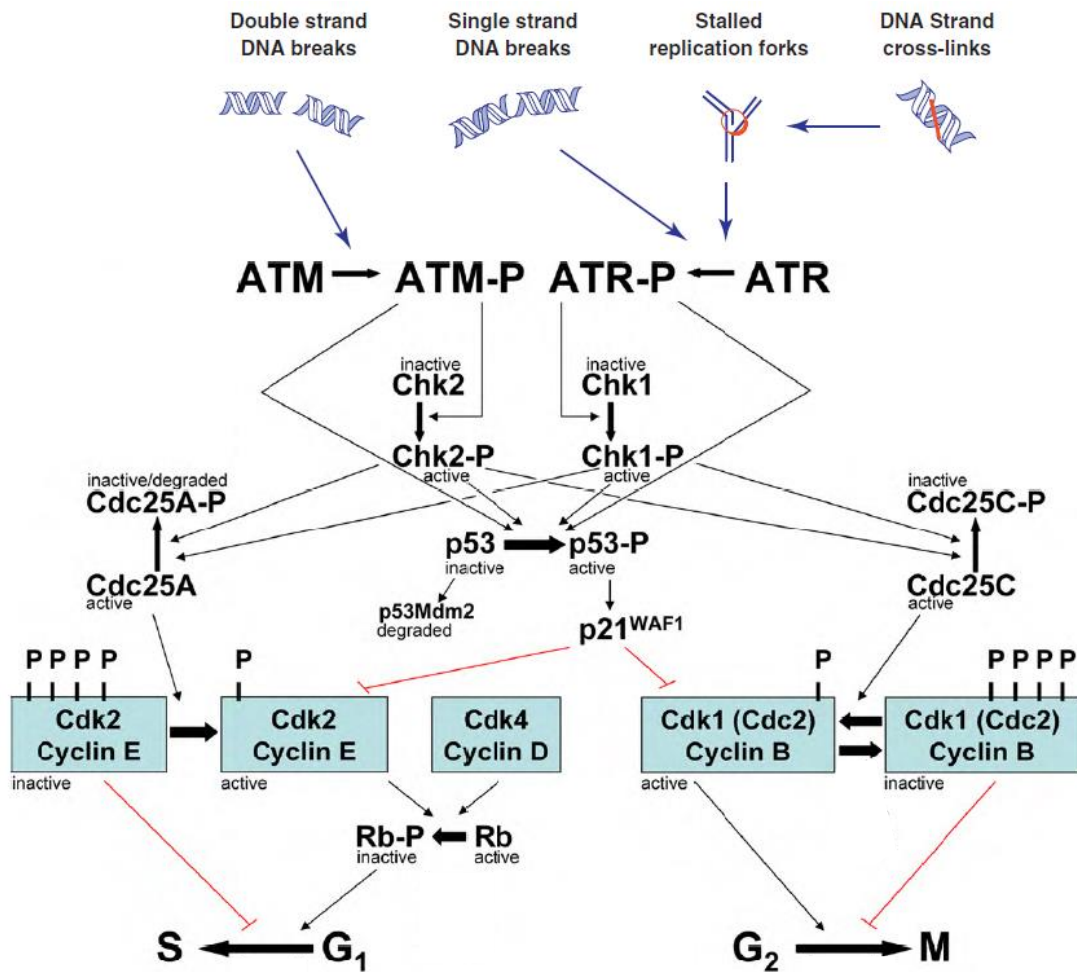


Figura 24 - Vias de regulação dos checkpoints G1/S e G2 do ciclo celular por ativação das proteínas ATM e ATR em resposta a danos no DNA. ATM é ativada e ativa CHK2 e p53, que também pode ser ativada pela CHK2-P. A CHK2-P ativa a p21^{WAF1} e promove a degradação das Cdc25A e Cdc25C, que mantém o complexo Cdk1 e Cdk2 inativos, resultando na paragem do ciclo nas fases G1 e G2. A ativação da via ATR/CHK1 também ativa a p53 e p21^{WAF1}, e as Cdc25A e Cdc25C também de forma cruzada.

ATM: proteína ataxia telangiectasia mutada; **ATR:** proteína da ataxia telangiectasia relacionada com Rad3; **CHK:** proteínas cinases de checkpoint do ciclo celular; **p53:** proteína 53; **p53Mdm2:** complexo da p53 com a Mdm2 (do inglês, *mouse double minute 2 homolog*); **Cdk:** cinase dependente de ciclina; **Cdc:** fosfatases da divisão do ciclo celular; **Rb:** proteína do retinoblastoma. Todas as proteínas ou complexos com -P estão no seu estado fosforilado. Adaptado de Poehlmann *et. al.* (2010) e de Garrett *et. al.*(2011).

Os resultados anteriores sugerem que os compostos poderão causar algum

tipo de dano no DNA. Para elucidar esta possibilidade, foi realizado o ensaio cometa. O ensaio cometa, cujos resultados estão presentes na Figura 23, revelam que não se conseguem detectar quebras no DNA das células. A sensibilidade da técnica permite a detecção de danos no DNA tanto por SSB como por DSB e locais lábeis com terminal *nick*. Os resultados indicam que a exposição aos compostos não foi suficiente para causar danos no DNA. Porém, para confirmar estes resultados poder-se-ia realizar uma electroforese de DNA em condições alcalinas que permitissem a análise do genoma de células expostas aos compostos e uma electroforese com plasmídeos de baixo peso molecular.

O ensaio clonogénico realizado na LC-RE⁺, MCF7, tratada com o ASRO-13 revela que a sobrevivência celular, que é reflectida no factor de sobrevivência, atinge os 25,8±1,8% relativamente ao controlo. O mesmo composto na LC-TN, HCC1806, atinge um factor de sobrevivência significativamente mais baixo comparado ao efeito na LC-RE⁺, MCF7, ($p < 0,001$). Assim como o composto ASRO-13, o efeito do ASRO-17 afecta a sobrevivência celular da LC-TN, HCC1806, como se pode observar pelos resultados do ensaio clonogénico^{7,46}.

Vários estudos apontam que os tumores TN são sensíveis aos mesmos tratamentos direccionados aos tumores com mutações nos genes BRCA 1 e BRCA2, em que se sabe que têm os mecanismos de reparação comprometidos^{7,35,46,68}. Recentemente, Hastak *et. al.* (2010) provaram a sensibilidade de tumores TN à gemcitabina, cisplatina e PJ34, mesmo sem mutações nos genes BRCA1 e BRCA2. Essa sensibilidade é significativamente menor em LC-TN, HCC1806, do que na LC-RE⁺, MCF7. A incubação de 72h com várias concentrações destes fármacos permitiu calcular o IC₅₀ dos mesmos e, sendo que o IC₅₀ na LC-TN, HCC1806, é semelhante do que o da LC-TN com mutação no gene BRCA1. Os resultados do ensaio clonogénico na LC-TN, HCC1806, com tratamento de 10µM do PJ34, 0,6µM de gemcitabina e 0,4µM de cisplatina mostrou que a LC-TN, HCC1806, é muito mais sensível a estes compostos do que a LC-RE⁺, MCF7, confirmando então o pressuposto de que os tumores TN têm uma resposta fenotípica semelhante aos tumores BRCA mutados⁴⁶.

À semelhança do estudo referido⁴⁶, os ensaios clonogénicos com os compostos ASRO-13 e ASRO-17 mostraram uma grande sensibilidade da LC-TN, HCC1806, ao tratamento, contrariamente ao LC-RE⁺, MCF7, como se pode observar pelo gráfico da Figura 20. Muito embora o composto ASRO-17 também tenha impedido significativamente a sobrevivência e a recuperação da LC-RE⁺, MCF7.

Hastak *et. al.* (2010) mostrou que o IC₅₀ do PJ34 nas células HCC1806 é de 4,86µM, um valor consideravelmente baixo em relação ao valor calculado pela curva de dose resposta obtida neste trabalho, no mesmo período de incubação⁴⁶. Contudo as condições experimentais do artigo e da presente dissertação diferem na percentagem de FBS utilizada, o que é suficiente para que os valores de IC₅₀ do PJ34 não sejam iguais.

Os resultados da terapia combinada dos compostos ASRO-13 e ASRO-17 com o PJ34 na LC-RE⁺, MCF7, indicam que não há vantagens na combinação dos compostos. De facto verifica-se um aumento do valor de IC₅₀ quando o ASRO-13 é administrado com 2µM de PJ34 após 72h de incubação. Na LC-TN, HCC1806 as diferenças entre as monoterapias do ASRO-13 e ASRO-17 relativamente a terapia combinada mostram uma maior sensibilidade desta linha celular à acção das PARP em combinação com os compostos. Os estudos conduzidos por Hatak *et. al.* (2010) também mostram resultados semelhantes. As LC-RE⁺, MCF7, e LC-TN, HCC1806, em terapia combinada com cisplatina e PJ34 indicam sinergia entre os compostos na LC-TN e antagonismo na LC-RE⁺.

O artigo de revisão de Rouleau *et. al.* (2010) indica que, para que se consiga detectar uma reparação deficiente do DNA que comprometa a viabilidade das células, a inactivação das PARP deve ser superior a 90%. Embora não se esteja a debater sobre o efeito nas células apenas do PJ34, as concentrações usadas na terapia combinada são inferiores ao valor de IC₅₀ calculados (para a linha celular MCF7:72h=269,66µM⁴⁶ e 96h 14,8µM e para a linha celular HCC1806: 72h=20,7µM e 96h=18,7µM), o que justifica os resultados obtidos nas duas linhas celulares. Portanto, assim como no estudo de Hastak *et. al.* (2010), as concentrações de PJ34 utilizadas na terapia combinada estão abaixo do IC₅₀, sendo que o efeito antagonista dos compostos pode

ser explicado pela activação da PARP e indução de morte celular por necrose, assim como verificado na monoterapia com os compostos ASRO-13 e ASRO-17.

Embora os estudos de terapia combinada não tenham mostrado resultados suficientemente satisfatórios, seria interessante perceber quais os factores que influenciaram este resultado. Assim, seria interessante proceder a análise da viabilidade e tipos de morte celular por citometria de fluxo, assim como as alterações no ciclo celular e expressão de Bax e Bcl-2 por consequência da administração dos compostos em conjunto com o PJ34.

Uma vez que obtivemos resultados interessantes no ensaio clonogénico da LC-TN, HCC1806, com compostos ASRO-13 e ASRO-17 e na terapia combinada destes compostos com o PJ34, também seria interessante avaliar a capacidade de recuperação e sobrevivência da linha celular HCC1806 perante a terapia combinada.

Os resultados obtidos no contexto deste trabalho experimental não permitiram esclarecer completamente o mecanismo de actuação da família de composto em estudo. Apesar das semelhanças estruturais com outros compostos da mesma família sugerissem o mecanismo de acção por alquilação no DNA, o mesmo não foi comprovado. Assim, de modo a elucidar acerca dos seus efeitos, investigou-se também o proteoma de células LC-RE⁺, MCF7, submetidas ao tratamento.

O proteoma das células cancerígenas normalmente está alterado relativamente ao tecido não tumoral. Contudo, os tratamentos que envolvem a interferência com o funcionamento das células tumorais desencadeiam respostas celulares que muitas vezes envolvem a alteração da expressão de proteínas⁶⁹.

Numa primeira abordagem, a análise das diferenças do proteoma das células dos controlos e das células sujeitas a tratamentos passa por identificar alterações no padrão de *spots* nos géis, através das imagens. O composto ASRO-13 causou a alteração parcial do proteoma da LC-RE⁺, MCF7, aumentando a expressão de certas proteínas e diminuindo a expressão de outras, como se verifica na Figura 23.

Esta técnica, extremamente relevante, permite a análise de centenas de proteínas em simultâneo e de proteínas que até a data não se sabiam estar implicadas na resposta a um certo tratamento.

Desta forma, e tendo em conta a relevância do trabalho desenvolvido no contexto clínico, será de extrema importância, a continuidade do processo de separação de proteínas e a identificação dos *spots* com maior interesse pela técnica espectrofotométrica MALDI-TOF.

Conclusão

Deste trabalho, cujos principais objectivos foram avaliar o efeito citotóxico de novos compostos 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis quirais nas linhas celulares de adenocarcinoma da mama MCF7, HCC1954 e HCC1806 e estabelecer relações entre a estrutura e actividade dos referidos compostos, podemos tirar várias conclusões.

1. O ensaio do MTT realizado em culturas celulares de adenocarcinoma da mama positivo para RE, MCF7, positivo para HER2/neu, HCC1954 e triplo negativo, HCC1806, submetidas ao tratamento com os referidos compostos mostrou terem efeitos anti-proliferativos.
2. O IC₅₀ diminui com o aumento do tempo de incubação de 24h para 96h, excepto no caso em que o composto MIS1707 foi administrado à LC-RE⁺, MCF7.
3. O composto MIS1707 mostrou um fraco efeito anti-proliferativo nas linhas celulares em estudo, concluindo-se que a substituição do carbono 1 dos compostos 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole com dois grupos metilo não melhora a actividade anti-tumoral nas linhas celulares de adenocarcinoma da mama.
4. Os compostos MIS1786 e MIS1787 mostraram resultados promissores em todas as linhas celulares. As modificações estruturais que deram origem aos dois compostos resultaram num melhor o efeito anti-proliferativo nas linhas celulares de adenocarcinoma da mama.
5. Os compostos ASRO-13 e ASRO-17 induziram morte celular preferencialmente por apoptose tardia e necrose, tanto na LC-RE⁺, MCF7, como na LC-TN, HCC1806.

6. Os compostos ASRO-13 e ASRO-17 interferem com o ciclo celular das LC-RE⁺ e LC-TN.
7. O ciclo celular da LC-RE⁺, MCF7, é afectado de modo semelhante pelos compostos ASRO-13 e ARO-17.
8. Ambos os compostos interferem principalmente na fase de síntese de DNA no ciclo celular.
9. A razão Bax/Bcl-2 aumenta em ambas as linhas celulares após o tratamento com o composto ASRO-13, mas o aumento da razão após o tratamento com o ASRO-17 é significativo.
10. Não foi possível provar que os compostos interferem com o DNA e causem danos no mesmo.
11. Os dois compostos diminuem significativamente a sobrevivência celular e a LC-TN é particularmente sensível aos mesmos, provando a estreita relação com cancros com mutações nos genes BRCA.
12. A produção total de proteínas é afectada após o tratamento com ambos os compostos nas duas linhas celulares em estudo, a LC-RE⁺ e TC-TN, MCF7 e HCC1806, respectivamente.
13. O proteoma da LC-RE⁺, MCF7, é alterado após o tratamento com o composto ASRO-13 que em termos de aumento quer de diminuição da expressão de proteínas.
14. A terapia combinada dos compostos com o inibidor das PARP não resultou numa diminuição dos valores de IC₅₀ satisfatoriamente menores em relação às monoterapias.

Bibliografia

1. Rivenbark AG, Coleman WB: Field cancerization in mammary carcinogenesis - Implications for prevention and treatment of breast cancer. *Exp Mol Pathol* 93:391-8, 2012.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al: Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127:2893-917, 2010
3. Jemal A, Bray F, Center MM, et al: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90, 2011.
4. Turkoz FP, Solak M, Petekkaya I, et al: Association between common risk factors and molecular subtypes in breast cancer patients. *Breast*, 2012
5. International Agency for Research on Cancer, 2008
6. Wooster R, Weber BL: Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med* 348:2339-47, 2003.
7. Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, et al: Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev* 36:206-15, 2010.
8. Amir E, Seruga B, Serrano R, et al: Targeting DNA repair in breast cancer: a clinical and translational update. *Cancer Treat Rev* 36:557-65, 2010
9. Levitzki A, Klein S: Signal transduction therapy of cancer. *Mol Aspects Med* 31:287-329, 2010.
10. Schneider BP, Winer EP, Foulkes WD, et al: Triple-negative breast cancer: risk factors to potential targets. *Clin Cancer Res* 14:8010-8, 2008.
11. Garrett MD, Collins I: Anticancer therapy with checkpoint inhibitors: what, where and when? *Trends Pharmacol Sci* 32:308-16, 2011.
12. Yale School of Medicine, acessado a 16 de Dezembro de 2012.
13. Malhotra GK, Zhao X, Band H, et al: Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* 10:955-60, 2010.
14. Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ, et al: Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res* 7:143-8, 2005.
15. Obajimi O: Lapatinib as a chemotherapeutic drug. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 4:216-26, 2009.
16. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS: Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 363:1938-48, 2010.
17. Franceschini G, Magno S, Fabbri C, et al: Conservative and radical oncoplastic approaches in the surgical treatment of breast cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 12:387-96, 2008.
18. Dogan L, Gulcelik MA, Karaman N, et al: Oncoplastic Surgery in Surgical Treatment of Breast Cancer: Is the Timing of Adjuvant Treatment Affected? *Clin Breast Cancer*, 2012.

19. d'Eredita G, Serio G, Mele M, et al: Effect of the use of vital dye, lymphoscintigraphy, or a combination for axillary lymphatic mapping and sentinel node biopsy in breast cancer. *World Journal of Surgery* 26:588-590, 2002.
20. Sainsbury R: The development of endocrine therapy for women with breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 2012.
21. Dunbier AK, Martin LA, Dowsett M: New and translational perspectives of oestrogen deprivation in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 340:137-41, 2011.
22. Taxel P, Choksi P, Van Poznak C: The management of osteoporosis in breast cancer survivors. *Maturitas* 73:275-9, 2012.
23. Jones LW, Haykowsky MJ, Swartz JJ, et al: Early breast cancer therapy and cardiovascular injury. *J Am Coll Cardiol* 50:1435-41, 2007.
24. Yaromina A, Krause M, Baumann M: Individualization of cancer treatment from radiotherapy perspective. *Mol Oncol* 6:211-21, 2012.
25. Pazdur R: *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach, Medical, Surgical & Radiation Oncology*, CMP, 2004.
26. Cai X, Gray PJ, Jr., Von Hoff DD: DNA minor groove binders: back in the groove. *Cancer Treat Rev* 35:437-50, 2009.
27. Poehlmann A, Roessner A: Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. *Pathol Res Pract* 206:591-601, 2010.
28. Skeel RT, Khleif SN: *Handbook of Cancer Chemotherapy*, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2011.
29. Baquiran D: *Lippincott's cancer chemotherapy handbook* [electronic resource], Lippincott Raven, 2001.
30. Soares MI, Brito AF, Laranjo M, et al: Chiral 6-hydroxymethyl-1H,3H-pyrrolo[1,2-c]thiazoles: novel antitumor DNA monoalkylating agents. *Eur J Med Chem* 45:4676-81, 2010.
31. Deans AJ, West SC: DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer* 11:467-80, 2011.
32. Soares MIL, Brito AF, Laranjo M, et al: Chiral 6,7-bis(hydroxymethyl)-1H,3H-pyrrolo[1,2-c]thiazoles with anti-breast cancer properties. *European Journal of Medicinal Chemistry* 60:254-262, 2013.
33. Davies E, Hiscox S: New therapeutic approaches in breast cancer. *Maturitas* 68:121-8, 2011.
34. Telli ML, Ford JM: Novel treatment approaches for triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer* 10 Suppl 1:E16-22, 2010.
35. Fornier M, Fumoleau P: The paradox of triple negative breast cancer: novel approaches to treatment. *Breast J* 18:41-51, 2012.
36. Hayes DF: Disease related indicators for a proper choice of adjuvant treatments. *Breast* 20 Suppl 3:S162-4, 2011.

37. De Laurentiis M, Cianniello D, Caputo R, et al: Treatment of triple negative breast cancer (TNBC): current options and future perspectives. *Cancer Treat Rev* 36 Suppl 3:S80-6, 2010.
38. Curtin NJ: Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and PARP inhibitors. *Drug Discovery Today: Disease Models* 9:e51-e58, 2012.
39. Sodhi RK, Singh N, Jaggi AS: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and its therapeutic implications. *Vascul Pharmacol* 53:77-87, 2010.
40. David KK, Andrabi SA, Dawson TM, et al: Parthanatos, a messenger of death. *Front Biosci* 14:1116-28, 2009.
41. Consortium TU: Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research* 40:D71-D75, 2012.
42. Altmeyer M, Messner S, Hassa PO, et al: Molecular mechanism of poly(ADP-ribosylation) by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. *Nucleic Acids Res* 37:3723-38, 2009.
43. Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, et al: PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat Rev Cancer* 10:293-301, 2010.
44. Ellisen LW: PARP inhibitors in cancer therapy: promise, progress, and puzzles. *Cancer Cell* 19:165-7, 2011.
45. Rios J, Puhalla S: PARP inhibitors in breast cancer: BRCA and beyond. *Oncology (Williston Park)* 25:1014-25, 2011.
46. Hastak K, Alli E, Ford JM: Synergistic chemosensitivity of triple-negative breast cancer cell lines to poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition, gemcitabine, and cisplatin. *Cancer Res* 70:7970-80, 2010.
47. SJ Isakoff SP, SP Shepherd, N Falotico, B Kaufman, M Friedlander, M Robson, S Domchek, J Garber, E McKeegan, B Chyla, J Qian, and VL Giranda: A randomized, phase 2 study of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor veliparib (ABT-888) in combination with temozolomide (TMZ) or in combination with carboplatin (C) and paclitaxel (P) versus placebo plus C/P in subjects with BRCA1 or BRCA2 mutation and metastatic breast cancer. *Cancer Research* 72, 2012.
48. McDermott SP, Wicha MS: Targeting breast cancer stem cells. *Mol Oncol* 4:404-19, 2010.
49. Redden MH, Fuhrman GM: Neoadjuvant Chemotherapy in the Treatment of Breast Cancer. *Surgical Clinics of North America* 93:493-499, 2013.
50. McKnight JA: Principles of chemotherapy. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 18:67-72, 2003.
51. Hernandez-Aya LF, Gonzalez-Angulo AM: Adjuvant systemic therapies in breast cancer. *Surg Clin North Am* 93:473-91, 2013.
52. El Saghir NS, Tfayli A, Hatoum HA, et al: Treatment of metastatic breast cancer: state-of-the-art, subtypes and perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol* 80:433-49, 2011.

53. Nanda R: "Targeting" triple-negative breast cancer: the lessons learned from BRCA1-associated breast cancers. *Semin Oncol* 38:254-62, 2011.
54. Cleere DW: Triple-negative breast cancer: a clinical update. *Community Oncology* 7:203-211, 2010.
55. Oakman C, Moretti E, Galardi F, et al: Adjuvant systemic treatment for individual patients with triple negative breast cancer. *The Breast* 20, Supplement 3:S135-S141, 2011.
56. Eroles P, Bosch A, Perez-Fidalgo JA, et al: Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev* 38:698-707, 2012.
57. Davis JD, Lin SY: DNA damage and breast cancer. *World J Clin Oncol* 2:329-38, 2011.
58. Carey FA: *Organic chemistry*, McGraw-Hill Higher Education, 2008.
59. Sangster J: Octanol-Water Partition Coefficients of Simple Organic Compounds. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 18:1111-1229, 1989.
60. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63, 1983.
61. Vichai V, Kirtikara K: Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* 1:1112-6, 2006.
62. Tubbs JL, Tainer JA: DNA Damage: Alkylation, in Editors-in-Chief: William JL, Lane MD (eds): *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Waltham, Academic Press, 2013, pp 9-15.
63. Helleday T, Petermann E, Lundin C, et al: DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 8:193-204, 2008.
64. Sharma RA, Dianov GL: Targeting base excision repair to improve cancer therapies. *Mol Aspects Med* 28:345-74, 2007.
65. Berger SJ, Sudar DC, Berger NA: Metabolic consequences of DNA damage: DNA damage induces alterations in glucose metabolism by activation of poly (ADP-ribose) polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* 134:227-32, 1986.
66. Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, et al: Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev* 18:1272-82, 2004.
67. Bartek J, Lukas J: Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 13:738-47, 2001.
68. Glendenning J, Tutt A: PARP inhibitors--current status and the walk towards early breast cancer. *Breast* 20 Suppl 3:S12-9, 2011.
69. Stein R, Zvelebil M: The Application of 2D Gel-Based Proteomics Methods to the Study of Breast Cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7:385-393, 2002.